



Kísérlet, labor

Enzimek vizsgálatára javasolt kísérletek

1. Az enzimhatás kimutatása

Szükséges eszközök és anyagok: kémcsövek, cseppentő, fehér csempelap, vízfürdő, amiláz oldat búzából és emberi nyálból, keményítőoldat, Lugol-oldat, víz.

Mérjük ki a következő oldatokat három tiszta megszámozott kémcsőbe:

oldat\kémcső	1	2	3
Amiláz búzából	–	3ml	–
Amiláz nyálból	–	–	3 ml
Keményítő	5ml	5 ml	5 ml
Víz	3 ml	–	–

A kémcsövek tartalmát jól rázzuk össze és helyezzük egyszerre 40°C-os vízfürdőbe, amelyben 10 percig hagyjuk. Ekkor mindegyik kémcső tartalmából cseppentsünk fehér csempelapra 1-1 cseppet. Mindegyik csepphez adjunk 1 csepp Lugol-oldatot. A próbát 2-3-szor ismételjük 10 percenként. Ha a próba tartalmaz keményítőt, a csepp kékre színeződik.

Jegyezzük fel az észlelteket:

- melyik kémcső tartalma adta, s melyik nem a jódra jellemző reakciót?
- melyik kémcsőben negatív a jódra jellemző reakció? Mi az oka ennek?
- mennyi idő szükséges, hogy a próba ne adjon a jódra jellemző reakciót. Ez melyik kémcsőben volt észlelhető?

2. A hőmérsékletváltozás hatása az enzimaktivitásra

Az eszköz és anyagszükséglet mint előbbi kísérletnél, jég és hőmérő.

Négy, tiszta megszámozott kémcsőbe egyenként 4 ml amilázoldatot tegyünk (a 4. kémcsőt forraljuk fel) és 2 ml keményítőoldatot öntsünk hozzá, majd egyszerre helyezzük a négy kémcsövet a megfelelő hőmérsékletű helyre a következők szerint:

1. kémcső jegesvizet tartalmazó főzőpohárba
2. kémcső szobahőmérsékleten
3. kémcső 40°C hőmérsékletű vízfürdőbe
4. kémcsőbe először a kimért amilázoldatot forraljuk fel, s azután öntsük hozzá a keményítőoldatot

10 perc múlva a kémcsövek tartalmából 1-1 cseppet fehér csempére cseppentsünk, s tegyünk hozzá 1-1 csepp Lugol-oldatot. 3-4 alkalommal 10 percenként ismételjük meg a jódreakciót.

Jegyezzük fel az észlelteket táblázat formában.

- Melyik elegy nem adta először a keményítő-jód reakciót?
- Mennyi időre volt szükség ehhez?
- Hogyan befolyásolta a forralás az enzim aktivitását?
- Az észlelt adatokat ábrázoljuk grafikusán: vízszintes tengelyen a hőmérsékletet, függőleges tengelyen a negatív keményítő jód reakcióhoz szükséges időt rögzítsük. A grafikon alapján értékeljük, hogy hogyan befolyásolja a közeg hőmérséklete az enzimreakciók sebességét.
- Mi nevezhető az enzimreakció szempontjából optimális hőmérsékletnek?

3. Közeg kémhatása (pH) hogyan befolyásolja az enzimaktivitást

Három tiszta, megszámozott kémcsőbe mérjük ki a következő oldatokat

oldat/kémcső	1	2	3
Pufferoldat	2 ml ptt=6	2 ml ptt=7	2 ml ptt=8
Amiláz oldat	2 ml	2 ml	2 ml
Keményítő oldat	1 ml	1 ml	1 ml
A közeg kémhatása	enyhén savas	semleges	enyhén bázikus

Rázzuk össze a kémcsövek tartalmát és helyezzük őket egyszerre 40°C-os hőmérsékletű vízfürdőbe. 10 perc múlva fehér csempelapra cseppentsünk mind-egyik kémcső tartalmából 1 cseppet, s adjunk hozzá 1 csepp Lugol-oldatot. 10 percnként 3-4-szer ismételjük meg a próbát. Jegyezzük fel az észlelteket. A kapott oldatok alapján készítetek grafikon az enzimaktivitás változásáról a pH függvényeként (abcisszán pH, ordonátán az az idő, mely szükséges a negatív reakcióhoz).

4. A vizsgált folyamat sebességének változása az enzimkoncentráció függvényeként

Négy tiszta, megszámozott kémcsőbe tegyük a következő oldatokat:

oldat/kémcső	1	2	3	4
Amiláz	0,5 ml	1 ml	2 ml	4 ml
Víz	3,5 ml	3 ml	2 ml	-
Keményítő	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Rázzuk össze a kémcsövek tartalmát, egyszerre helyezzük őket 40°C hőmérsékletű vízfürdőbe. 10 perc után fehér csempe lemezen végezzük el a keményítő-jód reakciót Lugol oldattal, mint az előző kísérleteknél.

Az észlelt adatokat jegyezzük fel. Ábrázoljuk grafikusán az enzimaktivitás változását az enzimkoncentráció és a keményítő lebomlási ideje függvényeként.

5. Enzimek működését befolyásoló anyagok

Anyagszükséglet: mint előző gyakorlatoknál + benzol, 0,9%-os nátrium-klorid oldat, 1%-os rézszulfát oldat

Három tiszta, megszámozott kémcsőbe tegyük a következő oldatmennyiségeket

oldat/kémcső	1	2	3
Amiláz	2 ml	2 ml	2 ml
Keményítő	1 ml	1 ml	1 ml
Nátrium-klorid	1 ml	–	–
Réz(a)-szulfát		1 ml	–
Benzol			1 ml

Jól rázzuk össze a kémcsövek tartalmát, helyezük őket egyszerre 40°C hőmérsékletű vízfürdőbe. 10 percnként 3-4-szer végezzük el a keményítő-jód reakciót, mint az előző gyakorlatoknál.

