تأثیر آنزیم پراکسیداز بر نشاسته

شهره سلیمی
دبیر انجمن زیست‌شناسی و کارشناس آزمایشگاه پژوهش‌سرای دانش‌آموزی محمد بن زکریای رازی ناحیه یک شهرری

نرگس بنفش، کوثر حسن‌پور و فاطمه مغانلو
دانش‌آموزان عضو انجمن زیست‌شناسی پژوهش‌سرای دانش‌آموزی محمد بن زکریای رازی از دبیرستان ابراهیم

چکیده
در این آزمایش مشاهده کردیم که آنزیم پراکسیداز استخراج شده از جوانهٔ نخود موجب تجزیهٔ نشاستهٔ موجود در لولهٔ آزمایش به مالتوز می‌شود. این تجزیه با افزودن معرف مالتوز به محلول و مشاهدهٔ تغییر رنگ محلول آزمایش نسبت به محلول کنترل نتیجه‌گیری شد.

کلیدواژه‌ها: مالتوز، سالسیلیک اسید.

فرضیه

آنزیم پراکسیداز نشاستهٔ موجود در محلول سالسیلیک اسید را به مالتوز تجزیه می‌کند.

هدف

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز.

مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیست‌های زیستی با اندازه‌های نانومتری هستند که قابلیت‌های کاربردی فراوان و شناخته شده دارند. در گذشته معمولاً از آنزیم‌ها در صنایع، به‌ویژه در فرایند تولید شوینده‌ها استفاده می‌شد. درحال حاضر، آنزیم‌ها در زمینه‌های جدیدی مانند سنتز شیمیایی خالص، داروسازی، حسگرهای زیستی، حذف زیستی آلاینده‌ها، جداسازی زیستی، فرایند PCR[1]، هضم پروتئین‌ها در آنالیز پروتئومیک و پیل‌های سوختی زیستی نیز کاربرد گسترده‌ای یافته‌اند (۱۲ و ۱۴).

اختصاصی بودن فعالیت آنزیم‌ها قابلیت کاربردی فراوان آن‌ها را سبب شده، اما در حال حاضر، طول عمر کوتاه آنزیم‌ها استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. بهبود پایداری آنزیم می‌تواند کاربردهای عملی آن را بیشتر کند. استفاده از مواد نانو ساختار برای تثبیت و پایداری آنزیم نه تنها باعث افزایش پایداری فعالیت آنزیم می‌شود، بلکه سایر خواص ویژهٔ آن، به عنوان یک سیستم نانو کاتالیست زیستی، را هم تقویت می‌کند. از جمله این خواص می‌توان به بارگذاری بالای آنزیم، فعالیت زیاد آنزیم، امکان جداسازی مغناطیسی و افزایش سرعت انتقال الکترون اشاره کرد (۱۱ و ۱۲).

افزایش پایداری آنزیم می‌تواند موجب کاهش مقدار مصرفی آنزیم‌ها، افزایش طول عمر راکتورهای آنزیمی، افزایش شانس استفاده دوباره از آنزیم و نیز حصول سیگنال قوی‌تر در حسگر زیستی شود (۱۰). برای افزایش پایداری آنزیم‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد، اعم از: تثبیت آنزیم، اصلاح آنزیم، مهندسی پروتئین و مهندسی محیط پیرامون آنزیم‌ها (۸).

دو آنزیم پراکسیداز و آمیلاز از مهم‌ترین آنزیم‌های مؤثر در تحولات فیزیولوژیک گیاهان هستند. تحقیقات مشخص کرده است که در تمام فرایندهای فیزیولوژیک و تغییرات فنولوژیک گیاه، مادهٔ آب اکسیژنه در بافت‌های گیاهی تولید می‌شود که دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به دو شکل متفاوت این مادّه سمی را از محیط دور می‌کنند و همچنین آنزیم پراکسیداز از عوامل مهم لیگنین‌سازی درختان به

خصوص در مرحلهٔ آخر پلیمریزاسیون سه الکل اصلی (کونیفریل، سیناپین و P-کوماریل) است.
طی بیست سال اخیر به طور پیوسته آنزیم پراکسیداز به عنوان شاخص تغییرات اکولوژیک در گیاه معرفی شده و همچنین تغییرات کمی و کیفی این آنزیم در فرایند فتوسنتز و طبیعتاً نیاز نوری گیاه مشخص شده است (۱، ۲، ۴، ۶، ۷ و ۱۳).

