

1. Pred merjenjem aktivnosti polifenol oksidaze iz krompirja pripraviš standardno raztopino substrata, tako, da raztopiš 1,52 mg DOPA ($M=197,2\text{g/mol}$) v 4 ml pufru. Za test encimske aktivnosti odpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,8 ml standardne raztopine substrata ter 0,4 ml nerazredčenega krompirjevega ekstrakta in dopolniš do končnega volumna 3 ml z ustreznim pufrom. Po petih minutah naraste absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona ($\epsilon=5012\text{ L/mol}\cdot\text{cm}$) na vrednost 0,66. Izračunaj specifično aktivnost polifenol oksidaze (U/ml ekstrakta) v nerazredčenem ekstraktu. Izračunaj tudi preostalo množino substrata v kiveti po 5 min delovanja encima na substrat! 1 U (enota encimske aktivnosti) je tista količina encima, ki pri izbranih pogojih reakcije pretvori 10^{-6} mol substrata v produkt v eni minuti.

$$A = \epsilon \times l \times c \xrightarrow{c=?} c_{\text{pol.oxid.}} = \frac{A}{\epsilon \times l} = \frac{0,66 \times \text{mol} \times \text{cm}}{5012 \text{ L} \times 1 \text{ cm}} = 1,317 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$c_{\text{pol.oxid.}} = \frac{n}{V_{\text{kivete}}} \xrightarrow{n=?} n_{\text{pol.oxid.}} = V_{\text{kivete}} \times C = 0,003 \text{ L} \times 1,317 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 3,951 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

$$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = \frac{3,951 \times 10^{-7} \times 10^6 \mu\text{mol}}{5 \text{ min}} = 0,079 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = 0,079 \text{ U}$$

$$\xrightarrow{U/\text{ml}} \frac{U}{V_{\text{kromp.ekstr.}}} = \frac{0,079 \text{ U}}{0,4 \text{ ml}} = 0,198 \frac{\text{U}}{\text{ml}}$$

$$n_{\text{DOPA}} = \frac{m_{\text{DOPA}}}{M_{\text{DOPA}}} = \frac{1,53 \text{ mg} \times \text{mol}}{197,2 \text{ g}} = \frac{1,53 \times 10^{-3} \text{ g} \times \text{mol}}{197,2 \text{ g}} = 7,7586 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$0,0792 \text{ U} \dots\dots\dots 1 \text{ min}$$

$$X \dots\dots\dots 5 \text{ min} \xrightarrow{X=?} X = 5 \text{ min} \times 0,0792 \text{ U} = 0,396 \mu\text{mol} = 3,96 \times 10^{-7} \text{ mol}$$

$$n_{\text{preostala}} = (n_{\text{DOPA}} - n_{\text{pol.oxid.}}) = (7,7586 \times 10^{-6} \text{ mol} - 3,96 \times 10^{-7} \text{ mol}) = 7,363 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

2. Za test encimske aktivnosti adpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,8 ml standardne raztopine substrata, 0,4 ml nerazredčenega krompirjevega ekstrakta, ki vsebuje 0,3 U/ml polifenol oksidaze in dopolniš do končnega volumna 5 ml z ustreznim pufrom. Do 30 sekund se absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona ($\epsilon=5012\text{ L/mol}\cdot\text{cm}$) linearno povečuje s časom. Izračunaj kolikšna je absorbanca pri 475 nm po 30 s! 1 U (enota encimske aktivnosti) je tista količina encima, ki pri izbranih pogojih reakcije pretvori 10^{-6} mol substrata v produkt v eni minuti.

$$0,3 \frac{\text{U}}{\text{ml}} = 0,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \xrightarrow{\text{znebit. min. in ml} \rightarrow \text{siščič. n}} n = 0,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{ml}} \times V_{\text{ekstrakta}} (\text{ml}) \times t (\text{min}) =$$

$$= 0,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{ml}} \times 0,4 \text{ ml} \times (30 \text{ s}) \times 0,5 \text{ min} = 0,06 \mu\text{mol} = 6,0 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

$$C = \frac{n}{V} = \frac{6,0 \times 10^{-8} \text{ mol}}{5 \text{ ml}} = \frac{6,0 \times 10^{-8} \text{ mol}}{0,005 \text{ L}} = 1,2 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$A = \epsilon \times l \times c \xrightarrow{A=?} A = 5012 \frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \times 1 \text{ cm} \times 1,2 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0,06$$

