

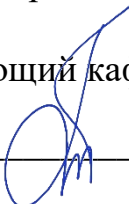
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Биотехнологий»

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«30» января 2023 г., протокол №6

Заведующий кафедрой

_____ О.Н. Понаморева

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Биосинтез и биокатализ»

основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата

по направлению подготовки (специальности)
19.03.01 Биотехнология

с направленностью (профилем)
Экобиотехнология

Форма(ы) обучения: очная

Идентификационный номер образовательной программы: 190301-01-23

Тула 2023 год

Разработчик методических указаний

Акатова Е.В., доцент, к.б.н.



(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)

(подпись)

Оглавление

Лабораторная работа №1	4
Изучение кинетических свойств ферментов.....	4
Лабораторная работа №2	8
Применение химического метода иммобилизации ферментов на полимерных носителях ..	8
Лабораторная работа №3	10
Влияние иммобилизации гидролитических ферментов на эффективность ферментативного гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов.....	10
Лабораторная работа № 4	13
Изучение действия ферментов животного, растительного и микробного происхождения.	13
Лабораторная работа № 5	24
Амилолитический ферментный комплекс солода.....	24
Лабораторная работа № 6	27
Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)	28
Лабораторная работа № 7	29
Выделение ферментов методом фракционирования	29
Лабораторная работа № 8	30
Определение активностей ферментов, участвующих в деградации нафталина	32

Лабораторная работа №1

Изучение кинетических свойств ферментов

Цель работы – закрепить знания о строении, свойствах и механизмах действия ферментов, которые необходимы для изучения обмена веществ и приобрести навыки исследования ферментов.

Кинетика ферментативных реакций – это раздел энзимологии, который изучает зависимость скорости реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ и от условий их взаимодействия. Изучение кинетики ферментативных реакций показывает их отличия от неорганических катализаторов.

Исследуемый материал: слюна, разведенная в 3 и 5 раз, и сахараза, извлеченная из дрожжей (2 г дрожжей растереть в ступке с 10 мл воды, поставить в термостат при 37°C на 10-15 мин, отцентрифугировать смесь при 3000 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость слить и использовать в работе).

Реактивы: 1% раствор крахмала; 0,2% раствор крахмала на 0,1% растворе NaCl; 10% раствор NaOH; 1% раствор CuSO₄; 0,1% раствор йода в 0,2% йодиде калия (раствор Люголя); 2% раствор сахарозы; реактив Фелинга (Готовят отдельно два раствора. Раствор 1: в мерной колбе на 100 мл растворяют 20 г сегнетовой соли и 15 г NaOH и доводят водой до метки. Раствор 2: в мерной колбе на 100 мл растворяют в воде 4 г сульфата меди (II) и доводят водой до метки. Перед употреблением смешивают равные объемы этих растворов); 1% раствор NaCl; фосфатный буфер с pH 5,0; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; 8,0 и 8,4 (Готовят раствор №1: 9,072 г KН₂РO₄ растворяют в 1 литре воды. Готовят раствор №2: 11,866 г Na₂НРO₄·2Н₂O растворяют в 1 литре воды. Растворы с определенным значением pH получают совместным смешиванием растворов №1 и №2 согласно таблице 3).

Оборудование: штатив с пробирками; песчаная баня или спиртовка; водяная баня с термометром или термостат на 38°C; стакан со льдом или снегом; часы; предметные стекла и стеклянные палочки.

Таблица 3

Приготовление буферных растворов с определенным значением pH

pH	Объем раствора №1, мл	Объем раствора №2, мл
5,0	91,05	0,95
5,8	92,10	7,90
6,2	81,60	18,40
6,6	62,90	37,1
7,0	38,80	61,20
7,4	18,20	81,80

8,0	3,10	96,90
8,4	-	100,00

1. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Метод основан на определении скорости гидролиза крахмала α -амилазой слюны в зависимости от температуры.

Ход работы: В пробирку помещают 5 капель слюны, кипятят 1-2 мин и остужают. В две другие пробирки помещают по 5 капель некипяченой слюны. Во все пробирки вносят по 10 капель крахмала и ставят первую и вторую пробирки на водяную баню при 38°C, а третью – в стакан со льдом или снегом на 3 минуты. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 капле раствора Люголя и сравнивают развивающуюся окраску.

Указания к составлению отчета: Написать уравнение гидролиза крахмала под действием α -амилазы. Сделать вывод о зависимости ферментативной реакции от температуры и причинах этой зависимости.

2. Специфичность действия амилазы и сахаразы

Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α -амилазой и сахаразой разных субстратов, содержащих гликозидные связи – крахмала и сахарозы. Гидролиз крахмала и сахарозы оценивают пробой Фелинга на восстанавливающие сахара (мальтозу и глюкозу). Проба Фелинга основана на способности углеводов в щелочной среде восстанавливать ион Cu^{2+} , содержащийся в реактиве Фелинга в виде комплексного соединения с тартратами, до оксида меди (I) красного цвета, выпадающего в осадок.

Ход определения: Для выявления специфичности α -амилазы в одну пробирку вносят 10 капель раствора крахмала, в другую – 10 капель раствора сахарозы. В обе пробирки вносят по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают встряхиванием и ставят в термостат при 38°C на 10 минут. Затем в обе пробирки прибавляют по 1 мл реактива Фелинга и нагревают до кипения. Отмечают появление красного осадка в одной из пробирок.

Для выявления специфичности сахаразы в одну пробирку вносят 10 капель раствора крахмала, в другую – 10 капель раствора сахарозы. В обе пробирки вносят по 5 капель сахарозы, перемешивают встряхиванием и ставят в термостат при 38°C на 10 минут. Затем в обе пробирки прибавляют по 1 мл реактива Фелинга и нагревают до кипения. Отмечают появление красного осадка в одной из пробирок.

Указания к составлению отчета: Написать уравнения гидролиза сахарозы. Нарисовать схему опыта по типу: фермент – субстрат – результат пробы с реактивом Фелинга. Сделать вывод о специфичности изученных ферментов.

3. Активаторы и ингибиторы α -амилазы слюны

Метод основан на сравнении скорости гидролиза крахмала под действием α -амилазы слюны до и после добавления ионов Cl^- и Cu^{2+} .

Ход работы: Берут три пробирки и наливают по 5 капель разведенной слюны. В первую пробирку добавляют 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 10 капель раствора хлорида натрия, в третью – 10 капель раствора сульфата меди. Затем в каждую пробирку

добавляют по 20 капель раствора крахмала. Содержимое перемешивают встряхиванием и помещают на водяную баню или термостат при 38⁰С. Через 5-10 минут с содержимым каждой пробирки проводят реакцию на крахмал, приливая по 1 капле раствора йода в йодиде калия.

Указания к составлению отчета: Отметить развившееся в пробирках окрашивание и на основании этого сделать вывод о действии ионов как активаторов или ингибиторов.

4. Определение оптимума рН активности амилазы

Метод основан на определении скорости гидролиза крахмала α -амилазой слюны в зависимости от рН.

Ферменты очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Можно считать, что для каждого фермента имеется определенная концентрация протонов, при которой он наиболее активен. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента.

Ход работы. В восемь пробирок вносят по 2 мл буферного раствора соответственно с рН 5,0; 5,8; 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; 8,0 и 8,4. Во все пробирки добавляют по 5 мл 0,2%-го раствора крахмала (на 0,1%-м растворе NaCl) и по 1 мл слюны, разбавленной в 3 раза. Пробы тщательно перемешивают (избегая образования пены!) и помещают в термостат (37⁰С).

Через 3 минуты из пятой пробирки отбирают 1 каплю раствора и наносят на предметное стекло, смешивая с 1 каплей раствора Люголя. Если образуется синее, фиолетовое или фиолетово-красное окрашивание, реакцию с раствором Люголя повторяют через каждые 3 минуты, пока окраска смеси не станет буро-красной. В этот момент все пробы извлекают из термостата и добавляют в них по 5 капель раствора Люголя, тщательно перемешивают. В пробе с оптимальным рН, где скорость реакции была максимальной, раствор окрашивается в желтый цвет, что свидетельствует о полном расщеплении крахмала.

Указания к составлению отчета. Сделать вывод о зависимости скорости ферментативной реакции от рН среды.

Контрольные вопросы:

1. Каково строение ферментов?
2. Что такое активный центр фермента?
3. Сопоставьте ферментативный и неферментативный процессы; как сказывается присутствие фермента на:
 - а) изменении стандартной свободной энергии реакции,
 - б) энергии активации реакции,
 - в) начальной скорости реакции,
 - г) температурном коэффициенте константы скорости?
4. Особенности ферментативного катализа и этапы ферментативной реакции.
5. На чем основана классификация ферментов? Перечислите классы ферментов и их кодовые шифры.

Заполните таблицу:

№ п/п	Класс ферментов	Тип катализируемой реакции	Кофермент	Группы действия фермента	Пример

6. Чем объяснить термолабильность ферментов? Какой температурный оптимум для действия ферментов живых организмов?

7. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении pH реакционной среды?

8. Что такое специфичность фермента и чем она обусловлена? Приведите пример фермента а) с относительной специфичностью, б) с абсолютной специфичностью, в) со стереоспецифичностью.

9. Количественный подход оценки активности ферментов с применением уравнения Михаэлиса-Ментен и важнейших ферментативных параметров – константы Михаэлиса и каталитической константы.

10. Что такое ингибиторы? Назовите типы ингибирования.

11. Что такое активаторы? Какова роль ионов металлов в катализе?

12. Как определить порядок ферментативной реакции по отношению к концентрации фермента?

13. Дайте определение иммобилизованным ферментам и назовите области их применения.

14. Как используются ферменты в биотехнологии и научных исследованиях? Приведите примеры.

Лабораторная работа №2

Применение химического метода иммобилизации ферментов на полимерных носителях

Цель. Применить химический метод иммобилизации фермента и сравнить активность фермента в иммобилизованном и не иммобилизованном состоянии.