طی بیست سال اخیر به طور پیوسته آنزیم پراکسیداز به عنوان شاخص تغییرات اکولوژیک در درون گیاه معرفی شده است

مواد مورد نیاز

۱. ۰٫۲ گرم اسید سالسیلیک
۲. جوانه (گندم، نخود و ...)
۳. آب مقطر
۴. دماسنج
۵. معرف مالتوز
۶. حمام آب ۳۷ درجه
۷. توری
۸. لولهٔ آزمایش
۹. هاون و دسته‌هاون
۱۰. قطره چکان
۱۱. همزن
۱۲. سرامیک سفیدرنگ
۱۳. برای تهیهٔ محلول نشاسته ۲ گرم نشاسته را همراه ۰٫۲ گرم سالسیلیک اسید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب داغ مقطر حل می‌کنیم و به مقدار ۱۵ میلی لیتر از این محلول در ۲ لولهٔ آزمایش که یکی لولهٔ آزمایش و دیگری لولهٔ کنترل است، می‌ریزیم.

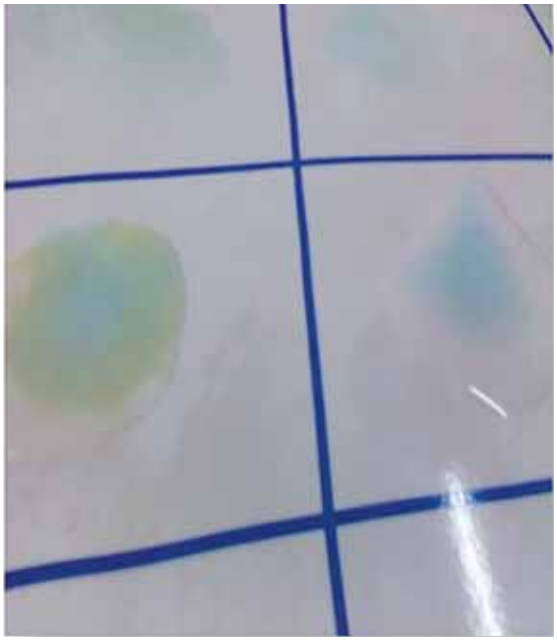
روش گام به گام

۱. ۵ گرم جوانهٔ نخود را به وسیله هاون له می‌کنیم.

۲. ۱۰ ml آب مقطر به آن می‌افزاییم و به طور کامل مخلوط می‌کنیم.
۳. سپس آن را از پارچهٔ توری عبور می‌دهیم.

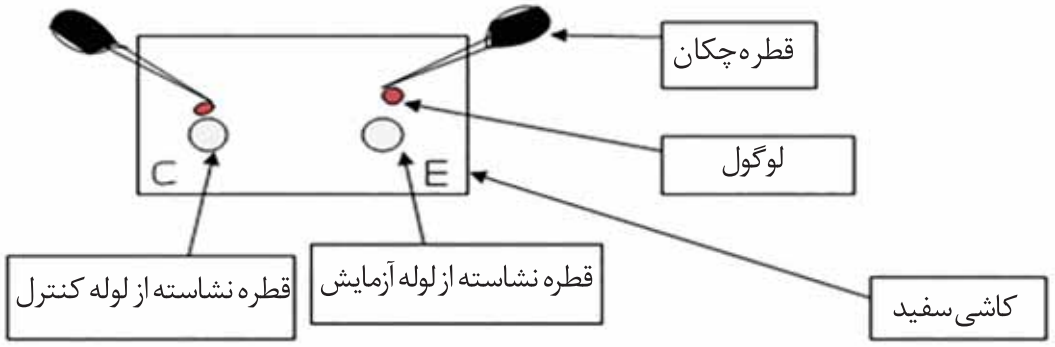
۴. به مقدار ۵ ml از این ماده را در هر یک از لوله‌های آزمایش می‌ریزیم و یکی را به عنوان شـــاهد (کنترل) و دیگری را متغیر (ENP) قرار می‌دهیم.
۵. ۵ ml از آنزیم استخراج شده به لولهٔ آزمایش دیگری با برچسب ENZ می‌ریزیم.
۶. هر سه لولهٔ آزمایش را در حمام ۳۷ درجه قرار می‌دهیم.
۷. دمای محلول را اندازه‌گیری می‌کنیم و زمانی که دمای آن به ۳۷ درجه رسید، به اندازهٔ ۱ ml محلول آنزیم را به محلول با عنوان ENP می‌ریزیم و با یک میلهٔ شیشه‌ای مخلوط می‌کنیم.
۸. به محض اینکه آنزیم را به نشانه EXP می‌افزاییم، فعالیت آن متوقف می‌شود.
۹. درهمان زمان یک قطره از هریک از این دو محلول در EXP و کنترل می‌ریزیم.

۱۰. قطرات نشاسته را روی کاشی سفید به طرز جداگانه قرار می‌دهیم و یک قطره از محلول ید در هر قطره محلول نشاسته می‌ریزیم و تغییرات آن را مشاهده می‌کنیم.



