

FERMENTAI

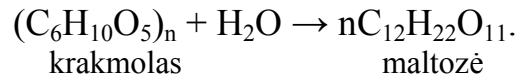
Fermentai (*enzimai*) yra biologinėse sistemose vykstančių reakcijų katalizatoriai (*katalizatoriai* – medžiagos, greitinančios chemines reakcijas, tačiau joms įvykus lieka nepakitę). Dauguma fermentų yra tirpūs globuliniai baltymai (išskyrus nedidelę grupę RNR molekulių (ribozimų), pasižyminčių katalitiniu aktyvumu), nors katalitinėmis savybėmis pasižymi ir kai kurie struktūriniai baltymai (pavyzdžiui, aktinas ir miozinas katalizuoja ATP hidrolizę).

Fermentai, kaip ir visi katalizatoriai, veikia ir didina tik energetiškai palankių reakcijų greitį. Jie vienodai greitina pusiausvyrinės reakcijos tiesiogines ir grįžtamasias reakcijas, t. y. nekeičia reakcijos pusiausvyros (krypties), tik sumažina jos aktyvacijos energiją. Dėl baltyminės fermentų prigimties jiems būdingos išskirtinės katalitinės savybės: didelis katalitinis efektyvumas – pagreitina reakciją 10^7 – 10^{10} kartų (pavyzdžiui, fermentas ureazė – net 10^{14} kartų); specifiskumas – veikia tik vieną ar keletą panašios struktūros medžiagų. Proteolitiniai fermentai pasižymi substratiniu specifiskumu: tripsinas hidrolizuoja peptidinius ryšius, kuriuos sudaro tik lizino ar arginino karboksigrupės. Fermentai veikia švelniomis sąlygomis, yra itin jautrūs aplinkos sąlygų (pavyzdžiui, temperatūros ir pH) pokyčiams; denatūruoti jie praranda aktyvumą. Fermentų aktyvumas gali būti reguliuojamas, sąveikaujant su specifinėmis molekulėmis, fiziologiniais efektoriais (kovalentinė modifikacija, alosterinė sąveika).

Fermentai atlieka tokias funkcijas: katalizuoja šimtus organizme vykstančių reakcijų (maisto medžiagų skaidymas, energijos transformacija ir kaupimas, biomolekulių sintezė); fermentams būdinga reguliacinė funkcija: veikiant įvairiems metaboliniams ir išorės signalams, fermentų katalitinis aktyvumas gali keistis. Dėl šios savybės sudėtingos fermentinės sistemos darniai veikia ir užtikrina ląstelės cheminių procesų atitiktą kintančioms aplinkos sąlygoms.

Fermentams pažinti specifinių reakcijų nėra. Apie fermento buvimą sprendžiama iš to, ar jis veikia substratą. Substrato pakitimas arba fermentinės reakcijos produktai atpažįstami iš specifinių reakcijų: pavyzdžiui, amilazės ir maltazės paveiktas krakmolas nereaguoja su jodu, o jo skilimo produktai – maltozė, gliukozė – redukuoja metalų hidroksidus.

Seilėse yra sacharidų hidrolizę katalizuojantys fermentai α -amilazė ir maltazė (jos seilėse yra labai nedaug). Seilių α -amilazės substratas yra krakmolas. Tai polisacharidas, sudarytas iš gliukozės liekanų, sujungtų α -1,4-glikozidiniu ryšiu. Seilių α -amilazė katalizuoja krakmolo hidrolizę iki maltozės:



Seilių α -amilazė yra endoamilazė, t. y. ji hidrolizuoja krakmolo glikozidinius ryšius molekulės viduje, todėl tarpiniai hidrolizės produktai yra dekstrinai – įvairios molekulinės masės polisacharidai: amilodekstrinai, chemine struktūra ir savybėmis panašūs į krakmolą, mažesni eritrodekstrinai ir maltodekstrinai, savybėmis panašūs į maltozę.

Apie hidrolizės eigą galima spręsti atliekant reakciją su jodo tirpalu. Krakmolas, reaguodamas su jodo tirpalu, sudaro mėlynos spalvos junginius (spalvos intensyvumas priklauso nuo krakmolo koncentracijos). Dekstrinai, priklausomai nuo jų ilgio, su jodo tirpalu sudaro violetinės ar raudonai rudos spalvos junginius. Krakmolui visiškai suskilus iki maltozės, reakcijos su jodo tirpalu metu gaunamas šviesiai geltonos spalvos tirpalas.

