

ĆWICZENIE 5

Wykrywanie obecności enzymów.

Prowadzący: mgr inż. Jadwiga ZAWISZA

Miejsce ćwiczenia: sala 104

CEL ĆWICZENIA

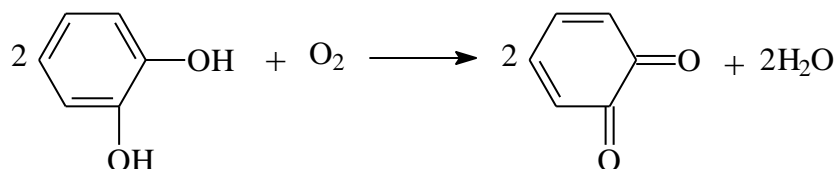
Celem ćwiczenia jest praktyczne poznanie enzymów z klasy oksydoreduktaz.

PODSTAWY TEORETYCZNE

Oksydoreduktazy katalizują wiele istotnych reakcji komórkowych zwłaszcza dotyczących utleniania biologicznego, które polega na łączeniu się wodoru z tlenem. W komórkach utlenia się jednak nie wodór cząsteczkowy, ale związany przeważnie z koenzymami nikotynamidoadeninowymi, które go pobierają wprost od substratów biologicznych utleniania (glukozy, kwasów tłuszczowych, aminokwasów itp.). Biologiczne utlenianie wodoru polega na przeniesieniu elektronów nie wprost z wodoru na tlen, ale przez wiele biologicznych układów oksydoredukcyjnych. Przyjmując za kryterium mechanizm działania, enzymy klasy oksydoreduktaz można ująć w cztery grupy:

- ♦ oksydazy,
- ♦ oksigenazy,
- ♦ dehydrogenazy,
- ♦ hydroperoksydazy.

Oksydazy aktywują atomy tlenu do przyjęcia elektronów oderwanych od utlenianego substratu i katalizują połączenie powstałych jonów tlenkowych z protonami na cząsteczkę H_2O lub H_2O_2 . Enzymy te przenoszą wodór bezpośrednio na tlen atmosferyczny. Substratem są często mono- i polifenole. Duże znaczenie praktyczne ma oksydoreduktaza o-difenol:tlen (EC.1.10.3.1.) zwana potocznie oksydazą fenolową. Typową reakcją katalizowaną przez ten enzym jest utlenianie pirokatechiny. Działaniu enzymu ulega również fenol jednowodorotlenowy, przy czym najpierw tworzy się pirokatechina. Oksydaza fenolowa jest metaloproteiną i zawiera miedź, która przyjmuje elektrony od dwufenoli i przekazuje na tlen cząsteczkowy.



Utlenianie pirokatechiny przez oksydazy

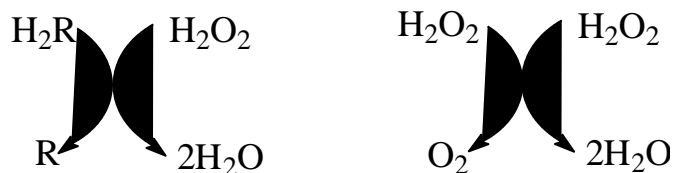
Oksydaza ksantynowa katalizuje utlenianie ksantyny tlenem powietrza. W wyniku reakcji powstaje kwas moczowy i nadtlenek wodoru. Enzym ten katalizuje też utlenianie aldehydów do kwasów organicznych. Reakcja zachodzi także w obecności innych niż tlen akceptorów wodoru. Jeżeli jako akceptora wodoru użyje się błękitu metylenowego, to barwa niebieska zanika, gdyż błękit metylenowy redukuje się do bieli błękitu.

Oksygenazy katalizują proces wbudowywania O_2 w cząsteczkę. Wyróżnia się oksigenazy właściwe i hydroksylujące.

Dehydrogenazy katalizują odrywanie atomów wodoru od utlenianego substratu i przenoszą je na inne enzymy czy związki pośrednie, a nie mają zdolności przenoszenia elektronów bezpośrednio na tlen. Różnią się one rodzajem koenzymów, które są właściwymi chwytnikami atomów wodoru.