3. Za test encimske aktivnosti adpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,4 ml raztopine substrata DOPA ter 0,25 ml razredčenega krompirjevega ekstrakta in dopolniš do 3 ml z ustreznim pufrom. Po 30 s naraste absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona ($\epsilon=5012\text{ L/mol}\cdot\text{cm}$) na vrednost 0,179. Izračunaj specifično aktivnost polifenol oksidaze (U/ml ekstrakta) v nerazredčenem ekstraktu! Pojasni kakšna bi bila določena vrednost specifične aktivnosti polifenol oksidaze v primerjavi

z realno, če bi reakcijo pustil teči nekaj minut in šele nato izmeril absorbanco!
Odgovor utemelji!

$$A = \epsilon \times l \times c \xrightarrow{c=?} c_{pol.oxid.} = \frac{A}{\epsilon \times l} = \frac{0,179 \times mol \times cm}{5012L \times 1cm} = 3,571 \times 10^{-5} \frac{mol}{L}$$

$$c_{pol.oxid.} = \frac{n}{V_{kivete}} \xrightarrow{n=?} n_{pol.oxid.} = V_{kivete} \times C = 0,003L \times 3,571 \times 10^{-5} \frac{mol}{L} = 1,071 \times 10^{-7} mol$$

$$U = \frac{\mu mol}{min} = \frac{1,071 \times 10^{-7} \times 10^6 \mu mol}{5 min} = 0,021 \frac{\mu mol}{min} = 0,021U$$

$$\xrightarrow{U/ml} \frac{U}{V_{kromp.ekstr.}} = \frac{0,021U}{0,25ml} = 0,086 \frac{U}{ml}$$

Če bi reakcijo pustil teči nekaj minut bi izmerili višjo absorbanco saj bi encim lahko v miru razgrajeval naš substrat in posledično bi nastalo več obarvanega produkta o-kinona in posledično bi bila tudi aktivnost večja vendar samo do določene mere oz. časa saj potem bi se pričela aktivnost zmanjševati zaradi:

- lahko zmanjka substrata (načeloma ga nebi smelo, saj ga imamo v prebitku)
- nastali produkt o-kinon lahko deluje antagonistično na encim
- ali pa pridemo do max encimske aktivnost, kjer je aktivnost konstantna (Michaeli-Mentonov graf).

4. Pojme na levi poveži z ustreznimi pojmi na desni. Možno je, da določeni pojmi ostanejo brez »partnerja«.

Substrat	→ O ₂
Produkt	polifenol oksidaza
Kofaktor	kinon
Encim	Ca ²⁺
Inhibitor	Cu ²⁺
	EDTA veže Cu ²⁺
	polifenol

5. Encimsko porjavenje v živilski tehnologiji je največkrat nezaželeno. Predlagaj tri neodvisne postopke s katerimi bi upočasnili oziroma preprečili encimsko porjavenje sadja in zelenjave.

1. blanširanje (denaturacija encimov)
2. antioksidativna sredstva (se oksidirajo (vežejo kisik) in preprečijo delovanje encima)
3. vakuumsko pakiranje (preprečimo dostop kisika)
4. pakiranje v modificirani atmosferi (preprečimo dostop kisika, oz. kisik nadomestimo z inertnimi plini)

6. Zakaj dodamo v fosfatni pufer, ki ga uporabimo za ekstrakcijo polifenol oksidaze NaF?

Z dodatkom NaF v ledeni kopeli inhibiramo encim (za zelen čas) že na začetku rezanja, ko se sprosti iz vakuol. Poleg tega želimo preprečiti inhibitorno delovanje produkta o-kinona na encim.

7. Poglej na diagram in povej v katerem času (meritvi) je hitrost reakcije največja! Največja hitrost je v prvem delu oz. v točki ko se tangenta loči od krivulje oz. ko je tangenta skladna s krivuljo.

8. Pojasni katere spojine v nastanku obarvanih produktov iz polifenolov so encimsko katalizirane in katere niso!
Encimsko katalizirana je reakcija, ki povzroča t.i. encimsko porjavenje kot je npr. nastajanje o-kinona. Med tem ko porjavenje povzročajo tudi neencimske reakcije kot je npr. Mailardova reakcija kjer iz reducirajočega sladkorja dobimo obarvan produkt imenovan melonoidin.

9. Ko rastlino poškodujemo se sprožijo signali, ki privedejo do indukcije biosinteze polifenolov. Kaj meniš zakaj?
V primeru poškodbe rastline se sproži signal za indukcijo zaradi tega, ker so polifenolne snovi za rastlino neke vrste levkociti saj jih branijo pred napadi M.O. in virusu; pravimo, da imajo antimikrobni učinek in oz. celo antioksidativni učinek. Rastline sicer hranijo določeno količino polifenolnih spojin v vakuolah vendar premalo za kakšno resno okužbo oz. poškodbo.