۱۱. هر پنج دقیقه مرحلهٔ ۱۰ را تکرار می‌کنیم و همین کار را با محلول نشاسته لولهٔ کنترل نیز انجام می‌دهیم. این کار را تا حدود یک ساعت ادامه می‌دهیم.

۱۲. جدول آزمایش را رسم می‌کنیم.



زمان(دقیقه)	تغییر رنگ در محلول آزمایش	تغییر رنگ در محلول کنترل
صفر	آبی روشن	آبی روشن
۵	آبی روشن	آبی روشن مایل به سبز
۱۰	آبی روشن	سبز خیلی روشن
۱۵	آبی روشن	سبز روشن

آنزیم پراکسیداز استخراج شده از جوانهٔ نخود موجب تجزیهٔ نشاستهٔ موجود در لولهٔ آزمایش به مالتوز می‌شود

مشاهده

در زمان صفر مشـــاهده کردیم که هر دو قطره از محلول‌ها در لوله‌های کنتـــرل و ENP به رنگ آبی تیره تبدیل شدند. پس از گذشت زمان معینی که ید را به محلول افزودیم، محلول ENP تغییر رنگ داد. افزودن ید به محلول برای شناســـایی نشاسته است. زمانی که به محلول نشاسته، ید می‌افزاییم به رنگ آبی تیره در می‌آید.

نتیجه‌گیری

آنزیم پراکسیداز استخراج شده از جوانهٔ نخود موجب تجزیهٔ نشاستهٔ موجود در لولهٔ آزمایش به مالتوز می‌شود که این تجزیه با افزودن معرف مالتوز به محلول و مشاهدهٔ تغییر رنگ محلول آزمایش نسبت به محلول کنترل نتیجه‌گیری می‌شود.

پی‌نوشت

1. Polymerase chaine Reaction

منابع

۱. آزادفر، و؛ س. علی احمد کروری. ۱۳۷۸. نقش الگوهای آنزیمی پراکسیداز اندام‌های مختلف در فیزیولوژی درختان(گیلاس وحشی)، نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد۲: ص ۱۰۵۳-۱۰۴۹

۲. آزادفر، و س. علی احمد کروری. ۱۳۸۰. پاسخ آنزیم پراکسیداز به تغییرات توپوگرافی و مورفولوژیکی گیلاس وحشی (Cerasus avium)، دومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد۲: ص ۷۸۷-۷۷۹

۳. صالحی شانجانی، پ. ۱۳۷۵. کشت بافت و بررسی اثر عوامل محیطی بر متابولیسم فراورده‌های ثانوی و تغییرات کمی و کیفی پروتئینی و ایزوآنزیمی پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در ارس Juniperus Spp. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۳۷۳صفحه

۴. کروری، س.۱۳۷۸.مجموعه مقالات بررسی نحو، پاسخ آنزیم‌ها در درختان جنگلی به تغییرات عوامل زیست محیطی.موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۳۳۳صفحه

5.Branow,G.and M.Ronnebery,1979,The peroxidatic oxidation of some phenolic lignin model component.Acta.Chem. Scond,B.33:22-26

6.Ebermann, R., C.Obinger, U.Burner and S.A. A. Korori,1996, The peroxidase-oxidase reaction. Plant peroxidases, IV International Symposium, Vienna-AUSTRIA. PP.O-13

7. Grambow, HJ. And B. Langenbeck-Schwich, 1983,The relationship between oxidase activity peroxidase activity, hydrogen peroxidase and phenolic compounds in the degradation of Indole 3-acetic acid in vitro.Planta 157:131-137

8.I. Hegedus,E.Nagy, “Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles”,Chemical Engineering Science,64,(2009),1053-1060

9.Ishirawa, K. and H. Itirata,1989,New substrate specificity of modifiend porcine daneratic-amylase,Archives of biochemistry and biophysics,vol. 272,2:356-363

10.J.Ge,D.Li,Z.Liu,Z.Liu, “Recent advances in nanostructured biocatalysts”,Biochemical Engineering Journal,44,(2009),53-59

11.J. Kim, H. Jia, P.Wang “Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells”,Biotechnology Advances,24,(2006),296-308

12.J.Kim,J.W.Grate,P.Wang, “Nanobiocatalysis and its potential applications”,Trends in Biotechnology,26,(2008),639-646

13. Klumpp, G., R. Guderian and K. Kuppers, 1989,Peroxidase and superoxide dismutase aktivitat sowie prolingehait von fichtennadeln nach belastungmit O3,So und No,Eur.J.For.Path.19:84-97

14.K.Sambamurthy,A.Kar,PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY,New Age International Pub.,(2006),309-327.