

СПЕЦИАЛИТЕТ

С.Ф. Андрусенко

ОБЩАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Рекомендовано
Экспертным советом УМО в системе ВО и СПО
в качестве **учебника** для направления специалитета
«Фундаментальная медицина»



КНОРУС • МОСКВА • 2023

УДК 61(075.8)
ББК 5+28.072я73
А66

Рецензенты:

Т.И. Джандарова, проф. кафедры биомедицины и физиологии Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, д-р биол. наук,

Е.В. Волосова, доц. кафедры химии и защиты растений Ставропольского государственного аграрного университета, канд. биол. наук

Автор

С.Ф. Андрусенко, доц. кафедры биомедицины и физиологии Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, канд. биол. наук

Андрусенко, Светлана Федоровна.

А66 Общая и медицинская энзимология : учебник / С.Ф. Андрусенко. — Москва : КНОРУС, 2023. — 242 с. — (Специалитет).

ISBN 978-5-406-10814-7

Представлен теоретический материал по энзимологии. Состоит из введения, 10 глав с контрольными вопросами и заключения. Рассмотрены структура и функции ферментов, история их открытия и исследования, значение отдельных ферментов, методы выделения и анализа, номенклатура и классификация ферментов, ферментативная кинетика, активаторы и ингибиторы ферментов, механизмы ферментативных реакций, теории действия ферментов, вопросы модификации ферментов и причины некоторых заболеваний, возникающих в результате патологии ферментов, некоторые аспекты энзимодиагностики и энзимотерапии, а также получение и использование иммобилизованных ферментов для медицинских целей.

Соответствует ФГОС ВО последнего поколения.

Для студентов специалитета, обучающихся по направлению «Фундаментальная медицина».

Ключевые слова: энзимы (ферменты); общая энзимология; медицинская энзимология.

**УДК 61(075.8)
ББК 5+28.072я73**

Андрусенко Светлана Федоровна

ОБЩАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Изд. № 664625. Формат 60×90/16. Гарнитура «Newton».

Усл. печ. л. 15,5. Уч.-изд. л. 12,0. Тираж 500 экз.

ООО «Издательство «КноРус».

117218, г. Москва, ул. Кедрова, д. 14, корп. 2.

Тел.: +7 (495) 741-46-28.

E-mail: welcome@knorus.ru www.knorus.ru

Отпечатано в АО «Т8 Издательские Технологии».

109316, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 5.

Тел.: +7 (495) 221-89-80.

ISBN 978-5-406-10814-7

© Андрусенко С.Ф., 2023
© ООО «Издательство «КноРус», 2023

УДК 615.0

ББК 52.81

А66

Авторы:

С.Ф. Андрусенко, доцент кафедры биомедицины и физиологии Института живых систем ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», канд. биол. наук, доц.

Е.В. Денисова, доцент кафедры биомедицины и физиологии Института живых систем ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», канд. биол. наук, доц.

Андрусенко, Светлана Федоровна.

А66

Общая и медицинская энзимология : учебно-методическое пособие / С.Ф. Андрусенко, Е.В. Денисова. — Москва : РУСАЙНС, 2020. — 208 с.

ISBN 978-5-4365-5583-6

В лабораторном практикуме представлен теоретический материал, методы качественного и количественного определения энзимов в различных биообъектах, способы выделения и очистки веществ и влияния различных факторов на свойства энзимов. Лабораторные работы сформированы с учетом доступности биоматериала, приборной базы и реактивов. В конце каждого занятия приводятся контрольные вопросы для проверки степени освоения пройденного материала.

***Ключевые слова:** энзимы (ферменты), общая энзимология, медицинская энзимология.*

УДК 615.0

ББК 52.81

© Андрусенко С.Ф.,
Денисова Е.В., 2020

© ООО «РУСАЙНС», 2020

ISBN 978-5-4365-5583-6

Оглавление

Авторское предисловие	5
Введение	6
Лабораторная работа № 1 ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ	9
Лабораторная работа № 2 МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ	13
Лабораторная работа № 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ	19
Лабораторная работа № 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ	28
Лабораторная работа № 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗ	33
Лабораторная работа № 6. ИССЛЕДОВАНИЕ УРЕАЗЫ	38
Лабораторная работа № 7. ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛАЗЫ	42
Лабораторная работа № 8. ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛАЗ	49
Лабораторная работа № 9. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПАЗ	54
Лабораторная работа № 10. ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ	59
Лабораторная работа № 11. КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ	65
Лабораторная работа № 12. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА	73
Лабораторная работа № 13. ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА	78
Лабораторная работа №14. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ	84
Лабораторная работа № 15. АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ	89
Лабораторная работа № 16. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА	97
Лабораторная работа № 17. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ	103

Лабораторная работа № 18. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ	108
Лабораторная работа № 19. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ТКАНЕЙ	114
Лабораторная работа №20. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МОЧИ	119
Лабораторная работа № 21. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СЛЮНЫ	125
Лабораторная работа № 22. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА	132
Лабораторная работа № 23. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО СОКА	138
Лабораторная работа № 24. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МОЛОКА.....	143
Лабораторная работа № 25. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МЕДА	148
Лабораторная работа № 26. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ.....	151
Лабораторная работа № 27. ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ	155
Лабораторная работа № 28. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ	160
Лабораторная работа № 29. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ	164
Лабораторная работа № 30. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ В НЕТРАДИЦИОННЫХ СРЕДАХ	169
Глоссарий.....	174
Список сокращений	192
Литература	193

Авторское предисловие

Ферменты – важный класс веществ, который нашел применение в различных областях науки и техники. Эти вещества издавна привлекали внимание исследователей, первые сведения использования ферментов известны с глубокой древности. Ферменты перспективны для использования в различных отраслях: пищевой промышленности, изготовление алкогольных напитков, производстве кисломолочных продуктов, производстве сыра, в обработке кожевельного сырья, в сельском хозяйстве, медицине, фармации и в косметологии.

Материал пособия включает 30 лабораторных работ, построенных по единой схеме: тема занятия, цель занятия, теоретическая часть, материалы и реактивы, приборы и посуда, рисунок используемого прибора, уравнения реакций, ход работы, расчеты, выводы и контрольные вопросы.

Результаты работы желательно оформлять в виде таблицы или графика. Все физические величины нужно приводить в международной системе СИ.

Необходимо соблюдать технику безопасности при работе в лаборатории, правила работы с веществами в вытяжном шкафу, правила работы с горелкой, электрическими приборами и т.д.

В пособии использованы, в том числе материалы из открытых учебников сети Интернет. Поскольку источники, размещающие у себя информацию, не всегда являются обладателями авторских прав, просим авторов, использованных нами материалов откликнуться, и мы разместим указание на их авторство.

Авторы будут благодарны за все замечания и дополнения, которые могут улучшить текст пособия.

Введение

Ферменты или энзимы, это высокоспециализированные вещества, используемые организмами для ускорения химических реакций. Термин «фермент» в переводе с лат. *Fermentum* означает закваска, а в переводе с греческого *En* – в, внутри и *zyme* – дрожжи. Раздел биохимии, изучающий биологические катализаторы белковой природы, называется энзимологией.

Экспериментально доказано, что большинство ферментов имеет белковую природу. Это подтверждают следующие факторы:

- 1) при гидролизе они распадаются на аминокислоты;
- 2) под действием денатурирующих факторов (ультрафиолет, рентгеновское излучение, ультразвук, высокая температура, действие минеральных кислот, щелочей, алкалоидов, солей тяжелых металлов) происходит денатурация ферментов;
- 3) ферменты получены в кристаллическом виде.

Первым ферментом, полученным в кристаллической форме, в 1926 г Самнером была уреаза. В зависимости от условий катализа кристаллизуется в различной форме.

При этом кристаллические формы ферментов порой обладают большей каталитической активностью, нежели ферменты в обычном виде.

Получены в кристаллическом виде химозин, трипсин и **трипсиноген**.

- 4) ферментам присущи свойств, характерные для высокомолекулярных веществ: амфотерность; электрофоретическая подвижность, неспособны к диализу через полупроницаемые мембраны, высокая молекулярная масса.

В восьмидесятых годах XX века произошло неожиданное открытие. Было установлено, что существуют катализаторы небелковой природы, состоящие только из РНК, их назвали **рибозимы**.

Рибозимы могут использоваться как лекарственные препараты направленного действия для лечения рака и вирусных инфекций. Успех в этой области зависит от специфичности рибозимов, которые, должны избирательно вычлнять молекулы РНК-мишени из популяции РНК, присутствующей в клетках.

От обычных белков ферменты отличает то, что на поверхности глобулы фермента есть активный центр. Молекулы субстратов, которые участвующие в реакциях чаще всего имеют гораздо меньшие размеры по сравнению с молекулой фермента, поэтому было высказано

предположение, что при образовании фермент-субстратных комплексов в контакт вступает лишь определенная часть ферментативной молекулы, образованная особой аминокислотной последовательностью. Отсюда возникло представление о центрах фермента.

Активный центр – это участок фермента, в котором происходит связываеся субстрат и протекает химическая реакция. В активном центре выделяют каталитический центр, который вступает во взаимодействие с субстратом, и адсорбционный (связывающий) центр.

Характеристика активного центра:

1. Образуется в результате формирования третичной структуры.
2. Формируется боковыми радикалами аминокислот.
3. Представляет собой область, занимающую небольшую часть молекулы фермента.
4. Не является жесткой структурой, его конформация может меняться.
5. В сложных ферментах в состав активного центра входят простетические группы или коферменты.
6. Связывание субстрата и активного центра происходит за счет не ковалентных связей.
7. Взаимодействие субстрата и активного центра требует их сближения и соответствия пространственной конфигурации.

Активных центров в структуре фермента может быть несколько. Чаще всего в них входят такие функциональные группы аминокислот как гидроксигруппы серина, треонина, тирозина; сульфогруппы цистеина; карбоксильные группы глутамата и аспартата; аминогруппы аргинина, лизина и др.

Адсорбционный центр – это участок фермента в активном центре, где происходит связывание субстрата. Его формирование идет из нескольких аминокислот, расположенных рядом с каталитическим центром. Главная функция адсорбционного центра – связывание субстрата и его передача каталитическому центру в наиболее удобном для последнего положении. Процесс сорбции протекает за счет слабых типов связей, в связи с чем, сорбция обратима.

Помимо активного центра, в структуру фермента может входить аллостерический центр, представляющий собой участок молекулы фермента, в котором происходит связывание эффекторов или модификаторов (низкомолекулярных веществ), молекулы которых отличны по структуре от молекул субстрата. Аллостерические центры характерны для ферментов, у которых активность может меняться под действием некоторых биологически активных веществ, например гормонов и ме-

предположение, что при образовании фермент-субстратных комплексов в контакт вступает лишь определенная часть ферментативной молекулы, образованная особой аминокислотной последовательностью. Отсюда возникло представление о центрах фермента.

Активный центр – это участок фермента, в котором происходит связываеся субстрат и протекает химическая реакция. В активном центре выделяют каталитический центр, который вступает во взаимодействие с субстратом, и адсорбционный (связывающий) центр.

Характеристика активного центра:

1. Образуется в результате формирования третичной структуры.
2. Формируется боковыми радикалами аминокислот.
3. Представляет собой область, занимающую небольшую часть молекулы фермента.
4. Не является жесткой структурой, его конформация может меняться.
5. В сложных ферментах в состав активного центра входят простетические группы или коферменты.
6. Связывание субстрата и активного центра происходит за счет не ковалентных связей.
7. Взаимодействие субстрата и активного центра требует их сближения и соответствия пространственной конфигурации.

Активных центров в структуре фермента может быть несколько. Чаще всего в них входят такие функциональные группы аминокислот как гидроксигруппы серина, треонина, тирозина; сульфогруппы цистеина; карбоксильные группы глутамата и аспартата; аминогруппы аргинина, лизина и др.

Адсорбционный центр – это участок фермента в активном центре, где происходит связывание субстрата. Его формирование идет из нескольких аминокислот, расположенных рядом с каталитическим центром. Главная функция адсорбционного центра – связывание субстрата и его передача каталитическому центру в наиболее удобном для последнего положении. Процесс сорбции протекает за счет слабых типов связей, в связи с чем, сорбция обратима.

Помимо активного центра, в структуру фермента может входить аллостерический центр, представляющий собой участок молекулы фермента, в котором происходит связывание эффекторов или модификаторов (низкомолекулярных веществ), молекулы которых отличны по структуре от молекул субстрата. Аллостерические центры характерны для ферментов, у которых активность может меняться под действием некоторых биологически активных веществ, например гормонов и ме-

Лабораторная работа № 1

ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: освоить технику безопасности при работе в лаборатории, изучить правила работы с ферментами.

1. ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории разрешается только после предварительной подготовки. Необходимо ознакомиться с руководством к занятию, основными физическими и химическими свойствами используемых веществ, изучить теоретический материал, относящийся к данной теме, проработать примеры необходимых расчетов, отметить опыты, выполнение которых требует особого внимания и осторожности.

2. Прежде чем приступить к выполнению опыта, необходимо продумать его в целом, составить план проводимых операций. Все приборы, в которых проводится тот или иной опыт, должны быть собраны компактно и целесообразно.

3. Обязательным является выполнение всех опытов, начиная от приготовления некоторых реактивов, до анализа и оценки результатов исследований. Каждая работа является контрольной задачей и обсуждение полученных результатов легче связать с соответствующим теоретическим материалом, чему способствуют контрольные вопросы, охватывающие каждую тему.

4. В лаборатории рабочее место нужно содержать в чистоте. На рабочем столе должны находиться только те предметы, которые нужны в данное время для работы. Запрещается без разрешения выполнять опыты, не описанные в занятии.

5. Сухие реактивы необходимо брать чистым шпателем или специальной ложечкой. При дозировании растворов из склянок следует держать последние таким образом, чтобы этикетка была повернута вверх (во избежание ее загрязнения). Крышки и пробки от реактивных банок и склянок следует помещать на стол поверхностью, не соприкасающуюся с реактивом.

6. Если в руководстве нет указания, какое количество вещества нужно взять для проведения опыта, предлагается брать сухое вещество в количестве, закрывающем дно пробирки, а раствор не более 1/6 объема пробирки. При работе с малыми количествами вещества, большинство операций (нагревание, охлаждение, фильтрование, высушивание и др.) требует значительно меньше труда и времени. Неизрасходованные

реактивы нельзя высыпать (выливать) обратно в склянки, их надо отдать лаборанту.

7. Для приготовления водных растворов и ополаскивания вымытой стеклянной посуды следует пользоваться дистиллированной водой.

8. Важно рационально и правильно использовать рабочее время. Если определение или опыт по какой-либо причине задерживаются, следует начать другое определение или подготовку к другому опыту. Работа в лаборатории требует тишины, переговоры следует вести в полголоса.

9. Необходимо соблюдать правила пожарной безопасности и техники безопасности. Работать в лаборатории только в халате.

10. Уходя из лаборатории, необходимо убедиться, что все краны (газовые, водопроводные) закрыты; все электроприборы выключены; столы убраны; дверцы вытяжных шкафов опущены.

2. ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Ферменты, как все белки, являются относительно неустойчивыми веществами. Они легко подвергаются денатурации и инаktivации. Работая с ферментами следует соблюдать определенные правила.

1. Запрещено сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образование пены при их перемешивании, что бы не допустить отрицательного влияния на него кислорода воздуха.

2. Растворенные, лиофильно высушенные, материалы содержащие ферменты, перед применением надо выдержать при 20°C в течение, указанного в инструкции времени, за это время энзим станет активным.

3. Время начала и окончания ферментативной реакции нужно засекать по часам. Начало реакции принимают время добавления сыворотки в смесь. Если определение ведут в нескольких параллелях, то сыворотку в смесь надо прибавлять через определенные по часам временные промежутки. По прошествии определенного времени нужно с тем же интервалом закончить реакцию в остальных пробах.

4. Перед началом реакции температуру реагента следует привести к значению указанному в инструкции с точностью $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. При определении активности ферментов необходимо использовать водяную баню.

5. Нельзя менять соотношение реагент/сыворотка. Уменьшение из-за экономии приведет к сужению области определения активности фермента, что может привести к получению заниженного результата. При повышении соотношения понизится чувствительность метода.

6. Не стоит разбавлять рабочий реагент, при этом условия реакции отклонятся от оптимального значения, это повлечет занижение результата при определении активности ферментов.

7. В случае если концентрация фермента в биожидкости выше верхнего уровня, то пробу нужно разбавить по инструкции. В противном случае это может привести к ошибкам, т.к. в сыворотке есть большое количество различных веществ, которые могут влиять на результат определения.

8. Фотометрирование нужно вести по указанному в инструкции диапазону длин волн. В случае расчета концентрации аналита или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции.

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна соответствовать указанной в инструкции.

10. При построении калибровочных кривых необходимо делать не менее 5 параллельных определений холостой пробы и каждого стандартного образца.

11. Калибровочную пробу, используемую для расчета концентрации аналита или активности фермента, необходимо ставить для каждой серии анализов в четырех параллелях.

12. После окончания работы необходимо хорошо помыть посуду, пипетки, наконечники с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой.

13. Требуется слежение за качеством дистиллята, используемого в анализе. Избыток ионов в ее составе, может ингибировать ферментативную активность.

14. При работе с наборами ферментов нужно пользоваться автоматическими дозаторами. Наконечники повторно не использовать.

15. Следует измерять активность ферментов в биоматериале в день взятия биопробы. Продолжительное хранение материала приводит к изменению активности ферментов.

16. Необходимо соблюдать условия хранения наборов ферментов. Хранение при более высокой температуре, может привести к инактивации ферментов. Ряд ферментов допустимо хранить в замороженном состоянии или в лиофилином виде, некоторые можно замораживать после добавления стабилизаторов. Но несколько раз замораживать и размораживать пробы нельзя.

17. Необходимо проверять правильность результатов исследования. При определении ферментативной активности учитывать рекомендации, касающиеся используемого метода.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Порядок работы в лаборатории. Техника безопасности при работе в лаборатории.
2. Определение предмета энзимологии и ее задачи.
3. Значение работ отечественных ученых в развитии энзимологии.
4. Значение работ зарубежных ученых в развитии энзимологии.
5. Биологическая роль ферментов.
6. Применение ферментов.
7. Последние достижения в изучении ферментов.
8. Связь энзимологии с другими науками.
9. Какую лабораторную посуду применяют в энзимологии?
10. Правила мытья лабораторной посуды.
11. Какое оборудование и какие анализы на нем проводят в энзимологии?
12. Правила работы с ферментами.
13. Правила хранения ферментативных препаратов.
14. Получение первых ферментативных препаратов.
15. Основные приёмы работы с биологическими объектами.
16. Объекты энзимологических исследований. Выделение ферментов из биоматериала.
17. Методы, применяемые при ферментативных анализах.

Лабораторная работа № 2

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить методы выделения и очистки ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основные источники сырья для выделения ферментов:

1. Ткани животных, особенно поджелудочная железа и слизистая желудка.
2. Соки растений, например папани и ричин и растительные ткани, например, амилаза ячменя.
3. Микроорганизмы, например мукорпепсин.
4. Грибы, например инвертаза дрожжей.

Ко всем ферментам предъявляются требования, по чистоте, количеству, стоимости, степени чистоты готового фермента.

Наибольшее значение в практической деятельности нашли микроорганизмы, что объясняется их доступностью, эффективным промышленным производством, относительно дешевым сырьем, возможностью управления процессом биосинтеза и т.д. Только с помощью микроорганизмов удалось получить некоторые ферменты, например, целлюлазу и глюкозоизомеразу.

Получение индивидуальных ферментов из биологического материала включает в себя ряд операций:

- гомогенизация биологического материала и дезинтеграция клеточных стенок;
- фракционирование ферментов;
- экстракцию ферментов (перевод их в растворённое состояние);
- разделение смеси ферментов на индивидуальные ферменты.

Ферменты являются термолабильными веществами и под действием денатурирующих агентов легко теряют биологическую активность, в связи с чем были разработаны специальные методы выделения ферментов при температуре, не превышающей 4 °С, с использованием реагентов сохраняющих нативную структуру фермента.

Очищенные ферментативные препараты нужны для исследования процессов кинетики ферментативных процессов, кофакторах, свойствах и структуре активных центрах, исследования механизма действия ферментов и т.д.

