

**Удмуртская Республика  
Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
Июльская средняя общеобразовательная школа  
Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования  
"Районный центр детского творчества"**

Номинация «Современная химия»

**Исследовательская работа  
«Качественный химический анализ содержания ферментов  
пероксидазы и полифенолоксидазы в различных сортах  
картофеля»**

Авторы: Мельникова Екатерина, ученица 7  
класса, МБОУ Июльской СОШ  
Руководитель: Загребина Анастасия  
Павловна, учитель химии  
МБОУ Июльской СОШ, ПДО РЦДТ  
Воткинского района

с. Июльское, 2020г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
Обзор литературы . . . . .	4
Методы исследования. . . . .	6
Результаты . . . . .	8
Заключение. . . . .	12
Список литературы . . . . .	13
Приложение. . . . .	14

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время энзимология – наука о ферментах, превратилась в отрасль знаний, которая тесно связана со многими другими науками, особенно – биохимией, физической химией, молекулярной биологией, генетикой и химической технологией. Информация, полученная при изучении ферментов, позволила понять механизмы многих жизненных процессов, таких как фотосинтез, дыхание, биологическое окисление, брожение, синтез множества необходимых для роста органических веществ. Большой интерес данные энзимологии представляют для различных химических производств. Ведь ферменты обладают способностью намного больше увеличивать скорость химической реакции, чем минеральные катализаторы, энзимы не загрязняют окружающую среду, а если рассматривать их как ингибиторы, то они могли бы сохранить на более длительное время созданные человеком технические средства, предметы быта и т.д.

**Актуальность.** Изучение содержания в клетках растений ферментов (в данной работе пероксидаза и полифенолоксидаза) позволяет делать выводы о многих физиологических процессах протекающих в растении. А значит, можно использовать полученные знания для повышения урожайности культур. Следовательно, изучение ферментативного катализа представляет как практический, так и теоретический интерес и делает актуальной данную работу.

Обмен веществ можно определить как совокупность всех химических превращений, которым подвергаются соединения, поступающие извне. Эти превращения включают все известные виды химических реакций. Оказалось, что большинство химических реакций с заметной скоростью протекают только в присутствии катализаторов (а в живых организмах ферментов).

Выбрав тему исследования, была выдвинута **гипотеза**, что в разных сортах картофеля в клубнях содержатся ферменты пероксидаза и полифенолоксидаза.

**Цель:** определить наличие ферментов пероксидазы и полифенолоксидазы в клетках клубней картофеля, различных сортов методом качественного химического анализа.

### **Задачи:**

1. Выявить наиболее популярные сорта картофеля, выращиваемых в личных подсобных хозяйствах.
2. Определить содержание ферментов, проведя качественные реакции на пероксидазу и полифенолоксидазу в клетках клубней картофеля различных сортов;
3. Определить содержание фермента пероксидаза и полифенолоксидазы в картофеле после озеленения.

**Предмет исследования:** Ферменты пероксидаза и полифенолоксидаза.

**Объект исследования:** картофельные клубни различных сортов.

**Сроки и место проведения исследования:** октябрь 2020г., МБОУ Июльская СОШ

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В книге Диксон М. «Ферменты» дается такое определение понятию ферменту пероксидаза – это фермент, который катализирует окисление органических соединений с помощью перекиси водорода и органических перекисей, например, образующихся из ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов. Фермент переносит кислород от молекулы субстрата к перекиси.

Пероксидаза присутствует в каждой растительной клетке. Этот фермент участвует в циклах фотосинтеза и дыхания, играет существенную роль в защите растений от инфекционных заболеваний. [3]

Основная функция пероксидазы - защитная: окисление химических соединений за счет кислорода перекиси с образованием промежуточных комплексов, обладающих различными спектральными характеристиками [1]

Известно, что в качестве маркера устойчивости к патогенам может служить активность ферментов прооксидантной и антиоксидантной системы растительных клеток: каталазы, НАДФН-оксидазы и особенно пероксидазы, которая распространена в природе и обладает широким спектром действия.[4]

Физиологическая роль пероксидазы в растительной клетке очень важна, в связи с чем, функции отдельных изоформ фермента в значительной мере различаются. Пероксидазы, выделенные из одного и того же растения, могут иметь неодинаковую молекулярную массу и субстратную специфичность. Пероксидаза найдена в растительной клетке, и для этого фермента отмечают видовую, органогенную, тканевую и внутриклеточную специфичность распределения ее форм.