Hydroperoksydazy obejmują dwie podgrupy enzymów, tj. peroksydazy (przeważają w tkankach roślinnych) i katalazy (w tkankach zwierzęcych). Reprezentują one białka

zawierające żelazoporfirynę. Reakcje katalizowane przez hydroksydazy przedstawia schemat:



Peroksydaza jest enzymem bardzo rozpowszechnionym w roślinach. Jej działanie związane jest z obecnością nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru nie jest rozkładany z wydzielaniem tlenu, lecz wykorzystywany przez enzym w reakcjach utleniania substratów (np. fenoli):



Peroksydaza jest mało wrażliwa na wysoką temperaturę i jeszcze w 100°C częściowo zachowuje swoją aktywność. Oksydazy o wiele szybciej niż peroksydazy tracą swoją aktywność w podwyższonej temperaturze.

Katalazy obecne we wszystkich organizmach tlenowych, katalizują rozpad H_2O_2 według równania:



Katalazy charakteryzują się dużą aktywnością. Inhibitorami katalazy są między innymi jony CN^- i S^{2-} .

WYKONANIE ĆWICZENIA

Zadanie 1. Wykrywanie oksydaz w ziemniaku

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety

Materiał i odczynniki:

- ♦ wyciąg ziemniaczany,
- ♦ 1% roztwór fenolu,
- ♦ 1% roztwór pirokatechiny,
- ♦ 1% roztwór pirogalolu,
- ♦ 1% roztwór NaCN.

Wykonanie ćwiczenia:

Sporządzenie wyciągu ziemniaczanego:

Umyty i obrany ziemniak należy utrzeć na tarce. Miazgę włożyć do płóciennego woreczka i zanurzyć w zlewce z około 200 ml wody. Zawartość zlewki łagodnie wymieszać. W ten sposób uzyskuje się ekstrakt wodny zawierający enzymy i skrobię. Jak skrobia opadnie na dno zlewki, należy zdekantować ciecz nadosadową i używać do doświadczeń.

Przygotować trzy probówki, wlać do nich po 5 ml wyciągu ziemniaczanego. Do pierwszej probówki dodać 10 kropli 1% fenolu, do drugiej 10 kropli 1% pirokatechiny, do trzeciej 10 kropli 1% pirogalolu. Zawartość probówek wymieszać i obserwować zmiany zabarwienia. Zanotować nasilenie barwy w probówkach zawierających poszczególne fenole oraz czas po jakim pojawia się zabarwienie. Wykonać analogiczne ćwiczenie po dodaniu kropli 1% roztworu NaCN.

Zadanie 2. Wykrywanie peroksydaz w ziemniaku

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety

Material i odczynniki

- ♦ wyciąg ziemniaczany,
- ♦ 1% roztwór fenolu,
- ♦ 1% roztwór pirokatechiny,
- ♦ 1% roztwór pirogalolu,
- ♦ 3% roztwór H₂O₂,
- ♦ 4% roztwór benzydyny

Wykonanie ćwiczenia:

2a. Próba z fenolami:

Przygotować trzy probówki, wlać do nich po 5 ml wyciągu ziemniaczanego przygotowanego w zadaniu 1. Do pierwszej probówki dodać 10 kropli 1% fenolu, do drugiej 10 kropli 1% pirokatechiny, do trzeciej 10 kropli 1% pirogalolu, a następnie do każdej probówki wprowadzić dodatkowo po 10 kropli 3% roztworu H₂O₂. Zawartość probówek wymieszać i obserwować zmiany zabarwienia. Zanotować nasilenie barwy w probówkach zawierających poszczególne fenole oraz czas po jakim pojawia się zabarwienie.

2b. Próba benzydynowa:

Do 5 ml wyciągu ziemniaczanego przygotowanego w zadaniu 1 dodać kroplę 4% roztworu benzydyny i kilka kropli H₂O₂. Zanotować spostrzeżenia.

Zadanie 3. Wykrywanie peroksydaz w chrzanie

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety

Material i odczynniki

- ♦ wyciąg wodny z korzenia chrzanu,
- ♦ chrzan tarty (kupny),
- ♦ 4% roztwór benzydyny
- ♦ 3% roztwór H₂O₂,
- ♦ 1% roztwór pirokatechiny,
- ♦ 1% roztwór pirogalolu,
- ♦ etanol

Wykonanie ćwiczenia:

Sporządzenie ekstraktu wodnego z korzenia chrzanu:

Kawałki korzenia ekstrahować kilkakrotnie etanolem i wysuszyć w temp. 37°C. Przez ekstrakcję wodą suchej pozostałości uzyskuje się roztwór peroksydazy, nie zawierający oksydaz. Po ekstrakcji etanolem korzeń chrzanu utrzyć na tarce i dodać około 100 ml wody, wymieszać i pozostawić do odstania, a następnie zdekantować roztwór z nad osadu.