При выделении и очистке ферментов используют различные методы, приведенные в таблице1.

Таблица1– Основные методы выделения и очистки ферментов

№	Способ очистки	Используемые методы
1	Дезинтеграция	Механическая, физическая, химическая, энзиматическая, биологическая
2	Экстракция	Водой, разбавленными кислотами и щелочами, буферными растворами, органическими растворителями, водными двухфазными системами
3	Отделение нерастворимых частиц	Центрифугирование, фильтрация, сепарация
4	Удаление небелковых веществ	Диализ, гельфильтрация, ультрафильтрация, обработка органическими растворителями
5	Разделение ферментов	Солями, органическими растворителями, с помощью водорастворимых полимеров, денатурации, адсорбционная, ковалентная, ионная, распределительная, аффинная хроматография, гельфильтрация, электрофорез
6	Концентрирование	Ультрафильтрация, лиофильная сушка, выпаривание в вакууме, диализ солями, органическими растворителями

1. ЛИЗИС КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ДЕТЕРГЕНТОВ

Это энзиматический способ дезинтеграции клеточных оболочек.

Материалы и реактивы: трис-ЭДТА буфер: 50 мМтрис- HCl , pH 8,0 и 10мМ ЭДТА (молекулярный вес 292,0); свежеприготовленный раствор лизоцима в TE-буфере, 10 мг/мл.

Приборы и посуда: центрифуга, центрифужные пробирки, баня со льдом, пипетка.

Ход работы

Клетки несколько раз промывают забуференным солевым раствором (например, 10 мМтрис- HCl буфером, pH 7,5, с 150 мМ NaCl) и центрифугируют. Затем биомассу суспендируют до плотности $107\text{--}108$ кл/мл или 3–4 мг сухих клеток на 1 мл в том же буфере, с добавлением 0,1–0,3 % Тритона X-100. Содержимое перемешивают и инкубируют

на льду в течение 10–90 мин. Для стабилизации в экстракт добавляют 0,2 объема 50 % глицерола.

2. ГОМОГЕНИЗАЦИЯ

Данный способ использовать для микроорганизмов с тонкой клеточной стенкой, для клеток животных и некоторых растений.

Материалы и реактивы: дрожжи, буферный раствор.

Приборы и посуда: гомогенизатор, баня со льдом.

Ход работы

Клетки суспендируют в буферном растворе (3–5 объемов), переносят в гомогенизатор и пропускают через него биомассу 10 раз. При использовании механических гомогенизаторов время гомогенизации составляет 1–2 мин с интервалами по 20 с, в промежутках биоматериал охлаждают во льду.

3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СОЛЯМИ

Фракционирования солями широко используют при выделении белковых веществ. На процесс высаливания так же оказывают влияние pH и температура.

Наиболее часто для фракционирования используют сульфат аммония, позволяющий получать четкое разделение фракций белковых веществ. Кроме того, он не оказывает инактивирующего действия на ферменты. Сульфат аммония добавляют к раствору, содержащему ферменты порционно, при постоянном перемешивании. Концентрацию сульфата аммония выражают в «процентах насыщения» или «долях от полного насыщения». За 100 % принимают максимальную возможную концентрацию сульфата аммония при комнатной температуре. Для достижения 100 % насыщения при комнатной температуре на 1 л раствора добавляют 760 г соли. Исходя из этого, проводят расчет количества соли, необходимой для прибавления к рабочему объему белка, для достижения нужной степени насыщения.

Материалы и реактивы: супернатант, сульфат аммония, дистиллированная вода, трис-HCl буфер.

Приборы и посуда: магнитная мешалка, центрифуга, центрифужные пробирки, весы, pH-метр, пипетка, пипетатор, спектрофотометр.

Ход работы

Для очистки фермента из экстракта объемом 5 мл проводят вы-
саливание фракции насыщения 35–80 % сульфата аммония.

Для получения 35 % насыщения сольюберут навескусульфата
аммония массой 0,985 г и высыпают раствор, содержащий фермент
небольшими порциями поэтапно, при перемешивании. Каждую порцию
вносят после растворения предыдущей порции. При этом следят за ве-
личиной pH; при необходимости корректировки значения pH нейтра-
лизацию проводятраствором NH_4OH .

После растворенияпоследней порции соли раствор перемешива-
ют течение 15–30 мин, центрифугируют при 5–10 тыс. g в течение 20–
30 мин и в дальнейшем используютсупернатант.

На второй стадии для получения 80 % насыщения сульфата ам-
мония для 4 мл супернатанта взвешивают 1,1 г сульфата аммония и
проводятход работы, аналогично первой стадии.

После центрифугирования осадок перерастворяют в объеме50
мМтрис–HCl буфера с pH 7,5 и определяют спектрофотометрическую
активность фермента. Затем освобождают фермент от избытка сульфа-
та аммонияв результате проведения диализа.

4. ДИАЛИЗ

Метод диализа основан на неспособности коллоидных частиц
проходить через полупроницаемые мембраны, в то время как частицы
кристаллоидов легко проходят через них. Обладая большим диамет-
ром, частицы фермента не способны к проникновению через мембра-
ны. Диализ используется для очистки коллоидных растворов от низко-
молекулярных примесей.

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, 10% раствор
 NaOH , 5% раствор CuSO_4 .

Приборы и посуда: диализный мешочек, стеклянные палочки,
резиновые кольца, стакан, пипетка, пипетатор.

Ход работы

Раствор фермента наливают во влажный диализный мешочек.
Закрепляют верхний край мешочка двумя стеклянными палочками,
скрепляют их концы резиновыми кольцами и помещают в стакан с ди-
стиллированной водой на 30 мин, меняя воду каждые 10 мин (рис. 1).



Рис. 1. Диализ коллоидных растворов

После окончания диализа с порциями диализата и диализируемой жидкости проделывают качественные реакции на наличие соли и белка, чтобы удостовериться в диффузии соли в диализируемую жидкость и наличие фермента в мешочке.

Для этого к нескольким каплям диализата прибавляют вдвое меньшее количество 10% раствора NaOH и 1–2 капли 5% раствора CuSO_4 . При появлении синего окрашивания в диализате делают вывод об отсутствии в нем фермента. Аналогичную реакцию проводят с диализируемой жидкостью и подтверждают наличие в нем фермента.

Что бы убедиться, в том, что все соли перешли из диализируемой жидкости в диализат проводят качественную реакцию на соответствующую соль, которой, проводилось фракционирование. Так, если например, осаждение проводилось сульфатом аммония, то при добавлении растворимой соли бария происходит реакция, в которой выпадает осадок BaSO_4 , не растворимый в избытке серной кислоты. Это качественная реакция на сульфат-ион.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Источники ферментов. Нахождение ферментов в природных объектах.
2. Локализация ферментов в клетке.
3. Последовательность операций при выделении ферментов.
4. Методы дезинтеграции клеток для получения ферментов.
5. Экстракция ферментов.



Рис. 1. Диализ коллоидных растворов

После окончания диализа с порциями диализата и диализируемой жидкости проделывают качественные реакции на наличие соли и белка, чтобы удостовериться в диффузии соли в диализируемую жидкость и наличие фермента в мешочке.

Для этого несколькими каплям диализата прибавляют вдвое меньшее количество 10% раствора NaOH и 1–2 капли 5% раствора CuSO_4 . При появлении синего окрашивания в диализате делают вывод об отсутствии в нем фермента. Аналогичную реакцию проводят с диализируемой жидкостью и подтверждают наличие в нем фермента.

Что бы убедиться, в том, что все соли перешли из диализируемой жидкости в диализат проводят качественную реакцию на соответствующую соль, которой, проводилось фракционирование. Так, если например, осаждение проводилось сульфатом аммония, то при добавлении растворимой соли бария происходит реакция, в которой выпадает осадок BaSO_4 , не растворимый в избытке серной кислоты. Это качественная реакция на сульфат-ион.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Источники ферментов. Нахождение ферментов в природных объектах.
2. Локализация ферментов в клетке.
3. Последовательность операций при выделении ферментов.
4. Методы дезинтеграции клеток для получения ферментов.
5. Экстракция ферментов.

Лабораторная работа № 3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: провести выделение и исследование активности некоторых ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Наименования ферментов по тривиальной номенклатуре (случайные признаки) используются и сегодня, например пепсин (от греч. *пепсин* – пищеварение), трипсин (от греч. *трипсис* – разжижаю). Они ускоряют гидролиз белков и по действию являются протеолитическими.

Наиболее привычно название ферментов по рациональной номенклатуре, согласно которой название фермента состоит из названия субстрата и окончания –аза. Предложил ее в 1883 г. Э. Дюкло. Так, фермент, ускоряющий реакцию расщепления крахмала, назван амилаза (от греч. *амилон* – крахмал), расщепления липидов – липаза (от греч. *линос* – жир) и т.п.

На V Международном биохимическом конгрессе был утвержден научно обоснованный проект номенклатуры. Название фермента необходимо формировать из химического названия субстрата и названия катализируемой реакции. Если реакция сопровождается переносом группировки атомов от субстрата к акцептору, в название фермента включает наименование акцептора. В основу классификации ферментов лежал тип катализируемой реакции.

В августе 2018 г был введен 7 класс ферментов. Таким образом согласно современной классификации ферменты делят на семь классов:

КФ 1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции).

КФ 2. Трансферазы (реакции межмолекулярного переноса атомов, групп атомов, радикалов).

КФ 3. Гидролазы (расщепление внутримолекулярных связей органических молекул с участием воды).

КФ 4. Лиазы (разрыв связей C–O, C–C, C–N, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов негидролитическим путем).

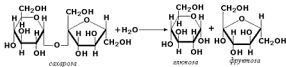
КФ 5. Изомеразы (взаимопревращения оптических и геометрических изомеров, т.е. ускоряют пространственные или структурные перестройки в пределах одной молекулы).

КФ 6. Лигазы (синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ).

КФ 7. Транслоказы (объединяет мембранные ферменты, функцией которых является перенос ионов).

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ИНВЕРТАЗЫ

Инвертаза катализирует гидролиз сахарозы.



Материалы и реактивы: дрожжи, 4% уксуснокислый натрий, толуол, 4 М уксусная кислота, ацетон, хлорид натрия, реактивы для определения белка по методу Лоури, реактивы для определения активности инвертазы, 0,05 М ацетатный буфер с pH 4,8.

Реактивы для определения белка по методу Лоури: реактив №1: 2 % раствор Na_2CO_3 в 0,1 н растворе NaOH; реактив №2: 0,5 % раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1% цитрате натрия; реактив №3 готовится непосредственно перед работой: 15 мл реактива №1 + 0,3 мл реактива №2; реактив №4: 10 г $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ и 2,5 г $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ помещают в круглодонную колбу на 200 – 250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85 % раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной HCl. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г Li_2SO_4 , 5 мл воды и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят водой с таким расчетом, чтобы получился 1 н раствор кислоты. Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н щелочью в присутствии фенолфталеина.

Приборы и посуда: центрифуга, центрифужные пробирки, мешалка, весы, холодильник, термостат, цилиндр, шейкер, цилиндр, баня со льдом, колба, pH-метр, пипетка, пипетатор.

Ход работы

В колбу помещают 25 г дрожжей, приливают 50 мл 4% уксуснокислого натрия и перемешивают в течение 15 минут при 2000 об/мин на мешалке, после чего добавляют 3,5 мл толуола и продолжают перемешивать еще 15 минут при той же скорости.

Колбу помещают в термостат при 30 °C на 60 час, по окончании термостатирования массу центрифугируют в течении 45 минут со скоростью 6000 об/мин, при температуре -4 °C. Надосадочную жидкость сливают, осадок промывают 10 мл воды и еще раз центрифугируют в течении 30 минут со скоростью 6000 об/мин.

Надосадочные жидкости объединяют и отбирают 10 мл жидкости, которую помещают в холодильник для определения активности инвертазы и количества белка.

Колбу с супернатантом помещают в баню со льдом, доводя pH до 4,2 в ходе добавления 4M раствора уксусной кислоты. Полученный раствор помещают в холодильник на 12 – 16 часов. В результате либо образуется осадок, либо мутный раствор, который центрифугируют в течение 30 мин со скоростью 3000 об/мин. Измеряют объём супернатанта и 10 мл отбирают и помещают в холодильник для последующего определения активности фермента и количества белка.

На третьей стадии супернатант нагревают до 50 °C, в течение 20 минут на водяной бане, охлаждают под струёй воды, а затем в бане со льдом до +1 °C. С целью контроля на данной стадии берут 10 мл жидкости, в котором в дальнейшем определяют активность инвертазы и количества белка.

В заключительной стадии к одной части раствора фермента с pH 4,2 при +1 °C, добавляют три части ацетона, охлажденного до -20 °C в морозильной камере. Выдерживают 30 минут, затем центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 4000 об/мин при температуре -4 °C, переносят осадок из пробирки на предварительно взвешенные предметное стекло или в бюкс и определяют массу осадка. Осадок хранят в холодильнике при -4 °C.

Определяют активности инвертазы и содержание белка по Лоури во всех ранее отобранных на хранение образцах.

Для определения активности инвертазы, часть осадка растворяют в 2–3 мл холодного 0,05 M ацетатного буфера с pH 4,8. Из этого раствора готовят рабочие растворы, разбавляя их так, чтобы содержание белка определённое по методу Лоури не превышало 0,25 мг/мл. Определение активности фермента ведут в растворе с содержанием белка 1–4 мг/мл.

Рассчитывают активность фермента в 1 мл исходного плазмоллизата и всех фракциях (А/мл), определяют удельную активность Е/мг, степень очистки и выход фермента на каждой стадии. Данные вносят в таблицу 2.

Таблица 2– Эффективность выделения фермента инвертазы из дрожжей

Стадия очистки	Объем, V мл	Активность А/мл	Суммарная активность А/мл $\times$ V	Содержание белка мг/мл	Удельная активность Е/мг	Степень очистки	Выход %,
исходный плазмоллизат							
осаждение при изменении рН							
термо- обработка							
осаждение ацетоном							

По результатам табличных данных проводят оценку эффективности выделения инвертазы и степени очистки фермента.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АВТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МУКИ

Материалы и реактивы: пшеничная мука, дистиллированная вода, толуол, 0,1 н раствор гидроксида натрия, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: весы, пипетка, цилиндр, воронка, фильтровальная бумага, термостат, колбы, бюретка.

Ход работы

К навеске пшеничной муки массой 5 г приливают 50 мл дистиллированной воды (рН 7,0) и 0,05 мл толуола. Смесь перемешать и инкубировать в термостате 60 мин при температуре 37 °С, периодически перешивая ее. Затем доводят объем до 100 мл и фильтруют. В фильтрате определяют азот аминокислот формальным титрованием, путем титрования 0,1 н раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания, в присутствии индикатора 1 % раствора фенолфталеина. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором формальное титрование проводят до инкубации.

Количество азота аминокислот, образующегося при действии протеолитических ферментов, содержащихся в 100 г исследуемого продукта (в мг), определяют по формуле:

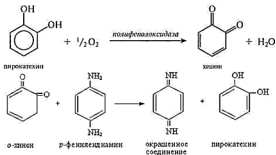
$$X = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot n},$$

где X – количество азота аминокислот, а – количество 0,1 н раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование опыта, в мл; b – количество 0,1 н раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование контроля, в мл; V_1 – количество фильтрата, взятого для определения аминного азота; V – количество полученной болтушки в мерной колбе в мл; n – навеска исследуемого материала в г; 1,4 – количество аминного азота, эквивалентное 1 мл раствора натрия гидроксида концентрации 0,1 моль/л, мг.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

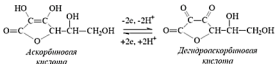
Этот фермент имеет важное значение при производстве черного чая. Чайный лист сначала подвяливают, а затем обрабатывают на роллерах. В них чайный лист проходит между двумя валками и ткани листа механически повреждаются. В результате дубильные вещества, которые содержатся в листе, окисляются в присутствии фермента. При

этом образуются темноокрашенные соединения, которые и определяют цвет черного чая.



Таким образом, в результате действия этого фермента о-дифенол превращается в о-хинон. Однако хиноны не обладают темным цветом, который развивается на срезе яблока или при ферментации черного чая. Темный цвет возникает в результате дальнейшего окисления хинонов и полимеризации продуктов окисления с образованием темноокрашенных веществ.

Метод определения полифенолоксидазы основан на ее способности окислять аскорбиновую кислоту. Получаемый хинон постоянно подвергается восстановлению аскорбиновой кислотой в исходное вещество, аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую.



При этом методе определяют активность полифенолоксидазы в первые 2 мин действия на субстрат.

Материалы и реактивы: аскорбиновая кислота, дистиллированная вода, 0,02 М раствор пирокатехина (0,22 г в 100 мл воды), 10 %

раствор фосфорной кислоты, 0,1 н и раствор йода, 1 % раствор крахмала, вытяжка фермента.

Приборы и посуда: весы, стаканы, пипетки, пипетатор, фарфоровая ступка с пестиком, битое стекло, воронка, фильтровальная бумага, колбы, бюретка.

Приготовление вытяжки фермента: отвешивают 1 г муки свежего помола и переносят навеску в фарфоровую ступку с добавлением небольшого количества битого стекла, добавляют 5 мл и тщательно растирают. Полученную массу количественно переносят в мерную колбу, емкостью 100 мл с помощью воронки. Ступку и пестик несколько раз ополаскивают дистиллированной водой, доводя объем до метки. Содержимое колбы встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1,5–2 часа. Содержимое колбы хорошо встряхивают и фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат используют для определения фермента.

Ход работы

Для приготовления субстрата берут 100 мг аскорбиновой кислоты и растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В две колбы отмеряют по 1 мл фильтрата, прибавляют по 3 мл воды, по 2 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 1 мл 0,02 М раствор пирокатехина.

В две контрольные колбы вносят по 1 мл предварительно прокипяченного фильтрата (для денатурации фермента) и добавляют все те же вещества, что и в рабочем растворе.

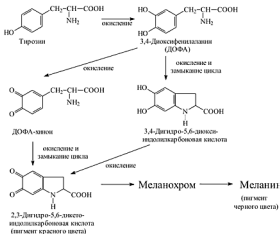
Колбы встряхивают в течение 2 минут, добавляют 1 мл 10% раствора фосфорной кислоты и титруют йодом в присутствии крахмала до появления стойкого слабо-синего окрашивания.

Активность выражают в мл 0,1 н раствора йода на 1 мл фильтрата, исследуемого на содержание полифенолоксидазы, исходя из того, что 1 мл 0,1 н раствора йода титрует 0,0088 г аскорбиновой кислоты.

Пример расчета: 1 мл 0,1 н раствора йода титрует 0,0088г, допустим было затрачено при титровании 15 мл раствора йода, тогда содержание аскорбиновой кислоты $15 \cdot 0,0088 = 0,132$ г.

4. ОТКРЫТИЕ ТИРОЗИНАЗЫ

Тирозиназа – фермент, действующий на фенолы и родственного им соединения. В нем содержится медь, которая является компонентом активного фермента и действует как переносчик электронов. Если к раствору тирозина добавить тирозиназу и смесь встряхивать для лучшего контакта с воздухом, то смесь постепенно будет окрашиваться в розовый цвет и в конце – в черный цвет. Это обусловлено окислением тирозина кислородом воздуха при участии тирозиназы.



Материалы и реактивы: клубни картофеля, дистиллированная вода, 1 % раствор тирозина в 0,04 % растворе соды.

Приборы и посуда: весы, гомогенизатор, фарфоровая ступка с пестиком, пипетка, пипетатор, воронка, фильтровальная бумага, штатив, термостат, капельницы.

Ход работы

Навеску картофеля массой 2 г измельчают и растирают в фарфоровой ступке с пестиком при добавлении 10 мл дистиллированной воды, несколько минут настаивают, встряхивают и фильтруют. В фильтрате содержится фермент тирозиназа. Полученный фильтрат разливают в две пробирки вносят по 1 мл вытяжки из картофеля. Содержимое одной из них кипятят 2 мин и охлаждают. В обе пробирки вносят по 5 капель 0,1 % раствора тирозина и термостатируют при температуре 45 °С. С пятиминутным интервалом пробирки вынимают и встряхивают. Жидкость в пробирке постепенно окрашивается в разные цвета.