Особое внимание уделяется изменению активности фермента во взаимодействиях патогена и растения. Известно, что пероксидазная активность может многократно повышаться в инфицированных патогеном растениях, причем наиболее существенно — у форм фермента, связанных с клеточной стенкой [8].

В своей работе таких специалистов как Колодязная В.С. с соавторами из Ленинградского НИИСХ «Белогорка» отмечается например, что реакция растительной клетки на охлаждение выражается в повышении активности пероксидазы. Фермент пероксидаза представляет собой одно из звеньев цепи переноса электронов и участвует в альтернативных механизмах дыхания.

Увеличение активности пероксидазы связано с утилизацией органических перекисей, образующихся в процессе усиленного дыхания зараженных тканей. Интенсивность дыхания характеризует физиологическое состояние картофеля изменяющееся в зависимости от условий хранения. Исследования по влиянию обработки клубней биопрепаратами показали, что в растительной клетке не происходит нарушения физиолого-биохимических процессов при хранении картофеля в условиях низких положительных температур. Так, интенсивность дыхания контрольных и опытных образцах клубней в течение 90 суток хранения снижается, а затем, при последующем хранении увеличивается, независимо от условий обработки. При снижении активности пероксидазы происходит значительное повышение активности фенолоксидазы, что свидетельствует об адаптации растительной клетки к неблагоприятным внешним воздействиям. [5]

Динамика активности пероксидазы коррелируется с развитием устойчивости растений. Известно, что у резистентных сортов количество пероксидаз в растительных клетках выше, чем у восприимчивых, но также отмечают, что большую роль в устойчивости растений к вредителям и болезням отводится и полифенолоксидазе и фенольным соединениям.[7]

Например, в ответ на воздействие солями отмечены как активация фермента пероксидазы, так и качественные изменения в его спектре, а также показано, что при недостатке кислорода увеличивается интенсивность работы фермента и существенно меняется состав катионных форм. Обезвоживание сопровождается не только повышением активности пероксидазы цитоплазмы и хлоропластов, но и изменением их изоферментного состава. [11] Еще в конце 80-х годов прошлого века Андреева В.А. в книге «Фермент пероксидаза» отмечала, что под влиянием низких температур в листьях озимой ржи также возрастала активность фермента. [2] Повышение активности фермента ранее было отмечено и при механических повреждениях. На этиолированных проростках пшеницы показано, что их обработка в течение часа при 42°C увеличивала активность пероксидазы в корнях проростков и уменьшала ее в листьях. Известно, что гипертермия изменяет активность антиоксидантных ферментов. Например, показано, что у ржи гипертермия необратимо изменяла активность каталазы, снижала активность каталазы огурца, сопровождаясь обесцвечиванием хлорофилла, что свидетельствует о существенном окислительном повреждении.[6].

В настоящее время широкое распространение получило заболевание картофеля - кольцевая гниль картофеля, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms). Показано, повышение активности пероксидазы в растениях картофеля, зараженных данным патогеном. Для выявления обеззараживающего эффекта гипертермии в зараженных Cms растениях картофеля ученые НИИСХ Ленинградской области определяли изменение активности общей пероксидазы, как одного из важнейших маркеров иммунного статуса растительного организма. [11]

Изучив литературу по нашей теме и опубликованные в СМИ материалы, мы заключили, что уже давно ведется работа по изучению пероксидазы и других ферментов, анализ которых позволит судить о состоянии благополучия растительного организма. Однако в своей работе, мы определим качественное содержание этого фермента в клубнях картофеля, который произрастал на территории с. Июльское, Воткинского района, Удмуртской республики. Возможно, подобное исследование и проводилось на территории республики, но нам эта информация не встречалась в открытом доступе.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

### Социологическое исследование.

Проводится анкетирование для выявления наиболее популярных сортов, среди населения и выращиваемых на территории МО «Июльское». Среди взрослого населения нашего села проводилось анкетирование, анкета создана с помощью Google –форм и размещена в родительских чатах школы (прохождение анкеты добровольное).