Химические методы иммобилизации ферментов.

Представляют иммобилизацию ферментов путём образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов. В отличие от физических вариантов, эти методы иммобилизации обеспечивают прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождаются стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создаёт трудности в осуществлении каталитического процесса. Ферменты отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки или спейсер), в роли которой чаще всего выступают полифункциональные агенты бромциан, гидразин, глутаровый диальдегид. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединённые между собой ковалентными связями. Выделяют:

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксогруппами.

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами.

Иммобилизация на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы.

Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами.

Ход работы

В колбу на 250мл отбирают навеску целлюлозы с точностью до 0,0002 г, равную 0,5 г (на а.с.м.) и заливают её 125 мл 2 % глутаровым диальдегидом. Периодически перемешивая, пробу оставляют на 60 мин. После целлюлозу тщательно промывают дистиллированной водой и отделяют остаток с помощью центрифугирования.

2. Иммобилизация фермента на целлюлозе

Иммобилизацию бета-галактозидазы проводят на подготовленные целлюлозные носители (активированный и неактивированный образцы целлюлозы). Отбирают навеску носителя определенной массы (0,1 г с точностью до 0,0002 г), помещают в пробирки на 1,5 мл. Далее готовят раствор нативного фермента заданной концентрации (2 мг/мл), имеющего значение рН 6,86 (на 0,1 М фосфатном буфере). Соотношение массы пропиточного раствора фермента и массы носителя составляет 10:1. После добавления фермента в пробирки содержимое оставляют на 60 минут, периодически (каждые 15 минут) перемешивая на вортексе.

3. Определение активности иммобилизованных препаратов

По прошествии указанного времени при помощи центрифуги отделяют целлюлозную матрицу от жидкой фракции, трижды промывают матрицу буфером. Содержимое пробирки буфером переносится в 1 мл 0,5 % раствора лактозы и определяется удельная активность иммобилизованного фермента в процессе 20- минутного гидролиза (замеры уровня продукта гидролиза – глюкозы проводится каждые 10 минут: 10, 20 минут на глюкозиметре).

Оформление работы. Результаты занести в таблицу 1 и 2. Построить график зависимости концентрации глюкозы в растворе с неактивированной целлюлозой от времени гидролиза и зависимость концентрации глюкозы в растворе с активированной целлюлозой от времени гидролиза. Сделать вывод по работе.

Таблица 1 – результаты измерений содержания глюкозы в растворе с неактивированным носителем и активности фермента

Время, мин	Концентрация, ммоль/л	Масса глюкозы, г	Активность фермента
10			
20			

Таблица 2 – результаты измерений содержания глюкозы в растворе с активированным носителем и активности фермента

Время, мин	Концентрация, ммоль/л	Масса глюкозы, г	Активность фермента
10			
20			

Массу глюкозы в растворе рассчитываем следующим образом:

$$m = \frac{C_i}{1000} * M * V,$$

где C_i – концентрация глюкозы, ммоль/л; 1000 – коэф. пересчета ммоль в моль; M – молекулярная масса глюкозы, 180 г/моль; V – объема раствора, в котором происходит гидролиз субстрата, 1 мл

Активность фермента:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{m_i - m_{i-1}}{\tau_i - \tau_{i-1}},$$

где m_i – масса глюкозы в момент времени τ_i .

Лабораторная работа №3

Влияние иммобилизации гидролитических ферментов на эффективность ферментативного гидролиза низко- и высокомолекулярных субстратов

Цель: Оценить влияние иммобилизации гидролитических ферментов на эффективность ферментативного гидролиза.

Иммобилизованными ферментами называют ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Иммобилизация (immobilisatio; лат. immobilis – неподвижный) – ограничение подвижности молекул ферментов, позволяющие закрепить их активный центр, сохраняя максимальную работоспособность в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям. Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами:

- такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды;
- могут использоваться многократно;
- обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Кроме того, иммобилизация ведёт к изменению свойств фермента: – субстратной специфичности; – устойчивости; – зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60%-ом полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом. Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты

Ход работы:

1. Приготовление растворов ферментов.

Приготовить по 20 мл растворов комплексного амилолитического ферментного препарата и лактазы в концентрациях, заданных руководителем практикума.

2. Иммобилизация ферментов

Иммобилизацию каждого ферментного препарата (отдельно) проводить в геле альгината кальция. Для этого осторожно смешать равные объёмы альгината натрия (4 %-ный раствор) и раствор фермента (по 5 мл). С высоты около 20 см капать смесь из шприца

в избыток 0,2 М раствора CaCl_2 (избыток, т.е. объем превышает общий объем смеси в 10 раз). Оставить частицы в растворе хлорида кальция на 20 минут для застывания.

3. Приготовление растворов субстратов.

Приготовить растворы крахмала и лактозы с концентрацией 0,2 % (по 500 мл). Для этого отмерить массу крахмала в стеклянном стаканчике на 50 мл и растворить в части холодной воды, отмеренной для приготовления раствора. Остальную воду довести до кипения на плитке и при постоянном перемешивании и кипении влить в нее содержимое стаканчика. После этого охладить получившийся раствор крахмала до комнатной температуры. Лактозу готовят растворением навески лактозы в холодной воде.

4. Осахаривание субстратов.

Провести частичное осахаривание крахмала в двух колбах: с использованием раствора фермента и иммобилизованного ферментного препарата. Продолжительность процесса – 1,5 часа. Объем раствора крахмала на осахаривание – 200 мл (+ 20 мл фосфатного 0,1 М буфера pH 6,8). Температура процесса – 30-35 °С. Объем раствора фермента, вносимого на осахаривание равен объемам, использованным для приготовления иммобилизованного препарата. Процесс вести при периодическом перемешивании. Осахаривание лактозы вести аналогичным образом свободным и иммобилизованными препаратами.

5. Определение степени гидролиза субстратов и сравнение эффективности иммобилизованных и не иммобилизованных ферментных препаратов.

Каждые 15 минут (включая нулевую точку – сразу в начале процесса) осахаривания из растворов отбирают аликвоту в 1 мл, центрифугируют ее при 10 000 об/мин в течение 1 минуты, определяют в ней содержание глюкозы на глюкозиметре (глюкозооксидазным методом).

Оформление работы.

Результаты измерения содержания глюкозы в растворе крахмала занести в таблицу1.

Таблица1.

№	Время, мин	Концентрации глюкозы, ммоль/л (неиммобилизованный фермент)	Концентрации глюкозы, ммоль/л (иммобилизованный фермент)
1	0		
2	15		
3	30		

4	45		
5	60		
6	75		
7	90		

Массу глюкозы в растворе рассчитываем следующим образом:

$$m = \frac{C_i}{1000} * M * V,$$

где C_i – концентрация глюкозы, ммоль/л; 1000 – коэф. пересчета ммоль в моль; M – молекулярная масса глюкозы, 180 г/моль; V – объема раствора, в котором происходит гидролиз субстрата, 225 мл (при каждом измерении уменьшается на 1 мл).

Активность фермента:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{m_i - m_{i-1}}{\tau_i - \tau_{i-1}},$$

где m_i – масса глюкозы в момент времени τ_i .

Удельная активность рассчитана как масса образовавшейся глюкозы в единицу времени одним мл раствора фермента.

Расчет удельной активности фермента амилазы внести в таблицу 2

№	Вре мя, мин	неиммобилизованный фермент				Иммобилизованный фермент			
		Концентр ации глюкозы, ммоль/л	Масса глюко зы, г	Активн ость фермен та	Удельн ая активн ость фермен та	Концентр ации глюкозы, ммоль/л	Масса глюко зы, г	Активн ость фермен та	Удельн ая активн ость фермен та
1	0								
2	15								
3	30								
4	45								
5	60								
6	75								
7	90								

Привести график зависимость концентрации глюкозы в растворе крахмала от времени гидролиза.

Аналогичные результаты проводят по определению содержания глюкозы в растворе лактозы.

Сделать вывод по работе.

Лабораторная работа № 4

Изучение действия ферментов животного, растительного и микробного происхождения

Цель работы - изучить действие ферментов животного, растительного и микробного происхождения на изменение пищевых систем в процессе переработки.

Ход работы. Выполняются задания:

Задание 1. Изучить характеристики ферментных препаратов и их использование в пищевой промышленности.

Задание 2. Изучить особенности процессов получения ферментов различного происхождения.

Задание 3. Исследовать процессы действия ферментов на пищевые системы и их активность.

Теоретическое обоснование

Биохимические процессы, протекающие при хранении сырья и при производстве пищевых продуктов, связаны с действием собственных ферментов пищевого сырья, а также ферментов, вносимых в ходе технологического процесса в виде ферментных препаратов. Последние могут быть животного, растительного или микробного происхождения.

Наиболее древние ферментативные процессы, освоенные человеком, - спиртовое и молочнокислое брожение, применение сычуга при приготовлении сыров, использование солода и плесневых грибов для осахаривания крахмалистого сырья, применение заквасок при изготовлении хлеба.

В настоящее время многие отрасли пищевой промышленности, в медицине и сельском хозяйстве основаны на использовании различных ферментативных процессов.

Ферменты - биологические катализаторы белковой природы. Ферменты ускоряют химические реакции в 100-1000 раз благодаря тому, что при взаимодействии с субстратом образуют фермент-субстратный комплекс, для этого требуется значительно более низкая энергия активации (по сравнению с протеканием реакции без фермента); на второй стадии

этот комплекс распадается на продукты реакции и свободный фермент, который может взаимодействовать с новой молекулой субстрата.

Многие ферменты являются двухкомпонентными, т.е. состоят из белковой части - апофермента и связанного с ним небелкового компонента - кофермента, участвующего в действии фермента в качестве обязательного кофактора. В качестве коферментов могут выступать витамины и их производные, нуклеотиды и нуклеозиды.

