

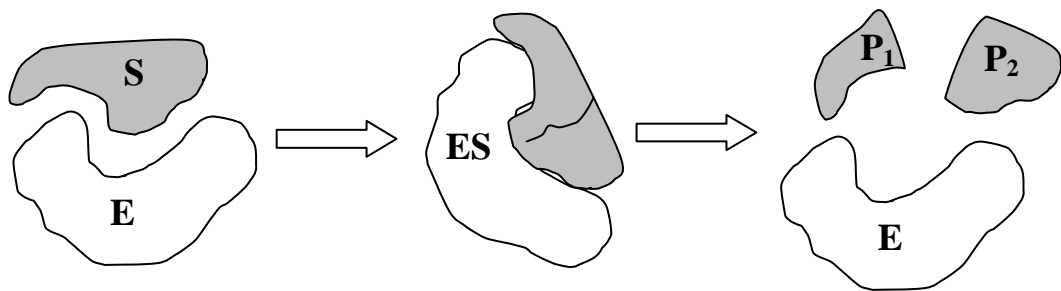
КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

Методические указания
к лабораторным занятиям по теме

“ФЕРМЕНТЫ”

для бакалавров агробиологических специальностей



Краснодар, 2012

Составители:

профессор Ю. П. Федулов, профессор В.В. Котляров,
доцент К.А. Доценко, доцент А.Я. Барчукова, доц.
Я.К. Тосунов, ст. преп. Л.А. Оберюхтина, ст. преп.
Ю.В. Подушин.

Утверждены учебно-методической комиссией
факультета:

протокол № 2 от 18 октября 2011 года

Рецензент: доктор химических наук,
профессор С.П. Доценко

В растениях реакции протекают с большой скоростью, потому что в любой живой клетке находятся многочисленные биологические катализаторы, называемые ФЕРМЕНТАМИ или ЭНЗИМАМИ, которые способны в тысячи и даже миллионы раз ускорять течение химических реакций.

ФЕРМЕНТЫ - специфические катализаторы белковой природы, ускоряющие течение определенных химических реакций и играющие важнейшую роль в обмене веществ.

Для того чтобы произошла химическая реакция, например, надо к молекуле присоединить или, наоборот, отнять группу атомов, для этого необходимо затратить энергию. Это дополнительное количество энергии, расходуемое для осуществления реакции между молекулами, называется энергией активации. Согласно законам химической кинетики, чем ниже энергия активации, тем быстрее протекают реакции (рис.1).

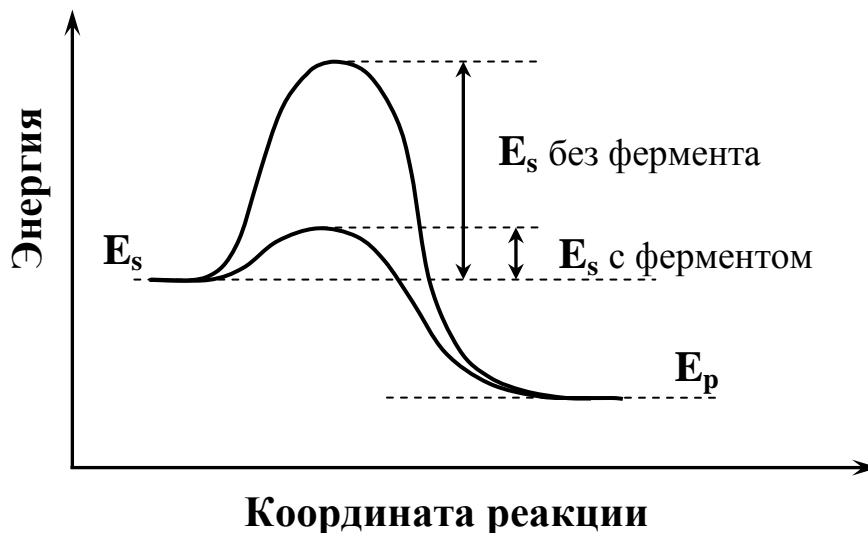


Рис.1- Влияние фермента на энергию активации реакции.
 E_s - энергия субстратов; E_p - энергия продуктов реакции, $E_{акт}$ - энергия активации

Механизм действия ферментов как раз и заключается в снижении энергии активации, необходимой для прохождения химической реакции.

Ферментативная реакция осуществляется в несколько эта-

пов (рис.2).