В анкетировании приняли участие 52 участника от 18 до 50 лет. Анкета представлена в Приложении 1 и расположена по ссылке <https://forms.gle/AJcxwf7pp81iFsja6>

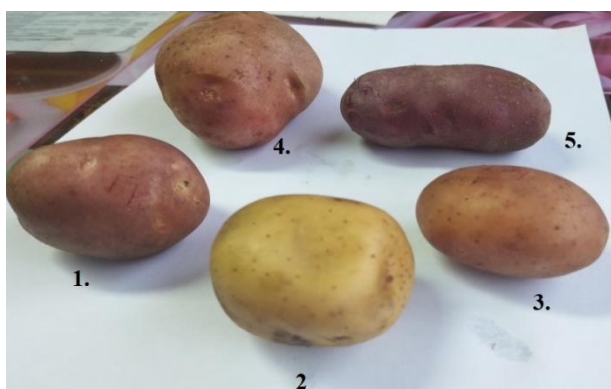
С помощью анкеты мы можем выбрать сорта картофеля, которые наиболее популярны на территории села и изучение которых будет для нас наиболее актуальным.

### Качественный химический анализ на пероксидазу и полифенолоксидазу

**Оборудование:** терка для овощей, водяная баня, пробирки, глазная пипетка, пипетки (5 мл., 10 мл.), и марля, терка.

**Реактивы:** дистиллированная вода, гидрохинон (1%) и аптечная перекись водорода (3%).

**Объекты изучения:** клубни картофеля разных сортов: «Родриго», «Беллароза», «Маяк», «Колетте», «Любава».



**Рис.1** Сорта картофеля, использованные в исследовании: 1-«Беллароза», 2-«Колетте», 3-«Родриго», 4-«Любава» 5- «Маяк»



**Рис. 2** Подготовка материала для опыта;

#### **Ход работы:**

1. Кусочек клубня, примерно 30 г, измельчить на терке;
2. Полученную кашу отжать через два слоя марли;
3. Сок собрать в стакан и разбавить водой в три раза.
4. В десять пробирок добавляем 1 мл. раствора гидрохинона и 1 мл. картофельного сока, в каждой пробирке сок картофеля определенного сорта. В первые пять пробирок добавляем 1 мл. перекиси водорода, а в оставшиеся пять воду – 1 мл.

5. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешать.
6. Проводим трехкратное повторение опыта с каждым сортом.

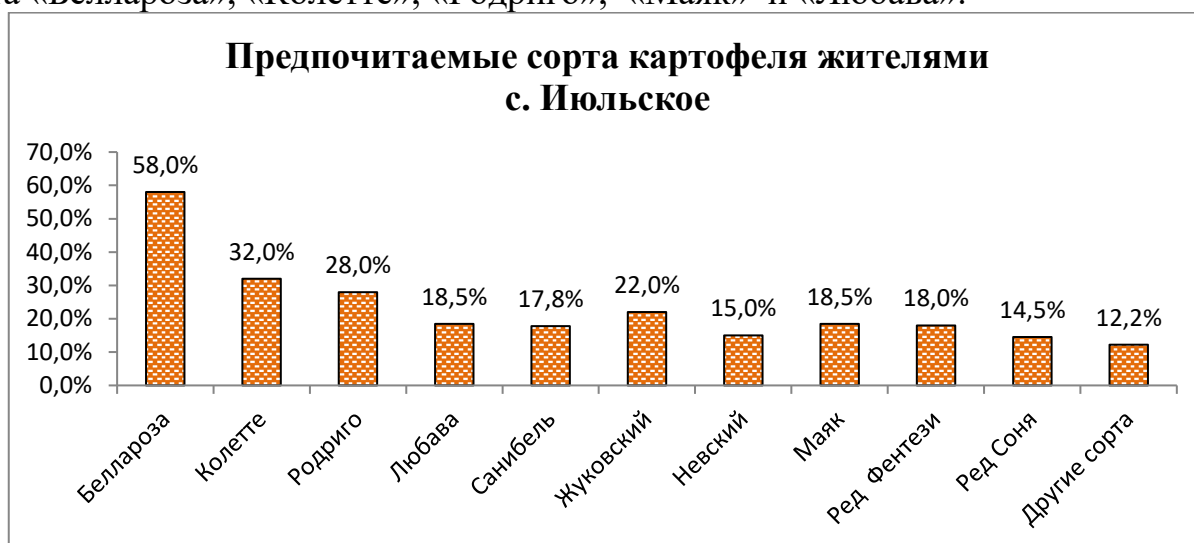
**Определение пероксидазы и полифенолоксидазы в клубнях картофеля  
после его озеленения.**