Для характеристики активности ферментов используются различные единицы:

Стандартная единица фермента - это такое количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях. Стандартная единица фермента обозначается буквой E (единица) или буквой U (unit).

Катал - каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль в секунду, в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал (кат) при практическом применении оказывается слишком большой величиной, поэтому в большинстве случаев каталитические активности выражают в микрокаталах (мккат), нанокаталах (нкат) или пико- каталах (пкат). Стандартная единица фермента находится с каталом в следующем соотношении: $1 \text{ E (U)} = 16,67 \text{ нкат}$.

В большинстве случаев ферменты обладают строгой специфичностью, а также лабильны, т. е. могут изменять свою активность под действием pH, температуры, в присутствии активаторов и ингибиторов и др.

Активаторами называют вещества, которые повышают активность ферментов. В роли активаторов могут выступать некоторые металлы, аминокислоты и другие вещества. Ингибиторами называют вещества, снижающие активность ферментов.

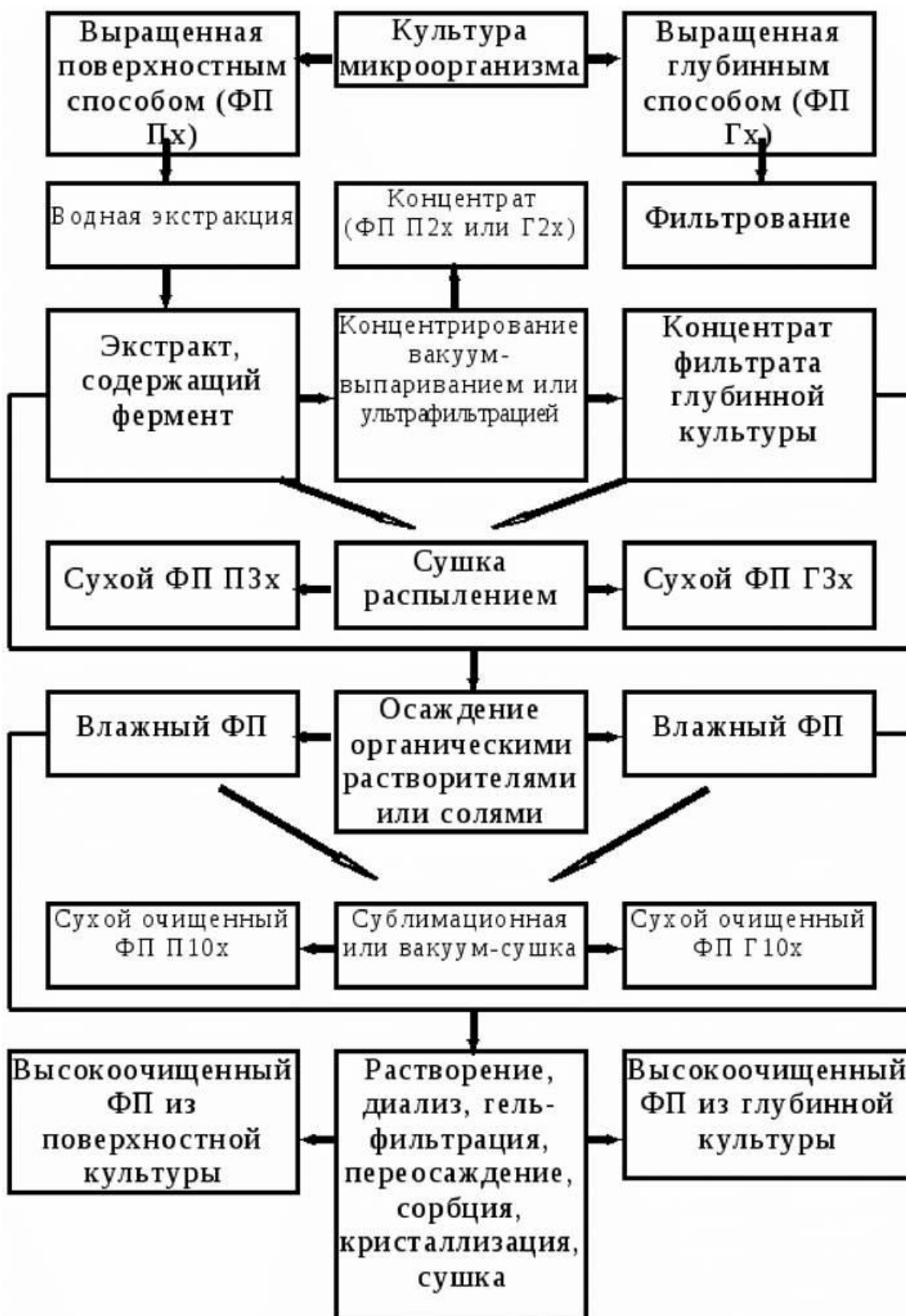
При определении названия ферментного препарата учитывают только основной фермент, активность которого преобладает. Наименование ферментного препарата начинается с сокращенного названия основного фермента. Если основным ферментом является амилаза, то наименование препарата начинается с «амил», глюкоамилаза - «глюк», у протеолитических ферментов - «прот», у пектолитических - «пект», у цитолитических - «цит» и т. д. Затем следует измененное видовое название продуцента. Наименование препарата оканчивается на «ин». Если продуцентом является *Aspergillus oryzae*, то вторая часть названия фермента звучит «оризин», если *Bacillus subtilis*, то «субтилин», если *Aspergillus awamori*, то «аваморин», если *Aspergillus foetidus*, то «фоетидин», если *Trichoderma viride*, то «виридин» и т. д. В наименовании препарата отражается также и способ культивирования микроорганизма-продуцента. При глубинном культивировании после названия ставится буква «Г», при поверхностном - «П».

Выпускаемые ферментные препараты представляют собой либо жидкости с содержанием сухих веществ не менее 50 %, либо порошки белого, серого или желтоватого цвета с определенной стандартной ферментативной активностью.

Производство ферментных препаратов осуществляется поверхностным или глубинным способом (рис. 27). В основе поверхностного способа лежит выращивание микроорганизмов на рыхлых питательных средах. Этот способ используется для культивирования микроскопических грибов. При глубинном способе культивирования микроорганизмы выращиваются в толще жидких питательных сред. В этих условиях культивируют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы. Из поверхностных

культур труднее получить высокоочищенные препараты, так как они содержат много балластных веществ. Питательные среды подбирают в зависимости от физиолого-биохимических особенностей микроорганизма-продуцента и того фермента, который необходимо получить.

Принципиальная схема получения ферментных препаратов



Ферментные препараты широко используются в различных отраслях промышленности. Отличаются они от чистых ферментов тем, что содержат один либо несколько ферментов с преобладанием какого-либо одного, а также балластные вещества среды, на которой были выращены микроорганизмы-продуценты ферментов. Для промышленного производства ферментных препаратов используют микроорганизмы, выделенные из природных источников, и мутагенные штаммы.

Основную часть ферментов, получаемых промышленным способом, составляют гидролазы. К ним относятся в первую очередь амилалитические ферменты: α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза. Их основная функция - гидролиз крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе расщепляется на декстрины, а затем до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Продуцентами амилалитических ферментов являются микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus* (видов *oryzae*, *niger*, *awamori*, *batatae*, *foetidus*, *flavus* и др). Большое количество амилалитических ферментов синтезируют также спороносные бактерии рода *Bacillus* (видов *subtilis*, *mesentericus*, *brevis* и др.).

Протеолитические ферменты образуют класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - на связь между аргинином и лизином. Среди продуцентов протеолитических ферментов практический интерес представляют грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Спороносные бактерии рода *Bacillus* способны образовывать протеолитические ферменты. Протеазы находят широкое применение в разных отраслях промышленности: молочной - производство сыров, творога; мясной - для смягчения мяса; кожевенной - смягчение шкур; парфюмерной - добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны; производство моющих средств - добавки для удаления загрязнений белковой природы; медицина - при лечении воспалительных процессов, тромбозов и т. д.

Пектолитические ферменты уменьшают молекулярную массу и снижают вязкость пектиновых веществ. Пектиназы делятся на две группы - гидролазы и трансэлиминазы. Гидролазы отщепляют метильные остатки или разрывают гликозидные связи. Трансэлиминазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей. Применяются в текстильной промышленности (вымачивание льна перед переработкой); в виноделии - осветление вин; при консервировании фруктовых соков.

Продуцентами пектолитических ферментов являются бактерии, микроскопические грибы, дрожжи. Наибольшая продуцирующая способность обнаружена у грибов рода *Aspergillus*, *Penicillium*. Продуцентами пектиназы могут быть также анаэробы - спороносные бактерии рода *Clostridium*. Активными продуцентами цитолитических ферментов являются грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* (вид *viride*).

Целлюлолитические ферменты очень специфичны, их действие проявляется в деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно используются в виде комплекса, доводящего гидролиз целлюлозы до глюкозы (в гидролизной промышленности). В медицинской промышленности их используют для выделения стероидов из растений; в пищевой - для улучшения качества растительных масел; в сельском хозяйстве - в качестве добавки в комбикорма для жвачных животных. Целлюлолитические ферменты синтезируются в основном грибами, относящимися к различным видам: *Aspergillus*

amstelodamy, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma virida*, *Trichoderma koningii* и многие другие. Они широко распространены в природе (в почве, в организмах животных, в растительных остатках).

Молокосвертывающие ферменты. В основе технологии производства сыров лежит способность казеина молока коагулировать под воздействием протеолитических ферментов, получивших название молокосвертывающих. Общее свойство молокосвертывающих ферментов, применяемых в сыроделии, - способность гидролизовать χ -казеин по связи Фен105-Мет106 называют молокосвертывающей активностью, в отличие от общей протеолитической активности - способности расщеплять другие связи в белках. Общая протеолитическая активность ферментов, применяемых в сыроделии, должна быть как можно более низкой по отношению к молокосвертывающей.