Отметить результаты, сделать выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Номенклатура ферментов. Примеры названий ферментов по разным номенклатурам.
2. Классификация ферментов. На чем она основана? История разработки классификации ферментов.
3. Какие ферменты относятся к классу оксидоредуктаз, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
4. Какие ферменты относятся к классу гидролаз? Напишите примеры катализируемых реакций.
5. Какие ферменты относятся к классу трансфераз, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
6. Какие ферменты относятся к классу лиаз, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
7. Какие ферменты относятся к классу изомераз, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
8. Какие ферменты относятся к классу лигаз, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
9. Какие ферменты относятся к классу транслоказ, как они подразделяются? Напишите примеры катализируемых реакций.
10. К какому классу ферментов относится инвертаза? Напишите уравнение реакции с участием инвертазы. На чем основан метод определения активности инвертазы?
11. К какому классу ферментов относится тирозиназа? На какие субстраты действует фермент тирозиназа? Напишите реакции.
12. На какие субстраты действует фермент полифенолоксидаза? Напишите реакции.
13. Что такое автолитическая активность?

Лабораторная работа № 4.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить ферменты класса оксидоредуктаз.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Первый класс оксидоредуктазы ускоряют реакции биологического окисления и восстановления, т.е. реакции, связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения; активность некоторых дегидрогеназ в сыворотке крови служит дополнительным диагностическим тестом при ряде заболеваний.

Около половины оксидоредуктаз, содержат в качестве кофермента никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺). Он усиливает способность восстанавливаться по кольцу никотинамида, в итоге пиридин-протенины могут отщеплять от субстратов гидрид-ионы (H⁻) и протоны (H⁺), окисляя, таким образом, субстраты.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ДРОЖЖАХ

Дегидрогеназы являются подклассом оксидоредуктаз и ускоряют процессы отщепления ионов водорода от субстрата с использованием в качестве акцептора водорода различных молекул за исключением кислорода.

Материалы и реактивы: дрожжи, дистиллированная вода, сахароза, краситель, масло.

Приборы и посуда: фарфоровая ступка и пестик, пипетки, пипетатор, пробирки, водяная баня, штатив, весы.

Ход работы

Навеску дрожжей массой 0,5 г растирают в ступке пестиком с добавлением 1-2 мл дистиллированной воды. Когда смесь станет однородной, ее делят на две части и вносят по одной части в чистые пробирки. Из пипетки в обе пробирки капают 2 капли масла.

Одну из пробирок опускают на 5 мин в кипящую водяную баню, а затем охлаждают до комнатной температуры. В обе пробирки добавляют 0,5 г сахарозы и осторожно переворачивая пробирки растворяют сахарозу, затем вносят по 5 капель красителя и делают вывод по результатам окрашивания.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРАЗ ДРОЖЖЕЙ

Дегидразы – группа ферментов, отнимающих водород от окисляемого органического вещества в промежуточных реакциях гликолиза, брожения, дыхания и при некоторых других окислительно-восстановительных процессах в организме.

Материалы исследования и реактивы: дрожжи, раствор метиленового синего, 5 % раствор сахарозы.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, термостат, пипетки, пипетатор.

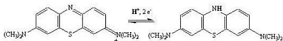
Ход работы

В первую пробирку помещают по 3 мл суспензии из свежих дрожжей в 5 % растворе сахарозы, во вторую пробирку вносят аналогичную суспензию, но уже прокипяченных дрожжей. Вносят в каждую 2–3 капли метиленовой сини и термостатируют при 37 °С в течение 10 мин.

Объясните, в какой пробирке и почему изменяется окраска.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Для демонстрации механизма работы дегидрогеназ в процессе дыхания используют модельный эксперимент, в котором в качестве донора протонов служат органические вещества в составе растительного материала, а акцептором – метиленовая синь, которая при восстановлении переходит в бесцветную лейкоформу.



В аэробных условиях при соприкосновении восстановленной лейкоформы метиленового красителя с кислородом происходит ее самопроизвольное окисление до исходной формы и сине-фиолетовое окрашивание красителя восстанавливается.

Материалы и реактивы: предварительно замоченные за 2 дня до использования семена гороха, клубни картофеля, раствор метиленовой сини (50 мг/л), дистиллированная вода.

Приборы и посуда: пробирки с пробками, штатив, пипетки, стеклогрaф, термостат, скальпель, термометр, колбы, фарфоровые чашки.

Ход работы

10 наклюнувшихся семян гороха очищают от кожуры, разделяют на семядоли. Из клубня картофеля вырезают 10 одинаковых размеру с семядолями гороха кусочков. Половину приготовленного материала помещают в две пробирки, добавляют несколько мл воды, кипятят 3 минуты, охлаждают, после чего жидкость декантируют.

В третью и четвертую пробирки помещают оставшийся растительный материал. Во все четыре пробирки добавляют раствор метиленовой сини и настаивают в течение 10 мин.

По окончании этого времени раствор метиленовой сини декантируют из всех пробирок и растительный материал промывают водой.

Отмытый материал заливают до краев пробирок дистиллированной водой и закрывают пробками. Пробирки помещают в термостат с температурой 30 °С и на 15–20 мин.

По окончании термостатирования воду из пробирок сливают и высыпают материал в фарфоровые чашки. Отмечают восстановление синего окрашивания под действием кислорода воздуха. Результаты наблюдений вносят в таблицу 3.

Таблица 3– Обнаружение действия дегидрогеназ

Материал	Окраска материала		
	После выдерживания в красителе	После выдерживания в термостате	При выдерживании на воздухе
Горох			
Картофель			
Горох прокипяченный			
Картофель прокипяченный			

4. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ МОЛОКА

Материалы и реактивы: молоко, вода, раствор формальдегида, раствор метиленового синего, масло.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня, пипетки, пипетатор.

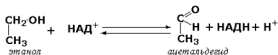
Ход работы

Пронумеруйте шесть пробирок. В пробирки 1 и 2 налейте по 5 мл свежего некипяченого молока, а в пробирку 3 – такое же количество холодного кипяченого молока. Воду в водяной бане нагрейте до 37 °С. Во все три пробирки добавьте по 0,5 мл (около 50 капель) раствора формальдегида и по 5 капель раствора метиленового синего. Смесь станет голубой. В каждый флакон налейте немного масла, чтобы образовался тонкий изолирующий слой на поверхности, и поставьте пробирки 1 и 3 на водяную баню.

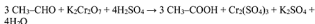
Пробирку 2 оставьте при комнатной температуре. Заметьте время начала реакции и наблюдайте за изменением окраски растворов. Результаты нужно записать в тетрадь.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Фермент, катализирующий окисление спирта в ацетальдегид, называется алкогольдегидрогеназа (АДГ):



Реакция является обратимой, и обратная ей реакция представляет собой последний этап спиртового брожения в дрожжевых клетках. Количественное определение активности данного фермента основано на определении количества образующегося уксусного альдегида с помощью его окисления бихроматом калия:



Затем бихромат калия восстанавливают избытком сульфита натрия, который оттитровывают перманганатом калия:



Материалы и реактивы: дрожжи; 1 % этиловый спирт, 1 % раствора CuSO_4 , 10 % раствор H_2SO_4 , 0,1 н раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,1 н раствор Na_2SO_3 (готовят перед экспериментом, растворяя 3,25 г сухого сульфита натрия в 500 мл воды); 0,1 н раствор KMnO_4 .

Приборы и посуда: мерная колба, коническая колба, пипетки, пипетаторы, бюретки, фильтровальная бумага, фарфоровая ступка с пестиком, весы.

Ход работы

В ступке растирают 2 г дрожжей. Растертую массу с помощью дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, доводя объем жидкости до метки. Полученный раствор настаивают в течение 5 мин, после чего смесь фильтруют через бумажный фильтр.

Контрольное титрование: 1 мл фильтрата гомогената дрожжей смешивают в колбе с 1 мл 1% этилового спирта, добавляют 2 капли 1% раствора CuSO_4 для инактивации фермента, 2 мл 10% H_2SO_4 и 20 мл 0,1 н $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем приливают 25 мл 0,1 н Na_2SO_3 , при этом окраска раствора из оранжевой переходит в зеленую, и титруют 0,1 н KMnO_4 до не исчезающего фиолетового цвета перманганата калия.

Опытное титрование: 1 мл фильтрата гомогената дрожжей смешивают в колбе с 1 мл 1% этилового спирта и помещают на 30 мин в водяную баню с температурой воды 40 °С. Затем добавляют 2 капли 1% раствора CuSO_4 для инактивации фермента, 2 мл 10% H_2SO_4 и 20 мл 0,1 н $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем приливают 25 мл 0,1 н Na_2SO_3 , при этом окраска раствора из оранжевой переходит в зеленую, и титруют 0,1 н KMnO_4 до не исчезающего фиолетового цвета перманганата калия.

$$A = \frac{(V_k - V_o) \cdot 0,1}{2 \cdot 30 \cdot 0,04}, \quad \text{мкмоль/г·мин}$$

где A – активность фермента, V_k – объем титранта пошедший на контрольное титрование, V_o – объем титранта пошедший на опытное титрование, 0,1 н – концентрация растворов, $\frac{1}{2}$ – эквивалент этанола, 30 мин – время, 0,04 – масса дрожжей в 1 мл фильтрата.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Подклассы оксидоредуктаз. Примеры реакций.
2. Приведите уравнения реакций с участием дегидрогеназ.
3. Механизм действия дегидрогеназ. Приведите примеры использования процессов, катализируемых дегидрогеназами.
4. Назовите ферменты, катализирующие окисление этанола, приведите уравнения реакций.
5. Назовите ферменты, катализирующие окисление дикарбонных кислот, приведите уравнения реакций.
6. Назовите ферменты, катализирующие окисление трикарбонных кислот, приведите уравнения реакций.

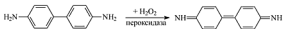
Лабораторная работа № 5.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗ

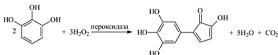
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: выделить и изучить фермент пероксидазу.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Пероксидаза активирует перекиси, в том числе и перекись водорода. Под действием перекиси происходит окисление различных фенолов и ароматических аминов. Этот фермент очень широко распространен в тканях растительного и животного происхождения. По химической природе пероксидаза – геминный фермент. Она содержит одну гематиновую группу. Пероксидаза катализирует окисление бензидина с образованием окрашенного соединения парахинондимиды.



Пирогаллол окисляется при участии пероксидазы с образованием пурпургаллина красного цвета.



1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ РЕДЬКИ

Материалы и реактивы: редька, 2% раствор пирогаллола, дистиллированная вода, 1% раствор H_2O_2 , пероксидаза.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетки, пипетатор, стакан, воронка, фильтровальная бумага.

Ход работы

Навеску редьки массой 1-2 г измельчают, растирают в ступке и переносят в стакан, смывая водой, общий объем вытяжки не должен превышать 10 мл, вытяжку фильтруют через складчатый фильтр. В пробирку вносят 2 мл вытяжки из редьки и кипятят. После охлаждения в 4 пробирки вносят по 1 мл 2 % раствора пирогаллола и добавляют в пробирки номер 1 и 4 пробирки по 1 мл нативной вытяжки редьки, в пробирку номер 2 вносят 1 мл прокипяченной вытяжки, в пробирку

номер 3 вносят 1 мл воды. После этого в пробирки 1, 2, 3 добавляют 2–3 капли 1% раствора H_2O_2 , взбалтывают и наблюдают образование осадка пурпургаллина.

В пробирку наливают 1 мл вытяжки редьки, кипятят и охлаждают. В 3 пробирки добавляют по 1 мл раствора пирогаллола. В пробирку номер 1 добавляют 1 мл нативной пероксидазы, во вторую пробирку вносят 1 мл инактивированного фермента, в третью – 1 мл воды. Затем во все пробирки добавляют по 1 мл H_2O_2 и перемешивают.

Сделать выводы по результатам образования или отсутствия осадка в пробках.

1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ КАПУСТЫ

Материалы и реактивы: капуста, гидрохинон, пероксид водорода, яблоко, луковица, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: терка, марля, пробирки, водяная баня, скальпель, штатив, весы, стакан, стеклогрэф, цилиндр, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Навеску капусты, массой 20 г, измельчают иотжимают однородную массу через марлюдо получения сока, которыйсобирают в стакан и разбавляют десятикратным количеством воды. Стеклографом нумеруют четыре пробиркии сносят в них по 1 мл полученной жидкости. Пробирки 1 и 2 помещают в кипящую водяную баню на 5 минут, а затем дают остыть. Пробирки 3 и 4 оставляют без изменений. В пробирки 5 и 6 наливают по 1 мл воды. Во все шесть пробирок на кончике скальпеля добавляют гидрохинон. В пробирки 1, 3 и 5 наливают по 1 мл воды, в пробирки 2, 4 и 6 по 1 мл перекиси водорода. Жидкости во всех пробиркахосторожно перемешивают и оставляют на10–15 минут для наблюдений.

Делают вывод о прошедшем окислении в определенных пробирках.

1.3. ОТКРЫТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В КАРТОФЕЛЕ

Многократное дегидрирование (окисление) пирогаллола и ряда промежуточных продуктов на пути к пурпурогаллину осуществляется с участием пероксидазы.

Материалы и реактивы: 1 % раствор пирогаллола, дистиллированная вода, клубни картофеля, 2 % раствор H_2O_2 .

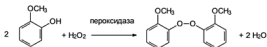
Приборы и посуда: пробирки, штатив, капельницы, весы, пипетка, пипетатор, воронка, фильтровальная бумага, фарфоровая ступка с пестиком.

Ход работы

Навеску картофеля массой 2 г измельчают, растирают в ступке и добавлением небольшого количества воды, отфильтровывают и переносят в пробирку. Добавляют 1 мл 1 % раствора пирогаллола и 2 капли 2 % раствора пероксида водорода и оставляют на столе. Через некоторое время выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина.

1.4. ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В СЫРОМ И ВАРЕНОМ КАРТОФЕЛЕ

Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов (гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и других) с помощью перекиси водорода. При окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета в реакции:



Материалы и реактивы: сырой и вареный картофель, 5 % спиртовой раствор гваякола, 1 % раствор пероксида водорода.

Приборы и посуда: скальпель, капельницы.

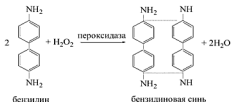
Ход работы

На тонкие срезы сырого и вареного картофеля наносят по 1–2 капли растворов гваякола и пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется.

Отметить результаты и объяснить различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ ПО МЕТОДУ А.Н. БОЯРКИНА

Метод основан на измерении светопоглощения бензидиновой сини, образующейся при окислении бензидина под действием пероксидазы.



Материалы и реактивы: исследуемый растительный материал, дистиллированная вода, пероксид водорода.

Приборы и посуда: весы, фарфоровая ступка и пестик, цилиндр, колба, воронка, центрифужные пробирки, центрифуга, гальванометр, пипетки, секундомер.

Ход работы

Навеску 100 мг свежего материала помещают в ступку и растирают, прибавляя порциями 10 мл дистиллированной воды. Растертую массу переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки. Содержимое колбы настаивают 10 мин, а затем сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

Ставят кюветы в кюветодержатель прибора: слева контрольную и справа опытную. Шкалу правого отчетного барабана устанавливают на нулевую отметку и с помощью оптических клиньев приводят стрелку гальванометра в нулевое положение.

Правый отчетный барабан ставят на деление 0,250 (исходная экстинкция), при этом стрелка гальванометра отклоняется в сторону.

В левую (контрольную) кювету добавляют 2 мл воды, а в правую (опытную) вносят 2 мл раствора пероксида водорода пипеткой с широким носиком (чтобы сильная струя перемешала жидкость в кювете). Одновременно с первой каплей жидкости включают секундомер.

В опытной кювете раствор синее, по мере нарастания интенсивности окраски, стрелка гальванометра приближается к нулевому положению. Отмечают время от начала приливания раствора пероксида водорода до достижения стрелкой гальванометра нулевого положения. Повторяют определения трижды и берут среднее значение времени.

Активность фермента рассчитывают по формуле

$$X = \frac{\Delta E \cdot 725 \cdot 1000}{t \cdot d \cdot 0,1 \cdot 2},$$

где X – активность пероксидазы, $E \cdot c^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$ (E – единица экстинкции); ΔE – изменение экстинкции, равное 0,250; t – время реакции, с; d – толщина слоя кюветы, равная 2; 1000 – коэффициент перерасчета г в кг; 0,1 – навеска, г; 2 – объем пробы, мл.

$$X = \frac{15625}{t},$$

Рассчитать активность пероксидазы в исследуемом материале.

3. ОТКРЫТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В МОЛОКЕ

Пероксидаза расщепляет пероксид водорода с выделением кислорода, который окисляет йодистый калий. Реакция идет по следующему уравнению:



Материалы и реактивы: молоко, 1 % раствор крахмала, 10 % раствор KI, 0,5 % раствор H_2O_2 .

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки наливают по 5 мл молока. Молоко во второй пробирке, служит контролем, ее нагревают до кипения. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл 1 % раствора крахмала, по 2 капли 10 % раствора KI и по 5 капель 0,5 % раствора H_2O_2 . В одной из пробирок появляется синее окрашивание. В какой и почему?

Сделайте вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится пероксидаза.
2. Какие реакции катализирует этот фермент? Напишите уравнения реакций.
3. Методы определения пероксидаз.
4. Какая температура наиболее благоприятна для действия пероксидаз?
5. Биологическое значение пероксидаз.
6. Глутатионпероксидаза, ее роль, напишите уравнение реакции.

Лабораторная работа № 6.

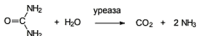
ИССЛЕДОВАНИЕ УРЕАЗЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: выделить и исследовать фермент уреазу.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Уреаза – первый фермент, полученный в кристаллическом виде (Дж. Самнер, 1926). Обнаружена во многих бактериях, грибах, растениях, а также у некоторых беспозвоночных.

Уреаза относится к классу гидролаз, для которой характерна абсолютная специфичность к мочеvine.



1. ВЫДЕЛЕНИЕ УРЕАЗЫ

Материалы и реактивы: соевая мука, вода, 0,1 н соляная кислота, толуол.

Приборы и посуда: центрифуга, фарфоровая ступка, весы, воронка, фильтровальная бумага.

Ход работы

Уреаза содержится во многих растениях, например в сое.

Навеску соевой муки массой 8 г растирают в ступке со смесью 46 мл воды и 2 мл 0,1н соляной кислоты и нескольких капель толуола. Полученную массу встряхивают в течение 60 мин и центрифугируют в течение 15 мин со скоростью 5000 об/мин или оставляют на ночь. Раствор декантируют, отфильтровывают, объем фильтрата доводят промывными водами до 50 мл и используют в качестве препарата уреазы.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Определение активности уреазы основано на учете образующегося в процессе реакции аммиака при гидролизе мочевины $\text{NH}_2\text{—CO—NH}_2$. При этом уреаза не действует на тиомочевину, структурно сходное вещество $\text{NH}_2\text{—CS—NH}_2$.

Материалы и реактивы: препарат уреазы, 0,1 % раствор HgCl_2 , 0,2% метиловый красный, 0,1 н соляная кислота.

Приборы и посуда: термостат, колбы, стеклянные палочки, капельницы, бюретка.

Ход работы

В две колбы добавляют по 5 мл приготовленного препарата уреазы и вносят по 5 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере pH 7, перемешивают. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения; обе колбы ставят на 1 час в термостат при 37 °С, после чего в колбы добавляют по 1 мл 0,1 % раствора HgCl_2 , несколько капель 0,2 % метилового красного и выделившийся аммиак титруют 0,1 н раствором HCl . 1 мл 0,1 н раствора HCl соответствует 1,4 мг азота. Расчет активности уреазы производят по формуле:

$$v = \frac{(A - B) \cdot T \cdot 1,4 \cdot 1,25 \cdot 5}{t},$$

где А и В – объем 0,1 н раствора HCl , израсходованный на титрование опытной пробы и контрольной, мл; Т – поправка к титру раствора HCl ; t – время, в течение которого действовал фермент, мин; 1,25 – коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г навески муки.

