

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
« Открытия 2030»

Исследование ферментативной активности проростков

Исследовательский проект

Автор:

Калугин Георгий Владимирович,
10 класс, МБОУ «СОШ № 121 г.
Челябинска»,

Научный руководитель:

Лисун Наталья Михайловна,
к.п.н., доцент, учитель биологии
МБОУ «СОШ № 121 г. Челябинска»

Челябинск, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОРОСТКОВ	
1.1 Физиология проростков.....	4
1.2 Биохимические изменения в семени при прорастании.....	8
ГЛАВА 2 ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОРОСТКОВ	
2.1 Методы исследования ферментативной активности проростков.....	11
2.2 Анализ проведенных исследований.....	14
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	17
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	24

ВВЕДЕНИЕ

С древних времён считается, что проростки – это самая богатая ферментами пища на всей планете. Регулярное питание проростками улучшает общее состояние организма, работу нервной и кровеносной систем, работу сердца, органов дыхания и пищеварения. Питание проростками способствуют омоложению всего организма, восстановлению обмена веществ и снижению веса, улучшению состояния волос, зубов, ногтей и т.д.

Широко известно, что пищеварение и метаболизм в организме человека происходит за счет работы энзимов – ферментов. Ферменты являются важным компонентом для поддержания жизненной активности, поэтому они есть у большинства растений и животных. Следовательно, употребление энзимов способствует оздоровлению.

Рекомендуют употреблять в пищу, проростки семян, выращенные не более пяти дней, так как большинство ферментов снижают свою активность на пятый день. Проверим эту гипотезу.

Целью работы является обнаружение, и изучение активности ферментов овса в зависимости от времени замачивания.

Задачи работы:

- 1) Изучить физиологию проростков и биохимические изменения, протекающие в проростках семян;
- 2) Изучить химический состав семян овса;
- 3) Определить ферментативную активность проростков овса.

Гипотеза исследования: большинство ферментов проростков семян снижают свою активность на пятый день.

Предмет исследования: активность ферментов проростков овса.

Объект исследования: биохимические процессы прорастания семян.

Для достижения поставленных задач были использованы следующие методы: анализ литературных источников; фотоколориметрический метод; титрометрический метод; статистический метод.

ГЛАВА 1. МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОРОСТКОВ

1.1 Физиология проростков

Прорастанием называется совокупность физических и биохимических изменений, происходящих в семенах в процессе их перехода из состояния покоя к активной жизнедеятельности, которая заканчивается образованием проростка, то есть новообразования, способного расти и дать растение. Различают два понятия: процесс прорастания, если говорят о качественных изменениях при прорастании, и период прорастания, если имеют в виду изменения во времени, то есть продолжительность тех или иных преобразований.

Период прорастания состоит из последовательных этапов – фаз прорастания. Каждой фазе присуща определенная продолжительность, определенные биохимические и морфологические изменения, происходящие в семени, а также определенные требования к условиям среды. Всего можно выделить пять фаз: 1) водопоглощения; 2) набухания, заканчивающегося наклевыванием; 3) роста первичных корешков; 4) развития ростка; 5) становления проростка. Рассмотрим подробнее сущность каждой фазы.

Фаза водопоглощения. Сущность ее заключается в том, что сухие семена, находящиеся в состоянии покоя, поглощают воду из воздуха или из какого-либо субстрата до наступления критической влажности, которая является строго определенной величиной для каждой культуры. Поступающую воду поглощают гидрофильные коллоиды семени, она включается в содержимое клетки, где связывается различными ее соединениями, и поэтому в семени не происходит заметной активизации биохимических процессов и не наблюдается никаких изменений в морфологии. Поглощение воды может несколько повысить интенсивность дыхания семян (к концу фазы в 2–3 раза), но общий ее уровень остается очень низким.

В этой фазе сухие семена могут всасывать воду с колоссальной силой, достигающей многих десятков атмосфер, а у сорных растений – даже несколько сотен атмосфер. Семена всех культур способны пройти эту фазу путем поглощения воды из воздуха, если относительная влажность его будет выше 75%. Основа фазы водопоглощения – физико-химическое явление, сорбция, но одновременно происходят и некоторые биохимические изменения, связанные с включением в конституцию клеток дополнительных молекул воды.

Продолжительность фазы зависит от состояния семян, температуры и влажности субстрата, с которым соприкасается семя. Если влажность зерна пшеницы 8%, а его критическая влажность 14,5%, то зерно должно поглотить недостающее количество воды (6,5%), прежде чем появятся условия для прохождения второй фазы – набухания. Естественно, что продолжительность фазы будет различна – довольно большая, если влага поступает из воздуха, или очень короткой, если семена находятся в воде. Однако в последнем случае, хотя общая влажность зерна достигает критической в течение всего нескольких часов (в зависимости от температуры и других факторов), но для равномерного насыщения клеток требуется еще некоторое время, и только после такого распределения влаги наступает вторая фаза.