Продолжаем описанный ранее ход действий и для картофеля подвергшийся озеленению (картофель хранился на свету, периодически смачивался водой на протяжении 3 недель при температуре 16<sup>0</sup>С). Сравниваем полученные результаты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Социологическое исследование.

Социологическое исследование позволило выбрать наиболее популярные сорта картофеля, которые используют жители села. Самый популярный сорт оказался «Беллароза» с кожурой красного цвета и белой мякотью. На втором месте картофель со светлой кожурой «Колетте», на третьем месте разместился сорт «Родриго», остальные сорта имеют примерно равное распространение. (Рис.3) Однако мы внесли небольшие коррективы, выбрав для исследования сорта с одного хозяйства, так как это позволяет нам учесть одинаковые агротехнологические приемы и почвы при выращивании картофеля. Таким образом определению пероксидазы и полифенолоксидазы в клубнях подверглись сорта «Беллароза», «Колетте», «Родриго», «Маяк» и «Любава».



**Рис.3. Диаграмма «Предпочтения сорта картофеля жителями  
с. Июльское»;**

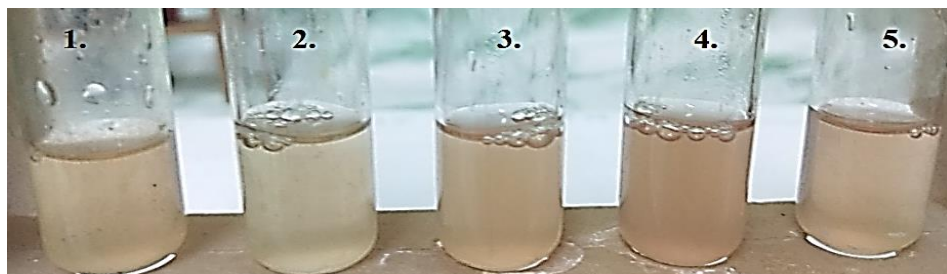
Все опрошенные выращивают на своих приусадебных участках картофель (100%), приоритеты отдают ранозревающим сортам (86%), с отличными вкусовыми (100%) и товарными характеристиками (96%). Многие отмечали и устойчивость к заболеваниям (62%) и сроки хранения (57%) . Таким образом, можно констатировать, что тем, кто выращивает картофель, важен внешний вид картофеля, так как многие в селе занимаются его продажей на рынках и сбытом в сети магазинов и организации питания городов Удмуртии. Для картофеля его внешний вид, особенно весной, обусловлен не только генетически заложенным сроком хранения сорта, но и устойчивостью различного рода заболеваниям.

### Качественный химический анализ на пероксидазу и полифенолоксидазу в разных сортах картофеля

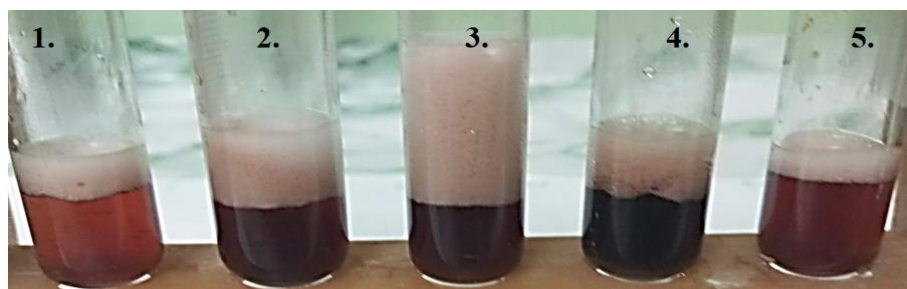
Появление окраски говорит нам о том, что фермент сработал. А интенсивность окраски позволяет судить о количестве продуктов окисления. Если же окраска вообще не появляется, значит, фермент неактивен. Это может случиться в слишком кислой или слишком щелочной среде, или если отсутствуют

поставщики кислорода, или в присутствии вредных для ферментов веществ — так называемых ингибиторов ферментов.