За единицу активности уреазы берут количество фермента, которое за 5 мин при 37 °С и pH 7 образует из мочевины 1 мг азота.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ УРЕАЗЫ

Материалы и реактивы: препарат уреазы, 1% раствор мочевины, 0,1 % спиртовой раствор фенолфталеина, 10% раствор гидроксида натрия.

Приборы и посуда: баня водяная, термостат, пробирки, штатив.

Ход работы

В две пробирки вносят по 1 мл препарата уреазы. Содержимое первой кипятят и охлаждают, после чего в обе пробирки вносят по 1 мл раствора мочевины и добавляют 1–2 капли фенолфталеина. Оставляют пробирки на столе на 5–10 мин. Отмечают окраску и делают вывод.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРЕАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ

Фермент уреазы содержится в различных растительных объектах.

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, 1 % раствор мочевины, 0,1 % спиртовой раствор фенолфталеина, соевые бобы, семена дыни, огурцов, кабачков, рисовая мука.

Приборы и посуда: фарфоровая ступка, пестик, цилиндр, пробирки.

Ход работы

Несколько очищенные семена или 1 г муки растирают в ступке с 5 мл воды до однородного состояния и переносят полученную массу в пробирку. Добавляют в нее 5 мл мочевины и 2–3 капли фенолфталеина. Содержимое перемешайте и оставляют на 15–20 мин.

Отмечают происходящие изменения и вносят результаты в таблицу 4.

Таблица 4—Определение уреазы в растительных объектах

Растительные объекты	Соевые бобы	Семена дыни	Семена огурцов	Семена кабачков	Рисовая мука
Наличие уреазы					

5. ИНАКТИВАЦИЯ УРЕАЗЫ

Некоторые вещества замедляют или полностью прекращают работу ферментов, такие вещества называются ингибиторами.

Материалы и реактивы: арбузные семена, 1 % раствор мочевины, 0,1 % спиртовой раствор фенолфталеина; зеленый чай, 0,01 М растворы фторида натрия, хлорида натрия, нитрата серебра, сульфата никеля, ацетата свинца, 0,3% раствор пероксида водорода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, капельницы, фарфоровая ступка и пестик, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Готовят суспензию семян арбуза, путем растирания их в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества воды и разливают в несколько пробирок по 1 мл полученной суспензии. В пробирки последовательно вносят по 1 мл 0,01 М раствора предполагаемого ингибитора (фторид натрия, хлорид натрия, нитрат серебра, сульфат никеля, ацетат свинца), перемешивают смесь, добавляют по 4 мл мочевины и 1–2 капли фенолфталеина. Оставляют при комнатной температуре на 5 мин, наблюдают за изменением окраски раствора и делают вывод, о том, какое из веществ является ингибитором уреазы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится уреаз. Какой у нее номер?
2. Какие реакции катализирует этот фермент? Напишите уравнения реакций.
3. Каким образом можно обнаружить уреазу?
4. Абсолютная специфичность уреазы.
5. Что такое уреазный тест.

Ход работы

Несколько очищенные семена или 1 г муки растирают в ступке с 5 мл воды до однородного состояния и переносят полученную массу в пробирку. Добавляют в нее 5 мл мочевины и 2–3 капли фенолфталеина. Содержимое перемешайте и оставляют на 15–20 мин.

Отмечают происходящие изменения и вносят результаты в таблицу 4.

Таблица 4—Определение уреазы в растительных объектах

Растительные объекты	Соевые бобы	Семена дыни	Семена огурцов	Семена кабачков	Рисовая мука
Наличие уреазы					

5. ИНАКТИВАЦИЯ УРЕАЗЫ

Некоторые вещества замедляют или полностью прекращают работу ферментов, такие вещества называются ингибиторами.

Материалы и реактивы: арбузные семена, 1 % раствор мочевины, 0,1 % спиртовой раствор фенолфталеина; зеленый чай, 0,01 М растворы фторида натрия, хлорида натрия, нитрата серебра, сульфата никеля, ацетата свинца, 0,3% раствор пероксида водорода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, капельницы, фарфоровая ступка и пестик, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Готовят суспензию семян арбуза, путем растирания их в фарфоровой ступке с добавлением небольшого количества воды и разливают в несколько пробирок по 1 мл полученной суспензии. В пробирки последовательно вносят по 1 мл 0,01 М раствора предполагаемого ингибитора (фторид натрия, хлорид натрия, нитрат серебра, сульфат никеля, ацетат свинца), перемешивают смесь, добавляют по 4 мл мочевины и 1–2 капли фенолфталеина. Оставляют при комнатной температуре на 5 мин, наблюдают за изменением окраски раствора и делают вывод, о том, какое из веществ является ингибитором уреазы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится уреаз. Какой у нее номер?
2. Какие реакции катализирует этот фермент? Напишите уравнения реакций.
3. Каким образом можно обнаружить уреазу?
4. Абсолютная специфичность уреазы.
5. Что такое уреазный тест.

Лабораторная работа № 7.

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛАЗЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность каталазы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз, распространен в аэробных клетках, он разрушает перекись водорода, образующуюся в процессе дыхания. Каталаза катализирует распад перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:



1. ОТКРЫТИЕ КАТАЛАЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Материалы и реактивы: 1 % раствор H_2O_2 , кровь, 3 % раствор H_2O_2 , раствор слюны.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

1.1. ОТКРЫТИЕ КАТАЛАЗЫ В СЛЮНЕ

В пробирку наливают 1 мл слюны и 1 мл 1 % раствора H_2O_2 . Тотчас же начинается выделение пузырьков кислорода.

1.2. ОТКРЫТИЕ КАТАЛАЗЫ В КРОВИ

В пробирку наливают 0,5 мл крови. Приливают 1 мл 3 % раствора H_2O_2 . В пробирке происходит выделение кислорода.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В МУКЕ

Материалы и реактивы: фосфатный буфер pH 6,8, 2 н раствор H_2SO_4 , вода, 1% раствор H_2O_2 , 2 н раствор H_2SO_4 , 0,1 н раствор $KMnO_4$.

Приборы и посуда: ступка, колба, термостат, бумажный фильтр, весы, пипетки, пипетатор, бюретка, воронка, стеклянная палочка.

Ход работы

Растирают в ступке 5 г муки с 20 мл фосфатного буфера pH 6,8. Содержимое ступки переносят в колбу, остаток на ступке смывают еще 30 мл буферного раствора и также сливают в колбу. Смесь перемешивают и ставят в термостат при 37 °C на 15 мин, по истечении которых смесь фильтруют. В две колбы вносят по 20 мл фильтрата. В одну колбу вливают 5 мл 2 н раствора H_2SO_4 для инактивации фермента, затем в обе колбы добавляют по 20 мл воды и по 3 мл пероксида водорода, перемешивают и термостатируют при 37 °C в течение 20 мин. По истечении указанного времени в опытную колбу добавляют 5 мл 2 н рас-

твора H_2SO_4 и перемешивают стеклянной палочкой. Содержимое обеих колб титруют 0,1 н раствором KMnO_4 до розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Активность каталазы определяют согласно расчетам:

$$V = \frac{(B - A) \cdot K \cdot C}{H \cdot C_1 \cdot t},$$

где А и В – объем перманганата калия, пошедшие на титрование соответственно опытной пробы и контрольной, мл; С – объем смеси, мл; C_1 – объем, взятый для определения, мл; Н – навеска растительного материала, г; t – время, ч; К – поправка к 0,1 н раствору перманганата калия (1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода).

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В ОВОЩАХ

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В КАРТОФЕЛЕ

Материалы и реактивы: песок, картофель, CaCO_3 , вода, 1% раствор H_2O_2 , 10% раствора H_2SO_4 , 0,02 М раствор KMnO_4 .

Приборы и посуда: весы, фарфоровая ступка, колба, пипетка, пипетатор, воронка, фильтровальная бумага, бюретка.

Ход работы

Взвешивают 2 г клубней картофеля, измельчают навеску и растирают в ступке с песком, добавляя на кончике скальпеля CaCO_3 до прекращения выделения углекислого газа.

В ступку небольшими порциями постепенно вносят 40 мл воды. Полученную массу переносят в колбу и доводят водой до метки. Смесь перемешивают и оставляют на 10 мин после следующего фильтрования. В две колбы вносят по 20 мл фильтрата. Первую кипятят в 1 мин и охлаждают, содержимое этой колбы будет являться контролем.

Содержимое второй колбы будет опытным образцом. К обеим колбам прибавляют по 20 мл воды и 3 мл пероксида водорода, все перемешивают и оставляют стоять в течение 30 мин. Затем в обе колбы вносят по 5 мл 10% раствора серной кислоты, перемешивают и избыток пероксида водорода оттитровывают 0,02 М раствором перманганата калия до розовой окраски, устойчивой в течение 1 мин.

Вычисляют активность фермента в мкмоль перекиси водорода, расщепленной в результате действия на него каталазы в расчете на 1 г материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. Расчет проводят по формуле:

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

где (a – b) – разность между объемами раствора KMnO_4 , пошедшего на титрование контрольной и опытной проб соответственно, мл; T – титр раствора KMnO_4 ; 50 – коэффициент пересчета на мкмоль H_2O_2 ; 100 – общий объем приготовленного экстракта, мл; m – масса взятого для анализа материала, г; 20 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл; 30 – время инкубации, мин.

3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В МОРКОВИ

Материалы и реактивы: 0,1 н перманганат калия; 10% серная кислота; карбонат натрия; 0,1 н раствор перекиси водорода; морковь.

Приборы и посуда: водяная баня; пипетки на 5, 10, 20 и 25 мл; цилиндры на 10 и 25 мл; колба мерная на 100 мл; колбы конические на 200 мл; фарфоровые ступка и пестик.

Ход работы

Навеску моркови массой 2 г измельчают и растирают в ступке с песком и добавлением 2–3 мл воды. На кончике шпателя вносят карбонат натрия до прекращения выделения углекислого газа. Полученную массу переносят в колбу, доводя объем водой до 100 мл. Смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут и фильтруют.

Определяют активность 2-х опытных и 2-х контрольных проб, согласно таблице 5.

Таблица 5 – Определение каталазы в пробах

ОПЫТ	КОНТРОЛЬ
20 мл вытяжки фермента	20 мл вытяжки фермента
–	Нагревание 10 мин на кипящей водяной бане
25 мл 0,1н перекиси водорода	25 мл 0,1н перекиси водорода
Инкубация 30 мин при комнатной температуре	
5 мл 10% H_2SO_4	5 мл 10% H_2SO_4

Опытные и контрольные пробы титруют 0,1 н раствором перманганата калия до образования розовой окраски, устойчивой в течение 1 мин.

По разности между объемом пошедшего на титрование перманганата калия опытной и контрольной проб находят количество, эквивалентное количеству разложенного каталазой пероксида водорода, из

расчета, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода. Результаты расчетов свести в таблицу 6, сделать выводы.

Таблица 6 – Определение активности каталазы

Активность каталазы	Исследуемый материал		
	Мука	Картофель	Морковь

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В МАСЛЕ

Фермент каталаза в свежем сливочном масле содержится в маленьком количестве, иногда ее нет вовсе. Появление каталазы в масле обусловлено его бактериальной обсемененностью. Наибольшее количество каталазы выделяют микробы гнилостной группы.

Материалы и реактивы: масло, 0,3 % раствор перекиси водорода, 10 % раствор серной кислоты; 0,1 н раствор перманганата калия, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: весы, колбы, водяная баня, цилиндр, бюретка; термометр.

Ход работы

Навеску 2 г масла расплавляют при температуре 40 °С в колбе на водяной бане и прибавляют 50 мл дистиллированной воды той же температуры, полученную эмульсию охлаждают до температуры 25 °С и добавляют 10 мл 0,3% раствора перекиси водорода. Все перемешивают и оставляют на 2 часа при комнатной температуре.

Одновременно ставят вторую пробу при тех же условиях, но с кипяченой и охлажденной эмульсией масла, через 2 часа пробы подкисляют 5 мл 10 % раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором перманганата калия до появления устойчивого в течение 30 секунд розового окрашивания.

Растворность в объемах (мл) 0,1 н раствора перманганата калия, пошедших на титрование некипяченой и кипяченой проб, отнесенная к 100 г масла, называется каталазным числом. Точность метода при титровании равна 0,1 мл раствора перманганата калия или 5 единицам каталазного числа. Полученные результаты внести в таблицу 8.

Таблица 8 – Определение активности каталазы в масле

№ опыта	Объем перманганата калия, пошедший на титрование холостой пробы, мл	Объем перманганата калия, пошедший на титрование опытной пробы, мл	Каталазное число

Сделать вывод о свежести масла.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ ГАЗОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода определения активности каталазы основан на учете количества кислорода, выделяющегося при разложении перекиси водорода. Если непосредственно измеряется объем газа, то такой метод называется газометрическим.

При определении активности каталазы газометрическим методом нужно использовать прибор «катализник» (рис. 2).

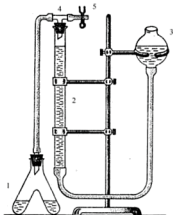


Рис. 2. Прибор для определения активности каталазы где 1 – катализник; 2 – бюретка; 3 – стеклянная груша; 4 – стеклянный тройник; 5 – зажим Мора

Материалы и реактивы: растительный материал, мел, 3 % раствор перекиси водорода.

Приборы и посуда: песок, фарфоровая ступка с пестиком, весы, цилиндр, пипетка, катализник, бюретка, стеклянная груша, стеклянный тройник, зажим Мора, металлический штатив с лапками.

Ход работы

Навеску ткани массой 1 г растирают в ступке с добавлением небольшого количества песка и щепотки мела (для создания слабощелочной среды).

Кашицу переносят через воронку в одно колено реактора, при этом затрачивают 20 мл воды, добавляя воду в ступку небольшими порциями. В другое колено реактора пипеткой налить 5 мл 3 % перекиси водорода. Заряженный реактор присоединить к прибору. При открытом зажиме, то есть при атмосферном давлении, поднимая или опуская грушу, установить в бюретке уровень жидкости на нулевом делении. Зажим закрыть, суспензию растительной ткани в реакторе смешать с перекисью водорода. С этого момента начать отсчет времени.

Время отмерять по песочным часам. Начнется выделение кислорода, который поступит в бюретку, и жидкость в ней опустится. Для равномерного выделения кислорода смесь в реакторе постоянно переливать из одного колена в другое. Реакция должна происходить при атмосферном давлении, для создания которого жидкости в бюретке и груше поддерживать на одном уровне. Кислород будет выделяться до тех пор, пока не разложится вся перекись водорода, но обычно активность каталазы измеряется в первые 5 минут.

Как только закончится время наблюдения, особенно тщательно установить мениски жидкости в бюретке и груше и по бюретке определить количество выделенного кислорода. Активность каталазы выражается в миллилитрах O_2 , выделенного за время опыта, в расчете на 1 г сырой растительной ткани.

Результаты оформить в виде таблицы 7.

Таблица 7—Схема записи опыта

Объект	Навеска, г	Время опыта, мин	O_2 , выделенный за время опыта, мл	Активность каталазы

Сделать выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится каталаза, укажите систематическое название фермента, его код по систематическому каталогу.
2. Какова биологическая роль каталазы? Какие реакции она катализирует? Напишите уравнения реакций.

Ход работы

Навеску ткани массой 1 г растирают в ступке с добавлением небольшого количества песка и щепотки мела (для создания слабощелочной среды).

Кашицу переносят через воронку в одно колено реактора, при этом затрачивают 20 мл воды, добавляя воду в ступку небольшими порциями. В другое колено реактора пипеткой налить 5 мл 3 % перекиси водорода. Заряженный реактор присоединить к прибору. При открытом зажиме, то есть при атмосферном давлении, поднимая или опуская грушу, установить в бюретке уровень жидкости на нулевом делении. Зажим закрыть, суспензию растительной ткани в реакторе смешать с перекисью водорода. С этого момента начать отсчет времени.

Время отмерять по песочным часам. Начнется выделение кислорода, который поступит в бюретку, и жидкость в ней опустится. Для равномерного выделения кислорода смесь в реакторе постоянно переливать из одного колена в другое. Реакция должна происходить при атмосферном давлении, для создания которого жидкости в бюретке и груше поддерживать на одном уровне. Кислород будет выделяться до тех пор, пока не разложится вся перекись водорода, но обычно активность каталазы измеряется в первые 5 минут.

Как только закончится время наблюдения, особенно тщательно установить мениски жидкости в бюретке и груше и по бюретке определить количество выделенного кислорода. Активность каталазы выражается в миллилитрах O_2 , выделенного за время опыта, в расчете на 1 г сырой растительной ткани.

Результаты оформить в виде таблицы 7.

Таблица 7—Схема записи опыта

Объект	Навеска, г	Время опыта, мин	O_2 , выделенный за время опыта, мл	Активность каталазы

Сделать выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится каталаза, укажите систематическое название фермента, его код по систематическому каталогу.
2. Какова биологическая роль каталазы? Какие реакции она катализирует? Напишите уравнения реакций.

Лабораторная работа № 8.

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИЛАЗ

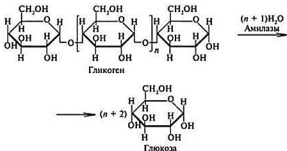
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить типы амилаз и исследовать их в различных объектах.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Амилаза является ферментом, который катализирует гидролиз α -гликозидной связи α -1,4-крахмала и гликогена до промежуточных продуктов – декстринов. Крахмал обладает способностью образовывать с йодом соединения синего цвета, амилодекстрин – фиолетового, эритродекстрин – красно-бурого, ахродекстрин – желтого.

Амилаза – это первый фермент, обнаруженный учеными. В 1833 году этот фермент был описан французским ученым Пайя, который обнаружил его в связи с разрушением крахмала в пищеварительном тракте.

Фермент этот бывает трех типов: α , β , а также γ . Амилаза присутствует не только в организме людей и животных, но и даже у некоторых растений (только β -амилаза не присутствует в организме животных). Спелые фрукты обладают приятным сладким вкусом часто благодаря наличию этого фермента. В пшенице присутствует γ -амилаза, которая является главным веществом для производства солода.



1. ВЫДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗ ИЗ СОЛОДА

Навеску измельченного солода массой 20 г растирают в ступке с несколькими мл воды до однородного состояния и переносят в мерную колбу объемом 100 мл, объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 2 ч. Затем содержимое центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Центрифугат используют в качестве источника амилазы.

Материалы и реактивы: солодовая вытяжка, порошок $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, Na_2HPO_4 .

Приборы и посуда: шпатель, водяная баня, колба.

Ход работы

1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ α -АМИЛАЗЫ

В пробирку вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике шпателя порошок $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, и выдерживают в течении 15 мин на водяной бане, нагретой до 68 °C (в период нагревания температура воды не должна подниматься выше 70 °C и опускаться ниже 66 °C). Затем содержимое пробирки охлаждают холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ β -АМИЛАЗЫ

В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл 0,1 М раствора HCl (рН полученной смеси должен быть 3,3). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на лед. В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. Затем к содержимому колбы добавляют 2 мл 0,15 М раствора Na_2HPO_4 . рН должно быть 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ

Принцип метода заключается в том, что берут ряд пробирок, в которые в убывающем количестве наливают исследуемую вытяжку из растительного материала, одинаковые количества крахмального раствора и доводят водой до постоянного объема. Затем содержимое пробирок инкубируют, после инкубации прибавляют раствор йода и наблюдают за изменением цвета содержимого пробирок. Пределом действия фермента является или исчезновение окраски в той или иной пробирке, или заметный переход к фиолетовому оттенку. Этот метод дает приближенное представление об активности амилаз, находящихся

в исследуемом материале, без дифференцированного учета их действия и называется «йодной пробой».

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, 0,1 % раствор йода в йодистом калии, солод, дистиллированная вода, толуол,

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стеклогрaф, весы, колба, центрифуга, пипетки, пипетатор, термостат, гомогенизатор.

Приготовление экстракта амилаз из солода. 5 г солода измельчают в гомогенизаторе, помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, приливают дистиллированную воду, несколько не доводя до метки, добавляют 5 капель толуола, взбалтывают и оставляют настаиваться на 24 ч. Затем доводят до метки водой, еще раз встряхивают и центрифугируют. В центрифугате определяют амилолитическую активность.