Šiems eksperimentams reikalinga α -amilazė bus gaunama iš pačių tyrėjų seilių. Kadangi žmonių α -amilazės aktyvumas ir jos kiekis seilėse labai skiriasi, todėl rezultatai gali būti labai įvairūs. Šių skirtumų galima išvengti maišant dviejų ar daugiau žmonių seilių preparatus ir eksperimentui naudojant seilių mišinį.

1 LABORATORINIS DARBAS

Fermentų aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros

Temperatūra veikia visas chemines reakcijas, nes didina kinetinę molekulių energiją ir reakcijos aktyvacijos energijos barjerą įveikiančių molekulių skaičių. Specifinis fermentinių reakcijų greičio priklausomybės nuo temperatūros bruožas – didėjant temperatūrai, nuo tam tikros ribos fermentinių reakcijos ima lėtėti. Temperatūra, kuriai esant fermentinės reakcijos greitis didžiausias, vadinama **optimalia temperatūra** T_{opt} .

Viršijus T_{opt} , fermentų aktyvumas staiga mažėja, nes, didėjant temperatūrai, yra vandeniliniai ryšiai, vyksta baltymų konformacijos pokyčiai, baltymai denatūruoja. Šiltakraujų gyvūnų fermentai dažniausiai netenka aktyvumo viršijus 50–55 °C temperatūrą. Tačiau yra ypač jautrių fermentų, kurių tretinė struktūra gali būti pažeista net karščiuojant (40 °C).

Reagentai

1 % krakmolo tirpalas 0,3 % NaCl tirpale,
seilės,
Liugolio tirpalas (2 g KI ir 1 g I₂ ištirpinta 50 ml H₂O),
Benedikto reagentas.

Darbo eiga

1. Paruošiamos pastovios temperatūros vandens vonios (stiklinėlės): viena – 37 °C, antra – 70 °C, trečia – 100 °C. Ketvirtoje stiklinėje į vandenį įdedama ledo (0 °C).
2. Į šešis mėgintuvėlius įpilama po 3 ml Benedikto reagento. Darbo metu į juos įlašinama po 4 lašus reakcijos (seilių – krakmolo) mišinio, ir mėgintuvėliai įstatomi į verdančio vandens vonią mažiausiai 5 minutėms. Jei sacharidai yra redukuojantys (tai atliekama, norint nustatyti, ar krakmolo hidrolizė įvyko iki galo), tai mėlyna spalva pasikeis į žalią, oranžinę ar tamsiai raudoną (priklausomai nuo sacharido kiekio).
3. Į tris mėgintuvėlius įpilama po 5 ml 1 % krakmolo tirpalo. Pirmas mėgintuvėlis įdedamas į 37 °C vandens vonią, antras į – 70 °C, trečias – į 0 °C (į ledus). Mėgintuvėliai vis supurtomi, kad tirpalo temperatūra susilygintų su vandens vonios temperatūra.
4. Į mažą švarią stiklinę arba mėgintuvėlį surenkama po 2 ml seilių (tuo metu galite galvoti apie mėgiamą maistą). Seilės supilamos į vieną mėgintuvėlį ir gerai sumaišomos (dalis mišinio paliekama kitiems darbams).
5. Paruošiamas seilių preparatas: 1 ml seilių skiedžiama iki 50 ml distiliuotu vandeniu, gerai sumaišoma ir įpilama po 5 ml į tris švarius mėgintuvėlius. Šie po vieną įmerkiama į skirtingų temperatūrų vandens vonias ir paliekami, kol tirpalas juose taps vonios temperatūros. Taigi kiekvienoje vonioje yra po du mėgintuvėlius: vienas – su krakmolu, kitas – su praskiestu seilių tirpalu.