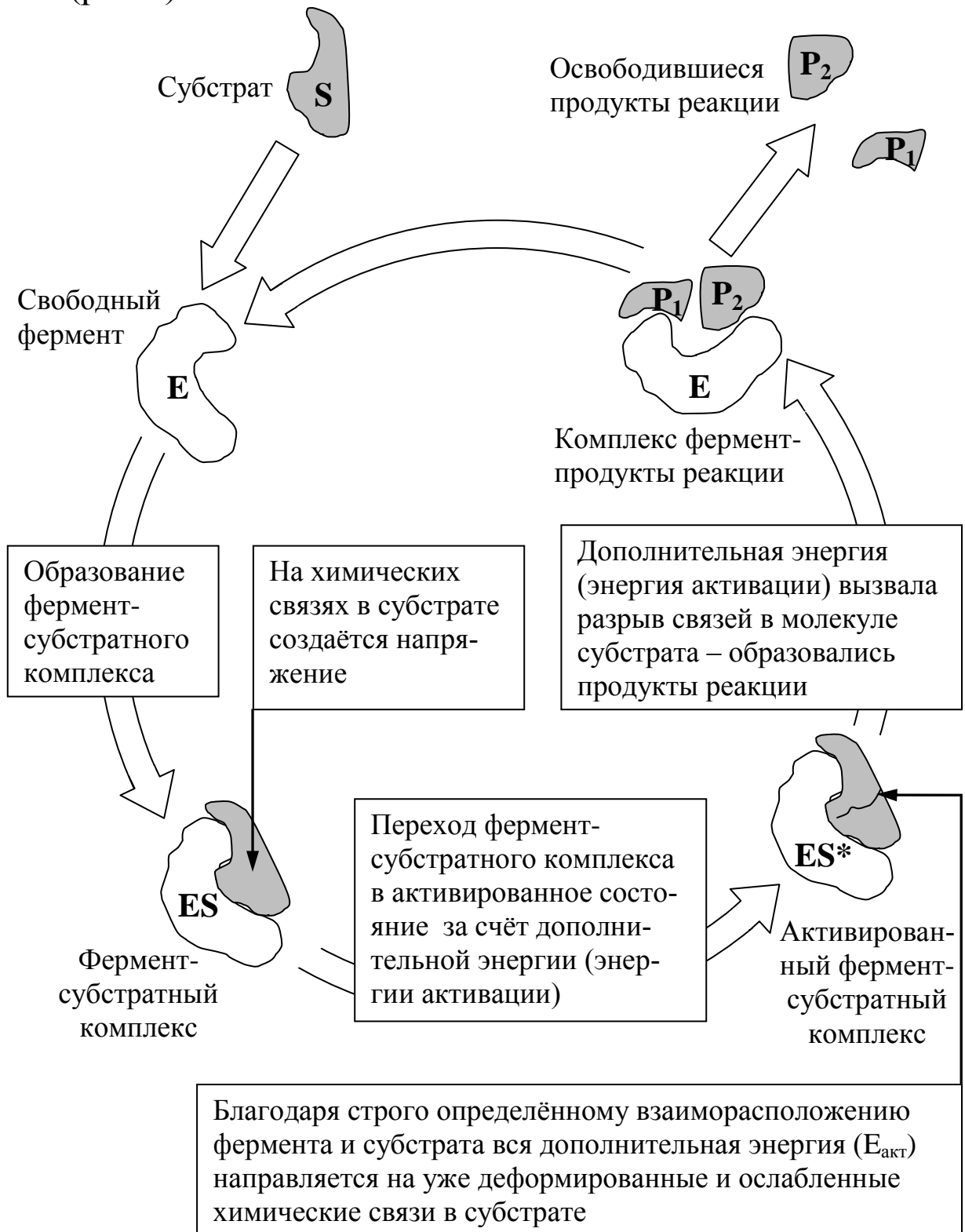


Рис. 2- Главные этапы ферментативной реакции

Сначала реагирующее вещество (субстрат, S) соединяется с ферментом (E) с образованием фермент-субстратного

комплекса (ES). В субстрате, соединённом с ферментом, происходит ослабление химических связей между определенными атомами, потому что фермент вызывает в нём поляризацию, смещение электронов, деформацию связей. Молекула субстрата при этом становится более реакционно-способной. Фермент-субстратный комплекс за счёт дополнительной энергии, называемой энергией активации, переходит в активированное состояние - активированный комплекс ES^* . Дополнительная энергия (энергия активации) обеспечивает разрыв определенных химических связей в субстрате и образование комплекс продуктов реакции с ферментом (EP). Наконец, продукты реакции отделяются от фермента и он снова может соединиться с новыми молекулами субстрата. Так как при образовании фермент-субстратного комплекса химические связи в субстрате уже были ослаблены, дополнительной энергии, необходимой для разрыва этих связей, нужно затратить меньше. Поэтому энергия активации для комплекса субстрат-фермент будет меньше, чем энергия активации чистого субстрата. Таким образом, роль фермента сводится к понижению энергии активации биохимической реакции. Все ферменты по составу делятся на две большие группы: однокомпонентные, состоящие только из белка, и двухкомпонентные, в состав которых наряду с белком входит небелковая часть, называемая простетической или активной группой. Если активная группа способна легко отделяться от белковой части молекулы фермента, то её называют коферментом. Активными группами двухкомпонентных ферментов в основном являются витамины и их производные, а также металлы. У однокомпонентных ферментов роль активных групп выполняют определенные химические группировки белка, называемые активными или каталитическими центрами.

Важнейшее биологическое свойство ферментов - специфичность их действия, т.е. каждый фермент катализирует

определённую реакцию, действуя на определенный субстрат. Различают *химическую (абсолютную)* специфичность, когда каждый фермент действует на какое-то одно химическое вещество, и *групповую* специфичность, заключающуюся в том, что фермент катализирует расщепление определённых химических связей в близких по строению веществах. Бывает стереохимическая специфичность, когда фермент действует только на определённые стереоизомеры органических соединений.

Ферменты обладают обратимостью действия, т.е. способны катализировать реакцию в прямом и обратном направлении.

Активность ферментов может значительно изменяться в зависимости от условий среды: температуры, рН среды, концентрации фермента и др.

При повышении температуры скорость ферментативной реакции, как и всякой химической, возрастает, но, в отличие от химической реакции, это ускорение наблюдается лишь до определённого предела. Температурный оптимум большинства растительных ферментов (*in vitro*) +40...60°C, а при более высоких температурах их активность резко снижается и при 70-80°C, вследствие денатурации белка, ферменты необратимо разрушаются.

Наивысшая активность большинства растительных ферментов отмечается при слабокислой или нейтральной реакции среды, которая характерна для растительных клеток. Влияние рН на активность ферментов связано с изменением состояния ионизации фермента, субстрата или комплекса фермента и субстрата.

Скорость ферментативной реакции в значительной степени зависит от концентрации фермента и субстрата в среде. При достаточном количестве субстрата скорость ферментативной реакции возрастает пропорционально увеличению количества фермента.

При постоянном количестве фермента и невысоких концентрациях субстрата скорость реакции возрастает пропорционально росту концентрации субстрата. Однако при избытке субстрата наступает насыщение фермента субстратом и скорость реакции достигает постоянного уровня (рис.3).

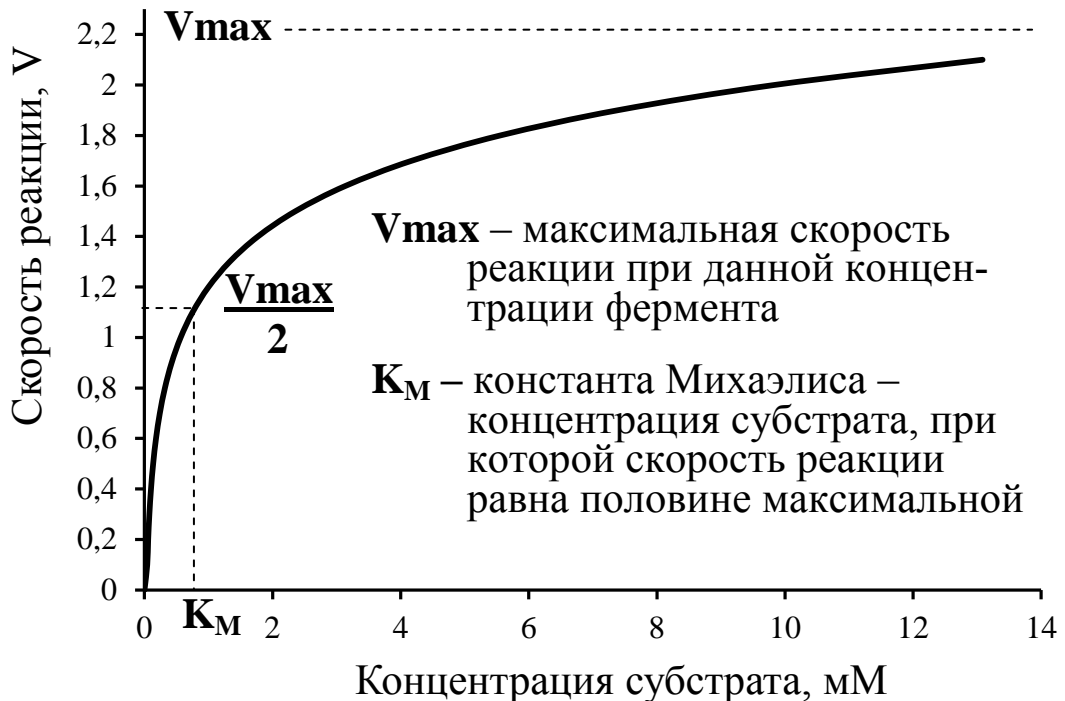


Рис. 3 - Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Уравнение Михаэлиса-Ментен выражает зависимость скорости односубстратной ферментативной реакции от концентрации субстрата:

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

Оно выражает количественное соотношение между начальной скоростью реакции (V₀), максимальной скоростью реакции (V_{max}) и исходной концентрацией субстрата, связанных между собой через константу Михаэлиса-

Ментен – (K_m). Концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции составляет половину от максимальной, называется константой Михаэлиса (K_m).