Ход работы

Нумеруют 10 пробирок. В первую и вторую пробирки наливают по 1мл экстракта солода. Во все пробирки, кроме первой, наливают по 1млдистиллированной воды. Затем из второй пробирки после смешивания берут 1 млраствора и переносят в третью пробирку, смешивают и из третьей пробирки переносят 1 мл в четвертую и т.д., до последней включительно. Из последней пробирки 1млраствора выливают. В результате получают ряд пробирок, в которых исходный раствор амилаз содержится в количествах, приведенных в таблице 9.

Таблица 9 - Содержание количества амилаз в растворе

Номер пробирки	Количество экстракта (центрифугата), мл
1	1,00
2	0,500
3	0,250
4	0,125
5	0,0625
6	0,0312
7	0,0156
8	0,0078
9	0,0039
10	0,00195

После приготовления указанного ряда пробирок в каждую из них прибавляют по 5 мл 1 % раствора крахмала и все пробирки ставят в термостат при 55 °С на 30 мин, по истечении срока инкубации пробирки вынимают, помещают в холодную воду и после охлаждения к каждой прибавляют по 0,5 мл 0,1 и раствора йода до появления хорошо выраженного окрашивания. При прибавлении йодного раствора со-

блюдают последовательность и сохраняют интервалы времени, которые были приняты при первоначальном сливании растворов в пробирки.

Для повышения точности опыта рекомендуют проводить его с дистиллированной водой, охлажденной до 0°C, и пробирки помещать в холодную воду. В этих условиях сохранение последовательности и постоянства интервала времени не имеют значения, так как реакция гидролиза практически не идет.

Крахмал считают полностью гидролизованным в той пробирке, в которой после прибавления йода наблюдается заметный переход к фиолетовому цвету. Негидролизированный полностью крахмал окрашивается йод, в синий цвет. В отдельных случаях гидролиз считают законченным, когда окрашивания после прибавления йода не наблюдается.

Красный цвет служит критерием полного гидролиза крахмала. Активностью амилаз считают наименьшее количество раствора амилаз, которое гидролизовало полностью 5 мл 1 % раствора крахмала в указанных условиях.

Амилолитическую активность продукта (X) определяют по формуле:

$$X = \frac{5 \cdot b}{a},$$

где а - степень разведения экстракта в пробирке со смесью красного цвета; 5 - навеска солода, взятого для экстрагирования; b- отношение объема вытяжки к навеске солода (в нашем случае 20).

Пример расчета. Допустим, что в красный цвет окрасилось содержимое третьей пробирки, в которой экстракт был разведен 4 раза, т.е. знаменатель по таблице 9 равен 0,250. Относительный показатель амилолитической активности будет: $5/0,250 \cdot 20 = 400$.

3. ОТКРЫТИЕ АМИЛАЗ В ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБАХ ПО ФЕНИКСОВОЙ

В препаратах грибных амилаз содержится в основном α-амилаза.

Материалы и реактивы: плесневые грибы, вода, 1 % раствор крахмала, раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, стеклянная палочка, термостат, весы, штатив, воронка, стакан, фильтрования бумага.

Ход работы

Навеску сухих плесневых грибов массой 2 г смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37 °С, встряхивают 5 мин, а затем настаивают 2 ч при комнатной температуре. После повторного встряхивания твердый остаток отфильтровывают. В фильтрате содержится комплекс грибных амилаз.

Наливают 5 мл полученного раствора в стеклянную пробирку и вносят 10 мл 1 % крахмала, перемешивают и 1 каплю из пробирки капают на стеклянную пластинку и смешивают с 1 каплей йода. Пробирки ставят в термостат при 37 °С. Через каждые 2 мин повторяют пробу с йодом. Отметить время образования промежуточных продуктов и конечный распад крахмала.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Приведите примеры использования амилазы в качестве аналитических реактивов.
2. Виды амилазы, механизм действия, код фермента по систематическому каталогу.
3. К какому классу и подклассу относятся амилизы?
4. В отличие в действии α -амилазы и β -амилазы.
5. Опишите принцип количественного определения активности амилаз.
6. Амилаза в биохимическом анализе крови.
7. Напишите уравнения реакций с участием амилаз.
8. Практическое применение амилаз.

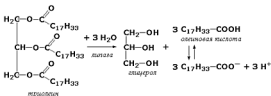
Лабораторная работа № 9.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПАЗ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность липазы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Липаза играет важную роль в переваривании липидов, катализируя гидролиз сложэфирных связей в триацилглицеридах:



1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

Материалы и реактивы: растительное масло, вода, 1% раствор гидрокарбоната натрия, 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат, пипетки, пипетатор, стеклографом.

Ход работы

В две пронумерованные пробирки наливают по 1 мл растительного масла, по 4 мл воды и по 5 мл 1% гидрокарбоната натрия. Пробирки встряхивают и прибавляют 2–3 капли 1% фенолфталеина. В пробирку номер один добавляют 1 мл липазы и перемешивают. Обе термостатируют при 37 °С в течение 5 мин.

Наблюдают за изменением окраски и делают выводы.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ ПО МЕТОДУ ОТА–ЯМАДА

За единицу ферментной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40 % эмульсии оливкового масла при pH 7,0 и температуре 37 °С в течение 1 ч.

Материалы и реактивы: оливковое масло; 2% раствор поливинилового спирта; 1 н раствор соляной кислоты; 0,05 н раствор гидроксида натрия; фосфатно-цитратный буфер с pH 7,0; 1 % спиртовой раствор фенолфталеина; 90 % раствор этанола; 1 % раствор фермента.

Приборы и посуда: колбы Эрленмейера, пробки, термостат, бюретка, капельницы, цилиндр, баня со льдом, бюретка, пипетки, пипетатор, индикаторная бумага.

Приготовление субстрата и ферментного раствора: 100 мл оливкового масла смешивают со 150 мл 2 % раствора поливинилового спирта в пищевом гомогенизаторе в течение 5–10 мин. Полученную эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивание не наблюдается, субстрат пригоден к использованию. Если замечено расслаивание, перемешивание необходимо повторить. Для приготовления ферментного раствора берут 200 мг испытуемого образца и растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

Ход работы

5 мл эмульсии субстрата и 4 мл буфера с pH 7,0 помещают в колбу Эрленмейера на 100 мл, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37 °C в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 мл раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37 °C в течение 1 ч, после чего немедленно добавляют 30 мл этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05 н раствором NaOH в присутствии 1% раствора фенолфталеина до исчезновения окраски.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К смеси субстрата и буфера с pH 7,0, выдержанной при температуре 37 °C, добавляют 30 мл этанола, затем 1 мл ферментного раствора и смесь немедленно титруют.

Разность между результатами титрований контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05 н раствора NaOH, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле:

$$ЛС = \frac{A \cdot T \cdot 50}{B},$$

где А – разность между результатами титрований опытной и контрольной проб, мл; Т – титр щелочи; В – концентрация образца ферментного раствора, г/мл.

3. ОТКРЫТИЕ ЛИПАЗЫ МОЛОКА

В молоке содержатся нативная и бактериальная липазы.

Материалы и реактивы: 5 % раствор молока, 5 % раствор панкреатина, дистиллированная вода, 1 % раствор фенолфталеина, 1 % раствор Na_2CO_3 .

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

В две пробирки вносят по 10 капель 5 % раствора молока. В первую пробирку добавляют 5 капель 5 % раствора панкреатина, во вторую – 5 капель воды. Затем в обе пробирки вносят по 1 капле 1 % раствора фенолфталеина и по каплям 1 % раствор Na_2CO_3 до появления бледно-розовой окраски. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °C на 30 мин, после чего наблюдают изменение окраски.

Сделайте вывод.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИПАЗЫ НА ЛИПИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В тонкой кишке происходит гидролиз липидов, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Материалы и реактивы: молоко, препарат липазы, раствор фенолфталеина, раствор гидроксида натрия.

Приборы и посуда: колбы, водяная баня, термостат, капельницы, пипетки, пипетатор, бюретка.

Ход работы

Готовят 2 колбы для опытной и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей водяной бане. В каждую колбу наливают молоко и препарат липазы, как указано в таблице 10.

Таблица 10– Исследование действия липазы

Компоненты смеси	Опыт, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10
Препарат липазы	1	1 (прокипяченный)

Приготовленные инкубационные смеси перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 1 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют 2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуют ор-

ганические кислоты – молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат, температура которого 37 °С, и через определенные интервалы (10, 20, 30 мин) из каждой пробы отбирают (не вынимая из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты титрования

Объем щелочи, пошедшей на титрование, мл	Время инкубации, мин			
	0	10	20	30
Опытная проба				
Контроль				

Результат первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минусах), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия в мл, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.

В тетрадь записать сделанные выводы.

5. ВЛИЯНИЕ ЭМУЛЬГАТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ

Для эмульгирования липидов используют различные эмульгаторы. Липолитическая активность фермента может меняться в зависимости от природы эмульгатора.

Материалы и реактивы: оливковое масло; 2 % раствор поливинилового спирта; 0,25% раствор Твина 20; 2 % раствор яичного альбумина; 3 % раствор желатина; 1 н раствор HCl; 0,05 н раствор NaOH; фосфатно-цитратный буфер с pH 7,0; 1 % спиртовой раствор фенолфталеина; 90 % раствор спирта; 1 % раствор фермента.

Приборы и посуда: колбы; гомогенизатор; пипетки; цилиндры; бюретка; баня со льдом; термостат, пипетатор, штатив.

Ход работы

В качестве эмульгаторов используют: 0,25 % раствор твина 20; 2 % раствор яичного альбумина; 3 % раствор желатина; 2 % раствор поливинилового спирта (в качестве контроля).

Для приготовления субстрата 100 мл оливкового масла смешивают со 150 мл раствора соответствующего эмульгатора в пищевом гомогенизаторе в течение 5–10 мин. Полученные эмульсии выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивание не наблюдается,

субстрат пригоден к использованию. Если замечено расслаивание, перемешивание необходимо повторить.

Затем из полученных эмульсий отбирают по 10 мл и используют, отобранный субстрат для определения активности липазы по модифицированному методу Ота-Ямада.

Оставшуюся часть эмульсий используют для определения устойчивости эмульсий. Для этого 50 мл соответствующей эмульсии помещают в мерный цилиндр и оставляют на льду в течение еще 60 мин. Отмечают время начала расслаивания каждой эмульсии.

Данные занести в таблицу 12.

Таблица 12 – Определение активности липазы

Эмульгатор и его концентрация	Активность липазы ЛС (ед/г)	Время расслаивания эмульсии, мин

Делают выводы об устойчивости полученных эмульсий, при использовании какого эмульгатора скорость гидролиза максимальна и как зависит активность липазы от устойчивости эмульсии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. К какому классу ферментов относится липаза. Напишите код фермента по систематическому каталогу.
2. Какие реакции катализирует этот фермент? Напишите уравнения реакций.
3. Каким образом можно обнаружить липазу?
4. Основные функции липазы.
5. Классификация липаз по происхождению. Что такое лингвальная липаза?
6. Использование липаз в различных отраслях, примеры.
7. Липаза в организме взрослого человека, нормы и диагностика. Чем грозит высокий уровень липазы?
8. Какие вы знаете препараты, содержащие липазу, для чего их применяют?

Лабораторная работа № 10.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: исследовать фермент фосфопротеинфосфатазу.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Фосфопротеинфосфатазы катализируют реакции дефосфорилирования. Фосфорилирование белков осуществляют протеинкиназы. Специфическое и обратимое фосфорилирование аминокислотных остатков в молекулах белков играет важную роль в регуляции метаболизма.



Существует большое разнообразие молекулярных форм ФПФаз, которые отличаются субстратной специфичностью, кинетическими параметрами, субъединичным составом, локализацией и другими параметрами.

Фосфопротеинфосфатаза клеточных ядер обладает широкой субстратной специфичностью, катализирует дефосфорилирование не только фосфопротеинов, но и низкомолекулярных субстратов: АТФ, АДФ, пара-нитрофенилфосфата.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Материалы и реактивы: CH₃COONa·3H₂O, CH₃COOH, KCl, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, NaCl, HCl, сахара, трис, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: центрифуга, гомогенизатор, капроновый фильтр, марля, весы, микроскоп, центрифужные стаканы, пипетки, пипетатор, цилиндр.

Приготовление рабочих растворов:

1. Буфер А: 0,3 М Na-ацетатный буфер pH 5,8. Этот буфер готовят из 2 М Na-ацетатного буфера pH 5,8, для получения которого берут CH₃COONa·3H₂O – 255,8 г и CH₃COOH (ледяная) – 7,2 мл. Объем доводят до 1 л водой.

2. Буфер В: 10 мМ трис- HCl , pH 7,55, содержащий 0,25 М сахарозы, 25 мМ KCl , 10 мМ MgCl_2 ; для получения которого берут трис – 1,21 г, сахарозу – 85,5 г, KCl – 1,86 г, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2,03 г, 0,1 л и HCl – 80 мл. Объем доводят до 1 л водой.

3. Буфер С: 10 мМ трис- HCl , pH 7,55, содержащий 3 мМ CaCl_2 ; для получения которого берут трис – 1,21 г, сахарозу – 85,5 г, KCl – 1,86 г, CaCl_2 – 0,333 г, 0,1 л и HCl – 80 мл. Объем доводят до 1 л водой.

4. Раствор Д: 0,2 М NaCl , для получения которого берут NaCl – 11,7 г. Объем доводят до 1 л водой.

Ход работы

Клеточные ядра выделяют при температуре +4 °С. Выделение ядер включает следующие этапы. Навеску ткани массой 10 г ткани измельчают и добавляют буфер В в соотношении 1 к 4.

Затем ткань гомогенизируют 1–2 мин. Гомогенат фильтруют через 2 слоя марли, затем через капроновый фильтр. Фильтрация необходима для отделения неразрушенных частиц и фрагментов фиброзной ткани.

Фильтрат центрифугируют при 800 g в течение 7 минут. Центрифугат отбрасывают.

Осадок промывают буфером В. Для этого осадок ядер суспензируют в буфере и затем центрифугируют при 800 g в течение 7 минут.

Осадок промывают буфером С, так же как в предыдущем случае. Этот этап необходим для лизиса эритроцитов. Осадок промывают раствором Д и затем буфером А. Очищенные ядра используют в дальнейшей работе.

2. ЭКСТРАКЦИЯ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Для экстракции ферментов используют разные методы. К таким методам относятся: механическое разрушение ткани, ультразвуковая обработка, замораживание – оттаивание, использование различных соединений, которые способствуют салюбилизации ферментов и др.

Материалы и реактивы: 2М Na -ацетатный буфер pH 5,8.

Приборы и посуда: центрифуга, гомогенизатор, стаканы.

Ход работы

Для экстракции фосфопротеинфосфатазы используют 0,4, 0,6, 0,8 и 1 М Na -ацетатный буфер pH 5,8, которые готовят из 2 М Na -ацетатного буфера pH 5,8. Для экстракции фосфопротеинфосфатазы к осадку ядер добавляют 4–кратный объем буфера соответствующей концентрации. Осадок ядер тщательно суспензируют и оставляют на холоду на 20 мин. Суспензию центрифугируют, надосадочную жид-

кость используют в качестве препарата фермента. В пробах определяют активность фермента и содержание белка. На основании этих данных рассчитывают общую и удельную активность препаратов фосфопротеинфосфатазы. Результаты заносят в таблицу 13.

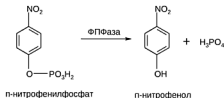
Таблица 13– Общая и удельная активность фосфопротеинфосфатазы

Концентрация буфера А, М	Содержание белка, мг	Общий белок, мг	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт/мг
0,4				
0,6				
0,8				
1,0				

На основании полученных результатов сделайте вывод, какую концентрацию буфера предпочтительнее использовать.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФОСФОПРОТЕИН-ФОСФАТАЗЫ

Для определения активности фосфопротеинфосфатазы используют реакцию гидролиза паранитрофенилфосфата, которая происходит по следующей схеме:



Паранитрофенол в щелочной среде имеет желтый цвет с максимумом поглощения при длине волны 410 нм. На этом свойстве основан принцип количественного определения продукта реакции.

Материалы и реактивы: 0,3 М Na-ацетатный буфер pH 5,8, 3 mM паранитрофенола в 0,3 М Na-ацетатном буфере pH 5,8 (2,5 мг паранитрофенола растворяют в 1 мл буфера), 0,1 н NaOH, препарат фермента.

Приборы и посуда: термостат, спектрофотометр, автоматические пипетки, пробирки, штатив.

Ход работы

Все растворы перед определением активности нужно прогреть при 37 °С в течение 5–10 минут. Затем приготавливают пробы согласно таблице 14.

Таблица 14–Приготовление проб для определения активности фосфопротеинфосфатазы

Проба	Буфер А, мкл	Субстрат, мкл	Препарат фермента, мкл
Опыт	0	50	50
Контроль	50	50	0

Ферментативную реакцию проводят при 37 °С в течение 15 минут. После инкубации реакцию останавливают добавлением 3 мл 0,1 М NaOH. Опытная проба должна окрашиваться в желтый цвет. Контрольная проба – бесцветная. Желтый цвет в опытной пробе обусловлен присутствием в ней паранитрофенола. После остановки реакции измеряют оптическую плотность раствора при 410 нм.

Количество полученного продукта определяют по интенсивности окраски пНФ в щелочной среде, используя молярный коэффициент экстинкции, равный $17,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ по формуле:

$$X = \frac{E_{410} \cdot V}{17,9 \cdot 10^3},$$

где: X – количество паранитрофенола в пробе (моль); E_{410} – оптическая плотность опытной пробы; V – объем пробы после остановки реакции (л); $17,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ – молярный коэффициент экстинкции.

Определив количество гидролизованного субстрата, рассчитывают скорость ферментативной реакции, которую выражают в нмолях гидролизованного субстрата за 1 мин. Затем в пробе определяют количество фермента в единицах активности. За единицу активности принимают количество фермента, которое гидролизует 1 нмоль субстрата за 1 минуту.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ОПТИМУМА ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

Материалы и реактивы: 0,3 М Na–ацетатный буфер pH 5,8, 3 mM паранитрофенилфосфата в 0,3 М Na–ацетатном буфере pH 5,8, 0,1 н NaOH, препарат фермента.

Приборы и посуда: термостат, спектрофотометр, автоматические пипетки, пробирки, штатив.

Ход работы

При определении температурного оптимума ферментативную реакцию проводят в интервале температур 10 – 90 °С. В этом случае изменяют температуру инкубации, как указано выше. На основе полученных данных строят график зависимости скорости реакции от температуры. По графику устанавливают температурный оптимум реакции.

5. ОЧИСТКА ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

Температура денатурации различных белков может значительно различаться. При определенной температуре можно добиться денатурации значительной части балластных белков, в то время как изучаемый белок при данной температуре будет находиться в нативном состоянии. Денатурированные белки можно удалить центрифугированием. Используя этот подход, можно добиться частичной очистки белка.

Материалы и реактивы: 0,3 М Na-ацетатный буфер pH 5,8,3 мМ паранитрофенилфосфата в 0,3 М Na-ацетатном буфере pH 5,8, 0,1 и NaOH, препарат фермента.

Приборы и посуда: термостат, центрифуга, спектрофотометр, автоматические пипетки, пробирки, штатив, баня со льдом.

Ход работы

Перед тем как начать очистку фермента при помощи термической обработки, необходимо изучить термостабильность фермента. Для этого препарат фермента прогревают в интервале температур 35 – 90 °С на протяжении 5 мин. Затем пробы охлаждают и в них определяют активность. На основе полученных данных строят зависимость активности фермента от температуры предварительной обработки.