Фаза набухания семян начинается с момента появления в семенах свободной влаги (то есть при влажности выше критической), которая активизирует жизнедеятельность клеток, усиливает гидролитические процессы, переводит в активное состояние ферментную систему, ведет к перестройке коллоидов. При этом дыхательный коэффициент увеличивается в сотни и даже в тысячи раз. Заканчивается фаза наклеванием.

В литературе, освещающей поглощение семенами воды, эти фазы водопоглощения и набухания не расчленены, и весь процесс носит название набухания семян, что в принципе не верно. Выделение этих фаз стало возможным потому, что качественный перелом в жизни семян, связанный с

критической влажностью, получил достаточно полное освещение только в последнее время.

Сущность процесса набухания заключается в том, что молекулы воды проникают в среду высокомолекулярных соединений и раздвигают отдельные звенья в цепи их молекул. Все это вызывает не только ослабление самих цепей молекул, но и сопровождается гидролизом последних, что ведет к интенсификации всех жизненных процессов. В процессе набухания семян оболочки их приобретают эластичность, а само семя увеличивается в объеме.

Процесс набухания семян, так же, как и водопоглощение, может характеризоваться двумя показателями: 1) степенью набухания – это количество воды в граммах, поглощенное семенами в фазе набухания в пересчете на 1 г сухого вещества; 2) числом набухания – количество воды в миллилитрах, которое поглощается 1 мл сухого вещества семени.

Фаза набухания заканчивается поглощением определенного количества воды, которое обеспечивает протекание всех жизненных процессов, связанных с прорастанием. В зависимости от химического состава семян и их природы требуется разное количество воды для наклевывания семян.

Набухание прекращается или вследствие полного насыщения клеток, или из-за наступления равновесия между поступлением воды в семена и диффузией растворимых веществ из него.

Для нормального протекания этой фазы требуется определенная температура, влажность и кислород. При подсыхании наклюнувшихся семян возможно возвращение в предыдущую фазу, исходную.

Фаза роста первичных корешков начинается с момента деления клеток первичного корешка, но морфологически ее можно зафиксировать несколько позже – при появлении над оболочкой семени первичного корешка. В этой фазе, кроме роста корешков, происходит новая качественная перестройка биохимических процессов, подготавливающая условия для возможности роста ростка (в корнях синтезируются витамины и т.п.). Для нормальной биохимической перестройки и роста корешков требуется иной

гидротермический режим, чем для протекания других фаз. Заканчивается фаза готовностью семени к развитию ростка.

Для большинства культур еще возможно прекращение прорастания семян на этой фазе и возвращение их в исходное состояние (состояние покоя), хотя для некоторых культур такой переход связан уже с нарушением физиологии и морфологии прорастания.

Фаза развития ростка начинается с появлением ростка. Продолжается дальнейший рост корешков, но уже имеются все возможности и для развития ростка, который также интенсивно растет. Но здесь уже требуются иные условия питания и внешней среды.

Из этой фазы уже нет возврата в состояние покоя, и при подсыхании развивающееся семя гибнет. Это тот рубеж, где начал жизнь проросток, он еще не полноценное растение, но уже и не семя. Фаза оканчивается с появлением у проростка сформированного колеоптиля у злаков или с формированием почечки у других культур.

На этой фазе и заканчивается процесс прорастания семян, но молодой проросток еще является объектом семеноведческих исследований. Развивающийся проросток находится в сложной зависимости от экологических условий, но еще не порвал связи с семенем, получая от него основное питание и некоторые специфические соединения. Эту фазу, которая продолжается до перехода проростка на автотрофное питание. Она также обусловлена определенными требованиями к экологической среде.

Проросшими семенами следует считать только те, которые имеют сформированный проросток (появление ростка с первичными корешками), если нет ростка, то независимо от длины корешков семена нельзя назвать проросшими, а только прорастающими (то есть находящимися на разных фазах прорастания).

1.2 Биохимические изменения в семени при прорастании

Известно, что в покоящихся семенах ферменты, ауксины и витамины находятся в связанной форме, а с поступлением воды начинается их переход в физиологически активное состояние. Поэтому в прорастающем семени возрастает содержание витаминов (аскорбиновой и никотиновой кислот, рибофлавина, пиридоксина, фолиевой кислоты и др.), а также холина, органических кислот и некоторых других веществ. Количество этих веществ увеличивается не только вследствие освобождения их из связанной формы, но и благодаря биосинтезу.

Физиологически активные вещества концентрируются преимущественно в зародыше, в щитке и в алейроновом слое, то есть вблизи основного местонахождения запасных питательных веществ – эндосперма. Такое расположение способствует быстрому переходу их в активные формы (вода поступает, прежде всего, в эти части семени), а затем происходит и гидролиз питательных веществ. Как идет гидролиз, лучше рассмотреть по группам семян в зависимости от характера запасных питательных веществ.