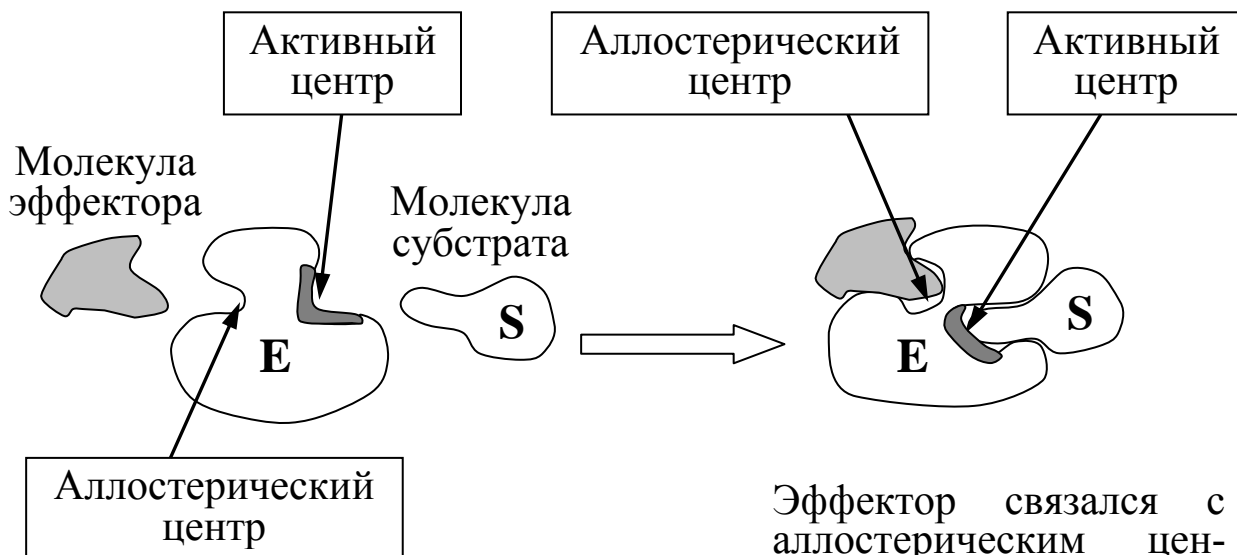
Вещества, которые усиливают каталитическую активность ферментов, называются активаторами. Роль активаторов ферментов часто выполняют катионы металлов: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} и др., а также анионы: J^- , Br^- , Cl^- .

Вещества, подавляющие действие ферментов, называются ингибиторами. Они могут быть общими и специфическими. К общим ингибиторам относятся соли тяжёлых металлов (свинца, серебра, ртути, вольфрама), трихлоруксусная кислота, которые денатурируют белки.

Специфические ингибиторы действуют или по принципу конкурентного ингибирования, когда ингибитор близок по своей конфигурации к субстрату данного фермента, или блокируют часть активного центра фермента. Так, азиды, цианиды, сульфиды и окись углерода блокируют металл в молекулах ферментов.

Наряду с ингибиторами, связывающимися с функциональными группами в активном центре фермента, имеются ингибиторы, присоединяющиеся не к активному центру, а к какому-то другому участку молекулы фермента. При этом изменяется конформация всей молекулы, а, следовательно, и структура активного центра, в результате чего происходит ингибирование данного фермента. Участок молекулы фермента, присоединение к которому вызывает изменение её конформации и связанное с ним изменение структуры активного центра, получил название **аллостерического центра**, а соответствующие ферменты называют **аллостерическими**. Вещества, присоединение которых к аллостерическому центру вызывает изменение активности ферментов, называют **эффекторами** (рис.4).

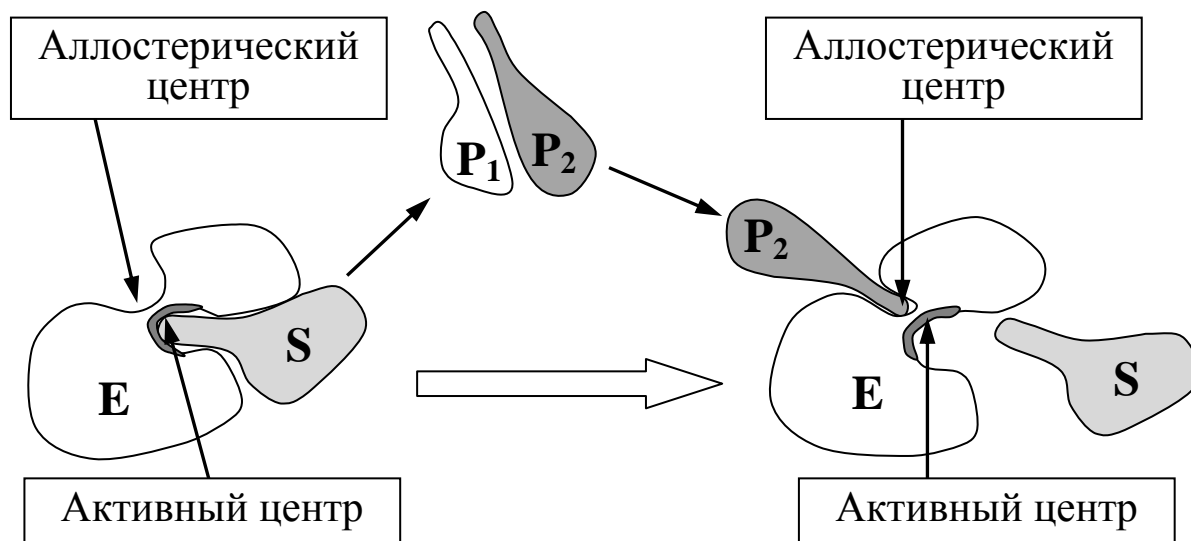
Аллостерическое усиление активности фермента



Молекула эффектора не связана с аллостерическим центром и конформация активного центра не позволяет ему связываться с субстратом – фермент не работает

Эффектор связался с аллостерическим центром, конформация активного центра изменилась так, что он стал способен связываться с субстратом – активность фермента возрастает

Аллостерическое торможение активности фермента



Молекула эффектора не связана с аллостерическим центром, активный центр связывается с субстратом – активность фермента высокая

Эффектор (продукт реакции или другая молекула) связывается с аллостерическим центром, конформация активного центра меняется, и он не связывается с субстратом – активность фермента падает

Рис.4. Аллостерическая регуляция активности фермента

Все ферменты разделены на шесть главных классов (в основу классификации положено основное свойство ферментов - специфичность их действия):

1. Оксидоредуктазы.
2. Трансферазы.
3. Гидролазы.
4. Лиазы.
5. Изомеразы.
6. Лигазы (синтетазы).