6. Pirmiausiai atliekamas tyrimas, vykdant reakciją 37 °C temperatūroje. Abiejų 37 °C temperatūros vonioje esančių mėgintuvėlių turinys supilamas į vieną, gerai sumaišomas ir vėl įmerkiamas į vandens vonią.
7. Ant porcelianinės plokštelės tuojau pat užlašinami 4 mišinio lašai ir 1 lašas jodo tirpalo (tai yra 0 min. mėginys).
8. Į mėgintuvėlį su Benedikto reagentu įlašinami 4 mišinio lašai. Tirpalas sumaišomas ir įmerkiamas į verdančio vandens vonią (tai yra 0 min testas). Šios procedūros kartojamos kas 3 min., kol reakcija su jodu bus neigiama (apie 12 min.), ir po to kas 5 min., tačiau jau su Benedikto reagentu, kol reakcija bus teigiama. Lašintuvai visą laiką paliekami mėgintuvėliuose.
9. Abiejų mėgintuvėlių, esančių 70 °C vandens vonioje, turinys sumaišomas. Tuoj pat atliekama reakcija su jodu, kaip ir anksčiau, naudojant 4 lašus mišinio (tai 0 min. mėginys). Procedūra kartojama kas 3 min., kol reakcija su jodu bus neigiama. Lašintuvas visą laiką laikomas mėgintuvėlyje. Su šiuo mišiniu, kaip ir atliekant eksperimentą 0 °C temperatūroje, Benedikto reakcija neatliekama.
10. Ta pati procedūra (reakcija su jodu) pakartojama ir 0 °C temperatūroje.
11. Rezultatai surašomi į lentelę:

Laiko intervalas (min.)	Spalva, susidariusi sumaišius jodo tirpalą su krakmolo ir seilių mišiniu			Benedikto mėginys
	70 °C	37 °C	0 °C	37 °C
0 min.				
3 min.				
6 min.				
9 min.				
12 min.				
...				

2 LABORATORINIS DARBAS

Fermentų aktyvumo priklausomybė nuo terpės pH

Daugelio fermentų aktyvumas priklauso nuo terpės pH. pH sritis, kurioje fermento aktyvumas didžiausias, yra optimalus pH (pH_{opt}). Todėl dirbant turi būti naudojami buferiniai tirpalai. pH_{opt} gali priklausyti nuo temperatūros, substrato ar slopiklio

koncentracijos. Net katalizuojama to paties fermento reakcija gali pasižymėti skirtingu tiesioginės ir grįžtamosios reakcijos pH_{opt} . Daugelio fermentų pH_{opt} yra pH 5–9 srityje, tačiau yra ir labai rūgščioje (pepsinas $pH = 2$) ar labai šarminėje aplinkoje aktyvių fermentų.

Fermentų aktyvumo priklausomybę nuo pH sąlygoja baltymo funkcinų grupių jonizacijos pokyčiai, substrato joninės formos pasikeitimai, tiesioginis H^+ ir OH^- jonų dalyvavimas reakcijoje, fermento stabilumo pokyčiai.

Reagentai

Fosfatinis buferis: 0,1 M citrinos rūgštis ir 0,2 M Na_2HPO_4 ,
1 % krakmolo tirpalas 0,3 % NaCl tirpale,
seilės,
Liugolio tirpalas (2 g KI ir 1 g I_2 ištirpinta 50 ml H_2O).

Darbo eiga

1. Paruošiama pastovios temperatūros (37 °C) vandens vonia (žr. 1 laboratorinio darbo skirsnį).
2. Surenkamos seilės (žr. 1 laboratorinio darbo skirsnį).
3. Paruošiami žinomo pH buferiniai tirpalai optimaliai pH reikšmei nustatyti pagal lentelę:

Mėgintuvėlio nr.	0,2 M Na_2HPO_4 tirpalas (ml)	0,1 M citrinos rūgšties tirpalas (ml)	pH
5.	2,58	2,42	5,0
6.	4,12	0,88	7,0
7.	5,06	0,14	8,0

4. Į 3 mėgintuvėlius įpilama po 5 ml 1 % krakmolo tirpalo. Mėgintuvėliai įmerkiami į 37 °C vandens vonią ir pamaišant paliekami, kad turinio temperatūra susilygintų su vandens vonios temperatūra.
5. 1 ml seilių preparato praskiedžiama iki 25 ml distiliuotu vandeniu ir gerai sumaišoma. Į 3 mėgintuvėlius įpilama po 3 ml praskiestų seilių tirpalo ir pažymima „5“, „7“ ir „8“. Į mėgintuvėlį, pažymėtą penktuoju numeriu, įpilama 5 ml buferio, kurio pH 5, į mėgintuvėlį, pažymėtą septintuoju numeriu – 5 ml pH 7 buferio, į pažymėtą

aštuntuoju numeriu – 5 ml pH 8 buferio. Mėgintuvėliai įmerkami į 37 °C vandens vonią. Vandens vonioje yra iš viso 6 mėgintuvėliai.

