

# *Eesti koolinoorte 56. bioloogiaolümpiaad*

## *Lõppvooru taimefüsioloogia praktikum*

---



**Eesnimi:** .....

**Perekonnanimi:** .....

Juhendajad: Evi Padu, Mikk Välbe

Punktid: 30

### **Peroksüdaasi (EC 1.11.1.7) katalüütilise aktiivsuse määramine**

Peaaegu kõik keemilised reaktsioonid rakkudes toimuvad katalüsaatorite – ensüümide vahendusel. Ensüüme ei kasutata reaktsioonis ära ja nad vabanevad uuesti iga reaktsioonitsükli lõpus. Ühendit, mille muutumist ensüüm katalüüsib, nimetatakse substraadiks. Ensüümi selektiivsust, mis ilmneb võimes muuta ainult teatud kindlat ühendit (ühendeid) nimetatakse spetsiifilisuseks. Ensüümid suurendavad sadu ja tuhandeid kordi reaktsioonide kiirust.

Näiteks reaktsioon vee ja süsihappegaasi vahel süsihappe moodustumisega  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  võib toimuda ilma katalüsaatorita väikese kiirusega. Ensüüm süsinikanhüdraasi üks molekul katalüüsib 600 000 süsihappe molekuli teket sekundis ja katalüüsitud reaktsioon on  $10^7$  korda kiirem kui katalüüsimata reaktsioon.

Kuigi iga ensüümi detailne toime on unikaalne, üldjoontes kõik ensüümid toimivad sarnasel viisil. Ensüüm (E) seostub reaktsiooni käigus ühe või mitme substraadiga (S) vahepealse ensüüm-substraat kompleksi (ES) moodustumisega. ES seejärel laguneb produkti (produktide) P ja vaba ensüümi tekkega.



Reaktsiooni kiirust võib mõõta substraadi kadumise kiiruse ( $dS/dt$ ) või produkti tekkimise kiiruse ( $dP/dt$ ) alusel reaktsiooniseigus. Aine (substraat või produkt) hulka lahuses on võimalik määrata Lambert-Beer'i valemit kasutades.

$$A = \epsilon C l$$

A – lahuse optiline tihedus ehk absorptsioon (spektrofotomeetri küvetis olevale lahusele langeva ja lahust läbinud valguse intensiivsuste suhte logaritmi,  $A = \log I_0/I_t$ );

$\epsilon$  – ekstinktsioonikoefitsient (proportsionaalsuskonstant), dimensiooniga näiteks  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;

C – substraadi/produkti kontsentratsioon reaktsiooniseigus;

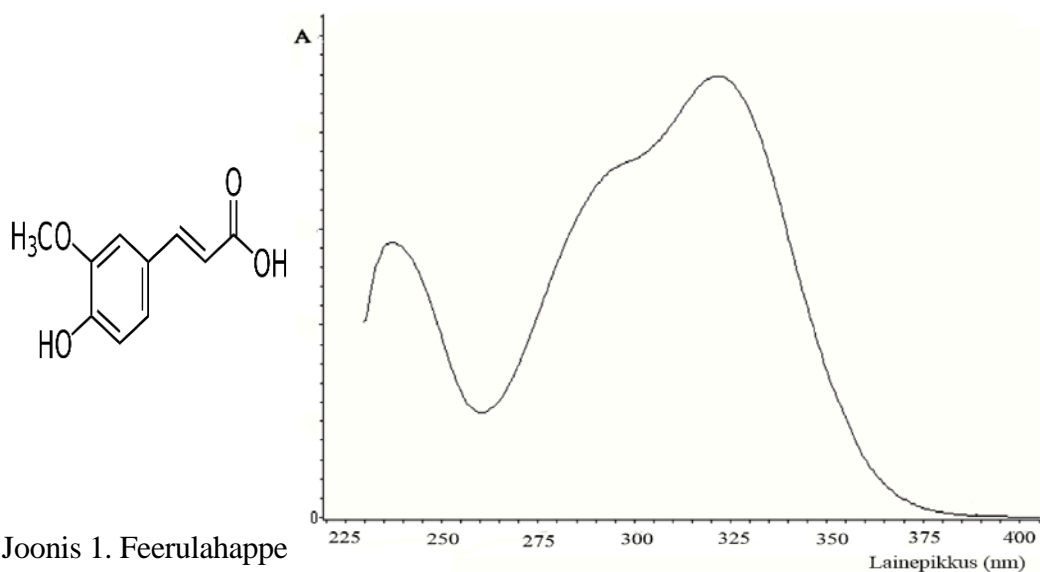
l – valgusekiire teel oleva lahusekihi paksus (cm).