Шифр каждого фермента состоит из четырёх чисел, разделённых точками. Первая цифра указывает, к какому из шести главных классов принадлежит данный фермент. Второе число обозначает подкласс. Третья цифра обозначает ещё более мелкую группу ферментов (подподкласс), а четвертая - номер конкретного фермента в данном подподклассе. (Например, α - и β -амилазы имеют шифры 3.2.1.1 и 3.2.1.2.).

1. **ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ** - ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции в растениях. Эти ферменты имеют большое значение в процессах дыхания и фотосинтеза растений. Под окислением понимают все химические реакции, связанные с отнятием электронов от окисляемого субстрата (т.е. с увеличением положительных валентностей вещества), а под восстановлением - присоединение электронов к молекулам вещества (т.е. уменьшение положительных валентностей). Реакции окисления веществ в организмах всегда сопровождается реакциями восстановления. Установлено, что большинство биологических окислений осуществляется дегидрированием - отщеплением водорода. Отщепление водорода от окисляемых субстратов катализируется ферментами, которые получили название дегидрогеназ.

По характеру своего действия они делятся на группу анаэробных и аэробных дегидрогеназ. Анаэробными дегид-

рогеназами называются те из них, которые не способны присоединять отнятый от субстрата водород непосредственно к кислороду воздуха. Такие дегидрогеназы передают водород соответствующим ферментам - переносчикам, следующим за ними в цепи дыхания. Анаэробные дегидрогеназы являются двухкомпонентными ферментами. К анаэробным относят дегидрогеназы пиридиновой природы, коферментом которых является НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) - производные витамина РР, а также часть дегидрогеназ флавиновой природы (производные витамина В₂). Флавиновые дегидрогеназы могут не только окислять субстрат дыхания непосредственно, но и отнимать водород от восстановленных пиридиннуклеотидов и передавать его на коэнзим Q (убихинон), глутатион и некоторые другие вещества, восстанавливая их. Простетическими группами флавиновых ферментов могут быть как флавинмононуклеотид (ФМН), так и флавинадениндинуклеотид (ФАД) (производные витамина В₂).

Большинство дегидрогеназ флавопротеинового типа могут отдавать водород непосредственно кислороду воздуха. Такие ферменты составляют группу аэробных дегидрогеназ. В отличие от анаэробных флавиновых дегидрогеназ они в своем составе, как правило, не содержат металл, следовательно, не ингибируются азидами, цианидами, СО и поэтому называются ферментами остаточного дыхания.

Помимо группы дегидрогеназ в растениях присутствуют многочисленные оксидазы, т.е. ферменты, способные передавать водород или электрон преимущественно кислороду воздуха. Поскольку эти ферменты завершают собой цепь передачи водорода и электрона, они иначе называются ферментами завершающих этапов окисления или терминальными оксидазами. Сюда относятся: системы цитохромов и цитохромоксидазы, полифенолоксидазы и аскорба-

токсидазы, гликолатоксидаза, оксидазы аминокислот и др.

Цитохромы представляют собой двухкомпонентные ферментные системы, близкие по природе к гемоглобину. Основу строения цитохромов составляет порфириновое ядро. В центре порфиринового ядра цитохромов находится Fe. Изменение валентности железа от двух до трёх и определяет собой основные свойства цитохромов. Они переносят только электрон.

Полифенолоксидаза - это фермент, окисляющий фенолы и их производные в присутствии молекулярного кислорода. В основе действия полифенолоксидазы лежит обратимое превращение одновалентного атома Cu в двухвалентный.

Аскорбатоксидаза - это фермент, окисляющий аскорбиновую кислоту в присутствии молекулярного кислорода в дегидроаскорбиновую кислоту (содержит Cu).

К оксидазам относятся также оксигеназы - ферменты, катализирующие реакции окисления путем включения в свои субстраты атомов кислорода из O₂.

При этом происходит включение либо двух атомов кислорода, обычно с раскрытием кольца донора по двойной связи (диоксигеназы), либо одного атома кислорода с одновременным образованием молекулы воды (монооксигеназы).

Важное значение для растений имеет фермент *липоксигеназа*, катализирующий окисление кислородом воздуха некоторых ненасыщенных высших жирных кислот и образуемых ими сложных эфиров. Наиболее активна липоксигеназа в семенах масличных культур.

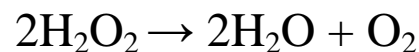
Из всех ненасыщенных жирных кислот липоксигеназа окисляет с достаточной скоростью лишь линолевую и линоленовую кислоты, при этом образуются гидроперекиси, которые имеют высокую окислительную способность и могут затем окислять новые порции ненасыщенных жирных кислот, а также каротиноиды, витамин А, аминокислоты,

хлорофилл, аскорбиновую кислоту. Липоксигеназа играет крайне негативную роль при разрушении каротина во время сушки и хранения различных растительных продуктов. Перекиси жирных кислот могут легко подвергаться дальнейшему распаду, вот почему липоксигеназа играет существенную роль в определении прогоркания таких продуктов, как мука и различные крупы.

Помимо перечисленных истинных оксидаз, использующих для окисления молекулярный кислород, в растениях существует ещё одна система терминального окисления - пероксидазная система.

Пероксидаза относится к числу ферментов, широко распространённых в тканях высших растений. Она играет большую роль в процессе дыхания растений и обеспечения их иммунитета. Пероксидаза представляет собой двухкомпонентный фермент, активной частью которого является железопорфирин. Окисление субстратов (полифенолов, гликозидов, дубильных веществ, ароматических аминов и др.) пероксидаза осуществляет с помощью перекиси водорода, которую разлагает до воды и атомарного кислорода, идущего на окисление субстрата. Поскольку при работе флавиновых оксидаз образуется перекись водорода, активность пероксидазы сопряжена с деятельностью флавопротеиновых ферментов.

Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород:



Каталаза имеет такую же простетическую группу, как и пероксидаза - железопорфирин. Роль этого фермента заключается в том, что он разлагает ядовитую для клеток перекись водорода (которая образуется в процессах дыхания и фотосинтеза) на воду и кислород.

2. ТРАНСФЕРАЗЫ - ферменты, катализирующие перенос отдельных радикалов, частей молекул от одних со-

единений на другие.