В пробирках, где в реакцию вступила перекись водорода, очень быстро наблюдаем изменение цвета от красного до кирпично-красного, там, где присутствовала только вода, изменение цвета происходит, но не столь выражено и медленнее.

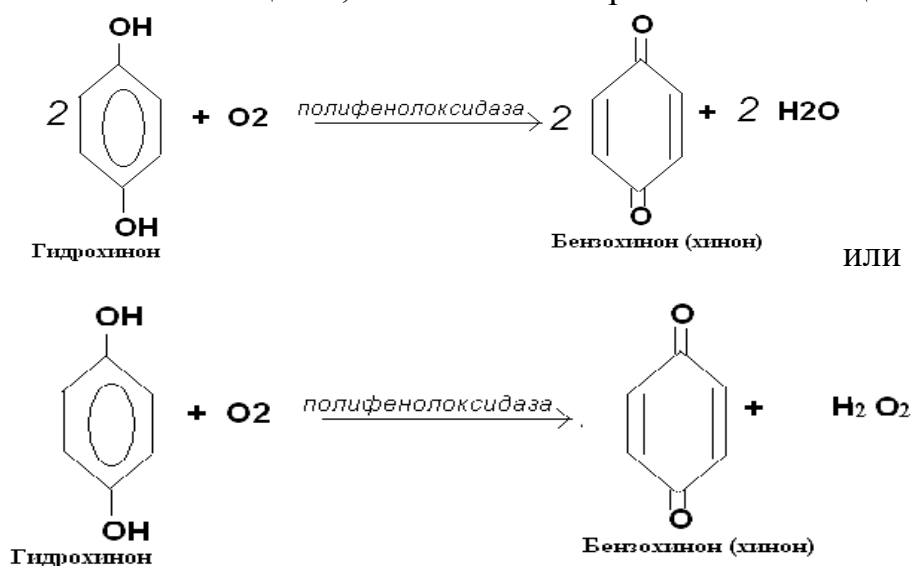


**Рис. 4 Действие пероксидазы в растворе гидрохинона и картофельного сока:** 1- сорт «Беллароза», 2- сорт «Колетте», 3- сорт «Любава», 4- сорт «Маяк» 5- сорт «Родриго»



**Рис. 5 Действие пероксидазы в растворе гидрохинона и картофельного сока с перекисью водорода:** 1 - сорт «Беллароза», 2 - сорт «Колетте», 3 - сорт «Любава», 4 - сорт «Маяк» 5 - сорт «Родриго»;

Образующийся хинон имеет цвет от оранжево – красного до темного кирпично-красного цвета. В ряде случаев идет и обильное газообразование, так как идет разрушение перекиси водорода другим ферментом - каталазой. Реакция, протекающая с изменением цвета, может быть выражена с помощью реакции:





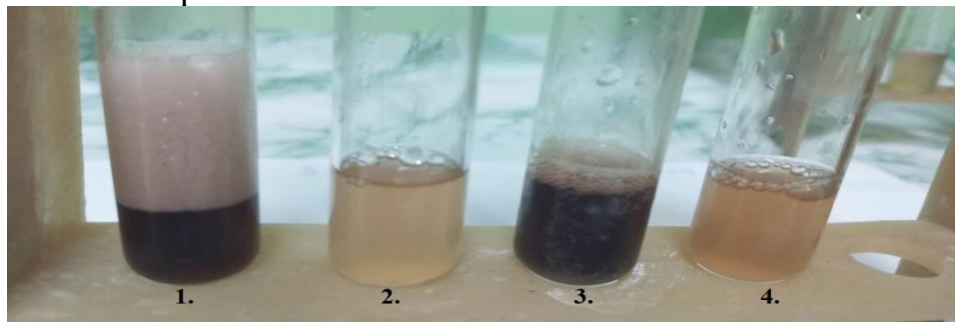
**Рис. 6. Реакции, протекающие в исследуемом растворе [7];**

Как можно увидеть на рисунке 4 и 5 цвет отличается, так как в присутствии перекиси водорода ускоряется реакция восстановления гидрохинона до хинона под действием фермента. В пробирках, где цвет изменился не значительно, так же присутствуют ферменты, но гидрохинон окисляется за счет фермента полифенолоксидазы, при этом также образуется перекись водорода, но органического происхождения (рис.6). Она окисляется каталазой, и мы видим на поверхности незначительное образование пузырьков газа (рис.4).