Реннин (химозин) - *фермент* из класса *гидролаз*, который вырабатывается в желудочных железах млекопитающих. У жвачных животных вырабатывается железами *сычуга* (4-го отдела желудка), отсюда одно из его названий - сычужный фермент. Вторым главным составляющими сычужного фермента являются пепсин.

Сычуг, полученный из желудка теленка молочного возраста (до 3 месяцев), содержит 88-94 % химозина и 6-12 % пепсина. Сычуг из желудка более взрослого животного, получающего обычный корм, содержит 90-94 % пепсина и всего 10 % химозина. Химозин, полученный из желудка молочного теленка, наиболее активен при pH 6,2-6,4, а активность пепсина располагается в области повышенной кислотности при pH 1,7-2,3, поэтому эти ферменты дополняют друг друга, и их смеси нашли широкое применение в сыроделии.

В настоящее время в связи с дефицитом сычужного фермента из-за нецелесообразности забоя молодняка в молочный период жизни и снижения поголовья скота при резком возрастании его продуктивности широко используются другие ферменты, близкие по действию к сычужному: пепсины свиной, говяжий, птичий, а также энзимы, продуцируемые некоторыми микроорганизмами.

Разработаны методы генной инженерии, позволяющие включать гены, осуществляющие синтез сычужного фермента, в геномы микроорганизмов и тем самым осуществлять синтез сычужного энзима микроорганизмами. Сычужный фермент, полученный методами генной инженерии, уже вырабатывается и применяется в промышленных масштабах (табл. 4).

Таблица 4. Номенклатура, продуценты и производители микробиальных молокосвертывающих ферментов

Название фермента/ КФ*	Продуцент	Торговое название	Производитель
Аспергиллопепсин I (aspergillopepsin I) КФ 3.4.23.18	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	CHY-MAX Liquid M	Chr. Hansen, Дания
Эндофиапепсин (endothiapepsin) КФ 3.4.23.22	<i>Endolhia parasitica</i>	Суперен	Pfizer, США
	<i>Mucor miehei</i>	Реннилаза	Novo Rennet, Дания

Мукопротеин (mucorpepsin) КФ 3.4.23.23		Фромаза	Wallerstein, США
		Микробиальный ренин	Meito Sangyo, Япония
		Marzyme	Danisco, Франция
		Milase	CSK food enrichment, Нидерланды

*КФ - код фермента по Международной классификации ферментов (энзимов).

Наряду с ферментными препаратами животного и микробного происхождения для сквашивания молока используются также препараты растительного происхождения. Экстракты растений, которые традиционно считались ферментными коагулянтами молока, такими не являются, так как они имеют другой механизм действия или, возможно, они содержат микробы, обладающие способностью к свертыванию молока. Примером использования растительного экстракта может служить выработка португальского сыра Sena da Estrela из овечьего молока с помощью водной вытяжки цветков кардона (артишока).

Известно, что использование ферментов, как сычужного, так и микробиального происхождения, производится однократно, в связи с этим являются актуальными использование и разработка приемов, позволяющих многократно использовать ферменты. Одним из таких приемов является иммобилизация, т. е. включение молекул фермента в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Прежде всего, такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов.

Методические указания

Оборудование и материалы: весы лабораторные аналитические, водяная баня, термостат, секундомер, ФЭК, рН-метр, пипетки на 5 и 10 см³, мерный цилиндр на 100 см³, колбы на 50-100 см³, бюретки на 25 см³, стаканы на 100 см³, чашка фарфоровая, пестик, шпатель, термометр со шкалой 0-100 С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 3 %-й раствор сычужного фермента, препарат амилазы, 1 %-й раствор крахмала, ацетатный буферный раствор с рН 4,7, 0,1 М раствор соляной кислоты, основной раствор йода.

Подготовить образцы к исследованию.

Приготовить рабочие растворы ферментных препаратов.

Исследовать влияние температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока.

Исследовать амилалитическую активность ферментов.

Сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Техника определения

Изучение влияния температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока

Для свертывания молока в сыроделии применяют препараты сычужного фермента и пепсин, который содержит два компонента - химозин (реннин) и пепсин (А и В), оба свертывают молоко, но химозин более активен. Молокосвертывающая активность сычужного фермента зависит от соотношения компонентов и от свойств молока: кислотности, температуры и содержания в нем ионов кальция. Фермент стабилен при pH 5,3-6,3, имеет оптимальную активность при pH 6,2 и температуре 40 °С. Увеличение дозы фермента ускоряет процесс сычужного свертывания молока - сокращается общая продолжительность гелеобразования и его отдельных стадий.

Приготовление рабочего раствора фермента. Рабочий 0,03 %-й раствор сычужного фермента (пепсина) готовят

непосредственно перед проведением исследования из 3 %-го. Для приготовления рабочего раствора отмеряют 1 см³ 3 %-го раствора фермента, вносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

Подготовить образцы сырого молока для исследований. Определить титруемую и активную кислотность молока.

В стаканы отмерить по 50 см³ молока и подготовить по схеме, представленной в табл. 5. Ставятся 2 серии параллельных опытов с применением сычужного фермента и пепсина.

Молоко подогреть до требуемой температуры и в каждый образец внести раствор фермента. Тщательно перемешать стеклянной палочкой. Палочку после каждого образца сполоснуть водой, протереть сухим бумажным фильтром или салфеткой.

Таблица 5. Схема исследования и результаты

Образец молока	Температура свертывания, °С	Количество 0,03 %-го раствора фермента, см ³	Продолжительность свертывания молока с применением, мин	
			препарата сычужного фермента	препарата пепсина
8.	40	10		
9.		5		
10.	30	10		
11.		5		
12.	20	10		

13.		5		
-----	--	---	--	--

После внесения фермента молоко тщательно перемешать и оставить в покое до готовности сгустка. Готовность определяют визуально. Через каждые 2-3 мин стакан с образцом слегка наклоняют, чтобы определить начало свертывания молока. Затем оставляют в покое. Окончание процесса свертывания молока определяют: через каждые 2-3 мин аккуратно надавливают на поверхность шпателем или стеклянной палочкой у стенки сосуда. Если при незначительном разрушении сгустка начинает отделяться прозрачная сыворотка, процесс закончен.

Продолжительность свертывания отмечают по секундомеру и записывают в таблицу. Рассчитать дозу фермента, вносимую в каждый образец молока. Построить графики зависимостей продолжительности свертывания молока от дозы ферментных препаратов при разных температурах свертывания.

Сделать выводы.

Определение амилалитической активности ферментов (АС)

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилалитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилалитическая активность характеризует способность ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата (или на 1 мг белка).

За единицу активности амилалитического фермента (АС) принято такое количество фермента, которое в строго определенных условиях температуры, рН и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, что составляет 30 % от введенного в реакцию.

За единицу амилалитической активности (АС) принято такое количество фермента, которое при определенных значениях рН (6,0 - для бактериальных и 4,7 - для грибных амилаз) и температуре 30 °С за 1 ч катализирует гидролиз 1 г крахмала до декстринов различной молекулярной массы, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию. Активность выражается в ед. АС/г (для порошкообразного) или в ед. АС/см³ (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Техника определения

В 2 пробирки наливают по 5 мл 1 %-го раствора крахмала, ставят в термостат с температурой 30 °С и выдерживают 5-10 мин. Не вынимая пробирки из термостата, наливают в первую пробирку 2,5 см³ дистиллированной воды (контрольная), а во вторую - 2,5 см³ ферментного раствора (опытная). Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин. Через 10 мин из контрольного и опытного растворов отбирают по 0,25 см³ и переносят в одну из колб с предварительно налитыми 25 см³ рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный - синюю, опытный - фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала. Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на ФЭК с максимумом поглощения 656 нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощающего слоя 10 см³.

Контрольным раствором при колориметрировании является дистиллированная вода. Оптическая плотность контрольного раствора (D_1) соответствует количеству исходного субстрата - крахмала. Оптическая плотность опытного раствора (D_2) соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между значениями оптической плотности соответствует прогидролизованному количеству крахмала.

Расчет активности фермента

Количество прогидролизованного крахмала C в граммах определяют по формуле

$$C = \frac{(D_1 - D_2)0,05}{D_1},$$

где D_1 - оптическая плотность контрольного раствора; D_2 - оптическая плотность опытного раствора; 0,05 - количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Если количество прогидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,04 г, испытание повторяют. При приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Амилолитическую активность (ед/г) препарата бактериального происхождения (AC) определяют по формуле

$$AC = \frac{(5,885C + 0,001671)1000}{n},$$

где C - количество прогидролизованного крахмала, г; n - количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг; 1000 - коэффициент пересчета мг в г; 5,885 и 0,001671 - коэффициенты расчетного уравнения.

Коэффициенты расчетного уравнения получены при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества прогидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания. В коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 ч действия фермента.

Выполнить расчеты и сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какими способами осуществляется производство ферментных препаратов?
2. Какие единицы используются для характеристики активности ферментов?
3. Назовите основные продуценты амилалитических ферментов.
4. Назовите основные продуценты протеолитических ферментов.
5. Назовите основные продуценты пектолитических и целюлолитических ферментов.

6. Дайте характеристику молокосвертывающих ферментов и назовите особенности их применения.
7. Назовите области применения ферментов.
8. В чем заключается преимущество применения иммобилизованных ферментов?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание основных групп ферментов и их продуцентов.
3. Описание факторов, влияющих на молокосвертывающую способность ферментов и их активность.
4. Расчеты амилалитической активности фермента.
5. Выводы.

1. Приготовление 1 %-ного раствора крахмала (субстрат).

1 г крахмала помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 25 см³ воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 см³ воды, помещают колбу в кипящую водяную баню, непрерывно перемешивая до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 см³ ацетатного буферного раствора pH 4,7 и доводят объем жидкости до метки дистиллированной водой. Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

2. Приготовление ацетатного буферного раствора с pH 4,7.