Затем препарат с известными активностью ФПФазы и концентрацией белка обрабатывают в течение 5 мин при максимальной температуре, при которой фермент стабилен (устанавливают по графику). Далее пробы охлаждают в бане со льдом, осадок удаляют центрифугированием (2000 g, 15 мин). В центрифугате определяют активность фермента и содержание белка. На основании полученных данных рассчитывают степень очистки и выход фермента по формулам:

$$\text{Степень очистки} = \frac{\text{Удельная активность очищенного препарата фермента}}{\text{Удельная активность исходного препарата фермента}},$$

$$\text{Выход} = \frac{\text{Общая активность очищенного препарата фермента}}{\text{Общая активность исходного препарата фермента}},$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Фосфопротеинфосфатаза, класс фермента, роль в метаболизме.
2. Приведите примеры уравнений реакций с участием фосфопротеинфосфатазы.
3. Приведите примеры других фосфатаз, напишите соответствующие уравнения с их участием.
4. Код фермента по систематическому каталогу. К какому классу и подклассу относится фосфопротеинфосфатаза?
5. Чем объясняется большое разнообразие молекулярных форм ФПФаз?

Лабораторная работа № 11.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:изучитькинетику ферментативных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В ферментативной кинетике изучается зависимость скорости протекания ферментативных реакций, зависящих от природы веществ, вступающих в реакцию и факторов окружающей среды.

В начале XX века А. Браун и В. Анри высказали предположение, что в основе энзиматической реакции лежит обратимое взаимодействие субстрата с ферментом, в результате чего образуется комплекс распадающийся в последствии на продукт реакции и регенерированный фермент. Леонор Михаэлис и Мод Ментен в 1913 гразработали общую теорию ферментативной кинетики.

Отношение суммы констант скоростей реакций, в которых фермент-субстратный комплекс распадается, к константе скорости реакции, в которой он образуется, называют **константой Михаэлиса-Ментен (K_m)**. Эта константа характеризует степень диссоциации комплекса фермент-субстрат. Это такое значение концентрации субстрата, при котором скорость протекающей реакции равна половине максимально достижимой скорости в данной реакции. Для каждой пары фермент-субстрат константа имеет свое значение.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Т.е. ее можно использовать для оценки сродства фермента к субстрату, чем ниже значение K_m , тем предпочтительнее субстрат для данного фермента.

Михаэлис и Ментен вывели уравнение скорости ферментативной реакции:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

где: V – скорость данной биохимической реакции, $V_{\max}$ – максимальная скорость реакции, S – субстрат, K_m – константа Михаэлиса–Ментен)

Уравнение Михаэлиса и Ментен положено в основу кинетики всех ферментативных реакций, позволяя рассчитать количественные характеристики ферментов.

Международной комиссией по ферментам за единицу активности фермента было предложено принимать такое его количество, которое при определенных условиях будет катализировать преобразование 1 микромоля исходного вещества за единицу времени или 1 микроэквивалента затронутой группы, если атакуется более 1 группы в субстрате. При этом нужно указывать температуру, при которой проходит реакция. Активность фермента можно выразить в виде **общей, удельной и молекулярной активности.**

В медицине и фармации используются международными единицами активности – МЕ.

В системе СИ за единицу фермента принято считать катал (кат), количество фермента, катализирующее преобразование 1 моля исходного вещества за 1 с.

Международная единица и катал связаны между собой равенствами:

$$1 \text{ ME} = 1 \text{ мкмоль/мин} = 1/60 \text{ мкмоль/с} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$$

$$\text{или } 1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \cdot \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ E}$$

Например, 1 г пепсина расщепляет 50 кг яичного белка за 1 час, то есть его активность составляет 50 кг в час на 1 г энзима. Другой пример, 1,6 мл слюны подвергает расщеплению 175 кг крахмала в 1 ч, то есть его активность составляет 109,4 кг/ч из расчета на 1 мл слюны.

Общая активность фермента – количество фермента, катализирующее преобразование 1 мкмоль исходного продукта за единицу времени с учетом материала, взятого для анализа.

Так, при определении общей активности фермента ЛДГ было использовано 100 мг печени, которую инкубировали в течении 15 мин в субстрате и установили, что выход продукта составил 210 ммоль, это значит, что в 1 г печени содержится $210/(0,1 \cdot 15) = 140$ единиц ЛДГ.

Удельная активность фермента (удак.) определяется количеством превращенного субстрата, деленного на массу белка в исследуемом образце в единицу времени.

Например, если в 1 г навески печени 140 единиц ЛДГ и 200 мг белка, удельная активность данного фермента составит $140/200=0,7$ (мкмоль·мин⁻¹)·мг⁻¹. Если в 0,5 мл исследуемого образца, содержащего 8 Е аргиназы, было обнаружено 20 мг белка, это означает, что удельная аргиназная активность экстракта равна $8:20=0,4$ Е/мг. Удельную активность целесообразно определять в случаях необходимости сопоставления активности различных препаратов, в которых содержится один и тот же фермент. В случаях если есть необходимость сравнить активность различных ферментов, проводят расчет молекулярной активности.

Молекулярная активность (число оборотов фермента) – характеризует количество молей исходного продукта, которое подверглось изменению в ходе действия 1 моля энзима за единицу времени (чаще всего за 1 мин). Например, в растворе фумаразы обнаружено 240 единиц фермента, а его содержание составляет 0,002 мкмоль, тогда активность фумаразы будет равна $240/0,002=12 \cdot 10^4$ мин⁻¹.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ, k_m И V_{max} , РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМИЛАЗЫ

Материалы и реактивы: раствор крахмала в концентрациях 0,125, 0,25, 0,5 I, 2 mM, препарат амилазы слюны, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, пипетки на 1 мл, пипетаторы, автоматический дозатор, спектрофотометр.

В 5 пробирок вносят по 1 мл препарата амилазы слюны. Затем в каждую добавляют по 1 мл воды и термостатируют при 37 °C в течение 1 мин.

Постепенно, после засекания начала время реакции, во всепробивносят 1 мл раствора крахмала в концентрации, указанной в таблице 15.

Таблица 15– Внесение крахмала в пробы

№ пробирки	1	2	3	4	5
Концентрация крахмала, mM	2	1	0,5	0,25	0,125

В каждую пробирку добавляют 200 мкл раствора Люголя. Пробы инкубируют в течение 10 мин.

Определяют оптическую плотность при $\lambda=620$ нм. Полученные результаты представляют в виде таблицы 16.

Таблица 16 – Определение оптической плотности

Пробирки	Концентрация крахмала, mM	A_{620}
1	2	
2	1	
3	0,5	
4	0,25	
5	0,125	

Строят график зависимости $V_{\text{отн}}$ от $[S]$. По графику Лайнуивера-Бэрка определяют значение K_m .

2. ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В зависимости от способа наблюдения за ходом ферментативной реакции все методы можно разделить на 2 типа: метод непрерывного наблюдения и методы, связанные с отбором проб.

В первом случае наблюдение ведут непрерывно, получая большое количество точек отсчета или автоматически регистрируя с помощью специальных устройств (например, спектрофотометрические методы).

При использовании методов, связанных с отбором проб перед инкубацией и через определенные промежутки времени в процессе инкубации из реакционной смеси отбирают определенное количество раствора. Останавливают реакцию и проводят количественное определение субстрата (продукта).

В процессе получения ферментативного гидролизата из мяса по Хоттингеру о ходе реакции судят по нарастанию аминного азота. Пробы отбирают в начале гидролиза и через каждые 24 часа до достижения концентрации аминного азота 700–900 мг/мл.

Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Материалы и реактивы: 0,1 н раствор гидроксида натрия, 0,1 н раствор соляной кислоты, мясного перевар, дистиллированная вода, формалин.

Приборы и посуда: потенциометр, электроды, воронка, стаканы, фильтровальная бумага, пипетки, пипетатор, микробюретка на 5 мл.

Ход работы

Для анализа используют определенный объем В жидкого образца. "В" равно для жидких гидролизатов низкой степени расщепления (0,1–0,2% аминного азота) – 3 мл; средней степени расщепления (0,3–0,6 аминного азота) – 1 мл; высокой степени расщепления (0,7–1,3% аминного азота) – 0,5 мл; для жидких питательных сред (0,08–0,14% аминного азота) – 3 мл.

В течение 72 ч от начала гидролиза на анализ отбирают 3 мл отфильтрованного мясного перевара, в последующие 1 мл.

В стакан емкостью 50 мл наливают объем "В" анализируемого раствора образца и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор, pH которого доводят до 7,0 с помощью 0,1 н раствора гидроксида натрия или 0,1 н раствора соляной кислоты. Во время определения электроды должны все время оставаться погруженными в раствор. К нейтрализованному раствору добавляют 2 мл нейтрального формалина, перемешивают и, не вынимая электродов, титруют содержимое 0,1 н раствором едкого натра до pH 9,1. При титровании следует использовать микробюретку на 5 мл. Содержание аминного азота в исследуемом образце в % (X) вычисляют по формуле:

$$X_n = \frac{A \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{B \cdot 1000}$$

где А – объем 0,1 н раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование испытуемой пробы, мл; К – поправка к титру 0,1 н раствора NaOH, К=1; 1,4 – количество аминного азота в мг, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора NaOH; 100 – коэффициент пересчета в проценты; Р – объем жидкого образца, взятого для анализа, мл; 1000 – коэффициент пересчета мг в г.

Данные определения заносят в таблицу 17.

Таблица 17– Определение скорости ферментативной реакции

Время определения t (сут)	1	2	3	4	5	6	7
Концентрация аминного азота X_n (%)							
Скорость ферментативной реакции ν $\frac{X_n - X_{n-1}}{X_n}$							

Реактивы и материалы: растительный материал (корни хрена); мел; 3 % раствор пероксида водорода.

Приборы и посуда: ступка с пестиком; стакан, реакционная колба, зажим, бюретка, сосудик для раствора, делительная воронка, резиновая трубка, пинцет, пробка, цилиндр.

Ход работы

Навеску корня хрена массой 0,5 г измельчить и растереть в ступке с 20 мл дистиллированной воды с добавлением небольшого количества мела (для создания слабощелочной среды). Собрать установку для сбора газа (рис. 3).

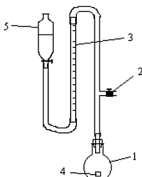


Рис. 3. Газометрический прибор для определения активности каталазы

1 – реакционная колба; 2 – зажим; 3 – бюретка с делениями; 4 – сосудик для раствора пероксида водорода; 5 – делительная воронка. Стеклнные части прибора соединены резиновой трубкой.

Гомогенат оставить на 5–10 мин для отстаивания и после чего раствор переносят в колбу. В небольшой сосудик влить 5 мл 3 % раствора пероксида водорода и пинцетом поставить его внутри реакционной колбы. При открытом зажиме осторожно плотно закрыть реакционную колбу пробкой газометрического прибора.

Закрывать зажимом сообщение с атмосферой и одновременно перевернуть сосудик с перекисью внутри колбы. Пероксид смешивается с гомогенатом, содержащим каталазу, что вызовет разложение пероксида и выделение кислорода.

Выделяющийся кислород, попадая сверху в бюретку, будет отжимать воду вниз. По понижению уровня воды в бюретке судят об объеме выделившегося кислорода. Для того чтобы выровнять давление выделяющегося кислорода с атмосферным давлением, нужно выровнять уровни воды в бюретке и воронке, опуская воронку вниз.

Определить объем выделившегося кислорода через разные промежутки времени от начала реакции (1, 2, 3, 4, 5 мин.). Рассчитать активность каталазы по формуле:

$$A = \frac{V O_2}{m \cdot t},$$

где А – активность каталазы, см³/г·мин.; m – масса навески ткани, г; t – время, мин Найдите среднее значение.

Результаты исследования оформить в виде таблицы 19.

Таблица 19 – Активность каталазы

Время, мин	Объем кислорода, см ³	Масса сырья, г	Активность каталазы

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Кинетика ферментативных реакций.
2. Напишите уравнение и график Михаэлиса–Ментен. Графическое определение величины константы Михаэлиса.
3. Напишите уравнение и график Лайнуивера–Берка.
4. Другие способы определения ферментативной активности. Напишите уравнения и нарисуйте графики.
5. Перечислите факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
6. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента.
7. Зависимость скорости ферментативной реакции от времени.
8. Что такое каталитическая активность фермента.
9. Что такое международная единица активности (МЕ).
10. Что такое единица активности в системе СИ (катал).
11. Что такое удельная активность фермента.
12. Способы определения ферментативной активности.

Лабораторная работа № 12.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:изучить термоллабильность ферментов, определить оптимальную температуру действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Т.к. ферменты являются белками, то при повышении температуры до определенного уровня они будут подвергаться тепловой денатурации, что приведет к прекращению ферментативной реакции. При температурах ниже нуля ферменты не денатурируют, однако их активность падает. При температуре выше 50 °С многие ферменты утрачивают биологическую активность.

Однако существуют и термостабильные ферменты. Примером этого может служить термоллизин, который при 60 °С полностью сохраняет свою активность в течение 1 ч. При 80 °С через 1 ч наблюдается потеря 50 % активности. Пероксидаза, даже при нагревании в течение 60 секунд до 150 °С может сохранить биологическую активность, она считается одним из самых термостабильных ферментом.

Высокой термостабильностью отличаются ферменты, являющиеся гликопротеинами, т.к. углеводный компонент обеспечивает белку дополнительную устойчивость. Например, микроорганизмы, обитающие в горячих источниках, имеют такие термоустойчивые ферменты. Таq-полимераза, содержащаяся у микроорганизмов обитающих в горячих источниках, не денатурирует при температуре до 95 °С. Таq-полимеразу используют в медицине для диагностики заболеваний с использованием метода ПЦР.

1. ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ α -АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Ферменты термоллабильны, т.е. чувствительны к высокой температуре. Свойство ферментов инактивироваться при кипячении можно показать на примере α -амилазы слюны.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, раствор Люголя, раствор слюны, реактивы для реакции Троммера (10 % раствор гидроксида натрия, 5 % раствор сульфата меди).

Приборы и посуда: пробирки, штатив, спиртовки, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

В пробирку отливают около 2 мл разбавленной слюны и кипятят в течение 2–3 мин (следя за тем, чтобы образующаяся пена также прогревалась), после чего охлаждают. В две пробирки наливают по 10 капель 1 % раствора крахмала. В одну из них добавляют 10 капель разбавленной слюны, в другую – 10 капель разбавленной слюны, предварительно прокипяченной и остуженной.

Содержимое обеих пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 10 мин. После действия фермента на субстрат из каждой пробирки отбирают по 3–5 капель жидкости в заранее заготовленные пробирки с 1–2 каплями раствора Люголя. Проба из пробирки с не прокипячённой слюной окрашивания с йодом не даст. Проба из пробирки с предварительно прокипяченной слюной даст с йодом синее окрашивание.

С оставшейся жидкостью в обеих пробирках производят реакцию Троммера, внося 1 мл 10 % раствора гидроксида натрия и добавляя по каплям 5 % раствор сульфата меди. Реакция Троммера будет положительна с не прокипячённой слюной, и отрицательна в случае действия на крахмал прокипяченной слюны.

Полученные данные внести в таблицу 20.

Таблица 20 – Термоллабильность амилазы

Фермент	Субстрат	Реакция с крахмалом	Реакция Троммера
Нативная α -амилаза			
Инактивированная α -амилаза			

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Скорость химической реакции увеличивается в 2–4 раза при повышении температуры на каждые 10 °С. Однако из-за белковой природы фермента повышение температуры более 50 °С приведет к тепловой денатурации молекул фермента.

Материалы и реактивы: 0,5 % раствор крахмала, лед, раствор Люголя, раствор слюны.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, водяная баня, штатив, стакан, пипетки, пипетатор, капельницы.

Ход работы

В пробирки 1–4 вносят по десять капель 0,5 % раствора крахмала. В пробирки 5–8 вносят по 10 капель разведенной в 10 раз слюны.

Пробирки 1 и 5 помещают на 10 мин в стакан со льдом. Пробирки 2 и 6 оставляют при комнатной температуре, пробирки 3 и 7 ставят в термостат при температуре 37 °С, пробирки 4 и 8 помещают в кипящую воду на водяной бане.

Через 10 мин сливают вместе (попарно) содержимое пробирок, тщательно перемешивают и оставляют стоять 10 мин.

Затем из каждой пробирки отбирают несколько капель жидкости и проделывают на стекле реакцию с йодом. Если окраска получается синей, оставляют раствор еще на 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле до появления оранжевой окраски.

Полученные результаты занести в таблицу 21.

Таблица 21– Определение оптимальной температуры действия ферментов

Номер пробирок	Температура, °С	Окраска с йодом, мин		
		1	10	20
1 и 5	0			
2 и 6	20			
3 и 7	37			
4 и 8	100			

3. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПСИНА

Пепсин (от греч. pépsis – пищеварение) вырабатывается слизистой желудка в виде неактивного предшественника – пепсиногена, который превращается в пепсин под влиянием HCl. Кристаллический пепсин обладает высокой каталитической активностью – 1 г его растворяет за два часа 50000 г сваренного яичного белка.

Материалы и реактивы: молочно-ацетатная смесь, желудочный сок.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, штатив, стеклограф, пипетки, пилетатор, емкость со льдом.

Ход работы

Пронумеровать стеклографом четыре пробирки, в которые налить по 2 мл молочноацетатной смеси. Пробирку номер один прокипятить; пробирку номер два поместить в термостат при 40 °С; пробирку номер три оставить при комнатной температуре; пробирку номер четыре поместить в лед.

Через 10 мин, когда содержимое примет необходимую температуру, во все пробирки добавляют по 0,1 мл желудочного сока, быстро перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдая за моментом

появления на стенках пробирок первых ступков казенна, образующегося из казенногена под действием пепсина, отмечают оптимальную температуру действия данного фермента.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Материалы и реактивы: капустный сок, гидрохинон, лед, пероксид водорода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, емкость с теплой водой, емкость с горячей водой, пипетки, пипетатор, марля, скальпель, термостат.

Ход работы

Измельчить капустную кочерыжку, сок отжать через марлю и добавить воды в 10 раз больше, чем материала. Пронумеруйте пробирки-клеткографом и в 1, 2, 3, 4 пробирки внесите по 1 мл полученного сока и на кончике скальпеля в каждую пробирку добавьте гидрохинон.

В пробирки 5 и 6 внести по 1 мл воды и так же внесите гидрохинон на кончике скальпеля.

Пробирку номер один поместить в баню со льдом; пробирку номер два в термостат при 40 °С; пробирку номер на водяную баню при 60 °С; пробирку номер четыре оставляют при комнатной температуре; пробирку номер пять прокипятить; пробирку номер шесть оставить на столе без изменений.

Через 5 мин от начала опыта во все пробирки, добавляя по пять капель перекиси водорода. Смесь встряхивают и отмечают время начала реакции. Еще через 5 мин все пробирки ставят в штатив.

Результаты опыта оформляют в виде таблицы.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТИ ИНВЕРТАЗЫ

Инвертазу можно получить из дрожжей.

Материалы и реактивы: пивные или прессованные дрожжи, песок, вода, 5 % раствор NaOH, 1 % раствор сахарозы, реактив Фелинга.

Приборы и посуда: воронка, бумажный фильтр, термостат, весы, песок, фарфоровая ступка и пестик, пробирки, штатив.

Приготовление реактива Фелинга: 150 г тартрата калия растворяют в литровой колбе в 600—700 мл раствора гидроксида натрия, плотностью 1,12 г/см³ и постепенно вливают раствор сульфата меди (34,636 г соли на 160 мл воды), при этом выделяется осадок, который растворяется при взбалтывании. Полученный прозрачный раствор разбавляют водой до 1 литра, хранят в непрозрачных емкостях.

Ход работы

Навеску 0,5 г высушенных на воздухе пивных или прессованных дрожжей растирают в фарфоровой ступке в течение 20 мин с кварцевым песком и 5 мл воды, подогревают до 60 °С, затем фильтруют. Фильтрат должен быть прозрачным, если первые порции фильтрата мутные, их снова выливают в воронку для фильтрования.

Берут четыре пробирки, в первые две приливают по 1 мл инвертазы, 2 мл 5 % раствора NaOH и нагревают до кипения. В две другие приливают по 1 мл инвертазы. Затем во все четыре пробирки приливают по 5 мл 1 % раствора сахарозы. Пробирки три и четыре ставят термостатируют в течение 15 мин при 37 °С. Затем добавляют по 2 мл 5 % гидроксида натрия. Пробирки охлаждают и вносят по 5 мл фелинговой жидкости и кипятят. Выпадает красный осадок гидрата закиси меди. По количеству осадка судят об активности инвертазы.

6. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

Материалы и реактивы: предварительно замоченный горох, 1 % перексид водорода, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: термостат, пробирки, штатив, термостат, часы, термометр, скальпель, ножницы, пинцет, стеклянная палочка.

Ход работы

Перед началом опыта необходимо удостовериться в наличии каталазы в исследуемом материале. С этой целью растирают горошину и добавляют несколько капель перекиси водорода.

Ставят две пробирки с водой в термостат при температуре 40 °С. В третьей пробирке кипятят три целые горошины и помещают их в одну из пробирок в термостате. В другую пробирку в термостате помещают три свежие горошины и засекают 10 мин.

Проверить каждую из проб на каталазную активность.

Аналогичный опыт провести при 50, 60, 70, 80 и 100 °С.

Объяснить результаты, сделать выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Зависимость активности ферментов от температуры.
2. Температурный оптимум действия ферментов.
3. Как влияет снижение температуры ниже 0 °С на активность ферментов? Приведите примеры термолабильных ферментов.
4. Как установить температурный оптимум для ферментов?
5. Постройте график зависимости ферментативной активности в зависимости от влияния температуры.

Лабораторная работа № 13.

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить влияние pH среды на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Большинство ферментов активны в диапазоне pH от 6 до 8. Кривая зависимости между активностью фермента и pH может иметь форму плато, если при значениях pH, намного превышающих pH кислой зоны, в которой достигается максимальная активность, начинает действовать фактор, ограничивающий ферментативную активность при высоких pH.

Если снижение активности в щелочной зоне происходит при низких значениях pH, результатом является кривая с острым оптимумом pH.

Изменения pH среды на фермент заключается в изменении степени ионизации функциональных групп ферментов, карбоксильных, сульфгидрильных, аминогрупп и т.д. При сдвигах оптимума pH среды ферменты подвергаются конформационным изменениям, что приводит к изменению заряда молекулы или денатурации фермента.

При определенных значениях pH активный центр фермента находится в отчасти ионизированном или неионизированном виде, что определяет его третичную структуру и формирует активный центр.

Величина pH крови сохраняется на постоянном уровне, в норме pH, близко к 7,3–7,4. Даже небольшие сдвиги pH могут привести к значительным изменениям скорости жизненно необходимых организму ферментативных реакций, идущих например, в скелетных мышцах или мозге.

Например, при физической нагрузке в мышечных волокнах накапливается молочная кислота и pH снижается до 5,0. При этом pH фермент креатинкиназа начинает ускорять синтез АТФ, необходимый клеткам, из креатинфосфата и АДФ. В покоящейся мышце pH клеток повышается до 9,0 и реакция идет в обратном направлении, что приводит к синтезу креатинфосфата.

Нарушение механизмов, отвечающих за регуляцию pH, наблюдающиеся, например, при некоторых заболеваниях – диабете в результате ацидоза, из-за усиленной выработки метаболитических кислот, приводит к падению pH крови до 6,8 и ниже, что может привести к тяжелым последствиям и смертельному исходу.

Аналогичные проблемы могут возникнуть при повышении уровня pH при алкалозе.

1. ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА

Для определения влияния pH на активность трипсина проводят расщепление казеина трипсином при различных значениях pH реакционной смеси. В ходе реакции увеличивается количество аминокислот, которые определяют методом формолового титрования. Источником фермента служит обезжиренный и высушенный препарат поджелудочной железы – панкреатин, содержащий ряд ферментов, в том числе и активный трипсин.

Материалы и реактивы: казеин, 0,5 % раствор пищевой соды, 0,1 и раствор гидроксида натрия, 0,5 % раствор гидрокарбоната натрия, лед, панкреатин, 5 % раствор трихлоруксусной кислоты, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: колбы, термостат, фильтровальная бумага, форонки, пробирки, бюретка, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Готовят 3 навески казеина по 100 мг и 3 навески панкреатина по 30 мг. В три колбы наливают растворы с различными значениями pH: а) 5 мл 0,1 н NaOH; б) смесь 5 мл 0,5 % раствора Na_2CO_3 и 0,15 мл 0,1 н раствора NaOH; в) смесь 5 мл 0,5 % раствора NaHCO_3 и 0,15 мл 0,1 н раствора NaOH.

В каждую колбу вносят по 100 мг казеина; тщательно размешивают палочкой и быстро измеряют pH с помощью универсальной индикаторной бумаги. Затем в каждую вносят по 30 мг панкреатина и проводят инкубацию в течение 25 мин при комнатной температуре, время от времени перемешивая реакционную смесь.

Перед окончанием инкубации проверяют pH смесей и ставят колбы в ледяную воду для прекращения реакции. К охлажденным пробам добавляют по 5 мл 5 % раствора ТХУ для осаждения белков. Через 5 мин отфильтровывают осадок, фильтрат анализируют вместе с контрольной пробой.

Контролем служат пробы с 5 мл 0,1 н NaOH и казеином, в которые до добавления панкреатина приливают 5 мл охлажденного 5 % раствора ТХУ. После удаления осадка фильтрат контрольных проб обрабатывают так же, как и опытные пробы.

Из содержимого каждой колбочки отбирают в другие колбочки по 5 мл трихлоруксусного фильтрата, добавляют к нему по 5 капель 1 % раствора фенолфталеина и 5–10 капель 0,1 н NaOH до получения отчетливой розовой окраски раствора. После этого осторожно, по каплям, добавляют, встряхивая после каждой капли, 0,1 н HCl до слабо-розовой окраски.

К нейтрализованным пробам приливают по 2 мл 20% раствора формальдегида. Содержимое колб перемешивают и титруют 0,025 н раствором щелочи.

Активность трипсина может быть выражена количеством миллиграммов аминного азота, нарастающего за время инкубации:

$$A = (B - B') \cdot 0,35$$

где А – активность трипсина; В – объем 0,025 н раствора щелочи, пошедший на титрование опытной пробы, мл; В' – объем 0,025 н раствора щелочи, пошедший на титрование контрольной пробы, мл; 0,35 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,025 н раствора щелочи, мг.

Вычисляют средние величины активности трипсина по данным титрования и строят график зависимости активности трипсина от pH: для этого на оси абсцисс откладывают значения pH, а на оси ординат – величины активности трипсина. Сделать вывод об оптимуме pH трипсина.

2. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ РЕАКЦИИ СРЕДЫ

Ферменты, как и все белки, имеют заряженные группы. Общий заряд молекулы зависит от уровня pH. Ферменты, как правило, активны в пределах определенной зоны концентрации водородных ионов. Точка, в которой фермент максимально активен, считается его оптимумом pH.

Материалы и реактивы: 0,2 М гидрофосфат натрия, 0,1 М лимонная кислота, раствор слюны, 1% раствор крахмал, раствор Люголя, раствор йода, лед.

Приборы и посуда: термостат, пробирки, предметное стекло, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Готовят 5 буферных растворов с pH от 5,6 до 7,8, как указано в таблице 22.

Таблица 22 – Приготовление буферных растворов

№	pH	Количество 0,2 М Na_2HPO_4 , мл	Количество 0,1 М лимонной кислоты, мл
1	5,6	2,90	2,10
2	6,4	3,45	1,55
3	6,8	3,65	1,15
4	7,2	4,35	0,63
5	7,8	4,80	0,20

К 5 мл приготовленных смесей добавляют по 0,5 мл слюны, разбавленной водой в 10 раз и 0,5 мл крахмала. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 10 мин. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с раствором Люголя.

Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 мин до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2–3 мин после появления подобной окраски все пробирки вынимают из термостата и помещают в стакан со льдом.

После этого быстро добавляют в каждую пробирку по 2–3 капли раствора йода, перемешивают и отмечают окраску. Оптимальная pH для амилазы слюны будет в той пробирке, в которой крахмал полностью расщепился (при реакции с йодом окраска будет желтой). Фиолетовое, красно-фиолетовое и бурое окрашивание показывает степень распада крахмала.

Результаты занести в таблицу 23.

Таблица 23 – Зависимость активности амилазы слюны от pH среды

№ пробы	pH среды	Окраска с йодом	Оптимум pH
1	5,6		
2	6,4		
3	6,8		
4	7,2		
5	7,8		

Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, а по оси ординат – время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ pH НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ СОЛОДА

Материалы и реактивы: буферные растворы, H_3BO_3 , CH_3COOH , NaOH , 1 % раствор крахмала.

Приборы и посуда: капельницы, штатив, пробирки, стеклогграф, пипетки, пипетатор, колбы.

Ход работы

Стеклогграфом пронумеровать пять пробирок и в каждую внести по 4 мл буферного раствора со значениями pH: 2,87; 4,10; 5,33; 6,59; и 7,96.

Буферные растворы готовят в соответствии с таблицей 24.

Таблица 24 – Составление буферных растворов

Раствор, мл		pH
№ 1	№ 2	
100	17,5	2,86
100	25,0	4,10
100	37,5	5,33
100	47,5	6,59
100	60,0	7,96

Раствор № 1 с pH 1,81: в колбе вместимостью 1 л растворяют 0,04 моль борной кислоты, 0,04 моль H_3PO_4 , 0,04 моль CH_3COOH .

Раствор № 2: раствор с концентрацией NaOH 0,2 М.

Во все пробирки добавляют по 2 мл 1 % раствора крахмала и по 0,5 мл вытяжки из солода. Содержимое перемешивают и в дальнейшем поступают точно так же, как описано ранее. Результат оформить в виде таблицы 25.

Таблица 25 – Влияние pH на активность амилазы солода

Показатели	pH				
	2,87	4,10	5,33	6,59	7,96
Окраска с J_2					

Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, при котором проводился гидролиз крахмала, а по оси ординат – время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина.

Сделать вывод, при каком значении pH оптимум действия фермента.

4. ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

Материалы и реактивы: картофель, 5 % раствор гидроксида натрия, 5 % раствор соляной кислоты, 3 % раствор пероксида водорода.

Приборы и посуда: пинцет, чашки Петри, лакмусовая бумага, капельницы.

Ход работы

Три кусочка картофеля по 1 см² раздробить, положить в чашки Петри. Лакмусовой бумагой определить pH сока картофеля.

На первый кусочек наносим несколько капель 3 % H₂O₂. Наблюдаем образование газа. На второй капаем 5 % NaOH, ждем 1 мин и затем капаем H₂O₂. Третий обрабатывается несколькими каплями 5 % HCl и H₂O₂, также как второй – NaOH.

Результаты сравниваются в соответствии с показателями pH. Сделать выводы. Аналогичный опыт можно проделать с кусочками сырого мяса.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каково оптимальное значение pH среды для ферментативной активности ферментов? Каковы физико-химические основы влияния оптимального значения pH среды на ферментивную активность?

2. Как определить изменение активности амилазы под влиянием pH? Характеристика оптимальных pH и её параметры для амилазы слюны.

3. Каково влияния на ферментивную активность сдвига pH от оптимума?

4. Нарисуйте графики зависимости активности ферментов от pH среды.

5. Ацидоз и алкалоз, причины и последствия.

Лабораторная работа №14.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить специфичность действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Специфичность – важное свойство ферментов, определяющее их биологическую значимость. Она обусловлена комплементарностью субстрата и фермента и структурой активного центра, который обеспечивает сродство и избирательность протекания одной из тысяч реакций, одновременно идущих в клетках. Данное свойство ферментов существенно отличает их от неорганических катализаторов, например, платина и палладий катализируют восстановление десятков тысяч веществ с участием молекулярного водорода.

Специфичность ферментов приводит к упорядоченному превращению субстратов в клетке, благодаря этому фермент направляет реакцию по строго определенному пути. Именно это свойство ферментов представляет собой специфическую особенность, которая характеризует живую материю.

Различают субстратную специфичность и специфичность действия.

1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, молоко, раствор слюны, 0,1 % раствор йода в 0,2 % растворе йодида калия, 1 % раствор сычужного фермента.

Приборы и посуда: пробирки, водяная баня, пипетки, пипетатор, штатив.

Ход работы

Берут четыре пробирки, нумеруют их. В пробирки 1 и 2 наливают по 5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 – по 5 мл молока. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 1 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 – по 1 мл раствора сычужного фермента. Все 4 пробирки на 10–15 мин ставят в водяную баню с температурой 37 °С. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирках с молоком, а расщепление крахмала проверяют добавлением в пробирки 2–3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в таблицу 26.

Таблица 26 – Определение специфичности ферментов

Субстраты и ферменты	Номера пробирок			
	1	2	3	4
Крахмал	+	+	–	–
Казени молока	–	–	+	+
Амилаза	+	–	+	–
Сычужный фермент	–	+	–	+
Изменение цвета				

Объясните результаты опыта.

2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ

Контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп в глюкозе. В крахмале свободных альдегидных групп нет, поэтому проба Троммера отрицательна.

Материалы и реактивы: 0,5 % раствор крахмала, 0,5 % раствор сахарозы, реактивы для реакции Троммера (2 н раствор NaOH и 0,2 н раствор CuSO_4), 30 % NaOH, 7 % раствор CuSO_4 , раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, пипетки, пипетатор, штатив, капельницы.

Ход работы

В первую пробирку вносят 10 капель крахмала, во вторую 10 капель сахарозы. В обе пробирки добавляют по 5 капель предварительно разбавленной в 5 раз слюны, все перемешивают и термостатируют в течение 10 мин при температуре 37 °С. После чего содержимое пробирок с крахмалом делят на две части. После этого в пробирке с сахарозой и в одной из пробирок с крахмалом проводят качественную реакцию Троммера и убеждаются в том, что произошло расщепление только крахмала, но не сахарозы.

К 5 каплям содержимого пробирок добавляют 5 капель 30 % NaOH и несколько капель 7 % раствора CuSO_4 до появления исчезающей мути гидроокиси меди $\text{Cu}(\text{OH})_2$. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок CuOH или красный осадок закиси меди Cu_2O .

В другой пробирке с крахмалом, чтобы подтвердить его расщепление, ставят реакцию с йодом. В этом случае раствор не приобретет синей окраски. К 2–3 мл раствора крахмала приливают 1 каплю раствора Люголя; жидкость окрашивается в синий цвет, исчезающий при нагревании и появляющийся при охлаждении.

3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахаразу – фермент, расщепляющий дисахарид сахарозу на глюкозу и фруктозу, можно легко получить из дрожжей.

Материалы и реактивы: раствор Люголя, реактивы для реакции Троммера, 0,5 % раствор сахарозы, 0,5 % раствор крахмала.

Приборы и посуда: фарфоровая ступка с пестиком, пробирки, воронка, фильтровальная бумага, пипетка, пинзетатор, штатив, воронка, стакан.

Ход работы

Насеку дрожжей массой 0,5 г растирают в фарфоровой ступке. Добавляют 3 мл воды и растирают дрожжи с водой; при этом сахараза переходит в раствор. Смесь фильтруют через небольшой складчатый фильтр, полученный фильтрат служит источником сахаразы.

В первую пробирку вносят 10 капель сахарозы; во вторую 10 капель крахмала и в обе пробирки добавляют 5 капель дрожжевого фильтрата. Пробирки термостатируют в течение 10 мин при 40 °С, после чего в обеих пробирках проводят реакцию Троммера и убеждаются в том, что расщепляется только сахароза, но не крахмал. В пробирке с крахмалом проводят цветную реакцию с раствором Люголя. Результаты работы записывают в таблицу 27.

Таблица 27 – Определение специфичности действия амилазы и сахаразы

Фермент	Субстрат	Контрольные реакции (+ или –)	
		Реакция на крахмал	Реакция Троммера
Амилаза слюны	Крахмал		
Сахараза дрожжей	–“–		
Амилаза слюны	Сахароза		
Сахараза дрожжей	–“–		

4. ГРУППОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахараза специфична по отношению к фруктозной части сахарозы и рафинозы. Расщеплению подвергается бетта-гликозидная связь, расположенная ближе к фруктозной части данных молекул. Продукты ферментативного гидролиза сахарозы и рафинозы дают положительную реакцию с реактивом Фелинга.

Материалы и реактивы: 1 % раствор сахарозы, 1 % раствор рафинозы, реактив Фелинга.

Приборы и посуда: штатив, термостат, пробирки, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки вносят по 1 мл препарата сахаразы, в первую вносят 2 мл сахарозы, во вторую 2 мл рафинозы. Пробирки термостатируют в течение 10 мин при 38 °С, по окончании термостатирования в обеих пробирках проводят реакцию с реактивом Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения. В обеих пробирках образуется красный осадок оксида меди.

5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ УРЕАЗЫ

Для уреазы характерна абсолютная специфичность по отношению к мочеvine.

Материалы и реактивы: раствор мочевины, раствор тиюмочевины, соевая мука, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетки, пипетатор, весы.

Ход работы

Используют две пробирки, в первую вносят 1 мл мочевины, во вторую 1 мл тиюмочевины. В обе пробирки вносят 10 мг соевой муки. В каждую пробирку добавляют по 2–3 капли раствора фенолфталеина и содержимое обеих пробирок встряхивают.

Пробирки оставляют стоять на столе при комнатной температуре и через несколько минут наблюдают появление розовой окраски в пробирке с мочевиной и отсутствие окраски в пробирке с тиюмочевиной. Результаты работы записывают в таблицу 28.

Таблица 28 – Определение специфичности действия уреазы

№	Уреаза, мл	Мочевина, мл	Тиюмочевина, мл	Фенолфта- лсин	Результат реакции
1	10	1	–	2–3 капли	
2	10	–	1	2–3 капли	

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое специфичность действия ферментов. Чем она обусловлена?
2. Методы изучения специфичности ферментов.
3. Виды специфичности ферментов.
4. Субстратная и каталитическая специфичность, примеры.
5. Напишите уравнения реакций абсолютной специфичности действия ферментов.

Приборы и посуда: штатив, термостат, пробирки, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки вносят по 1 мл препарата сахаразы, в первую вносят 2 мл сахарозы, во вторую 2 мл рафинозы. Пробирки термостатируют в течение 10 мин при 38 °С, по окончании термостатирования в обеих пробирках проводят реакцию с реактивом Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения. В обеих пробирках образуется красный осадок оксида меди.

5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ УРЕАЗЫ

Для уреазы характерна абсолютная специфичность по отношению к мочеvine.

Материалы и реактивы: раствор мочевины, раствор тиюмочевины, соевая мука, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетки, пипетатор, весы.

Ход работы

Используют две пробирки, в первую вносят 1 мл мочевины, во вторую 1 мл тиюмочевины. В обе пробирки вносят 10 мг соевой муки. В каждую пробирку добавляют по 2–3 капли раствора фенолфталеина и содержимое обеих пробирок встряхивают.

Пробирки оставляют стоять на столе при комнатной температуре и через несколько минут наблюдают появление розовой окраски в пробирке с мочевиной и отсутствие окраски в пробирке с тиюмочевиной. Результаты работы записывают в таблицу 28.

Таблица 28 – Определение специфичности действия уреазы

№	Уреаза, мл	Мочевина, мл	Тиюмочевина, мл	Фенолфта- лсин	Результат реакции
1	10	1	–	2–3 капли	
2	10	–	1	2–3 капли	

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое специфичность действия ферментов. Чем она обусловлена?
2. Методы изучения специфичности ферментов.
3. Виды специфичности ферментов.
4. Субстратная и каталитическая специфичность, примеры.
5. Напишите уравнения реакций абсолютной специфичности действия ферментов.

Лабораторная работа № 15.

АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить влияние активаторов на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Активаторы увеличивают активность ферментов. Их делят на активаторы органической и неорганической природы.

К активаторам органической природы относят: желчные кислоты, энтерокиназу, глутатион, цистеин, витамин С и др.

К активаторам неорганической природы относят: HCl, ионы металлов (Na, Cl, K, Mg, Mn, Zn) и др.

В создании каталитической активности ферментов важную роль играют металлы, например, ионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} и др.

Металлы способствуют формированию комплекса фермент-субстрат, являются донорами и акцепторами электронов, выступают электрофилами или нуклеофилами, способствуя сохранению реакционных групп в нужной ориентации; принимают участие в образовании активного центра ферментов, участвуют в ходе катализа, служа мостиком между ферментом и субстратом, участвуя в образовании комплекса фермент-кофермент-субстрат.