Таким образом, по цвету полученных растворов мы можем заключить, что наибольшее количество определяемых ферментов в картофельном соке сорта «Маяк», чуть менее в сортах «Колетте» и «Любава», а меньше всего в сорте «Беллароза». По полученным данным можно судить об устойчивости сорта к заболеваниям и его иммунном статусе. Сорт «Маяк» наименее восприимчив к заболеваниям, а вот сорт «Беллароза» среди представленных сортов, имеет максимальную устойчивость.

### **Качественный химический анализ на пероксидазу и полифенолоксидазу в картофеле подвергшемся озеленению**

Как можно заметить (рис.7), в картофельном соке клубней озелененных интенсивность окраски раствора выражена сильнее и когда присутствует перекись водорода (пробирка 1 и 3) и без нее в водном растворе с гидрохиноном (пробирка 2 и 4). Таким образом, можно говорить, что устойчивость клубней картофеля к заболеваниям выше у растений подвергшихся озеленению. Можно предположить, что это связано с содержанием в нем солонина, так как он обладает антимикробным и противогрибковым свойством. Эти свойства озелененного картофеля для посадки используются, чтобы сохранить его зимой, избежать порчи семенного материала.



**Рис.7 Сравнение сорта «Любава» (1,2- раствор сока озелененного картофеля, 3,4- раствор сока незелененного картофеля);**

В растворе с гидрохиноном, перекисью в картофеле сорта «Любава» обильное выделение газа, что говорит о действии фермента каталазы. Его роль мы не анализировали, т.к. перед нами не стояло такой задачи.

Из полученных результатов можно сделать следующие **выводы**:

1. Самыми популярными среди населения с. Июльское являются сорта картофеля «Беллароза», «Колетта», «Родриго», «Жуковский», «Маяк», «Любава». Высокое значение придается не только товарному виду и вкусу картофеля, но и его устойчивостью к заболеваниям и хорошей сохранности в течении зимнего и весеннего периода.
2. Наибольшее содержание полифенолоксидаз и пероксидаз содержится в сорте «Маяк», что говорит о его низкой устойчивости к заболеваниям картофеля. Больше всего изучаемых ферментов, содержится в сорте «Беллароза», что говорит о его высоком иммунном статусе, по сравнению с другими, представленными нами сортами.
3. Картофель, подвергшийся озеленению, содержит меньше пероксидаз и полифенолоксидаз, так как повышается его устойчивость к болезням в результате продолжительного воздействия на него света, который запускает другие защитные биохимические реакции и механизмы растения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В клетках растений и животных непрерывно протекают сложные химические процессы. Они регулируются белковыми веществами — ферментами, которые играют роль катализаторов химических реакций в клетках.

Окислительные ферменты — полифенолоксидаза и пероксидаза присутствуют во многих живых тканях,

При окислении некоторых веществ, например, гидрохинона, образуются окрашенные продукты реакции. Таким образом, зная содержание ферментов можно с уверенностью предполагать о физиологических процессах, протекающих в клетках, или же об их нарушении, вследствие воздействия на организм различных патогенов. Работа по изучению ферментов не нова, но каждый год появляются все новые сорта с различными генетическими характеристиками продукта и адаптированные для разных климатических условий.

Проводя исследование, мы удивились широкому разнообразию сортов, которые выращивают в нашем селе. Названия некоторых сортов услышали впервые. Хотелось бы выразить благодарность Меркушевой Алевтине Ивановне — жительнице села Июльское, за предоставленные клубни картофеля для исследования, что позволило нам использовать сорта, подвергшиеся одинаковым агротехнологическим приемам.