Семена крахмалистые. Вода, поступающая в щиток зародыша, активизирует ферменты, которые через особые всасывающие клетки эпителиальной ткани проникают в соприкасающиеся с ней слои эндосперма. Под воздействием ферментов амилазы происходит распад клеток полисахаридов (в основном крахмала, но в этот процесс могут вовлекаться и другие полисахариды, при этом крахмальные зерна как бы подвергаются коррозии) на более подвижные соединения – декстрины и мальтозу. Как только появилась мальтоза, тотчас же активизируется фермент мальтаза, которая расщепляет мальтозу до глюкозы, не только служащей энергетическим материалом, но и идущей на построение клеток тела. Глюкоза в особом транзитном соединении проникает через щиток к зародышу, где и происходит синтез новых веществ. Одновременно накапливается сахароза, которая образуется благодаря действию фосфоролитических и других ферментов. В этом процессе гидролиза

сложных углеводов принимают участие и ферменты эндосперма, которые активизируются водой и поступившими ферментами из зародыша.

Ферменты из щитка одновременно поступают в эндосперм и в зародыш, где сразу же начинается процесс гидролиза и синтеза. Естественно, что в этих процессах принимают участие сложные системы ферментов. Зародыш может расти и за счет своих запасов, которые мобилизуются ферментами, но их явно недостаточно для нормального роста проростка, с другой стороны, семена крупные, как правило, имеют избыточный запас эндосперма, который в нормальных условиях не может, быть использован (например, у кукурузы и др.).

Как известно, в составе эндосперма семян многих растений содержатся не только углеводы, но и другие органические соединения – жиры, белки и т.п. По мере расходования запасов углеводов, а на некотором этапе и одновременно с ним идет гидролиз сначала жиров, а затем белков. Для этого требуется больше энергии, но, вероятно, для синтеза белков в прорастающем семени легче воспользоваться готовыми аминокислотами, которые получают в процессе гидролиза белков семян, чем синтезировать белок из элементарных частиц. Во всяком случае, гидролиз белков идет даже тогда, когда еще имеются более доступные углеводные соединения.

При прорастании сильно увеличивается количество и состав витаминов, являющихся материалом для построения ферментов, необходимых для ростовых процессов. Возрастает также интенсивность дыхания.

При прорастании масличных семян под действием липазы жир гидролизуются на глицерин и свободные жирные кислоты, которые очень легко используются при различных синтезах, протекающих в ростках. Распад идет до низкомолекулярных соединений, содержащих всего 2-3 углеводных атома в молекуле, используемых непосредственно или путем последующего синтеза. При прорастании потребляются преимущественно ненасыщенные

кислоты. В прорастающих семенах подсолнечника ненасыщенные кислоты превращаются в насыщенные.

Под действием липазы у фосфатидов отщепляются молекулы жирных кислот от глицерина. Оставшаяся часть молекулы фосфатида гидролизуется под действием фосфатазы. Продукты расщепления фосфатидов – глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистое основание – вовлекаются в реакции обмена веществ. Главным продуктом, возникающим в результате распада жира, является сахар, который в прорастающих семенах накапливается за счет жира.

Семена белковые обычно содержат и углеводы, и жиры, но их количество недостаточно для роста зародыша, и поэтому в гидролиз вовлекаются и белковые соединения, которые после дезаминирования аминокислот используются на дыхание и синтез других веществ. Крахмал при прорастании используется в первую очередь.

Всякое прорастание сопровождается не только перестройкой органических веществ, но и их потерей на дыхание и синтез. Накопление органического вещества начинается только с началом фотосинтеза.

При прорастании под действием протеолитических ферментов белки расщепляются на свободные аминокислоты, которые затем используются на питание развивающихся зародышей и построение ростка.

В прорастающих семенах найдены лейцин, тирозин, аргинин, лизин, аспарагин, глютаминовая и другие кислоты, образовавшиеся в результате расщепления белков. Особенно возрастает содержание нуклеиновых кислот.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОРОСТКОВ

2.1 Методы исследования ферментативной активности проростков

Для исследования были взяты семена овса. Проростки овса имеют молочно-ореховый, сочный вкус. Они богаты витаминами С, Е и К, кальцием, железом, магнием, кремнием, хромом, цинком.

Особую пищевую ценность в составе проростков овса имеют белки. Общее содержание белка в семени овса колеблется от 9 до 19,5%. Соотношение различных белков в зерне овса представлено в таблице 1.

Таблица 1

Фракционный состав белков зерна овса

Наименование	Содержание азота в навеске, %		Соотношение между наименьшим и наибольшим содержанием	Среднее содержание к общему азоту, %
	колебания	среднее содержание		
Общее содержание азота	1,51-2,34	2,08	1:1,55	100
Альбумины	0,18-0,34	0,26	1:1,88	12,5
Глобулины	0,17-0,55	0,36	1:3,23	17,3
Проламины	0,12-0,58	0,48	1:4,83	23,1
Глютелины	0,41-0,80	0,61	1:1,86	29,3
Белковый азот	-	1,71	-	82,2
Азот, нерастворимый осадок	0,27-0,53	0,37	1:2,00	17,80

По фракционному составу белков зёрна овса сильно отличаются от белков зерна пшеницы, ржи и ячменя. Преобладающий белок у овса – глютелины, затем проламины и глобулины. Общее содержание белка в разных сортах овса колеблется незначительно, чего нельзя сказать об аминокислотах. Аминокислотный состав белков овса представлен в табл. 2.