Kasutades Lambert-Beer'i seadust on lahuse absorptsiooni (optilise tiheduse) abil võimalik määrata aine kontsentratsioon lahuses.  $C = \frac{A}{\epsilon l}$

Kui mõõta lahuse optiline tihedus reaktsiooni alguses ja reaktsiooni lõpus, saab optilise tiheduse vähenemise järgi (substraadi kasutamine) või optilise tiheduse suurenemise järgi (produkti teke) leida reaktsiooni kiirus, st kasutatud substraadi hulk või moodustunud produktide hulk kindla ensüümihulga kohta ajaühikus (minutis). Tavaliselt fikseeritakse ka teised ensüümi aktiivsust mõjutavad tingimused (temperatuur, pH, lisatud substraadi hulk jne). Rahvusvahelise Biokeemia ja Molekulaarbioloogia Ühingu nomenklatuurikomitee (NC-IUBMB) soovitusel vastavalt on ensüümi katalüütilise aktiivsuse ühikuks katal. 1 katal vastab reaktsioonikiirusele mool sekundis (mol/s). Katal on väga suur aktiivsus ja seetõttu kasutatakse rohkem ensüümiaktiivsuse ühikut 1U (ingl. *unit*), mis vastab kiirusele 1µmol/min. (1U=16,67 nkat). Spetsiifiline katalüütiline aktiivsus on modifitseeritud substraadi (tekkinud produkti) hulk reaktsioniseigus oleva ensüümivalgu kohta (Katalüütiline aktiivsus jagatud valgu hulgaga). Ringluskiirus (tähistatud kui  $k_{cat}$ ) on muundatud substraadimolekulide arv ühe katalüütilise tsentrumi kohta sekundis. Üks ensüümmolekul võib sisaldada sõltuvalt subühikute arvust mitmeid katalüütilisi tsentrumeid.

Peroksüdaasid (PRX) (süsteemilise nimetusega fenoolne ühend-vesinikperoksiid oksüdüreduktaasid) on laia substraatse spetsiifilisusega heemi sisaldavad valgud, mis katalüüsivad vesinikhüdroksiidi või elektronide ülekannet orgaanilistelt ühenditelt (fenoolsed ühendid, aromaatsed amiinid) vesinikperoksiidile. Heemi sisaldavad peroksüdaasid on laialt levinud bakterites, seentes, taimedes ja selgroogsetes. Käesolevas praktilises töös määratakse taimede rakust sekreteeritava peroksüdaasi (EC 1.11.1.7) aktiivsus. See ensüüm osaleb rakukestas ligniini ja suberiini sünteesis, auksiini ainevahetuses ja kaitsereaktsioonides patogeenide vastu.

Üheks sageli kasutatavaks substraadiks peroksüdaasi aktiivsuse määramisel on feerulahape. Feerulahape on kaneelhappe derivaat, molekulmassiga 194.18 g/mol, esineb taimede rakuseinas hemitsellulooside koostises ja on puitaine (ligniini) biosünteesi lähteühendiks.



