

4. gyakorlat

Enzimológia

A hőmérséklet hatása az enzimek aktivitására

Az enzimek, mint biokatalizátorok az anyagcsere-folyamatok intenzitását szabályozzák. Aktivitásukat számos tényező befolyásolja, melyek közül legfontosabb exogén (külső) szabályozó a hőmérséklet. Az életfolyamatok csak meghatározott hőmérsékleti tartományban játszódhatnak le.

A több alegységből álló biológiailag aktív komplexeknél (mint az enzimek is) a szerkezet fellazulása (magas hő), vagy lemerevedése (alacsony hő) az aktivitás csökkenésével, vagy akár annak megszűnésével jár.

Az enzimek két csoportba sorolhatók aszerint, hogy oldottan (solubilis), vagy membránhoz kötötten fejtik ki hatásukat. Az utóbbiak a hőmérsékletváltozásra fokozottan érzékenyek. Magas hőmérsékleten a membrán felületéhez kötődő enzimek ledisszociálnak (pl.. FS-2 enzimrendszere), alacsony hőmérsékleten a membránszerkezet rigidde válik, ami szintén enzimaktivitás-csökkenést eredményez. A solubilis enzimek kevésbé érzékenyek a hőmérsékletváltozásra. Ezek aktivitáscsökkenése fehérje-alegységeik szétválásával, vagy fehérjéik denaturációjával magyarázható. Van't Hoff törvénye szerint 10 °C-os hőmérsékletváltozás a biokémiai reakciók aktivitását 1,5 – 3 – szorosára növeli, vagy csökkenti.

Az enzimek eltérő hőérzékenységgel magyarázható a fotoszintézis és a légzés eltérő hőmérsékleti görbéje is. A fotoszintézis fényreakcióinak enzimrendszere membránhoz kötött, ezért már viszonylag alacsony hőmérsékleten (40-45 °C-on) károsodik, a légzés enzimrendszere azonban solubilis, így magasabb hőmérsékleten is stabil, aktivitáscsökkenése fehérjéi denaturációjával esik egybe.

A légzésnek két alapreakcióját és alapreakciónként két-két alternatív útját különböztetjük meg:

1. A légzés első alapreakciója – a légzési szubsztrátok oxidációja: szubsztrátok dehidrogenálása, redukált nukleotidok (NADH, NADPH, FADH), valamint szubsztrát szintű makroerg foszfátkötések képződése. (Ezek útja: pentóz-foszfát ciklus, illetve a glikolízis+citrát-ciklus.)

2. A légzés második alapreakciója – a redukált nukleotidok felhasználódása. (Ezek útja: mitokondriális elektrontranszport-lánc és az ehhez kötődő oxidatív foszforilálás, illetve az un. extramitokondriális-oxidázok rendszere.)

A kísérlet végrehajtása:

Kísérletünkben a kereskedelmi élesztő borostyánkősav-dehidrogenáz aktivitását vizsgáljuk a hőmérséklet függvényében. A borostyánkősav-dehidrogenáz a légzés szubsztrát-dehidrogenálási alapreakciójának enzime.

Az enzim a borostyánkősav hidrogénjeit fumársav keletkezése mellett FAD-ra viszi. A reakció a citromsav-ciklusban játszódik le. Kísérletünkben a FAD-ot egy alacsonyabb redoxpotenciálú redoxindikátorral, a metilinkékkel (MK) helyettesítjük. Enzimaktivitás esetén a MK szintelen leukometilénkékké redukálódik, ami autooxidálabilis, ezért a reakcióközeg felszínét légmentesen zárni kell.

10 g kereskedelmi élesztő szuszpenzióját üvegszűrőn alaposan kimosunk, majd 50 ml desztillált vízben szuszpendálunk.