Для белков зерна овса по сравнению с белками зерна пшеницы и ячменя характерно повышенное содержание аргенина и резко сниженное содержание глутаминовой кислоты. В белках зерна овса отмечено так же

высокое содержание незаменимой аминокислоты лизина – почти в два раза больше, чем в белках пшеницы.

Белки зерна овса характеризуются высокой биологической активностью.

Таблица 2

Аминокислотный состав белка зерна овса, г в 100 г белка

Наименование	Колебания	Среднее содержание	Наименование	Колебания	Среднее содержание
Глутаминовая кислота	21,5-22,7	22,0	Серин	4,0-4,4	4,1
Аспарагиновая кислота	8,6-9,8	9,1	Изолейцин	3,9-4,2	4,0
Аргенин	7,5-7,9	7,7	Тирозин	3,2-3,7	3,4
Лейцин	7,5-7,9	7,7	Треонин	2,9-3,1	3,0
Фенилаланин	5,2-6,4	5,7	Гистидин	2,5-2,7	2,6
Валин	5,6-5,8	5,7	Метионин	1,6-2,6	2,3
Аланин	5,0-5,3	5,1	Цистин (1/2)	1,7-2,1	2,0
Глицин	4,5-5,0	4,7	Амидный NH ₃	2,7-2,9	2,8
Лизин	4,4-4,8	4,4	Общее содержание белка, %	13,30-14,99	14,1

Большое количество белка в зернах овса, как и в любом живом организме, приходится на ферменты – биологические катализаторы белковой природы, обладающие способностью активизировать различные химические реакции, происходящие в живом организме. Определить активность ферментов возможно двумя основными способами: либо по расходу исходных веществ, либо по возрастанию продуктов реакции.

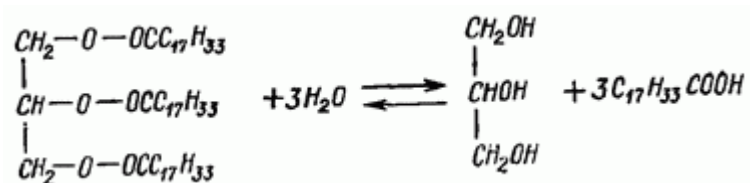
Наиболее популярные методы определения активности ферментов в проростках семян:

1. Определение активности амилаз по Вольгемуту. Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

2. Определение активности протеаз по методу Ансона. По методу Ансона активность протеаз оценивают по количеству аминокислоты тирозина, образующейся, как и другие протеиногенные аминокислоты, в процессе гидролиза белков под действием этих ферментов. Концентрацию тирозина определяют колориметрическим методом с использованием реактива Фолина или спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

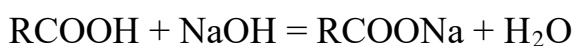
Непрореагировавший белок осаждают, а белок, подвергшийся гидролизу пропорционально содержанию тирозина, определяют колориметрически реакцией Фолина. Полученные величины оптической плотности подставляют в формулу и рассчитывают протеолитическую активность ферментного препарата. Протеолитическая активность характеризует способность ферментов катализировать расщепление белка до пептидов и аминокислот и выражается числом единиц протеазы в 1 г очищенного препарата.

3. Метод определения активности липазы. Липазы катализируют реакцию гидролитического расщепления сложноэфирных связей в молекулах жира, в результате которой освобождаются глицерин и жирные кислоты:



Гидролитическую активность липазы можно определить с помощью различных методов: титриметрического, сталагмометрического, колориметрического и ряда других.

Титриметрический метод основан на определении количества жирных кислот, образующихся при действии липаз на растительный жир. Титрование образовавшихся кислот щелочью происходит по схеме:



2.2 Анализ проведенных исследований

Семена овса замачивались на один, три и пять дней с целью отследить, как вместе с биохимическими процессами меняется активность ферментов. Для проращивания необходимо промытые семена залить водой до 2/3 объема банки и оставить их при комнатной температуре, но не на прямом солнечном свете. Воду использовать лучше всего либо пропущенную через фильтр, либо родниковую.

Исследование было начато с определения активности амилазы по Вольгемуту. Промежуточные результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3

Определение активности амилаз по Вольгемуту

1	2	3	4	5	6	7
1\2	1\4	1\8	1\16	1\64	1\128	1\256
Окраска растворов однодневных проростков						
Синий	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий	Желтый
Окраска растворов трехдневных проростков						
Синий	Синий	Синий	Синий	Желтый	Желтый	Желтый
Окраска растворов пятидневных проростков						
Синий	Синий	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый

Определив степень гидролиза крахмала по цвету раствора, можно рассчитать активность амилазы. Результаты расчётов представлены в виде диаграммы (рис.1).