Jegyezzük fel az észleléseket.

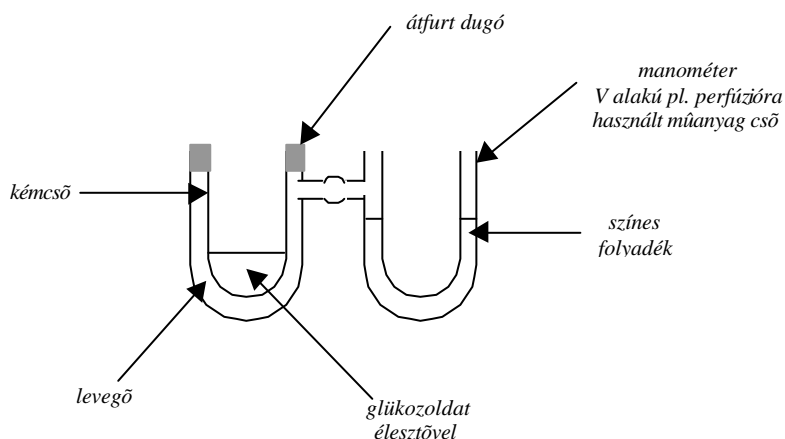
- Melyik anyag nem csökkentette az amiláz aktivitását?
- Melyik anyag gátolta az amiláz működését?

6. Alkoholos erjedés vizsgálata

Eszközök és anyagok: dörzsoszár, főzőpohár, kémcsövek, átfűrt dugó, gázvezető üvegcső, vízfürdő (esetleg termosztát), hőmérő élesztő, 5%-os glukózoldat, 1%-os borkősóoldat, 10%-os NaOH-oldat, Lugol-oldat, frissen készült meszesvíz.

Dörzsöljük el 1 g élesztőt 5 ml glukózoldattal mossuk főzőpohárba. A pohár tartalmához öntsünk 1 ml 1%-os borkősóoldatot. Ebből az oldatból töltsünk 5-5 ml-t két kémcsőbe. Az egyiket vattadugóval zárjuk le, s tegyük 37°C hőmérsékletű termosztátba, ahol 1 napig tartjuk. A másik kémcsövet gumidugóval zárjuk, amely furatába helyezük a gázvezető csövet. Ezt a kémcsövet is helyezzük 37°C hőmérsékletű vízfürdőbe, s a gázvezető cső szabad végét merítjük meszesvizet tartalmazó pohárba. 20-30 percig kövessük a változásokat.

Az első kémcsövet egy nap múlva vegyük ki a termosztátból, s cseppentsünk hozzá 4 csepp 10%-os nátrium-hidroxid oldatot, majd Lugol oldatból annyit, míg enyhe sárga színű nem lesz az elegy. A kémcsövet 3-4 percig tartjuk 80-90°C hőmérsékletű vízfürdőben. Amennyiben az oldat tartalmaz alkoholt, sárga jodoform kristályok válnak ki. (Amennyiben szabad szemmel nem láthatók a kristályok, nézzük meg mikroszkóp alatt két tárgylemez között 1 csepp oldatból.)



7. Az erjedésnél felszabaduló hő kimutatása

Készítsünk termoszkópot kémcsőből és szélesebb szájú oldalcsővel ellátott edényből (szűrőpalack, vagy iskolai készletben gázak előállítására szolgáló edény).

Ha lehet készítsünk három termoszkópot. Mindegyiken töltsünk 10 ml 10%-os glukózoldatot. A második kémcső tartalmához tegyünk 1 g élesztőt, a harmadikba 5 g élesztőt. Időben kövessük a termoszkópok manométerében a folyadék-szint állását.

Magyarázzuk az észlelteket.

A gyakorlathoz szükséges oldatok elkészítési módja:

Amiláz-oldat:

1. Búzából 8-10 csírázó búzaszemet dörzsmozsárban kevés vízzel zúzzunk péppé. A keveréket szűrjük le és a szűrletet vízzel hígítsuk 100 ml-re.

2. Nyálból: szájunkat vízzel öblítsük ki, majd 10-15 ml vizet vegyünk szájunkba, s pár percig tartsuk benne. A nyállal kevert vizet engedjük pohárba, szűrjük le és hígítsuk vízzel 100 ml-re. Mindig frissen készítsük, ne tároljuk.

Lugol-oldat:

1,3 g jódot és 2,5 g KI-t 20 ml desztillált vízben feloldjuk, majd az oldatot desztillált vízzel 100 ml-re hígítjuk.

Keményítő oldat:

1 g vízoldható keményítőt 0,3 g nátrium-kloridot 100 ml meleg desztillált vízben oldjuk. Hűtés után, ha szükséges, szűrjük. A vizsgálatokhoz frissen készítsük az oldatot.

Meszes-víz:

1 g kalcium-hidroxidot, vagy kalcium-oxidot kevés desztillált vízzel összekeverjük, majd 100 ml-re hígítjuk. Ülepedés után szűrjük és a tiszta szűrletet használjuk. Az oldatot jól záró üvegekben tároljuk, hogy ne kössön meg CO₂-t levegőből.

Az első gyakorlatnál leírt munka menetét követve végezzük el a keményítő kimutatására használt próbát.

M. E.