A próbákat az alábbiak szerint állítjuk össze:

Oldatok (ml)	Próbák		
	1.	2.	3.
0,01%-os metilénkék	0,5	0,5	0,5
0,1 M-os Na-szukcinát	1	1	1
Foszfátpuffer (pH:6)	1	1	1
Desztillált víz	2,5	2,5	2,5
Élesztő szuszpenzió	1	1	1
Paraffinolaj	3 csepp	3 csepp	3 csepp
Hőmérséklet	szobahőmérséklet	40 °C-os vízfürdő	jeges víz

Értékeljük a látottakat, hasonlítsuk össze az időeredményeket és próbáljunk törvényszerűségeket megállapítani a mérések alapján !!!

4. gyakorlat

Enzimológia

A kompetitív enzimgátlás kimutatása

A kompetitív enzimgátlás alapja, hogy a szubsztráthoz hasonló térszerkezetű anyag az enzim szubsztrát-kötőhelyét elfoglalja, így az adott enzim által katalizált szubsztrát-specifikus reakció nem játszódhat le,

A katalizált reakció sebességét a reakcióban résztvevő enzimek számának változása, illetve a meglévő enzimek aktivitása határozhatja meg. Enzimindukció során a szubsztrát (induktor) az enzim szintézisét (fehérje szintézis!) indítja el és ez vezet az adott reakció elkezdődéséhez, intenzitásának növekedéséhez. Enzimindukció esetén tehát a hatás elsőként genetikai szinten jelentkezik.

Az enzimaktivitás változásából eredő reakciósebesség-csökkenés, vagy növekedés oka, hogy változatlan enzimszám mellett az adott reakciót katalizáló enzim aktivitása (és nem száma!!!) változik meg. Az enzim aktivitásának megváltozása az enzim térszerkezetének változásaira vezethető vissza.

A kísérlet menete:

Az enzimgátlást a borostyánkősav dehidrogenáz esetében vizsgáljuk. Ha a reakcióközegbe malonsavat is adunk, a specifikus reakció gyorsaságát a borostyánkősav és a malonsav mennyiségi viszonya határozza meg. Ebben az esetben tehát a kompetitív inhibitor a malonsav.

Az előző kísérlethez készített élesztőszuszpenziót használjuk. A próbákat az alábbiak szerint állítjuk össze.

Oldatok (ml)	Próbák			
	1	2	3	4
0,01%-os metilénkék	0,5	0,5	0,5	0,5
0,15 M-os puffer (pH:6)	1,0	1,0	1,0	1,0
0,1 M-os Na-szukcinát	1,0	-	0,1	0,9
0,1 M-os malonsav	-	1,0	0,9	0,1
Desztillált víz	1,5	1,5	1,5	1,5
Paraffinolaj	3 csepp	3 csepp	3 csepp	3 csepp
Élesztő szuszpenzió	1,0	1,0	1,0	1,0

A kémcsöveket meleg (max. 40 °C-os) vízfürdőbe állítjuk és értékeljük a látottakat!!!

1. A hőmérséklet hatása az enzimek aktivitására

A próbákat az alábbiak szerint állítjuk össze:

Oldatok (ml)	Próbák		
	1.	2.	3.
0,01%-os metilénkék	0,5	0,5	0,5
0,1 M-os Na-szukcinát	1	1	1
Foszfátpuffer (pH:6)	1	1	1
Desztillált víz	2,5	2,5	2,5
Élesztő szuszpenzió	1	1	1
Paraffinolaj	3 csepp	3 csepp	3 csepp
Hőmérséklet	szobahőmérséklet	40 °C-os vízfürdő	jeges víz

2. A kompetitív enzimgátlás kimutatása

A próbákat az alábbiak szerint állítjuk össze:

Oldatok (ml)	Próbák			
	1	2	3	4
0,01%-os metilénkék	0,5	0,5	0,5	0,5
0,15 M-os puffer (pH:6)	1,0	1,0	1,0	1,0
0,1 M-os Na-szukcinát	1,0	-	0,1	0,9
0,1 M-os malonsav	-	1,0	0,9	0,1
Desztillált víz	1,5	1,5	1,5	1,5
Paraffinolaj	3 csepp	3 csepp	3 csepp	3 csepp
Élesztő szuszpenzió	1,0	1,0	1,0	1,0

A kémcsöveket meleg (max. 40 °C-os) vízfürdőbe állítjuk és értékeljük a látottakat!!!