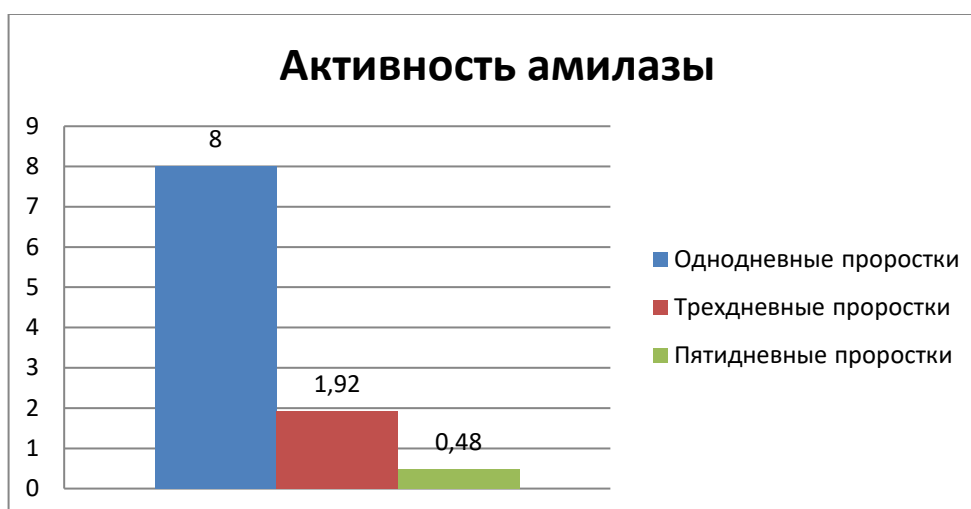


Рис.1. Активность амилазы в проростках семян овса

Таким образом, активность амилазы выше всего в однодневных проростках. Это связано с тем, что для прорастания семени необходимо большое количество сахаров, которые в первые дни не могут образовываться в процессе фотосинтеза, так как в семени нет хлорофилла.

Определение активности протеаз позволило сделать вывод, что пик активности данного фермента приходится на первые дни прорастания семени (рис.2). Для прорастания семян необходим пластический материал, не только в виде углеводов, но и в виде аминокислот. Поэтому в проростках большое количество протеаз – ферментов расщепляющих белок по пептидным связям, с образованием аминокислот.

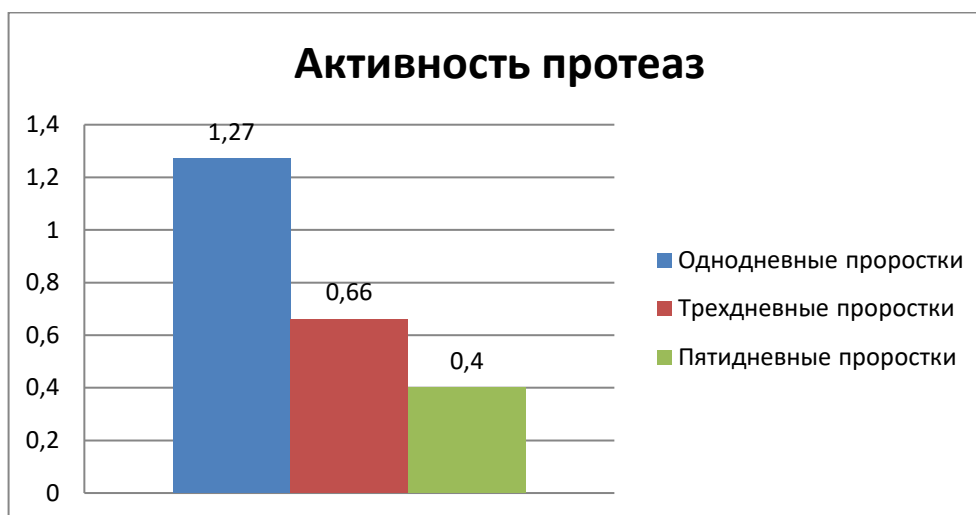


Рис.2. Активность протеаз в проростках семян овса

Исследование активности липаз в проростках овса показало, что с каждым днём активность липазы возрастает почти в три раза (рис.3). Овёс не является масличным растением, поэтому ни его зародыш, ни семя не обладают большим количеством жиров.

В проростках семян с увеличением в размерах начинаются активные метаболические процессы, в ходе которых образуются составляющие жиров: трехатомный спирт глицерин и высшие жирные кислоты. Липазы – ферменты, расщепляющие жиры и высшие жирные кислоты. Следовательно, чем выше уровень жиров в растительном организме, тем выше активность липаз.