Раствор А - 1 М раствор уксусной кислоты. 58 см³ ледяной уксусной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор Б - 1 М раствор уксуснокислого натрия. 82 г уксуснокислого натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Ацетатный буферный раствор с pH 4,7 готовят смешиванием равных объемов растворов А и Б. Проверяют значение pH на pH-метре.

3. Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты. 8,2 см³ соляной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. Приготовление основного раствора йода.

0,5 г йода и 5 г йодистого калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в малом количестве воды. Содержимое осторожно перемешивают при плотно закрытой крышке бюкса. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 200 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в темноте и используют в течение 1 месяца.

5. Приготовление рабочего раствора йода.

2 см³ основного раствора йода разводят 0,1 М раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 см³. Перед применением рабочего раствора проверяют на фотоэлектроколориметре его оптическую плотность, пользуясь светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 453 нм и толщине пропускающего слоя 1 см³. Оптическая плотность раствора йода должна составлять 0,21-0,23. В случае отклонения оптической плотности раствора от этой величины ее приводят к необходимой, добавляя несколько капель кислоты или основного раствора йода.

6. Приготовление основного раствора ферментного препарата.

0,1 г исследуемого препарата взвешивают в стаканчике вместимостью 25 - 30 см³. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и при необходимости фильтруют. Раствор ферментного препарата может храниться в течение 1 суток при температуре от 0 до минус 4 °С.

7. Приготовление рабочего раствора ферментного препарата.

Рабочий раствор фермента готовят из основного раствора, разбавляя его так, чтобы в 5 см³ рабочего раствора содержалось такое количество фермента, которое обеспечивает в принятых условиях гидролиз крахмала от 20 до 70 %. Для этого берут различные количества основного раствора в зависимости от активности исследуемого препарата и разбавляют водой до 50 см³ (при испытании препарата с активностью от 20 до 700 ед/г) и до 200 см³ (при активности от 700 ед/г и выше). Количество основного раствора препарата, которое необходимо взять для приготовления рабочего раствора фермента, находят по таблице:

Амилолитическая активность препарата, (АС) ед/г (предполагаемая)	Количество препарата в 5 см ³ рабочего раствора, мг	Количество основного раствора, необходимое для вторичного разбавления, см ³	Общий объем разбавленного раствора, см ³
От 20 до 80	5,0	50	50
От 80 до 150	2,0	20	50
От 150 до 300	1,0	10	50
От 300 до 700	0,5	5	50
От 700 до 1200	0,25	10	50
От 1200 до 2500	0,125	5	200
От 2500 до 5000	0,05	2	200
Свыше 5000	0,025	1	200

Лабораторная работа № 5

Амилолитический ферментный комплекс солода

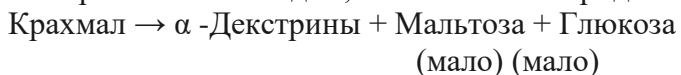
Цель работы: провести сравнительный анализ амилолитической и осахаривающей активностей солода; найти оптимальную концентрацию

Реактивы: основной раствор солода; основной раствор йода; рабочий раствор йода (приготовленный на 0,1н соляной кислоте); реактивы Фелинг I и Фелинг II; индикаторная бумага; 0,15М раствор гидроортофосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); фосфатный буфер pH 6,0 и 5,6; 0,1% раствор растворимого крахмала; 0,1н раствор соляной кислоты.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 100 мл; пробирки пипетки; мерные цилиндры; водяная баня, ледяная баня, термостат; фотоэлектроколориметр; термометры.

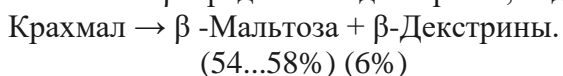
Теоретическая часть

Тривиальное название ферментов, расщепляющих крахмал, — амилазы. При участии амилаз осуществляется гидролиз крахмала гликогена, олигосахаридов и других веществ, построенных из остатков α -D-глюкопиранозы и содержащих в молекуле 1,4- и 1,6-гликозидные связи. Различают три основных типа амилаз: α -амилазу, β -амилазу и глюкоамилазу. В состав амилолитического комплекса растений входят α - и β -амилазы. Семена растений различаются по содержанию амилаз. В непроросших зернах пшеницы и ячменя присутствует только β -амилаза, α -амилаза образуется при прорастании. В зерне ржи присутствуют оба фермента, при прорастании количество и активность α -амилазы возрастает. В пищевой промышленности растительные амилазы используются в виде солода. Солодом называется проросшее и высушенное зерно. В качестве источника амилаз солод используют в производстве хлебобулочных изделий, полисолодовых экстрактов, пива, хлебного кваса и других безалкогольных напитков. Помимо α - и β -амилазы в солоде присутствуют α -глюкозидаза (мальтаза), фосфорилаза и инвертаза (сахараза) и др. α -Амилаза является эндоферментом и атакует внутренние гликозидные связи в молекуле крахмала. Для ее действия не имеет значения близость или удаленность нередуцирующих концевых остатков. α -Амилаза ускоряет гидролиз $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидных связей в молекуле крахмала без какого-либо определенного порядка, но преимущественно в середине цепи. Она не затрагивает $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидные связи, гидролиз прекращается на предпоследней $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидной связи (рис. 1). При гидролизе клейстеризованного крахмала α -амилазой вначале образуются менее вязкие, чем крахмал, низкомолекулярные декстрины, не окрашиваемые йодом, затем олигосахариды и даже глюкоза, мальтоза и декстрины:



α -Амилаза более устойчива к действию высоких температур, чем β -амилаза, например, зерновая α -амилаза может действовать в процессе выпечки хлеба.

β -амилаза – экзофермент, ускоряет реакцию гидролиза крахмала по $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидным связям, последовательно отщепляя остатки начиная с нередуцирующего конца молекулы крахмала (рис. 1). Ее действие прекращается в точках ветвления. В качестве главных продуктов ферментативного гидролиза крахмала под действием β -амилазы выступают β -мальтоза и β -предельные декстрины, содержащие $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидные связи:



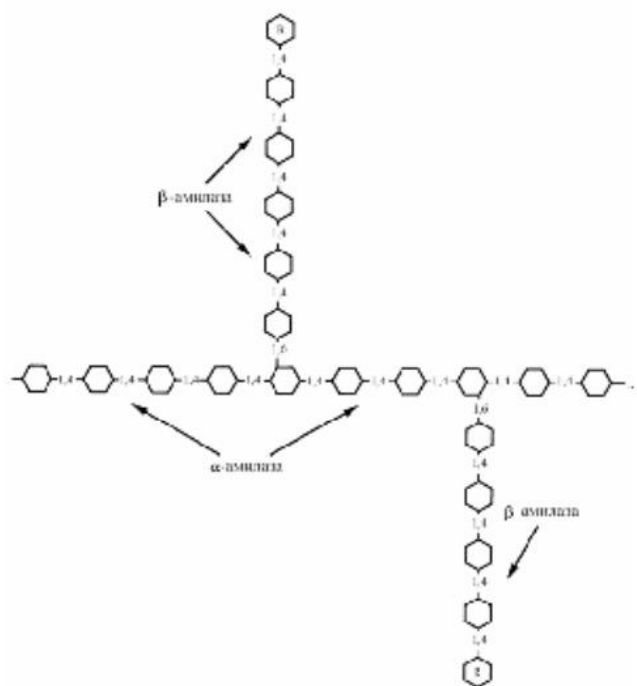


Рис. 1. Действие α - и β -амилазы на амилопектин (R-редуцирующий конец)

Фермент более активен в отношении высокомолекулярных субстратов, чем в отношении олиго- и дисахаридов. β -Амилаза менее термостабильна, чем α -амилаза, но более кислотоустойчива. Долгое время солод был единственным источником β -амилазы. В результате совместного действия α - и β -амилазы крахмал гидролизуеться с образованием смеси углеводов, состоящей из мальтозы, небольшого количества глюкозы и декстринов, в которых сосредоточены $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи. В связи с тем, что в промышленности обычно используют не индивидуальные амилазы, а ферментные препараты, содержащие целый набор ферментов, то для оценки их каталитической способности определяют амилолитическую и осахаривающую активность последних. Под амилолитической активностью понимают способность ферментного препарата гидролизовать крахмал до декстринов. Анализ ведут по качественной реакции с йодом. Амилолитическая активность солода обусловлена, главным образом, присутствием α -амилазы. 33 Под осахаривающей активностью амилолитических ферментных препаратов подразумевается их способность ускорять гидролиз крахмала до редуцирующих сахаров. Оценку осахаривающей активности ведут по качественной реакции на редуцирующие сахара (с реактивом Фелинга). Осахаривающая активность солода обусловлена присутствием β -амилазы. α -Амилазы являются пищеварительными ферментами, реализующими свои функции в пищеварительном тракте человека и животных. В плодах и семенах многих пищевых растений содержатся вещества, обладающие биологической активностью и подавляющие действие ферментов. Таким воздействием обладает альбуминовая фракция белков и представляющая собой в основном ферменты или ингибиторы ферментов, препятствующие гидролизу запасных веществ до момента прорастания семян. Данные белки отличаются высокой термостабильностью, выдерживают нагрев до 110°C . Они блокируют действие пищеварительных ферментов человека (трипсина, пепсина, химотрипсина, α -амилазы), снижая усвоение макронутриентов пищи. В клубнях картофеля содержится целый набор ингибиторов пищеварительных ферментов. В картофеле присутствуют мощные белковые ингибиторы, способные одновременно связывать амилазы и протеазы. Подобные белки присутствуют в рисе, ячмене, пшенице, ржи. В основе определения активности ингибиторов α -амилазы солода лежит количественная оценка убыли крахмала (по йодной пробе) в процессе гидролиза и накопления не окрашиваемых йодом декстринов.