В зависимости от того, какие атомные группировки переносят трансферазы, все ферменты этого класса делят на подклассы:

- 2.1. Переносят одноуглеродные остатки, например,
 - 2.1.1. Метилтрансферазы (-CH₃).
 - 2.1.2. Карбоксилтрансферазы (-COOH).
- 2.2. Переносят альдегидные (трансальдолазы) или кетонные (транскетолазы) остатки.
- 2.3. Переносят ацильные остатки (RCO⁻)-ацилтрансферазы.
- 2.4. Переносят гликозильные остатки - гликозилтрансферазы.
- 2.5. Переносят алкильные остатки.
- 2.6. Переносят азотистые остатки, например, аминоксидотрансферазы.
- 2.7. Переносят группы, содержащие фосфор - фосфотрансферазы или киназы.
- 2.8. Переносят группы, содержащие серу.

3. ГИДРОЛАЗЫ - ферменты, катализирующие гидролиз, а иногда и синтез сложных соединений с участием воды. Гидролазы делят на несколько подклассов:

3.1. Эстеразы катализируют реакции расщепления сложных эфиров. Все эстеразы делят на несколько групп. Например, липазы катализируют расщепление жиров (триацилглицеридов жирных кислот).

3.2. Карбогидразы катализируют расщепление гликозильных соединений. К этому подклассу относятся амилазы. Наиболее распространены следующие формы этих ферментов: α- и β-амилазы и амилопектин-1,6-глюкозидаза или R-фермент. Все они характеризуются гидролитическим действием на крахмал, в результате расщепления которого образуется дисахарид - мальтоза.

Крахмал состоит из смеси двух полисахаридов: амило-

зы (представляющей собой неразветвленную цепь остатков глюкозы соединенных 1,4-связями) и амилопектина (разветвленной молекулы, в которой наряду с 1,4-имеются и 1,6-связи, находящиеся в местах разветвления).

Фермент α -амилаза катализирует гидролитическое расщепление 1,4-связей в молекуле, причем связи разрываются без определенного порядка. Под действием α -амилазы образуются мальтоза, а также некоторое количество глюкозы и сравнительно низкомолекулярные олигосахариды - декстрины.

Под действием фермента β -амилазы также происходит гидролиз 1,4-связей в молекуле, но в отличие от действия α -амилазы β -амилаза последовательно отщепляет от концов молекулы крахмала остатки мальтозы.

Амилопектин-1,6-глюкозидаза или R-фермент катализирует гидролитическое расщепление 1,6-связей в молекуле амилопектина, т.е. действует на точки ветвления молекулы.

Таким образом, с участием перечисленных выше ферментов молекулы крахмала полностью распадаются до мальтозы и глюкозы.

Промежуточные продукты расщепления крахмала амилазами (декстрины) - дают характерное окрашивание с йодом и по степени уменьшения их размера располагаются в следующем порядке: амилодекстрины - дают с йодом фиолетовое окрашивание; эритродекстрины - дают с йодом красное окрашивание; мальтодекстрины не дают окрашивания.

3.4. Протеазы или протеолитические ферменты катализируют гидролитическое расщепление пептидных CO-NH-связей в белках или пептидах (например, пепсин, трипсин, химотрипсин).

3.5. Дезамидазы (3.5.1., 3.5.3.) катализируют гидролитическое дезаминирование амидов (например, уреазы, аспарагиназы, глутаминазы).

Дезаминазы (3.5.4.) катализируют гидролитическое дезаминирование азотистых оснований и нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот.

4. ЛИАЗЫ - ферменты, катализирующие отщепление от субстратов тех или иных групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп к двойным связям. Лиазы делятся на подклассы в зависимости от того, какой тип связи подвергается разрыву между отщепляемой группой и остатком молекулы.

4.1. Углерод-углерод-лиазы. К этому подклассу относятся карбоксилазы и декарбоксилазы, катализирующие присоединение или отщепление углекислоты.

4.2. Углерод-кислород-лиазы или гидролиазы, отщепляющие от субстрата водород и гидроксил с образованием воды.

4.3. Углерод-азот-лиазы катализируют присоединение и отщепление азотистых соединений (например, NH_3).

5. ИЗОМЕРАЗЫ катализируют превращение органических соединений в их изомеры. Изомеразы делят на несколько подклассов.

5.1. Рацемазы катализируют взаимные превращения D- и L - изомеров, эпимеразы - реакции эпимеризации. Например: рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза.

5.2. Внутримолекулярные изомеразы, катализирующие превращение альдоз и кетоз. Например: триозофосфат-изомераза.

5.3. Внутримолекулярные трансферазы осуществляют внутримолекулярный перенос ацильных, фосфорильных групп.

Например: фосфоглицерат-фосфомутаза.

6. ЛИГАЗЫ или синтетазы - ферменты, ускоряющие синтез сложных органических соединений из более простых. Активность лигаз проявляется лишь в присутствии АТФ или других макроэргических соединений. Все лигазы

разделяют на подклассы в зависимости от того, какие связи образуются при их участии. Различают С-О-лигазы, С-S-лигазы, С-N-лигазы, С-C-лигазы.

Например: ацетил-КоА-синтетаза, глутаминсинтетаза, аспарагинсинтетаза.

Изоферменты (или изоэнзимы) - это группа ферментов из одного и того же источника, обладающих одним типом субстратной специфичности, катализирующих одну и ту же химическую реакцию, но различающихся по ряду физико-химических свойств.

Ферменты, у которых выявлены изоферменты, - это лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, каталаза, пероксидаза, эстеразы, α - и β -амилазы и др.

Разделить изоферменты удалось с помощью метода электрофореза - движения в электрическом поле белков-ферментов, имеющих определённый электрический заряд.

Наличие изоферментов свидетельствует о большой лабильности ферментативного аппарата растений и даёт им возможность осуществлять необходимые процессы обмена веществ в клетках, при изменении условий внешней среды.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 1

ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ НА ПРИМЕРЕ АМИЛАЗЫ

Работа 1. Получение вытяжки фермента (амилазы).

Задание. Получить вытяжку (фильтрат) амилазы.

Материалы и оборудование. Ячменный солод, ступка, мерный цилиндр, пробирка, воронка, фильтры, капельница.

Ход работы. 3 г ячменного солода тщательно растереть в ступке.

Муку залить 20 мл воды, перемешать, настоять 10 мин и затем профильтровать. Фильтрат слить в капельницу. Полученная вытяжка содержит смесь амилаз, поэтому в дальнейшем условно именуется амилазой.

Работа 2. Влияние температуры на действие фермента (амилазы).

Задание. Установить влияние температуры на действие фермента. Опыт зарисовать. Начертить график зависимости каталитических свойств фермента от температуры. Сделать выводы.

Материалы и оборудование. Вытяжка фермента (амилазы) в капельнице, 0,5% раствор крахмала, раствор йода ($I_2 + KI$), дистиллированная вода, пробирки, спиртовка, три термостата с температурой 30,45,60°C.