Joonis 1. Feerulahape

Feerulahape kasutamisel substraadina on reaktsiooni üldvõrrand avaldatav järgmisel kujul:  
 $2 \text{ feerulahape} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 2 \text{ feerulahape fenoksüülradikaali} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

### Töö läbiviimine

#### Ensüümilahuse valmistamine nisu (*Triticum aestivum*) idandite lehtedest.

Kaaluda 0.2 g nisuidandite lehti koos neid ümbritsevate koleoptüülidega, lisada kaalutisele vedelat lämmastikku ja taimne materjal peenestada. Seejärel lisada 5 ml 0.05M KPi fosfaatpuhvit (pH 6.0), 50 mg PVPP-d (polüvinüülpolüürrolidoon idandite fenoolsete ühendite absorbeerimiseks) ja hõõruda lehed täiendavalt uhmris ühtlaseks massiks. Uhmer, tsentrifuugitops ja puhvri lahus tuleb hoida jääkastil külmas. Saadud homogenaat valada 15 ml tsentrifuugitopsi ja tsentrifuugida jahutustsentrifuugis +4° C juures 10 min 12000 g kasutades. Supernatant valada sademelt uude reaktsioonituubi ja hoida jääl. (2p).

#### Reaktsioonisegu kokkusegamine küvetis

Kasutada automaatpipetti. **Iga reaktsioonikomponendi lisamiseks kasutada uut otsikut.**

Kaalium - fosfaatpuhver - 1.0 ml (pH 6.0, 0.05 M);

Feerulahape (0,01M) – 20 µl (0,19 mM);

Lehtedest valmistatud ensüümilahus – 10µl;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM) - 50 µl (0,28 mM)

Reaktsioonisegu segada pipetti kasutades ja asetada küvett spektrofotomeetri küvetihoidjasse.

#### Peroksüdaasi aktiivsuse määramine

Registreerida spektrofotomeetri vastava programmiga reaktsioonisegu optiline tihedus (A) kohe pärast küveti spektrofotomeetrise asetamist ja iga 20s möödudes 2 min jooksul 310 nm lainepikkuse juures. Arvutada reaktsioonisegu optilise tiheduse muutus (ΔA) iga järgneva 20 s jooksul. (2p).

t (s)	0	20	40	60	80	100	120
A							
ΔA	-						

#### Peroksüdaasi aktiivsuse arvutus

PRX aktiivsuse mõõduks võtta feerulahape oksüdeerumise kiirus. Feerulahape hulk määratakse reaktsioonisegus spektrofotomeetriliselt. ε väärtus feerulahape jaoks lainepikkusel 310 nm on 11,3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Arvusteks kasutada reaktsioonisegu 20s jooksul toimunud optilise tiheduse maksimaalset muutust. Ümbritseda ensüümi aktiivsuse määramiseks kasutatud arvud tabelis rõngaga. Lambert-Beer'i seadust kasutades leida sekundi jooksul oksüdeerunud feerulahape kogus mikromoolides ühes liitris reaktsioonisegus. (4p).

Arvutada ensüümi aktiivsus oksüdeeritud feerulahappe hulgana mikromoolides minutis küvetis oleva reaktsioonisegu kohta (2p) ja 1g taime toormassi kohta. (4p).

Aktiivsus avaldada ka (nano)katalites 1g taime toormassi kohta. (4p).

**Küsimused:**

1. Iseloomustada kahte enamkasutatavat ensüümi aktiivsuse ühikut ja nende arvulist seost. (2p).
2. Miks konkreetse töö puhul ei ole võimalik leida ensüümi spetsiifilist aktiivsust? (1p)
3. Defineerige lahuse optiline tihedus. (1p)
4. Millistes ühikutes väljendatakse optiline tihedus? (1p)
5. Defineerige ekstinktsioonikoefitsient ( $\epsilon$ ) ja kirjutage, millest  $\epsilon$  väärtus sõltub? (2p)
6. Mis võiks olla põhjuseks, et antud töös reaktsioonisegu optiline tihedus registreeritakse 310 nm juures, kuigi feerulahappe neeldumispektri maksimum on 321 nm juures (vt Joonis 1) ? (3p).
7. Kui palju tuleb kaaluda feerulahapet, et valmistada 10 ml 0,01M lahust? Feerulahappe molekulmass on 194,18. (2p).