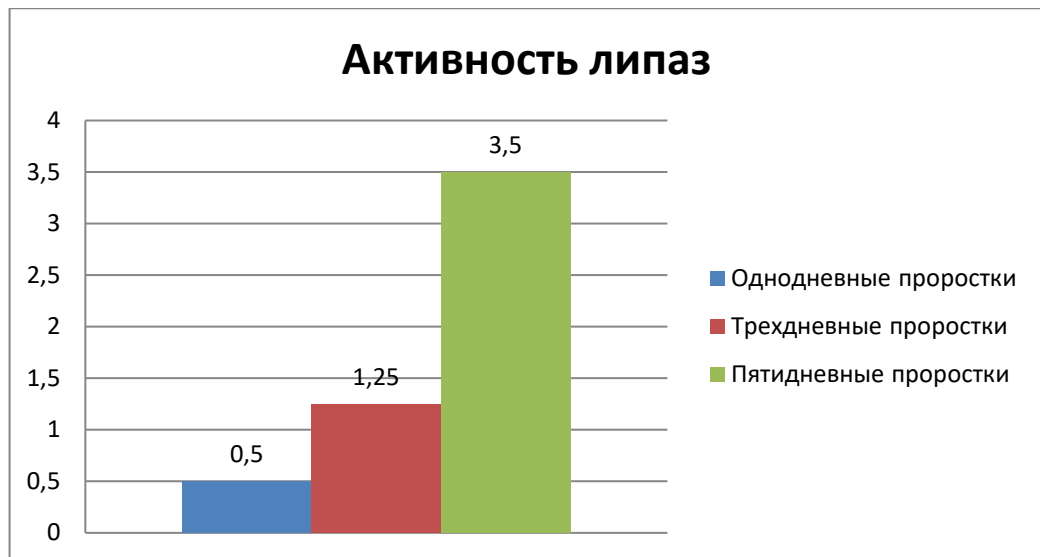


Рис.3. Активность липаз в проростках семян овса

Подводя итоги определения активности ферментов в проростках семян овса, замоченных на один, три и пять дней можно сделать один простой вывод: гипотеза исследования подтвердилась. Действительно, некоторые ферменты с возрастом проростка снижают свою активность, однако есть и такие ферменты, которые увеличивают свою активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Прорастанием называется совокупность физических и биохимических изменений, происходящих в семенах в процессе их перехода из состояния покоя к активной жизнедеятельности, которая заканчивается образованием проростка, то есть новообразования, способного расти и дать растение. Период прорастания состоит из последовательных этапов – фаз прорастания: водопоглощение, набухание, рост, развитие.

Известно, что в покоящихся семенах ферменты, ауксины и витамины находятся в связанной форме, а с поступлением воды начинается их переход в физиологически активное состояние. Поэтому в прорастающем семени возрастает содержание витаминов (аскорбиновой и никотиновой кислот, рибофлавина, пиридоксина, фолиевой кислоты и др.), а также холина, органических кислот и некоторых других веществ.

2. Для исследования были взяты семена овса. Проростки овса имеют молочно-ореховый, сочный вкус. Они богаты витаминами С, Е и К, кальцием, железом, магнием, кремнием, хромом, цинком. Особую пищевую ценность в составе проростков овса имеют белки. Общее содержание белка в семени овса колеблется от 9 до 19,5%.

3. Исследование активности ферментов в проростках семян овса показало, что активность амилазы выше всего в однодневных проростках, пик активности протеаз приходится на первые дни прорастания семени, активность липазы возрастает с каждым днем почти в три раза.

Подводя итоги исследования можно сделать один простой вывод: гипотеза исследования подтвердилась. Действительно, некоторые ферменты с возрастом проростка снижают свою активность, однако есть и такие ферменты, которые увеличивают свою активность. Следовательно, полезно употреблять как однодневные проростки, так и пятидневные, ведь в них содержатся необходимые организму ферменты разной активности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина, Н.Д. Физиология растений. Учебник для студ. вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко, и др. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с.
2. Казаков, Е.Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов К 14 (3-е переработанное и дополненное издание). / Е.Д. Казаков, Г.П. Карниленко. Спб.: ГИОРД, 2005. – 512 с.
3. Кретович, В.Л. Биохимия зерна. / В.Л. Кретович. М.: Наука, 1981. – 150 с.
4. Кретович, В.Л. Основы биохимии растений. / В.Л. Кретович. М.: Издательство «Высшая школа», 1971. – 582 с.
5. Кузнецов, В.В. Физиология растений: Учеб. для вузов / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева: М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
6. Медведев, С.С. Физиология растений: Учебник. / С.С. Медведев. СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. – 336 с.
7. Николаева, М.Г. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. / М.Г. Николаева, Н.В. Обручева. Пер. с англ. Н.А. Аскоческой, Н.А. Гумилевской, Е.П. Заверткиной и Э.Е. Хавкина. М.: Колос, 1982. – 495 с.