Ход работы. Четыре пробирки ополоснуть дистиллированной водой и налить в них по 10 мл 0,5% раствора крахмала, в каждую пробирку ввести по 10 капель амилазы и взболтать, затем поместить в соответствующие температурные условия: +30, +45, +60°C и +100°C (кипятить).

Приготовить 5 пробирок с индикаторами. Для этого в каждую из пяти чистых пробирок прилить по 9 мл дистиллированной воды и добавить 1-5 капель раствора йода. В одну пробирку добавить 1 мл крахмала, это будет эталон для сравнительной оценки степени гидролиза крахмала амилазой.

После экспозиции (4-10 минут) из каждой пробирки с крахмалом, находящейся при определенной температуре, взять пробу в 1 мл и перенести в пробирки с индикаторами. В результате взаимодействия йода с продуктами гидролиза (декстринами) в каждой из пробирок произойдет цветная

реакция, по которой можно судить о влиянии температуры на скорость ферментативной реакции.

Работа 3. Влияние концентрации фермента на его каталитические свойства (гидролиз крахмала).

Задание. Установить влияние концентрации фермента на скорость реакции. Опыт зарисовать. Начертить график влияния концентрации фермента на скорость реакции. Сделать выводы.

Материалы и оборудование. Вытяжка амилазы в капельнице, 0,5% раствор крахмала, раствор йода ($J_2 + KJ$), дистиллированная вода, пробирки, штатив, термостат на $+60^\circ C$.

Ход работы. В четыре пробирки налить по 10 мл 0,5% раствора крахмала. Затем в каждую пробирку ввести соответственно по 4, 8, 16 и 32 капли амилазы. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат с температурой $+60^\circ C$. Через 8-10 мин экспозиции из каждого раствора взять пробу в 1 мл и перенести в пробирку с водным раствором йода (9 мл $H_2O + 1-5$ капель $J_2 + KJ$). По полученной цветной шкале можно судить о результатах опыта.

Работа 4. Влияние рН среды на активность фермента (амилазы).

Задание. Определить величину рН внешнего раствора, оптимальную для каталитического действия фермента (амилазы). Опыт зарисовать. Результаты опыта выразить графически. Сделать выводы.

Материалы и оборудование. Буферные растворы с рН: 3,5; 6,7; 8; 0,5% раствор крахмала, амилаза в капельнице, раствор йода ($J_2 + KJ$), пробирки, штатив, термостат на $+60^\circ C$.

Ход работы. В пять пробирок налить по 8 мл буферно-

го раствора соответственно со значением рН: 3,5, 6,8, и 8, затем прилить по 2 мл 0,5% крахмала. Смеси прогреть в термостате до 60°C и в каждую пробирку ввести по 5 капель амилазы. Растворы тщательно перемешать и вновь установить в термостат на 5 мин. После экспозиции в каждую пробирку ввести по 1-5 раствора йода (J₂ + КJ).

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 2

ФЕРМЕНТЫ КЛАССА ГИДРОЛАЗ

Работа 1. Определение активности липазы

Задание. Определить активность липазы в растительных объектах (семенах клещевины).

Материалы и оборудование. Растительный материал (семена масличных культур), ступка, три колбы на 50 или 100 мл, стакан химический на 50 мл, стакан химический на 100 мл, бюретка, градуированная пипетка, 0,1 N уксусная кислота, 0,1 N спиртовой раствор NaOH, фенолфталеин, дистиллированная вода, воронка, фильтровальная бумага, термостат.

Ход работы. Навеску исследуемого материала из 4 г семян, которые очищаются от кожуры, тщательно растирают в ступке, заливают 18 мл воды, подкисляют 2 мл 0,1 N раствора уксусной кислоты и устанавливают в термостат на 2 ч при температуре +50°C.

После экспозиции массу фильтруют и 10 мл фильтрата титруют 0,1N спиртовым раствором NaOH в присутствии 3-4 капель фенолфталеина до появления слабо-розовой окраски.

Параллельно с основным закладывают контрольный опыт по вышеуказанной схеме, но без экспозиции в термо-

стате.

В результате гидролитического расщепления жиров под действием фермента липазы в исследуемом материале накапливаются продукты гидролиза - жирные кислоты, которые определяют путем нейтрализации щелочью при титровании. Активность липазы определяют количеством образовавшихся жирных кислот за единицу времени на единицу массы исходного материала.

Расчеты ведутся по формуле:

$$A = \frac{(y_2 - y_1) Q Y 60}{P t a}, \text{ мг жирных кислот за 1 час на 1 г,}$$

где А - активность липазы, выражающаяся в миллиграммах жирных кислот, образовавшихся в результате деятельности фермента за 1 ч в 1 г исследуемого материала;

У - разведение навески (в данном случае - 20);

У₁ - количество NaOH, пошедшего на титрование контрольного образца, мл;

У₂ - количество NaOH, пошедшего на титрование опытного образца, мл;

Q - коэффициент соотношения 1 мл NaOH к жирным кислотам, равный 3,2 мг;

P - навеска исследуемого материала, взятого для опыта, г;

t - время экспозиции, мин.;

60 - коэффициент пересчета в часы;

a - количество миллилитров фильтрата вытяжки из опытного образца, взятое для титрования.

Работа 2. Определение активности протеазы.

Задание. Определить активность протеазы (пептидазы) в растительном материале.

Материалы и оборудование. Растительный материал, ступка, четыре колбы на 50 мл (в том числе 1 мерная), стакан химический на 100 мл, бюретка, градуированная пипет-

ка, фосфорнокислая буферная смесь с рН 5,1 М раствор NaOH, тимолфталейн, фосфорнокислая суспензия меди, 9% уксусная кислота, КJ, 1% раствор крахмала, 0,01N раствор гипосульфита натрия, термостат.

Ход работы. Навеску растительного материала (лучше проростки семян ячменя) в 3 г тщательно растирают в ступке и переносят в колбу. Ступку промывают 20 мл буферной смеси с рН 5, которой заливается масса, и колба устанавливается на 2 часа в термостат при температуре 50°C.

После экспозиции настой фильтруют и 10 мл фильтрата переносят в мерную колбу на 50 мл. Фильтрат нейтрализуют молярным раствором щелочи в присутствии тимолфталейна (3-4 капли) до появления устойчиво не исчезающей синей окраски. После нейтрализации к фильтрату приливается 15 мл фосфорнокислой суспензии меди, общий объем смеси доводится водой до 50 мл и снова фильтруется. 10 мл вторичного фильтрата переносится в химический стакан, подкисляется 6 мл 9% уксусной кислоты (CH₃COOH), добавляется 4 мл КJ и 3-4 капли крахмала.

Смесь титруют 0,01N раствором гипосульфита натрия до обесцвечивания. Параллельно ставится контрольный опыт по определению содержания свободных аминокислот в исходном материале, для чего опыт закладывается по вышеприведенной схеме, но без экспозиции.