3a. Próba benzydynamowa:

Do 3 ml wyciągu wodnego chrzanu dodać kroplę 4% roztworu benzydynamy i kilka kropli 3% H₂O₂. Analogicznie wykonać próbę dla kupnego chrzanu tartego.

Zanotować spostrzeżenia i wnioski.

3b. Próba z fenolami:

Do dwóch probówek wprowadzić po 3 ml wyciągu wodnego z korzenia chrzanu. Do jednej dodać 10 kropli 1% pirokatechiny, do drugiej 10 kropli 1% pirogalolu, a następnie dodać do obu po 10 kropli 3% H₂O₂. Zanotować spostrzeżenia.

Zadanie 4. Porównanie wrażliwości oksydaz i peroksydaz na temperaturę

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety,
- ♦ łaźnia wodna 70°C

Materiał i odczynniki:

- ♦ wyciąg ziemniaczany,
- ♦ 1% roztwór pirokatechiny,
- ♦ 3% roztwór H₂O₂.

Wykonanie ćwiczenia:

Do dwóch probówek odmierzyć po 5 ml wyciągu ziemniaczanego przygotowanego w zadaniu 1. Ogrzewać probówki na łaźni wodnej w temperaturze 70°C przez 10 minut. Do jednej dodać 10 kropli 1% roztworu pirokatechiny, a do drugiej 10 kropli 1% roztworu pirokatechiny i 10 kropli 3% roztworu H₂O₂. Zanotować wyniki.

Zadanie 5. Wykrywanie katalazy w ziemniakach i chrzanie

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety,
- ♦ łaźnia lodowa.

Materiał i odczynniki:

- ♦ wyciąg wodny z korzenia chrzanu,
- ♦ wyciąg ziemniaczany,

- ♦ 3% roztwór H₂O₂,
- ♦ 1% roztwór NaCN,

Wykonanie ćwiczenia:

5a. Do probówki wprowadzić 2 ml wyciągu ziemniaczanego, do drugiej 2 ml wyciągu z chrzanu i dodać kilka kropli 3% H₂O₂. Pod działaniem katalazy następuje obfite wydzielanie tlenu.

5b. Powtórzyć ćwiczenie po:

- ♦ uprzednim ogrzaniu wyciągów enzymatycznych do wrzenia,
- ♦ uprzednim wstawieniu probówek do łaźni lodowej na 15 minut,
- ♦ dodaniu do wyciągów 1 kropli roztworu NaCN.

Zadanie 6. Wykrywanie oksydazy ksantynowej w mleku

Sprzęt:

- ♦ statyw z probówkami,
- ♦ pipety,
- ♦ łaźnia wodna 40°C,
- ♦ zlewka o poj. 250 ml.

Material i odczynniki:

- ♦ mleko świeże,
- ♦ mleko przegotowane,
- ♦ 0,5% roztwór aldehydu mrówkowego
- ♦ 0,02% roztwór błękitu metylenowego,
- ♦ ciekła parafina

Wykonanie ćwiczenia:

Do trzech numerowanych probówek odmierzyć podane w tabelce ilości mleka (enzym), aldehydu mrówkowego (substrat) oraz błękitu metylenowego (akceptor wodoru). Do probówki 3 (kontrolna) zamiast mleka świeżego należy dodać mleko przegotowane. Do wszystkich probówek dodać 1 ml płynnej parafiny celem zabezpieczenia prób przed tlenem powietrza. Probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 40°C. Zanotować czas potrzebny do odbarwienia lub osłabienia barwy w próbach.

Numer próby	Mleko ml	Woda ml	Aldehyd mrówkowy ml	Błękit metylenowy ml	Wynik
1	2	0,0	0,5	0,5	
2	2	0,5	0,0	0,5	
3	2	0,0	0,5	0,5	