6. Kai mėgintuvėlių turinys tampa vonios temperatūros, paimamas vienas mėgintuvėlis su krakmolo tirpalu, ir jo turinys greitai sumaišomas su penktuoju numeriu pažymėto mėgintuvėlio seilių preparatu, antrame mėgintuvėlyje esantis krakmolo tirpalas sumaišomas su septintuoju numeriu pažymėto mėgintuvėlio seilių preparatu, trečiame – su aštuntuoju, ir mėgintuvėliai vėl įmerkami į vandens vonią.
7. Tuoju atliekama krakmolo skilimo nustatymo reakcija: iš kiekvieno mėgintuvėlio paimama po 4 lašus reakcijos mišinio ir atliekama reakcija su Liugolio tirpalu (0 min. testas). Reakcija kartojama kas 3 min., kaip ir 1 laboratoriniame darbe.
8. Rezultatai surašomi į lentelę. Daromos išvados.

Laiko intervalas (min.)	Spalva, susidariusi sumaišius jodo tirpalą su krakmolo ir seilių mišiniu 37 °C temperatūroje, priklausomai nuo terpės pH		
	pH 5	pH 7	pH 8
0			
3			
6			
9			
12			
15			

3 LABORATORINIS DARBAS

Fermentinės reakcijos greičio priklausomybė nuo fermento kiekio

Daugelis fermentų tirpaluose aptinkami tik pagal jiems būdingą specifinį katalitinį poveikį. Fermentų kiekis nustatomas matuojant katalizuojamos reakcijos greitį tokiomis sąlygomis, kuriomis greitis tiesiogiai priklauso tik nuo fermento koncentracijos (esant substrato pertekliui), tuomet fermento katalizuojamos reakcijos greitis V yra lygus:

$$V = k \times E,$$

kur k – reakcijos greičio konstanta, E – fermento kiekis.

Ryšys tarp fermento kiekio (koncentracijos) ir reakcijos greičio dažniausiai yra linijinis, jeigu reaguojančių medžiagų koncentracijos neriboja reakcijos greitis (esant substratų pertekliui).

Bet kurios fermento E katalizuojamos reakcijos greitis vertinamas pagal substrato sunaudojimo arba produktų kaupimosi greitį, kitaip tariant, pagal substrato ar produkto koncentracijos pokytį per laiko vienetą. Matavimui pasirenkama ta reakcijoje dalyvaujanti medžiaga, kurios koncentraciją nustatyti lengviausia. Fermentinių reakcijų greitis nustatomas esant optimalioms fermento veikimo sąlygoms (optimalus pH, temperatūra ir kt.).

Šiame darbe nustatomas seilių amilazinis aktyvumas: substrato (krakmolo) kiekis, kurį suskaido 1 ml seilių per tam tikrą laikotarpį (pavyzdžiui, per 30 min.).

Reagentai

0,1 % krakmolo tirpalas,
seilės,

Liugolio tirpalas (2 g KI ir 1 g I₂ ištirpinta 50 ml H₂O).

Darbo eiga

1. Seilių preparato paruošimas: surinktos seilės praskiedžiamos 10 kartų (1 ml seilių skiedžiama distiliuotu vandeniu iki 10 ml).
2. Į 10 sunumeruotų mėgintuvėlių iš biuretės įpilama po 1 ml distiliuoto vandens.
3. Į pirmą mėgintuvėlį įpilama 1 ml 10 kartų praskiestų seilių.
4. Mišinys pirmame mėgintuvėlyje sumaišomas (tirpalas keliskart pipete įtraukiamas ir vėl išpilamas). Po to 1 ml gauto mišinio ta pačia pipete perpilamas iš pirmo mėgintuvėlio į antrą.
5. Antro mėgintuvėlio tirpalas taip pat sumaišomas, pipete keliskart įtraukiant ir išpilant tirpalą. 1 ml gauto mišinio ta pačia pipete perpilamas į trečią mėgintuvėlį, iš šio – į ketvirtą ir t. t. Taip fermentas praskiedžiamas: kiekviename kitame mėgintuvėlyje yra dvigubai mažiau fermento negu prieš jį stovinčiame mėgintuvėlyje (1/20; 1/40; 1/80 ir t. t.).
6. Į visus mėgintuvėlius iš biuretės įpilama dar po 1 ml vandens ir atitinkamai po 2 ml krakmolo tirpalo; kiekvieno mėgintuvėlio turinys sumaišomas.