Практическая значимость исследования заключается в том, что его результаты будут интересны людям занимающимся выращиванием картофеля и его разведением. По количеству фермента пероксидаз и полифенолоксидаз можно определить как будет храниться тот или иной сорт, не будет ли он подвержен болезни. Наглядно убедились, что озеленение картофеля благотворно влияет на его иммунную устойчивость, о чем свидетельствовало более низкое содержание ферментов по сравнению с клубнями не подвергшимся этому воздействию.

В процессе написания работы узнали много нового о мире ферментов, наглядно убедились в их действии. Работа в химической лаборатории школы была интересна и позволила наглядно убедиться в действии ферментов. Работа кропотливая и требует большой подготовительной работы.

На наш взгляд было бы интересно изучить подробнее новые сорта картофеля, а также сравнить действие ферментов на протяжении всего года развития клубня картофеля от начала созревания, до момента его посадки. Хотелось бы изучить на конкретных примерах зараженного картофеля действия в нем ферментов. Исследования в этом направлении будут продолжены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев В.П., Соболев П. С., Попова Г. Н. Новые типы субстратов пероксидаз // Princ. ekol.. 2017. №3 (24). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-tipy-substratov-peroksidaz> (дата обращения: 12.11.2020).
2. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука, 1988 128 с.
3. Диксон М., Уэб Э. Ферменты. Т.1-3. М.: Мир, 1982 ,276 с.
4. Живетьев М. А., Папкина А. В., Граскова И. А., Войников В. К. Участие слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости к кольцевой гнили у диких мексиканских видов и культурных сортов картофеля // С.-х. биол., Сельхозбиология, 2014. №1
5. Колодязная В.С., Глазкова О.Р., Булькран М.С., Нагиев Т.Б. Влияние обработки клубнеплодов биопрепаратами на интенсивность дыхания и активность оксидаз при их хранении // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2015. №3.
6. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник. -М.: Дрофа, 2010 - 638 с.
7. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соровский образовательный журнал. 1999. № 1. С. 2-7.
8. Минаева О.М., Апенышева М.В., Акимова Е.Е., Блинова П.А., Куровский А.В. Влияние бактеризации семян пшеницы на активность оксидаз в растениях при фитопатогенной нагрузке // Достижения науки и техники АПК. 2015. №6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-bakterizatsii-semyan-pshenitsy-na-aktivnost-oksidaz-v-rasteniyah-pri-fitopatogennoy-nagruzke> (дата обращения: 12.11.2020).
9. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. Физиология растений, 2003, 53(3): 459-464.
10. Ольгин О.. Опыты без взрывов URL: <http://zadachi-pokhimii.ru/books/children/olgin.pdf> (дата обращения 15.10.2020)
11. Перфильева А. И., Рымарева Е. В., Живетьев М. А., Папкина А. В. Влияние гипертермии и заражения на активность общей пероксидазы картофеля двух сортов, контрастных по устойчивости к *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2012. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-gipertermii-i-zarazheniya-na-aktivnost-obshchey-peroksidazy-kartofelya-dvuh-sortov-kontrastnyh-po-ustoychivosti-k-clavibacter> (дата обращения: 01.11.2020).
12. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: Гиорд, 2004 – 240с.
13. Уайт А. и др. Основы биохимии, М.: Мир, 1981., 297с.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ**

**Анкета-опросник**  
<https://forms.gle/AJcxwf7pp81iFsja6>  
 (скриншот)



### Анкета о картофеле

Ответьте пожалуйста, на вопросы анкеты, это поможет нам в исследовании.

\* Обязательно

Укажите Ваш возраст \*

Мой ответ \_\_\_\_\_

Укажите населенный пункт, где Вы проживаете. \*

Мой ответ \_\_\_\_\_

Выращиваете ли вы на приусадебном участке картофель? \*

Да

нет

Какой сорт картофеля Вы выращиваете? (можно указать несколько ответов) \*

Винетта

Бклароса

Невский

Родриго

Жуковская

Маяк

Колетта

Другое: \_\_\_\_\_

По каким характеристикам Вы выбираете сорт картофеля для разведения (можно выбрать несколько ответов) \*

Вкус

Срок созревания

Устойчивость к заболеваниям

Урожайность (много клубней картофеля на кусту)

Лежкость

Товарный вид

Другое: \_\_\_\_\_

Благодарим за участие в анкетировании.

Отправить