Определение активности амилаз по Вольгемуту

Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

Ход работы. В штатив устанавливают и нумеруют 7 пробирок и в каждую вносят по 1 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл вытяжки из солода, тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После этого в каждую пробирку вносят по 2 мл раствора с массовой долей крахмала 1 % и содержимое перемешивают встряхиванием. Все пробирки помещают в термостат при 37-38°C на 30 мин. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10 % (для остановки реакции) и по 3 капли водного раствора йода. Результат опыта вносят в табл. 16, обозначая окраску первыми буквами образовавшегося цвета раствора.

Таблица 3

Окраска проб с йодом после инкубации

	Номера пробирок и доля солодовой вытяжки в содержимом, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Окраска раствора							

Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число). Допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала произошел в 1, 2, 3 и 4 пробирках, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке 4, в которой доля солодовой вытяжки составляет 1/16 мл. Пересчитав объем расщепленного крахмала на 1 мл солодовой вытяжки, получим число 32. Это означает, что 1 мл неразбавленной солодовой вытяжки в таких же условиях может расщепить 32 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %, т.е. амилазное число составляет 32.

При определении амилазной активности молока кратность разведения уменьшают в 8-10 раз, время инкубации увеличивают до 60 мин, для исследования применяют раствор с массовой долей крахмала 0,1 %.

Реактивы. Вода дистиллированная; водная вытяжка из солода; растворы с массовыми долями: крахмала 1 % (суспендируют 1 г растворимого крахмала в 10 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 90 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, охлаждают, доливают водой до 100 мл и перемешивают), серной кислоты 10 % (60,6 мл концентрированной серной кислоты влить в 0,5 л воды и разбавить в мерной колбе до 1 л) или соляной кислоты 10 % (236 мл концентрированной соляной кислоты влить в 0,5 л воды и разбавить в мерной колбе до 1 л); водный раствор йода.

Определение активности протеаз (по методу Ансона)

Принцип метода. По методу Ансона активность протеаз оценивают по количеству аминокислоты тирозина, образующейся, как и другие протеиногенные аминокислоты, в процессе гидролиза белков под действием этих ферментов. Концентрацию тирозина определяют колориметрическим методом с использованием реактива Фолина или спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Оборудование. Фарфоровые ступки с пестиками диаметром 8-10 см; лабораторные весы; марля для фильтрования; фарфоровые чашки диаметром 6-8 см; дозирующие пипетки на 1-10 мл; конические колбы на 50 мл; воронки диаметром 5-6 см; бумажные фильтры; мерный цилиндр на 25 мл; стеклянные пробирки на 20 мл в штативах; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр с набором кювет; термостат, мерные колбы на 100, 500, 1000 мл; тёмная склянка на 150 мл.

Реактивы. Химически чистый альбумин; 0,05 М фосфатный буфер с рН=8,0; трихлоруксусная кислота (ТХУ); карбонат натрия; реактив Фолина; дистиллированная вода (свободная от диоксида углерода).

Приготовление растворов. 0,05 М фосфатный буфер (рН=8,0): в 1 л дистиллированной воды растворяют 17,911 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,780 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Затем 53 мл раствора $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ смешивают с 947 мл раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

0,5% раствор альбумина: 0,5 г чистого белка альбумина растворяют раствором 0,05 М фосфатного буфера в мерной колбе на 100 мл.

14% раствор ТХУ: 70 г ТХУ растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл.

0,5 М карбонат натрия: 52,995 г Na_2CO_3 растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л.

Раствор реактива Фолина: 10 мл реактива Фолина разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл, объём раствора в колбе доводят до метки, перемешивают и переливают в тёмную склянку.

Ход определения. На лабораторных весах взвешивают навеску проросших семян 2 г (злаковых, зернобобовых, масличных и других растений) с точностью до 0,01 г и растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. Затем в ступку приливают 20 мл дистиллированной воды, и смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут, после чего ферментный экстракт отжимают через 4 слоя марли в фарфоровую чашку и далее используют как источник протеаз для проведения ферментативной реакции.

В 2 конические колбы на 50 мл дозирующей пипеткой приливают по 4 мл 0,5% раствора альбумина и 4 мл дистиллированной воды, в одну из колб также приливают 10 мл 14% раствора ТХУ для осаждения белков (инактивация ферментов); содержимое пробирок перемешивают и помещают на 15 минут в термостат при температуре 40°C. Затем в обе колбы приливают по 2 мл ферментного раствора, их содержимое перемешивают и фиксируют точное время начала ферментативной реакции, после чего колбы помещают на 30 минут в термостат при указанной выше температуре для проведения ферментативной реакции гидролиза белков альбумина протеазами. По истечении 30 минут во вторую колбу приливают 10 мл 14% раствора ТХУ, содержимое колбы перемешивают и фиксируют точное время прекращения ферментативной реакции, затем полученную смесь оставляют на 15 минут для осаждения белков.