7. Visi mėgintuvėliai vienu metu įmerkami į 37 °C vandens vonią ir inkubuojami 30 min.
8. Išimti iš vonios, mėgintuvėliai greitai atšaldomi šalto vandens srove. Kiekvieno mėgintuvėlio turinys sumaišomas, ir mėgintuvėliai paeiliui sustatomi į stovą.
9. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 2 lašus Liugolio tirpalo, sumaišoma ir stebima, kaip keičiasi spalva (nuo geltonos iki mėlynos). Geltona spalva rodo, kad krakmolas visiškai suskilo, rausva – kad yra tarpinių krakmolo skilimo produktų dekstrinų, o mėlyna – kad yra krakmolo arba jo pradinių skilimo produktų.
10. Apskaičiuojamas tiriamų seilių aktyvumas. Žinoma, kad mėgintuvėlyje, kuriame esama mėlynos spalvos tirpalo, krakmolas liko nesuskaidytas, o mėgintuvėlyje, kuriame nėra mėlynos spalvos, krakmolas visiškai suskilęs, pavyzdžiui, penktame mėgintuvėlyje (šeštame mėgintuvėlyje jau matomas melsvas atspalvis). Penktame mėgintuvėlyje nepraskiestų seilių buvo 1/320 ml, vadinasi:

1/320 ml seilių suskaidė 2 ml 0,1 % krakmolo tirpalo.

1 ml seilių suskaidė x ml 0,1 % krakmolo tirpalo.

$$\text{Iš čia } x = 2/1/320 = 640.$$

Taigi 1 ml nepraskiestų seilių per 30 min 37 °C temperatūroje suskaidė 640 ml 0,1 % krakmolo tirpalo.

4 LABORATORINIS DARBAS

Fermentų efektoriai

Fermentų veikimą gali reguliuoti prie fermento molekulės prisijungusios mažos molekulinės masės medžiagos, vadinamos *efektoriais*. Efektoriai gali būti teigiami – *aktyvikliai* arba neigiami – *slopikliai*. Aktyvikliai (Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- ir kt) prisijungia prie ne tokio aktyvaus fermento, pakeisdami jo konformaciją, tuomet susidaro katalitiškai aktyvi fermento forma. Slopikliai (neorganinės druskos, metabolitai ir kt.) taip pat gali pakeisti fermento natyvinę konformaciją.

Nustatant amilazinį seilių aktyvumą, galima stebėti aktyviklių ir slopiklių įtaką fermentams. Praskiesti NaCl tirpalai greitina seilių amilazės veikimą. Vario sulfato tirpalai, atvirkščiai, labai sulėtina amilazės veikimą.

Reagentai

1 % krakmolo tirpalas,

1 % NaCl tirpalas,

1 % CuSO₄ tirpalas,

seilės,

Liugolio tirpalas (2 g KI ir 1 g I₂ ištirpinta 50 ml H₂O).

Darbo eiga

1. Surenkamos seilės (žr. 1 laboratorinis darbas). Darbui naudojamas 25 kartus praskiestas seilių tirpalas (1 ml seilių skiedžiamas iki 25 ml distiliuotu vandeniu).
2. Į tris mėgintuvėlius įpilama po 4 ml 1 % krakmolo tirpalo. Į pirmą mėgintuvėlį įpilama 1 ml 1 % NaCl, į antrą mėgintuvėlį – 1 ml 1 % CuSO₄, į trečią – 1 ml distiliuoto vandens.
3. Į visus mėgintuvėlius įpilama po 2 ml praskiestų seilių. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir 10 min. inkubuojamas 37 °C vandens vonioje.
4. Mėgintuvėliai išimami iš vandens vonios ir atšaldomi šalto vandens srove. Į visus mėgintuvėlius įlašinama po kelis lašus Liugolio tirpalo ir sumaišoma. Įvertinama susidariusi spalva, kuri pažymima lentelėje. Pagal susidariusią spalvą galima įvertinti NaCl ir CuSO₄ įtaką seilių amilazės aktyvumui.

Mėgintuvėlio nr.	Fermentas	Substratas	Efektorius	Inkubacija	Susidariusi spalva su jodu
1	Amilazė	Krakmolas	-	10 min. 37 °C	
2	Amilazė	Krakmolas	NaCl	10 min. 37 °C	
3	Amilazė	Krakmolas	CuSO ₄	10 min. 37 °C	

Užrašoma, kuris iš efektorių yra teigiamas ir kuris yra neigiamas seilių amilazei.