Ход анализа

Выделение ферментов солода. α -Амилазу выделяют из основного ферментного комплекса солода путем инактивации β -амилазы. В колбу объемом 100мл поместить 20 мл основного раствора солода и прогреть при 70°C в течение 15 мин. β -Амилаза при указанной температуре инактивируется. Прогретый раствор охладить и использовать в дальнейшем для исследования активности α -амилазы. Так как оптимум активности α -амилазы лежит при pH 5,5...5,8, то после охлаждения к раствору добавить 4 мл фосфатного буфера pH 5,6.

β -Амилазу выделяют из солодовой вытяжки путем инактивирования α -амилазы в кислой среде. В колбу объемом 100 мл налить 20 мл основного раствора солода, выдержать в ледяной бане в течение 10 мин и прибавить 1 мл 0,1н раствора соляной кислоты. Полученный раствор оставить в ледяной бане на 15 мин и добавить 3 мл фосфатного буфера с pH 6,0 (оптимальный pH для β -амилазы). Определение амилолитической активности солода. В штативе расположить пронумерованные пробирки в три ряда. Во все пробирки первого ряда из пипетки налить по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку внести 1 мл раствора α -амилазы. Содержимое первой пробирки перемешать, продувая воздух из груши через пипетку. Отобрать из первой пробирки пипеткой 1 мл и перенести во вторую пробирку. Из второй пробирки после перемешивания отобрать 1 мл и перенести в третью пробирку. Аналогично методом последовательных разбавлений приготовить растворы в четвертой и пятой пробирках. В пробирки второго ряда добавить аналогичным образом раствор β -амилазы путем последовательного разбавления. В пробирки третьего ряда внести аналогичным образом основной раствор ферментного препарата солода. Во всех пробирках должно остаться по 1 мл соответствующим образом разведенных растворов ферментного препарата. Все пробирки термостатировать при температуре 40°C. Не вынимая пробирки из бани, добавить в каждую по 2 мл 0,1% раствора крахмала, спустя 10 мин внести по 2 мл рабочего раствора йода (приготовленного на 0,1н растворе соляной кислоты). Оптическую плотность окрашенных растворов измерить на фотоэлектроколориметре в кюветах с толщиной 10мм при светофильтре с длиной световой волны 670 нм. Остаточную концентрацию крахмала (Сост, мг/мл) в растворе найти по калибровочной кривой. Количество гидролизованного (X, мг) крахмала рассчитать по формуле

$$X = (C_{исх} - C_{ост}) \cdot V,$$

где $C_{исх}$ – концентрация крахмала в рабочем растворе, мг/мл; $C_{ост}$ – остаточная концентрация крахмала в рабочем растворе, найденная по калибровочному графику, мг/мл; V – объем рабочего раствора крахмала, мл

Таблица 5

Схема эксперимента и полученные результаты

Вариант	Кратность разбавления раствора солода	Оптическая плотность, нм			Количество гидролизованного крахмала X, мг		
		I	II	III	I	II	III
1	2						
2	4						
3	8						
4	16						
5	32						

Примечание. I – раствор α -амилазы; II – раствор β -амилазы; III – основной раствор ферментного препарата.

Заполнить табл. 5. Оценить глубину гидролиза и найти оптимальную концентрацию рабочего раствора солода. Определение осаживающей активности солода. В три плоскодонные колбы объемом 100 мл внести пипеткой по 10 мл 0,1% раствора растворимого крахмала, прогреть на водяной бане при темпера 40°C в течение 15 мин. Затем, не вынимая колб из бани, в первую прилить 2 мл раствора α -амилазы, во вторую – 2 мл раствора β -амилазы, в третью – 2 мл основного раствора солода. Содержимое пробирок

перемешать и выдержать при той же температуре 20 мин. По истечении этого времени ферментативный гидролиз остановить, нагрев все три колбы на кипящей водяной бане. Из всех трех колб отобрать по 1 мл полученных гидролизатов и перенести в отдельные пробирки, в которые заранее внести по 1 мл смеси реактивов Фелинг I и Фелинг II. Полученные растворы прогреть на кипящей бане в течение 5 мин. По интенсивности выпавшего осадка закиси меди оценить глубину гидролиза и количество образовавшихся восстанавливающих сахаров. На основании полученных данных сделать выводы о различиях в действии α - и β -амилаз. Ингибиторы амилаз солода Из основного раствора солода приготовить раствор с оптимальной концентрацией. В колбы объемом 100 мл внести рабочий раствор солода и воду согласно табл. 6. Содержимое колб перемешать и термостатировать при температуре 30°C течение 20 мин. Приготовить картофельный сок. Не вынимая колб из термостата, внести раствор ингибитора амилазы (картофельный сок) 36 и спустя 10 мин 0,1% раствор крахмала. Полученные растворы перемешать и сразу же отобрать по 2 мл полученной смеси в пробирки с заранее приготовленным рабочим раствором йода (2мл). Вторично отбирать пробы аналогичным образом в течение 15 мин (через каждые 5 мин).

Таблица 6

Схема и результаты эксперимента

Состав раствора, мл				Время гидролиза мин	Оптическая плотность нм	Количество гидролизованного крахмала, мг
Р-р солода	Ингибитор	Вода	Крахмал			
1,0	0,0	4,0	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	1,0	3,0	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	0,5	3,5	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	0,2	3,8	5,0	0		
				5		
				10		

Измерить оптическую плотность полученных окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре, найти по калибровочной кривой остаточную концентрацию крахмала (Сост, мг/мл) и рассчитать количество гидролизованного крахмала (X, мг): $X = (Сисх - Сост) \cdot V$, где V – объем исследуемой пробы, мл; Сисх – исходная концентрация крахмала в исследуемой пробе, мг/мл. Рассчитать ингибирующую активность (А, %) по формуле: $A = \frac{X_1 - X_2}{X_1} \cdot 100$, где X1 – количество гидролизованного крахмала в отсутствии ингибитора, мг; X2 – количество гидролизованного крахмала в пробе, мг; 100 – коэффициент пересчета в проценты.

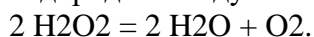
Оформление результатов работы 1. Записать в тетрадь ход работы. 2. Оформить результаты работы в виде таблицы (табл. 6).

Лабораторная работа № 6

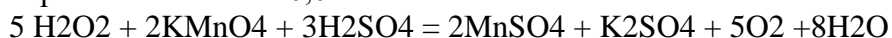
Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

Цель: Определить активность каталазы по методу Баха и Опарина

Оксидоредуктазы – класс ферментов катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс. Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения. Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД⁺, НАДФ, ФАД и ФМН, у некоторых флавиновых – кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталазы) – H₂O₂ (пероксид водорода). Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротейны). Каталаза (КФ 1.11.1.6) относится к гемопротейнам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород:



Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты образующие и обезвреживающие H₂O₂ находятся в пероксисомах – органеллах покрытых мембраной. Главными потребителями H₂O₂ являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов [2H] на H₂O₂, восстанавливая его до 2 H₂O. Молекулы пероксида водорода, невостребованные пероксидазами, обезвреживаются каталазой. Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H₂O₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода. Ход работы: 2-3 г сырого картофеля (или другого свежего растительного материала) тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклом. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике скальпеля CaCO₃ до прекращения выделения пузырьков CO₂. В процессе растирания в ступку добавляют небольшими порциями 40-50 мл воды. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять 10-15 мин и после перемешивания фильтруют. Берут две конические колбочки вместимостью 150-200 мл и вносят в них по 20 мл полученного фильтрата. Содержимое одной колбы кипятят в течение 1 мин и охлаждают до комнатной температуры (контроль). Другая колба опытная содержит активный фермент. К содержимому опытной и контрольной колб приливают по 20 мл воды и по 3 мл раствора с массовой долей H₂O₂ 1 %. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По окончании инкубации в обе колбы добавляют по 5 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 %, перемешивают и избыток H₂O₂ в каждой колбе оттитровывают раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л до образования розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Активность каталазы выражают в мкмоль пероксида водорода, расщепившегося под действием фермента в расчете на 1 г исследуемого материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. Вычисление ведут по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 20 \cdot 30}$$

где X – активность каталазы, Е/г; (a-b) – разность между объемами раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л, пошедшего на титрование контрольной (a) и опытной (b) проб, мл; Т – титр примененного для титрования раствора перманганата калия; 50 – коэффициент пересчета на мкмоль H₂O₂; 100 – общий объем приготовленного экстракта; m – масса взятого для анализа материала, г; 20 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл; 30 – время инкубации, мин. Принцип определения, порядок анализа и результат анализа записывают.

Контрольные вопросы:

1. Основные пути окисления субстратов в клетке.
2. Характеристика строения и действия НАД⁺ - и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
3. Характеристика строения и действия ФАД-зависимых дегидрогеназ.
4. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы.
5. Характеристика строения и действия пероксидаз и каталаз.
6. Характеристика строения и действия цитохромов.
7. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
8. Метод определения активности каталазы

Лабораторная работа № 7

Выделение ферментов методом фракционирования

Цель работы: освоить методики выделения и фракционирования белковых веществ

Для очистки ферментов применяют осаждение их из водных растворов органическими растворителями такими, как метиловый, этиловый, изопропиловый спирты, ацетон высаливание сульфатами аммония, натрия, цинка, хлоридом натрия фракционирование. Высушивание предварительно очищенных и сконцентрированных препаратов осуществляют в распылительных сушилках или методом сублимации.

Большинство ферментов являются лабильными белками. При переводе их в экстракт они лишаются своего естественного (в клетке) окружения и легко подвергаются денатурации и инактивации под влиянием различных факторов. В связи с этим при выделении и очистке ферментов необходимо соблюдать целый ряд предосторожностей. Как правило, все операции следует проводить при 2—4° С (лучше — в холодной комнате), а фракционирование органическими растворителями — при температуре ниже 0 С.