Активность протеазы определяется по количеству аминного азота, образовавшегося за единицу времени на единицу массы исходного материала по формуле:

$$A = \frac{(y_2 - y_1) Q V 60}{P t a}, \text{ мг аминного азота за 1 час на 1 г,}$$

где А - активность протеазы, выражающаяся в миллиграммах аминного азота, образовавшегося в результате деятельности ферментов за 1 ч в 1 г исследуемого материала.

У - разведение вытяжки (в данном случае в 100 раз);

У1 - количество 0,01N гипосульфита натрия, пошедшего на титрование контрольного образца, мл;

У2 - количество 0,01N гипосульфита натрия, пошедшего на титрование опытного образца, мл;

Q - коэффициент соотношения 1 мл 0,01N гипосульфита натрия к 1 мг аминного азота, равный 0,28;

P - навеска исследуемого материала, взятого для опыта, г;

t - время экспозиции, мин.;

60 - коэффициент пересчета в часах;

a - количество миллилитров фильтрата вытяжки из опытного образца, взятое для титрования.

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ 3

ФЕРМЕНТЫ КЛАССА ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Работа 1. Обнаружение анаэробных дегидрогеназ.

Задание. Установить присутствие анаэробных дегидрогеназ в растительном материале. Опыт зарисовать, сделать вывод.

Материалы и оборудование. Набухшие семена гороха, две пробирки с пробками, метиленовая синяя, термостат на 60°C, штатив.

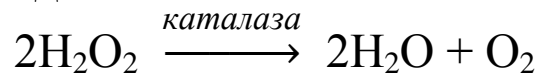
Ход работы. С набухших семян гороха снимают кожуру и по 15 штук помещают в две пробирки. Семена в одной из пробирок кипятят 3 мин. После кипячения семена в обеих пробирках заливают метиленовой синей. Через 10 мин краситель сливают, семена ополаскивают, и пробирки полностью заливают водой, закрывают пробками и устанавливают в термостат на 2 - 2,5 часа. После экспозиции семена просматривают, результаты опыта обрабатывают.

Принцип метода обнаружения дегидрогеназ основан на

способности метиленовой синей восстанавливаться водородом, перенесенным дегидрогеназами от окисляемых субстратов.

Работа 2. Определение активности каталазы газометрическим методом.

Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород:



Каталаза имеет такую же простетическую группу, как и пероксидаза - железопорфирин. Роль этого фермента заключается в том, что он разлагает на воду и кислород ядовитую для клеток перекись водорода, которая образуется в процессах дыхания и фотосинтеза, а также может выделяться при разрушении клеточных мембран под действием повреждающих факторов.

Задание. Определить активность каталазы по количеству выделяемого кислорода в единицу времени. На основании полученных данных вычертить график, сделать сравнительный вывод.

Материалы и оборудование. Растительный материал, ступка, пипетка, часы, песок, мел, 10% раствор H_2O_2 , газометрический прибор для определения активности каталазы.

Перед работой ознакомьтесь с устройством газометрического прибора для определения активности каталазы (рис. 5) и убедитесь в герметичности всех соединений. Основные части прибора составляют приемная камера, бюретка (на 25 или 50 мл), емкость для запаса воды (ею может служить воронка). Все они соединены между собой резиновыми шлангами так, что бюретка и емкость для воды представляют замкнутую систему сообщающихся сосудов. Поэтому, перемещая их относительно друг друга в вертикальном направлении, можно изменить уровень воды в бюретке при уста-

новке нуля.

Приемная камера может быть двух типов: в виде U - образной емкости с отверстием в верхней точке изгиба или в виде стеклянного сосуда на 100 -150 мл.

Емкости закрываются пробками с вмонтированными в них стеклянными трубками, которые с помощью резинового шланга через тройник соединены с бюреткой. Бюретка и емкость для воды крепятся на штативе в вертикальном положении. На резиновом шланге, соединяющем приемную камеру с бюреткой, и на свободном резиновом конце, отходящем от тройника, устанавливают клапаны - зажимы.

Ход работы. Навеску растительного материала в 5 г тщательно растереть в ступке с небольшим количеством мела (в сырой материал добавляют еще и песок). Растительный материал переносят в приемную камеру газометрического прибора. Ступку споласкивают 20 мл H_2O , которую также выливают в прибор. На дно приемной камеры устанавливают небольшой стаканчик с 5 мл H_2O_2 . Прибор собирают и устанавливают в нулевое положение. Для этого открывают оба зажима тройника и, перемещая воронку вверх или вниз, устанавливают уровень воды в бюретке на уровне верхнего деления. Затем плотно закрывают приёмную камеру и перекрывают сообщение бюретки с атмосферой зажимом 1.

Подготовив прибор, включают часы, одновременно вводя в исследуемый материал H_2O_2 , перевернув приёмную камеру на 90° , чтобы из установленного внутри стаканчика H_2O_2 полностью вылилась на дно приёмной камеры. Вернув приёмную камеру в исходное положение, необходимо слегка встряхнуть её для равномерного перемешивания мезги и H_2O_2 .

С момента начала опыта ведут наблюдения за выделением O_2 , отмечая его объем по уровню опустившегося мениска в бюретке.

По условиям данного опыта наблюдение продолжают в течение 3 мин, а отсчет производится через каждую минуту. Если выделение кислорода прекращается раньше, то опыт прерывают на соответствующей минуте наблюдения.