После отстаивания надосадочную жидкость в колбах фильтруют в стеклянные пробирки и в фильтрате определяют содержание тирозина. В 2 стеклянные пробирки вносят по 1,5 мл фильтрата и 4 мл 0,5 М раствора карбоната натрия, содержимое пробирок перемешивают и в каждую из них добавляют 0,8 мл разбавленного раствора реактива Фолина, содержимое пробирок снова перемешивают и через 20 минут колориметрируют на фото-

электроколориметре при длине волны 630 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см.

При определении содержания тирозина на спектрофотометре полученный фильтрат наливают в кварцевую кювету спектрофотометра и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм.

В результате колориметрирования окрашенного раствора или спектрофотометрирования фильтрата получают оптическую плотность раствора с активными протеазами (раствор ТХУ приливали после проведения ферментной реакции) и инактивированными протеазами (раствор ТХУ приливали до проведения ферментной реакции).

Обработка и оценка результатов.

Активность протеаз вычисляют по формуле:

$$A = (D_1 - D_2) * 20 / H * 2 * t$$

где А – активность протеаз в единицах оптической плотности раствора тирозина, образовавшегося за 1 час под действием этих ферментов в расчёте на 1 г растительной массы;

D_1 – оптическая плотность раствора в варианте с активными протеазами;

D_2 – оптическая плотность раствора в варианте с инактивированными протеазами;

20 – объём ферментного экстракта, выделенного из растительной пробы, мл;

2 – объём ферментного экстракта, взятый для проведения ферментной реакции, мл;

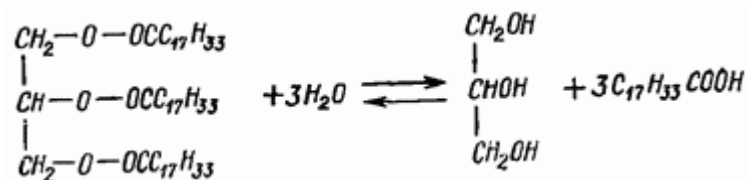
H – навеска растительного материала, г;

t – время ферментативной реакции в часах.

Полученный результат сравнивают с другими определениями протеазной активности в проросших семенах различных сельскохозяйственных культур, а также в семенах при разной длительности проращивания. На основе этих данных оценивают качество семян.

Метод определения активности липазы

Липазы катализируют реакцию гидролитического расщепления сложноэфирных связей в молекулах жира, в результате которой освобождаются глицерин и жирные кислоты:



Гидролитическую активность липазы можно определить с помощью различных методов: титриметрического, сталагмометрического, колориметрического и ряда других.

Реактивы: а) растительное масло; б) препарат липазы: 10—12 г семян льна, конопли, пшеницы тщательно растирают с кварцевым песком до образования гомогенной массы, которую обрабатывают в ступке пятикратным количеством ацетона в течение 10 мин., растирая пестиком. Кашицеобразную массу центрифугируют. Остаток два раза обрабатывают диэтиловым эфиром, после чего высушивают над серной кислотой в вакуум-эксикаторе в течение 12 ч и растирают в ступке. Перед опытом ферментный препарат растирают с водой в отношении 1 : 10. Для анализа берут 0,1-0,5 мл суспензии; в) едкое кали, 0,1 н раствор; г) ацетатный буфер, рН 4,7. Смешивают равные объемы нормальных растворов уксусной кислоты и уксуснокислого натрия (оптимум действия большинства растительных липаз лежит при рН 4,6-4,9); д) смесь этилового спирта с диэтиловым эфиром (1:1) (готовится перед употреблением); е) фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор.

В коническую колбу на 50 мл отвешивают на техно-химических весах 2,0-2,5 г растительного масла, к навеске добавляют 2 мл ацетатной буферной смеси, тщательно встряхивают и приливают 0,1-0,5 мл суспензии ферментного препарата, смешанной с 3 мл воды. Смесь в колбе доливают водой до общего объема 8 мл, энергично встряхивают и переносят

в аппарат для взбалтывания. Колбу закрывают пробкой и взбалтывают в течение 1 ч при температуре 20°C, затем ее содержимое (с помощью 60 мл нейтрализованной спирто-эфирной смеси) количественно переносят в сухую коническую колбу большего объема. Свободные жирные кислоты, образовавшиеся при гидролитическом расщеплении масла, оттитровывают 0,1 н раствором едкого кали (индикатор — раствор фенолфталеина). Одновременно проводят контрольный опыт с прокипяченной суспензией ферментного препарата.

Активность липазы x выражают количеством миллилитров 0,1 н раствора щелочи, израсходованных для нейтрализации свободных жирных кислот, образующихся при гидролитическом расщеплении 1 г масла:

$$x = \frac{(a - b) k}{n},$$

где a — количество 0,1 н раствора едкого кали, израсходованное на титрование опытного образца, мл; b — то же для контрольного образца; k — поправочный коэффициент 0,1 н раствора едкого кали; n — навеска масла, г.