При выделении фермента используют метод фракционирования белков путем изменения рН. Очистка фермента на этой стадии достигается за счет денатурации белков, которые отделяют центрифугированием. Изменение рН белкового раствора следует осуществлять осторожно, по возможности не использовать сильные кислоты и щелочи. Рекомендуются добавлять уксусную кислоту, трис-буфер, карбонат натрия и др. Добавление соответствующего буфера или кислоты проводят на холоде. Их вносят по каплям, по стенке сосуда, при постоянном перемешивании. После нейтрализации раствора проводят короткую инкубацию при 25—30° С, чтобы перед центрифугированием произошла полная агрегация денатурированных белков.

Высаливанием называют процесс осаждения белка из раствора под действием нейтральных солей: NaCl, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄, MgCl₂ и другие. При высаливании белок выпадает в осадок, не подвергаясь денатурации.

При добавлении к растворам белка солей щелочных и щелочно-земельных металлов их ионы адсорбируются на противоположно заряженных группах частиц белка, делая их электронейтральными и тем самым, понижая устойчивость белков в растворе. Кроме того, соли щелочных и щелочно-земельных металлов растворяясь, связывают большие количества воды, что при достаточно высоких концентрациях ведет к дегидратации частиц белка и лишает их гидратной оболочки. Белок при этом выпадает в осадок.

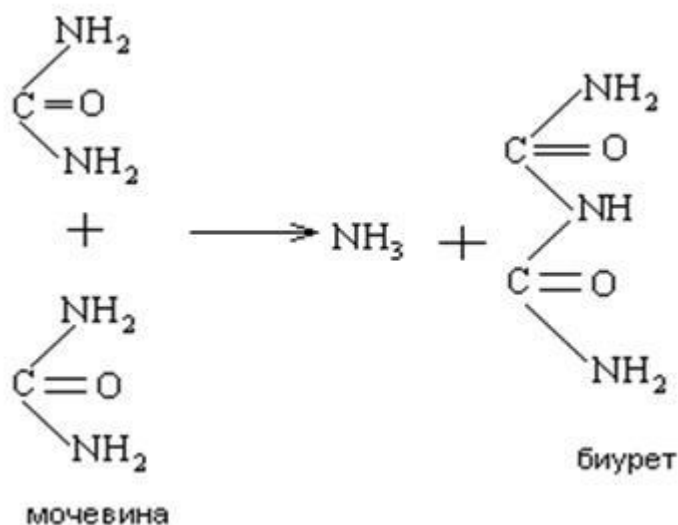
Для осаждения из раствора различных белков используют растворы соли разной концентрации. Глобулины, например, осаждаются полунасыщенным раствором сернокислого аммония, а альбумины – только насыщенным раствором. Это происходит из-за того, что частицы глобулинов значительно крупнее частиц альбуминов, это используется для разделения альбуминов и глобулинов.

Осаждающиеся при высаливании белки способны вновь растворяться в воде, т.к. макромолекулы белков при высаливании, как правило, сохраняют свои нативные свойства.

Приборы и реактивы: штатив с пробирками, воронки, фильтры бумажные, стеклянные палочки, пипетки, 1% раствор яичного белка, сульфат аммония кристаллический, сульфат аммония насыщенный раствор, 10 % раствор гидроксида натрия, 0,5 % раствор сульфата меди.

В пробирку прилить 2-3 мл раствора яичного белка и равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки тщательно перемешать и оставить на 10 минут. Выпадает хлопьевидный осадок глобулина. Осадку дают отстояться, после чего отфильтровать. К фильтрату добавить кристаллический сульфат аммония на кончике шпателя до насыщения; выпадает хлопьевидный осадок альбуминов. Осадок отцентрифугировать в течение 5 минут при 3000 оборотах в минуту. С фильтратом провести биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения. Осадок альбуминов из центрифужной пробирки перенести в пробирку и растворить в 2-3 мл воды. Раствор альбуминов отфильтровать и провести с ним биуретовую реакцию.

Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины – биурета, который дает эту реакцию. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака:



В присутствии солей меди в щелочной среде белки дают фиолетовое окрашивание. Окраску дает комплексное соединение меди с пептидными группами -CO – NH-.

Цвет комплекса, получаемый при биуретовой реакции с разными пептидами, зависит от длины пептидной цепи.

Пептиды с длиной цепи от четырех аминокислотных остатков и выше образуют красный комплекс, трипептиды – фиолетовый, а дипептиды – синий.

В пробирку с фильтратом налить 1 мл раствора едкого натра и 1-2 капли раствора сернокислой меди. При взбалтывании в случае присутствия белков появляется фиолетовое окрашивание.

В молоке общее содержание белков находится, как правило, в пределах 2,9-4,0%. Белки молока делят на две группы: казеиновые и сывороточные. Среди белков молока рассматривают: основных белков: казеины (α_{s1} -, α_{s2} -, β -), сывороточные белки (β -лактоглобулин, α -лактоальбумин), альбумин сыворотки крови, иммуноглобулины, β 2-микроглобулин, лактоферрин, церулоплазмин и компонент 3 протеозопептонов.

Основной белок коровьего молока – казеин – является фосфопротеидом. На его долю приходится около 80% белкового азота молока. Казеины – это группа гетерогенных фосфопротеидов, самоассоциирующихся в мицеллы в присутствии кальция, цитратов и фосфатов. Основная часть казеина (около 95%) в молоке содержится в виде казеиновых мицелл. Мицеллы соединены между собой с помощью кальция и мицелярного фосфата. Казеин можно выделить из молока добавлением уксусной кислоты до изоэлектрической точки (рН 4,6). Белок выделяется в виде мягкого, медленно оседающего осадка.

Приборы и реактивы: химический стакан на 100 мл; мерный цилиндр на 100 мл; стеклянные палочки; пробирки; воронки; бумажные фильтры; пипетки; 10% раствор уксусной кислоты; универсальная индикаторная бумага; 10 % раствор гидроксида натрия; молоко; азотная кислота концентрированная; гидроксид аммония концентрированный; спиртовка.

В стакан емкостью 100 мл налить 20 мл молока и прилить равный объем дистиллированной воды. К этой смеси осторожно, по стеклянной палочке прилить 10% раствор уксусной кислоты до рН 4,6 (2-3 мл уксусной кислоты), рН раствора определить с помощью универсального индикатора. Для этого стеклянной палочкой наносят каплю на универсальную индикаторную бумагу и по шкале определить рН. При рН 4,6 казеин выпадает в осадок. Ему дают отстояться 10 минут. Слить без взбалтывания надосадочную жидкость. В оставшийся осадок добавить по каплям 10% раствор гидроксида натрия до растворения осадка. Полученный раствор отфильтровать через влажный фильтр. С фильтратом провести цветные реакции (биуретовую и ксантопротеиновую).

Подавляющее большинство белков и пептидов при нагревании с крепкой азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи или аммиака. Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот. При действии крепкой азотной кислоты на эти аминокислоты происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета.

В пробирку с фильтратом прилить 5-6 капель концентрированной азотной кислоты. Появляется осадок свернувшегося белка, который при осторожном нагревании окрашивается в желтый цвет. Дать пробирке охладиться и осторожно прибавить концентрированный аммиак.

Приготовить 2 пробы А и Б. Навески исследуемого продукта взять из расчета, что проба А должна содержать около 15 мг гистидин + аргинин + лизин, проба Б – 15 мг гистидин + аргинина (расчет провести, исходя из содержания белка в продукте и его аминокислотного состава). Навески продукта поместить в коническую колбу на 250 мл, прилить в каждую колбу по 6 мл дистиллированной воды и оставить на 10 минут. В колбу Б внести 0,4 мл пропионового ангидрида и помещают на лабораторный встряхиватель на 15 минут. Далее обработку проб А и Б проводят одновременно.

В обе колбы добавить по 40 мл раствора красителя, встряхивать в течение 90 минут. Содержимое колб отфильтровать через стеклянные фильтры, отобрать пипеткой по 1 мл

каждого фильтрата и внести в мерные цилиндры. Довести объем в цилиндрах до 75 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать. Полученные растворы проб А и Б колориметрировать на спектрофотометре, при тех же условиях, что стандартные растворы для построения градуировочного графика. Для последующей обработки результатов используют только данные, находящиеся в пределах от 0,2 до 0,3 единицы оптической плотности, при этом разность между показателями А и Б не должна превышать 0,05 единицы оптической плотности.

На основании полученных для обеих проб величин оптической плотности по градуировочному графику устанавливают количество несвязанного красителя в ммольях (C_A и C_B).

Массовую долю доступного лизина (х) в мг/100г продукта вычислить по формуле:

$$X = \left(\frac{C - C_A}{m_A} - \frac{C - C_B}{m_B} \right) \cdot 2 \cdot 100 \cdot M, \text{ где}$$

C – исходное содержание красителя в рабочем растворе ($C = 0,0784$ ммоль)

C_A – содержание несвязанного красителя в пробе А, ммоль;

C_B – содержание несвязанного красителя в пробе Б, ммоль;

m

m_A – масса навески в пробе А, г;

m_B

m_B – масса навески в пробе Б, г;

M – молекулярная масса лизина, ($M=146,19$);

2 – коэффициент, учитывающий, что 1 молекула «Оранж Ж» связывает 2 молекулы лизина.

Полученные результаты записываются в таблицу 4.

Таблица 4

Пробы	Содержание несвязанного красителя	Масса навески	Массовая доля доступного лизина

Контрольные вопросы

1. Какие белки легче высаливаются – альбумины и глобулины?
2. В некоторых случаях перед высаливанием белков их приводят в состояние изoeлектрической точки. Зачем это делают?
3. Каков механизм образования гидрофильной оболочки белков?
4. Чем отличается денатурация от высаливания?