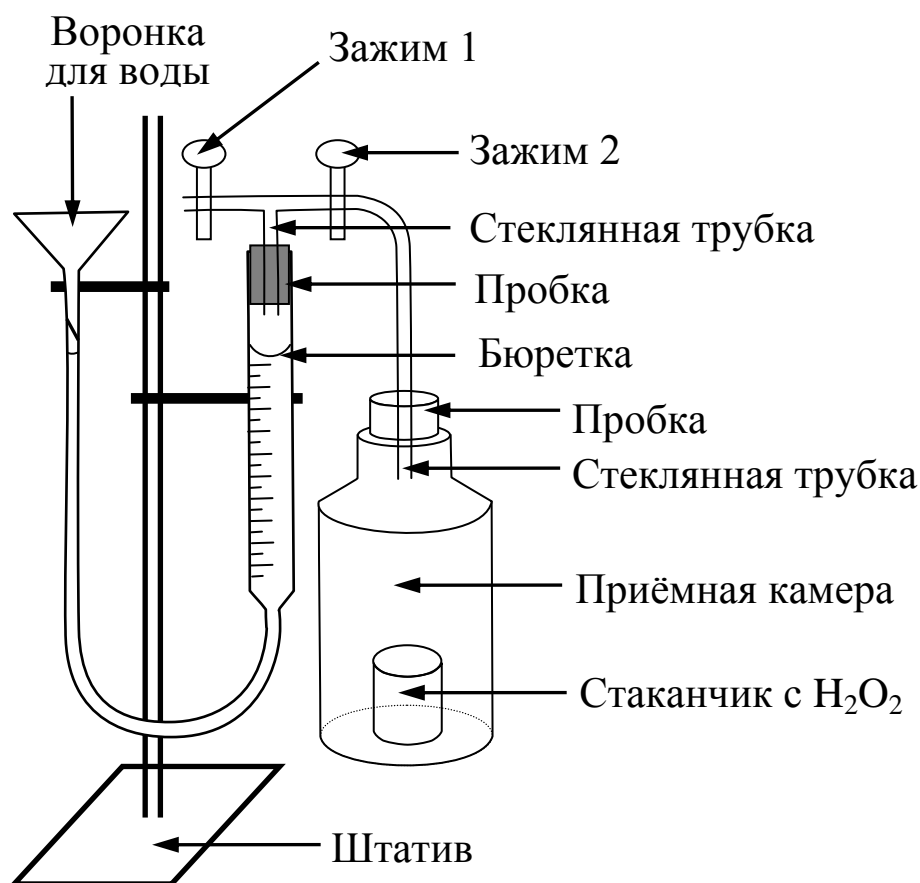


Рис. 5. Устройство газометрического прибора

По ходу эксперимента может оказаться, что O₂ выделится больше, чем вмещает объем бюретки. В этом случае перекрывают зажимом 2 выделение кислорода из приёмной камеры в бюретку, записывают показания прибора и открывают зажим 1. Кислород выходит из бюретки, а уровень воды восстанавливается в нулевом положении. После этого закрывают зажим 1, затем открывают зажим 2 и продолжают опыт. Результаты измерений после выпуска O₂ из бюретки суммируются с количеством кислорода в бюретке перед её открытием.

Все результаты наблюдений заносят в таблицу 1 и делают вывод об активности каталазы в растениях разных вариантов.

Таблица 1. Активность каталазы в мл O_2 за 1 мин. на 1 г

Наименование культуры и варианты опыта	Объем O_2 , мл, выделенный за 1 мин. Периоды наблюдений, мин			Общий объем O_2 , выделенный за время опыта, мл	Активность каталазы, мл O_2 за 1 мин. на 1 г
	1	2	3		
1					
2					
...					

Работа 3. Определение активности пероксидазы.

Большую роль в процессе дыхания многих растений играет пероксидаза. Окисление субстратов (полифенолы, гликозиды, дубильные вещества, ароматические амины и др.) пероксидаза осуществляет с помощью перекиси водорода или каких-либо органических перекисей. Поэтому активность пероксидазы сопряжена с деятельностью флавопротеиновых ферментов.

Огромно значение пероксидазы как фермента, обеспечивающего нормальный ход окислительных процессов при различных неблагоприятных воздействиях на растение. Активирование пероксидазы под влиянием неблагоприятных факторов является характерной ответной биохимической реакцией, по которой судят об устойчивости растения.

Принцип метода определения активности пероксидазы

Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта окисления определенной концентрации, заранее устанавли-

ваемой на фотоэлектроколориметре.

Ход анализа. Навеску растительного материала (50-200 мг) тонко растирают в ступке с ацетатным буфером рН 4,7 и переносят в мерную колбу емкостью 50мл. После 10 мин. настаивания вытяжку фильтруют. Для измерения активности фермента необходимо брать такое разведение вытяжки, чтобы изменение окраски происходило за 20-50 с.

В две кварцевые кюветы (2 см) приливают по 2 мл ферментной вытяжки, 2 мл бензидина, 2 мл воды, в контрольную кювету приливают 4 мл воды (данное разведение приемлемо для злаков).

Измерение производят на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре. Вначале устанавливают нулевую точку, затем в опытную кювету наливают 2 мл перекиси водорода из пипетки с широким отверстием или короткой пробирки. С внесением первой капли включают секундомер. Стрелка гальванометра начинает двигаться. Секундомер останавливают, когда стрелка достигнет показания 0,25 или 0,125.

По найденной скорости реакции вычисляют активность фермента:

$$A = E \cdot a \cdot b / p \cdot c \cdot t,$$

где А - активность пероксидазы (отн.ед.);

Е - экстинкция = 0,125 или 0,25;

а - разведение вытяжки (50);

в - степень разведения в кювете (4);

р - навеска, г;

с - толщина слоя 2 см;

t - время, с.

Данные по активности пероксидазы представить в виде диаграммы и провести анализ полученных данных.

Работа 4. Определение активности нитратредуктазы.

Фермент нитратредуктаза катализирует реакцию восстановления нитратов до нитритов. Колориметрический метод определения активности фермента основан на учете количества нитрита, образовавшегося за определенный промежуток времени.

Ход анализа.

а) Берется навеска 1,0 г листьев и корней исследуемых растений. Затем отдельно листья и корни нарезаются на кусочки размером примерно 2-3 мм и помещаются в биохимические пробирки, содержащие 5 мл 0,06 М фосфатного буфера, 1 мл яблочной кислоты, предварительно нейтрализованной KOH, 1 мл 0,1 М KNO₃ и 2 мл H₂O. Пробирки помещают в эксикатор с краном и проводят вакууминфильтрацию, для чего сначала откачивают воздух, а затем медленно его впускают. Далее опять из эксикатора откачивают воздух и оставляют его на 1 час в термостате при 37°C. Через час в эксикатор впускают воздух, пробирки вынимают и реакцию прекращают добавлением в них 1 мл ледяной уксусной кислоты. Затем раствор осветляют 3 мл насыщенного раствора (NH₄)₂SO₄. В контрольную пробирку ледяная уксусная кислота добавляется перед вакуум-инфильтрацией для инактивации фермента. Содержимое опытных и контрольных пробирок фильтруют, затем фильтрат используют для определения нитритов. Для этого к 5 мл фильтрата добавляют 2 мл реактива Грисса и измеряют оптическую плотность окрашенного раствора на ФЭКе при 540 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм.

б) Построение калибровочной кривой.

Приготовить из рабочего раствора, содержащего в 1 мл 0,001 мг азота или 0,0033 мг NO₂ серию разведений. С этой целью в отдельные пробирки приливают рабочий раствор нитрита натрия (в мл): 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и приливают дистиллированной воды до 5,0 мл. Концентрация NO₂ –

нитрита в каждой пробирке будет соответственно 0,33; 0,66; 0,99; 1,32; 1,65; мкг в 1 мл.

Активность фермента выражают в микрограммах NO₂- нитрита, образовавшегося за 1 час на 1 г растительной ткани.

Расчет проводится по формуле:

$$X = a \cdot b / Mt,$$

где X - активность фермента в мкг NO₂/ ч·г растительной ткани;

a - концентрация NO₂, мкг/мл, найденная по калибровочной кривой;

b - объем фильтрата, мл;

M - масса растительной ткани, взятая в опыт, г;

t - время инкубации, ч.

Данные представить в виде таблицы или диаграммы, сделать выводы.