Лабораторная работа № 8

Определение активностей ферментов, участвующих в деградации нафталина

Цель: Определить активность ферментов нафталин деградирующих микроорганизмов

Материалы и оборудование

Штамм-деструктор нафталина *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141), ультразвуковой дезинтегратор, спектрофотометр, центрифуга, pH-метр, компьютер

Растворы

50мМ KH_2PO_4 pH 7,0 буфер; 50мМ KH_2PO_4 pH 7,5 буфер; 1М трис-HCl pH 8,0 буфер; 20мМ раствор НАДН; 20мМ раствор салицилата натрия; 0,1М раствор катехола; 20мМ спиртовой раствор нафталина; 0,5 М ЭДТА pH 8,0

Основные положения

Определение активностей ферментов проводят в бесклеточных экстрактах. Культуры выращивают на минимальной среде Эванса с нафталином, фенантроном, салицилатом, 1-гидрокси-2-нафтоатом, протокатехатом или сукцинатом, в качестве источника углерода. Бактерии, используемые в экспериментах по изучению индукции ферментов, выращивают в минеральной среде, содержащей 1 г/л сукцината или глутамат натрия. Салицилат и 1-гидрокси-2-нафтоат (в концентрации 0.1 г/л) добавляют в начале экспоненциальной фазы роста клеток, после чего клетки выращивают еще в течение двух часов.

1. Приготовление бесклеточных экстрактов с помощью ультразвукового дезинтегратора

Бактериальные клетки выращивают до логарифмической фазы роста, осаждают центрифугированием (5000 об/мин, 0°C, 10мин), отмывают охлажденным 0,05 М фосфатным буфером pH 7,0 (дважды) и ресуспендируют в этом же буфере до плотности 0,2 ($\lambda=490$ нм, толщина кюветы 1 см). Клетки разрушают на ультразвуковом дезинтеграторе MSE150 в течение 1,5 минут при 0°C. Обломки клеток удаляют центрифугированием (15000 об/мин, 10 мин, 0°C).

2. Определение активностей ферментов

Супернатант немедленно используют в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов.

В реакционную смесь с конечным объемом 3 мл вносят 100 мкл экстракта. Определение активностей проводят при 30°C, начиная реакцию внесением клеточного экстракта или субстрата, на UV-160А спектрофотометре (Shimadzu, Япония) или UVIKON-спектрофотометре 810P (Kontron Instruments, Германия).

Активность фермента нафталиндиоксигеназы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащей 100 мкМ НАДН и 100 мкМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220$

мМ⁻¹ см⁻¹). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность фермента салицилатгидроксилазы определяют спектрофотометрически по уменьшению экстинкции НАДН реакционной смеси, содержащий 100 мкМ НАДН и 100 мкМ салицилат, бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер рН 7.5, учитывая эндогенное потребление НАДН бесклеточным экстрактом ($\lambda=340$ нм, $\epsilon=6.220$ мМ⁻¹ см⁻¹ для салицилата). Удельную активность фермента выражают в микромолях потребленного НАДН в минуту на мг белка, учитывая эндогенное окисление НАДН.

Активность катехол-2,3-диоксигеназы определяют по скорости образования α -оксимуконного полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0.5 мМ катехола, бесклеточный экстракт и 0.05 М Трис-НСl буфер [рН 7.5] ($\lambda=375$ нм, $\epsilon=33.4$ мМ⁻¹ см⁻¹). При высоких скоростях реакции бесклеточный экстракт разводят буфером в 10 раз. При наличии активности катехол 1,2-оксигеназы (K12O) этот фермент инактивируют нагреванием клеток или бесклеточного экстракта при 55°C в течение 10 минут. Удельную активность фермента выражают в микромолях образовавшегося α -оксимуконного полуальдегида в минуту на мг белка.

Активность катехол-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей 5 мМ Na ЭДТА, 1 мМ катехола, бесклеточный экстракт, 0.05 М фосфатный буфер [рН 7.0] ($\lambda=260$ нм, $\epsilon=16.9$ мМ⁻¹ см⁻¹). Добавление ЭДТА необходимо для ингибирования муконлактонизирующего фермента. Предварительно клетки обрабатывают H₂O₂ (30 мМ) для инактивации катехол 2,3-оксигеназы (K23O). Удельную активность фермента выражают в микромолях превращенного в *цис-цис*-муконат катехола в минуту на мг белка.

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяют по скорости образования малеил-пирувата в реакционной смеси, содержащей 100 мкМ гентизат, 3 мкМ сульфат железа (II), бесклеточный экстракт и 0.1 М фосфатный буфер [рН 7.4] до конечного объема 3 мл ($\lambda=334$ нм, $\epsilon=10.8$ мМ⁻¹ см⁻¹).

Объем реактивов в кювете для измерения активности ферментов

Нафталиндиоксигеназа	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РO ₄ буфер [рН 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ спиртовой раствор нафталина	15 мкл
Салицилатгидроксилаза	λ 340 нм
50 мМ КН ₂ РO ₄ буфер [рН 7.5]	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл

20 мМ раствор НАДН	15 мкл
20 мМ раствор салицилата натрия	15 мкл
Катехол-1,2-диоксигеназа	λ 260 нм
50 мМ KH_2PO_4 (рН 7,0) буфер	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.5 М ЭДТА	30 мкл
0.1 М раствор катехола	30 мкл
Катехол-2,3-диоксигеназа	λ 375 нм
50 мМ трис-НСl буфер [рН 7,5]*	2900 мкл
бесклеточный экстракт	100 мкл
0.1 М раствор катехола	15 мкл

Прим. * – для приготовления трис-НСl буфера трис(оксиметил)аминометан растворяют в бидистиллированной воде и доводят рН соляной кислотой

4. Определение концентрации белка в бесклеточных экстрактах по методу Бредфорда

Для получения реагента-красителя кумасси бриллиантовый синий G-250 (100 мг) растворяют в 50 мл 95% этанола. Добавляют 100 мл 85% (масса/объем) фосфорной кислоты. Доводят водой до 1 л.

Используют образец (разбавленный в случае необходимости), содержащий 10-100 мкг белка в 0.1 мл. Добавляют 5.0 мл реагента-красителя и хорошо перемешивают. Не ранее, чем через 5 мин, и не позднее, чем через 1 час, измеряют показание оптической плотности при 595 нм относительно чистого реагента. Для микроанализа используют образец, содержащий 1-10 мкг белка в 0.1 мл, добавляют 1.0 мл раствора красителя, смешивают и определяют поглощение при 595 нм, как описано выше. Концентрацию белка находят по градуировочному графику, построенному с помощью белка (бычий сывороточный альбумин). Могут быть небольшие отклонения от линейности.

5. Определение концентрации белка спектрофотометрически

Метод не так точен, как метод Бредфорда, но очень прост и используется как прикидочный. Используя UV-160A спектрофотометр (Shimadzu, Япония) задаем параметры двух длин волн: 280 и 260 нм. В кювету с 2900 мкл фосфатного буфера вносим 100 мкл бесклеточного экстракта. Контрольная кювета - 3000 мкл фосфатного буфера. Затем по формуле рассчитываем концентрацию белка в мг.

$C \text{ (мг общего белка /мл)} = (1,55 \times E_{\lambda 280} - 0,76 \times E_{\lambda 260}) \times \text{разведение (30 раз)}$

6. Расчет активности ферментов

Удельную активность ферментов выражают в микромолях потребленного субстрата (кофактора) (или образующегося продукта (кофактора)) в минуту на 1мг общего бактериального белка. Значения удельных активностей ферментов рассчитывают, используя компьютерную программу «Enzyme» (ИБФМ, Россия) или стандартную формулу.

Формула для определения активности фермента

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \times \frac{V_1}{V_2} \times 10^3 = \frac{\text{мкМ}}{\text{мин} \cdot \text{л}}$$

ΔE – изменение оптической плотности раствора,

Δt – время измерения (1 мин)

ε – коэффициент экстинкции субстрата

d – расстояние, проходимое лучем

V_1 – объем реакционной смеси (3000 мкл)

V_2 – объем клеточного экстракта (100 мкл)

Наиболее принятой единицей активности является стандартная единица (Ед). Под ней понимают то количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ субстрата в минуту при оптимальных условиях для данного фермента (температура, рН). Существует также понятие *удельной активности*, которая выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка в ферментативном препарате (Ед/мг).

Методика

1. Вырастить культуру микроорганизма (250 мл) в минеральной среде, содержащей нафталин или салицилат в качестве источника углерода, до середины логарифмической фазы роста.
2. Клетки осадить центрифугированием.
3. Клетки дважды отмыть 50 мМ фосфатным буфером рН7.0 от среды.
4. К осадку добавить 1 мл 50 мМ фосфатного буфера, клетки аккуратно ресуспендировать.
5. Разрушить клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора.
6. Отделить разрушенные клетки центрифугированием на 10000 g в течение 20 минут.
7. Супернатант (надосадочная жидкость) перенести в чистую пробирку. Поместить пробирку в лед.
8. Измерить активности ферментов на спектрофотометре, как описано выше.
9. Оценить концентрацию белка в бесклеточном экстракте, используя спектрофотометрический метод.
10. Определить концентрацию белка (метод Бредфорда)*
11. Рассчитать удельную активность ферментов.

Примечание

*Чтобы точно оценить концентрацию белка, используя метод Бредфорда, исследуемый образец должен содержать от 100 мкг до 1 мг белка в 1 мл. В случае, когда в образце по результатам спектрофотометрического метода концентрация выше указанной – делайте разведения.

Контрольные вопросы

- 1. Почему измерение производится при длинах волн 340нм, 375нм, 260нм, 334нм?***
- 2. Каков физический смысл коэффициента молярной экстинкции?***
- 3. Каков принцип действия ультразвукового дезинтегратора? Какие еще методы разрушения бактериальных клеток существуют?***
- 4. Какими методами определяют концентрацию белка?***
- 5. Как рассчитать активность фермента?***
- 6. В каких единицах измеряется активность ферментов? Каков их физический смысл?***