Субстрат соединяется с энзимом только после дополнения активного центра коэнзимом

Выделяют два метода активации ферментов:

1. Физические методы, заключаются в воздействии электромагнитного излучения, кратковременной тепловой обработки, акустических колебаниях, воздействии переменного электромагнитного поля, электрического тока и др. Например, звуковая обработка частотой 200 Гц увеличивает активность амилазы на 12%. При исследовании протениназ, установили, что непродолжительная тепловая обработка способствовала активизации ферментов до 20%. Установлено, что инкубация глюкоамилазных ферментов с углеводами приводила к приросту глюкоамилазной активности. Повышенная устойчивость гликолизированных ферментов к термообработке объясняется увеличением степени гидратации и повышением числа связей между белками и углеводами в молекуле гликолизированного фермента.

2. Химические методы, заключаются в воздействии химических агентов различной природы.

Активаторы повышают активность ферментов следующими способами:

- Способствуют правильному формированию активного центра;
- ускоряют формирование комплекса фермент-субстрат;
- стабилизируют третичную и четвертичную структуру фермента;
- обеспечивают защиту функциональных групп в активном центре.

Если фермент состоит из 2-х субъединиц – каталитической и регуляторной, активатор воздействует на регуляторную субъединицу, а в результате обнажается каталитическая субъединица:

Желчные кислоты способствуют повышению активности панкреатической липазы; оксидоредуктаза, катепсин, аргиназа, протеиназа активируются глутатионом и цистеином, содержащими SH-группы. Часто активаторами являются ионы двухвалентных и одновалентных металлов. Наибольшую близость в биологическом действии оказывают ферменты с микроэлементами со степенью окисления +2.

Анионы реже оказывают активирующее действие на ферменты. Например, ионы хлора активируют пепсиноген, переводя его в активную форму фермента пепсин. Анионами активируются оксидоредуктазы, амилаза слюны, аденилатциклаза активируется анионами галогенов.

1. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, 0,05 и раствор HCl, 0,05 и раствор CH₃COOH, 0,1 и раствор NaOH, 1 % раствор NaCl, раствор крахмала, раствор слюны, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, стеклянная пластинка, стеклянная палочка, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Пронумеровать 5 пробирок. В первую пробирку налить 1 мл дистиллированной воды, во вторую – 1 мл 0,05 и раствора HCl, в третью – 1 мл 0,05 и раствора CH₃COOH, в четвертую – 1 мл 0,1 и раствора NaOH и в пятую – 1 мл 1% раствора NaCl. Во все пробирки добавить по 5 мл раствора крахмала (стараясь это сделать одновременно) и затем по 5 мл раствора слюны. Все пробирки поместить в термостат при 37 °С.

Через каждые 2 мин исследуют жидкость из каждой пробы на реакцию с йодом. Для этого на стеклянную пластинку, помещенную на белую поверхность, наносят стеклянной палочкой каплю раствора Люголя и добавляют к ним стеклянной палочкой, отдельной для каждой пробы, каплю жидкости из каждой пробирки.

Повторяют взятие проб до тех пор, пока не обнаруживается прекращение изменения окраски (от синей к фиолетовой и от красной к желтой) в пробах жидкости. Отмечают время, прошедшее на образование декстринов в смесях с разными добавленными электролитами.

В выводах по работе необходимо отметить влияние на скорость гидролиза различных электролитов, добавленных к крахмалу. Скорость гидролиза крахмала в каждом случае сравнивают с первой пробой, являющейся контрольной ко всем остальным.

Данные внести в таблицу 29, отмечая в ней окраску с йодом различных проб.

Таблица 29 – Влияние электролитов на активность амилазы

Состав пробы	Время инкубации, мин						
	0	2	4	6	8	10	12
Слона + дистиллированная вода + крахмал							
Слона + раствор соляной кислоты + крахмал							
Слона + раствор уксусной кислоты + крахмал							
Слона + раствор едкого натра + крахмал							
Слона + раствор хлористого натрия + крахмал							

2.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ

Специфичность каталазы в отношении к субстрату – восстановителю невелика, поэтому она может катализировать не только разложение H_2O_2 , но и окисление низших спиртов.

Материалы и реактивы: картофель, соляная кислота; раствор этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), перекись водорода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, капельницы, пипетка, пипетатор.

Ход работы

Приготовить экстракт картофеля, профилировать его и разлить в 4 пробирки по 1 мл. Содержимое первой пробирки довести до кипения и охладить. Во вторую пробирку внести 10 капель соляной кислоты, в третью пробирку добавить 15 капель раствора ЭДТА и в четвертую пробирку 1 мл перекиси водорода.

Отметить изменения и оформить результаты в виде таблицы 30.

Таблица 30 – Определение влияния веществ на активность ката-
лазы

Реагенты	Наблюдения	Уравнения реакции
HCl		
ЭДТА		
H ₂ O ₂		

3. ДЕЙСТВИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ

Формальдегид – высокореакционноспособное карбонильное соединение, способное реагировать с белками, разрушая их структуру. В этом заключается его токсическое действие на организм человека.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, препарат амилазы, 5 % раствор формальдегида, дистиллированная вода, 1 % раствор Люголя.

Приборы и посуда: штатив пробирками, капельницы, термостат.

Ход работы

В первую пробирку вносят 1 мл крахмала, амилазы и формальдегида. Во вторую вносят по 1 мл крахмала, амилазы и воды. Термостатируют в течение 20 мин при 30 °С, после чего в обе пробирки вносят по 1 капле раствора Люголя. Синее окрашивание в пробирке с формальдегидом свидетельствует об инактивации амилазы.

4. ВЛИЯНИЕ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

В качестве источника липазы используют вытяжку поджелудочной железы или препарат панкреатина.

Материалы и реактивы: масло, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина, 10 % раствор гидроксида натрия, 0,1 н раствор гидроксида натрия.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, бюретка, воронка, колба, пипетки, лиллетатор.

Ход работы

В колбунносят 10 мл масла, 2 капли фенолфталеина и 4 капли 10% NaOH и титруют 0,1 н раствором NaOH до образования стабильной в течение 1 минуты розовой окраски.

Из нейтрализованного раствора готовят опытные пробы согласно таблице 31.

Таблица 31 – Приготовление опытных проб

Проба	Испытуемый образец, мл	Панкреатин, мг	Желчь, мл	Вода, мл
1	5	100	–	1
2	5	100	1	–
3	5	–	1	–

Данные вносят в таблицу 32.

Таблица 32 – Гидролиз триглицеридов

Объем щелочи, мл	Время, мин					
	0	10	20	30	40	50
Проба без желчи						
Проба с желчью						

Пробы тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре.

Через 15 мин от начала инкубации пробы титруют из бюретки 0,1 н раствором NaOH до слабо-розовой окраски, после чего вновь оставляют при комнатной температуре. Количество израсходованной щелочи фиксируют в таблице 4.

Титрование проб повторяют через 15, 30, 45 и 60 мин от начала инкубации. Каждый раз оттитровывается то количество жирных кислот, которое освобождается из жира при его гидролизе липазой за данный отрезок времени (15 мин).

Выразить активность липазы как концентрацию карбоксильных групп жирных кислот, образовавшихся в 100 мл масла за все время исследования, пользуясь формулой:

$$X = \frac{z - экв_{COOH-групп} \cdot 0,1 \cdot A \cdot 100}{5},$$

где 0,1 – нормальность раствора NaOH; А – количество 0,1 н раствора NaOH, израсходованного на титрование 5 мл масла за все

время инкубации (сумма всех титрований), мл; 5 – количество масла в титруемой пробе, мл.

5. СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ И ФЕРМЕНТОВ

И для ферментов и для неорганических катализаторов характерен ряд **одинаковых признаков**:

- И ферменты и неорганические катализаторы в состав конечных продуктов реакции не входят и не тратятся в ходе катализа, оставаясь после реакции в неизменном виде.
- И ферменты и неорганические катализаторы ускоряют реакции идущие и без них, не могут инициировать реакции, противоречащие законам термодинамики.
- Ферменты и неорганические катализаторы не смещают положение равновесия химической реакции, а лишь способствуют его скорейшему достижению.
- Ферменты и неорганические катализаторы в ходе катализа постепенно утрачивают свою активность.

Отличительные признаки ферментов и химических катализаторов небелковой природы:

1) Эффективность ферментов. Скорость ферментативной реакции гораздо выше, чем небиологической. Так, ионы железа ускоряют разложение перекиси водорода на воду и кислород в 800 раз, порошок платины – в 20 тысяч раз, а каталаза – в 300 миллиардов раз. Так 1 г фермента пепсина способен расщепить 50 кг яичного белка, 1 г кристаллического реннина заставляет свернуться 72 т молока, каталаза расщепляет 5 млн. молекул перекиси водорода за 1 мин!

2) Высокая специфичность. Существуют ферменты, обладающие абсолютной специфичностью, которые катализируют только одну определенную реакцию.

3) Для ферментативных реакций характерен 100% выход целевого продукта, т.е. реакции катализируемые ферментами не дают побочных реакций.

4) Ферменты могут работать в мягких условиях – нормальное давление, небольшие температуры, значения pH близкие к нейтральным.

5) Ферменты регулируемы, т.е. могут менять активность под действием некоторых факторов, меняя количественный выход продукта.

6) Скорость реакций идущих с участием ферментов прямо пропорциональна количеству фермента, в связи с чем, нехватка фермента

может привести к снижению скорости метаболизма или, напротив, к увеличению количества необходимого фермента.

7) Ферменты в клетке способны образовывать мультимерные комплексы.

8) Ряд ферментов синтезируется в неактивной форме в виде проферментов или зимогенов.

9) Многим ферментам для проявления каталитической активности нужны коферменты или простетические группы.

10) Характерной чертой биологического катализа является возможность его регуляции различными веществами, называемыми модуляторами или эффекторами.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, 10 % раствор H_2SO_4 , вытяжка из солода.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, водяная баня, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В пять пробирок наливают по 3 мл 1 % раствора крахмала. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по 1 мл 10 % раствора H_2SO_4 .

Содержимое перемешивают и первые три пробирки ставят в термостат при 37 °С, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждой проводят пробы с йодом и пробу Троммера. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона.

Записывают окраску содержимого каждой пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты опыта заносят в таблицу 33.

Таблица 33 – Сравнение действия катализаторов и ферментов

№	Субстрат, 2 мл	Катализатор, 1 мл	Температура, °С	После инкубации	
				Проба Люголя	Проба Троммера
1	Крахмал	Вода	37–38		
2	Крахмал	Амилаза	37–38		
3	Крахмал	Кислота	37–38		
4	Крахмал	Кислота	100		
5	Крахмал	Вода	100		

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение аллостерической регуляции активности ферментов.
2. Перечислите соединения, которые могут быть активаторами ферментов.
3. Назовите возможные механизмы активирующего действия ионов металлов на ферменты.
4. Механизм активации ферментов частичным протеолизом.
5. Приведите примеры ферментов, активация которых идет частичным протеолизом.
6. Какое биологическое значение имеет биосинтез протеолитических ферментов в виде зимогенов?
7. Функции коферментов и простетических групп.
8. Приведите примеры, когда один металл может активировать работу нескольких ферментов и когда один фермент может активироваться различными металлами.

Лабораторная работа № 16.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КАТАЛИЗА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить влияние ингибиторов на активность ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Работа ферментов во многом зависит от веществ, приводящих к угнетению активности ферментов. Такие вещества называют ингибиторы ферментов. Это природные и синтетические вещества, отличающиеся по характеру действия, специфичности и другим свойствам. В роли естественных ингибиторов могут выступать продукты реакций обмена веществ внутри клеток.

Ингибирование может проходить как на генетическом уровне (репрессор тормозит биосинтез какого-либо фермента, действующего в начале цикла или цепи), так и на кинетическом уровне (процесс ретроингибирования – снижается активность определенного фермента).

В некоторых случаях ингибитор входит в состав фермента в качестве его предшественника. Большую группу составляют ингибиторы специфические, оказывающие влияние на один или несколько ферментов, вызывая процесс их ингибирования.

Механизм действия многих ядов, токсинов (в том числе природных ядов змей, пчёл, скорпионов и др.) связан с процессом ингибирования ферментов. Например, так называемые «дыхательные яды» – цианиды, H_2S , постициды, ядохимикаты оказывают отрицательное действие на организм в результате ингибирования ряда ферментов. При отравлении солями сенильной кислоты смертельный исход может наступить в результате торможения и полной блокировки дыхательных ферментов цитохромной системы. Токсическое действие инсектицидов объясняется торможением активности холинэстеразы, играющей важную роль в работе нервной системы.

Изучение влияния ингибиторов на ферментные системы и отдельные ферменты позволяет целенаправленно находить противоядия к отравляющим веществам или напротив, разрабатывать новые виды веществ для борьбы с вредителями (насекомыми, клещами, сорняками и т.д.).

Ингибиторы делят на обратимые и необратимые.

1. ИНГИБИРОВАНИЕ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты, угнетающие некоторые «геминные» ферменты, монойодуксусная кислота, приостанавливающая спиртовое и молочнокислое брожение, фосфорорганические соединения, необратимо инактивирующие ряд эстераз и др.

Материалы и реактивы: вода, 1 % раствор хлорида натрия, 1 % раствор сульфата меди, раствор слюны, 1 % раствор крахмала, раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор, термостат, емкость со льдом.

Ход работы

В пробирку номер один вносят 1 мл воды, в пробирку номер два вносят 0,3 мл воды и 0,2 мл 1 % раствора хлорида натрия, в пробирку номер три вносят 0,8 мл воды и 0,2 мл 1 % раствора сульфата меди и во все пробирки вносят по 1 мл разбавленной слюны. Содержимое пробирок перемешивают и добавляют по 0,5 мл 1 % раствора крахмала.

Все пробирки термостатируют при 37 °С в течение 5 мин и одновременно охлаждают в емкости со льдом.

Затем во все пробирки вносят несколько капель раствора йода. Делают вывод по результатам окраски о скорости гидролиза крахмала.

Результаты работы заносят в таблицу 34.

Таблица 34 – Активирование и ингибирование фермента

№	Добавленное вещество	Окраска после добавления йода	Вывод
1	Вода		
2	NaCl		
3	CuSO ₄		

2. ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ НА ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗУ

Материалы исследования и реактивы: картофель и яблоко, соль йодида натрия, соль йодистого калия, соль хлористого калия, соль сернокислого цинка; соль азотнокислого натрия, соль хлористого натрия.

Приборы и посуда: скальпель, доска.

Ход работы

Делают срезы на картофелине и яблоке. Первый срез оставляют для контроля, второй посыпают солью хлорида натрия, третий йодидом натрия, четвертый хлоратом калия, пятый соль сернокислого цин-

ка, шестой – соль азотнокислого натрия, седьмой – солью хлористого калия. Все срезы оставляют на воздухе и через 20-30 мин проводят наблюдения за изменениями произошедшими на срезах.

Оформление результатов опыта в виде таблицы 35.

Таблица 35 – Определение ингибирующего действия ионов на полифенолоксидазу

Объект исследования	Наблюдения						
	Контроль	NaCl	NaI	KCl	ZnSO ₄	NaNO ₃	KI
Картофель							
Яблоко							

Сделайте выводы.

3. ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА ТРАСИЛОМ

Трасилол – полипептид, выделенный из околоушных желез крупного рогатого скота, является ингибитором трипсина, фибринолизина, химотрипсина.

Материалы и реактивы: 1 % раствор казеина; 4 % в 0,005 н HCl раствор трипсина; трасилол; 10 % раствор ТХУ; 3 % раствор желатина; 0,5н раствор NaOH; фосфатный буфер с pH 7,8; реактив Фолина.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор, термостат.

Приготовление реактива Фолина: в круглодонную колбу с притертым обратным холодильником вместимостью 1 дм³ наливают 600 см³ дистиллированной воды, добавляют 100 г вольфрамОВОКИСЛОГО натрия и 25 г молибденовоКИСЛОГО натрия, затем приливают 50 см³ ортофосфорной кислоты с массовой долей 85% и 100 см³ концентрированной соляной кислоты и осторожно перемешивают. Смесь кипятят на слабом огне на асбестовой сетке в течение 10 ч. Кипячение допускается прерывать. По окончании кипячения в охлажденную смесь добавляют 150 г сернистого лития, 50 см³ дистиллированной воды и пять капель брома. Открытую колбу кипятят на слабом огне под тягой в течение 15-20 мин, чтобы удалить избыток паров брома. Раствор должен иметь желтую окраску. После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 1 дм³. Приготовленный реактив Фолина хранят в склянке из темного стекла в холодильнике. Показателем непригодности раствора считается его помутнение и изменение окраски из желтой в зеленую.

Ход работы

Гидролиз казеина. В ряд пробирок вносят по 1 мл раствора казеина, 1,5 мл фосфатного буфера и по 0,5 мл раствора трипсина, содержимое пробирок тщательно перемешивают. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую пробирку 1 мл трасилола, в третью пробирку 0,5 мл трасилола и 0,5 мл воды, в четвертую пробирку 0,25 мл трасилола и 0,75 мл воды, в пятую пробирку (контрольная проба) добавляют 3 мл раствора ТХУ.

Все пробы тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при 37 °С в течение 20 мин. Затем в пробирки 1–4 добавляют по 3 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают и через 10 мин все пробы фильтруют через маленькие воронки с бумажными фильтрами в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен.

Определение степени гидролиза белка. Готовят 5 пробирок, в каждую наливают по 5 мл раствора гидроксида натрия, 2,5 мл соответствующего фильтрата и 0,5 мл реактива Фолина. Все пробирки перемешивают и выдерживают 30 мин. Оптическую плотность опытных растворов определяют по отношению к контрольному на фотокolorиметре при длине волны 656–670 нм.

Изучите гидролиз казеина трипсином в присутствии ингибитора трасилола, определите при какой концентрации трасилола активность фермента снижается в 2 раза, сделайте выводы по проделанной работе.

4. ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ – ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Тяжелые металлы являются ингибиторами ферментов. Белки сорбируют на себе ионы тяжелых металлов, предотвращая их губительное на организм действие.

Материалы и реактивы: препарат амилазы, 1 % раствор крахмала, 1 % раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, молоко, вода, 1 % раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В первую пробирку вносят 1 мл амилазы, 1 мл крахмала, 1 мл 1 % раствора ацетата свинца и 1 мл молока. Во вторую пробирку вносят все те же реактивы, но вместо молока добавляют 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают и термостатируют в течение 20 мин при 30 °С. По окончании термостатирования в обе пробирки вносят по 1 капле йода. В обеих пробирках есть ионы свинца, инактивирующие амилазу, однако в присутствии молочных белков активность амилазы сохраняется, о чем свидетельствует отсутствие синего цвета раствора после внесения йода.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА ИНГИБИРОВАНИЯ

Процесс ингибирования может быть обратимым и необратимым. Обратимые ингибиторы бывают конкурентного, неконкурентного, бесконкурентного и смешанного действия. Некоторые ферменты ингибируются избытком субстрата.

Ход работы

При измерении кинетики ферментативной реакции в зависимости от концентрации субстрата в присутствии и отсутствии ингибитора были получены данные, представленные в таблице 36.

Таблица 36– Скорость ферментативной реакции

Концентрация субстрата, мкмоль/л	Скорость реакции, ммоль/мин	
	Без ингибитора	С ингибитором
3	10,4	4,1
5	14,5	6,4
10	22,5	11,3
30	33,8	22,6
90	40,5	33,8

Определите графически K_m и V_{max} в отсутствие ингибитора и в присутствии его. Определите тип ингибирования.

6. ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

Материалы и реактивы: раствор фермента, 1 % раствора хлорида натрия, 2 % раствор сульфата меди, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор, термостат, спектрофотометр.

Ход работы

В 10 пробирок вносят по 1 мл раствора фермента. В первые 5 пробирок (серия № 1) вносят по 1 мл 1 % раствора хлорида натрия, в оставшиеся (серия № 2) – по 1 мл 2 % раствора сульфата меди. Пробирки термостатируют при 38 °С в течение 1 мин.

Добавление 1 мл субстрата в указанной в таблице 37 проводят попарно в каждую серию пробирок через 2 мин.

В каждую пробирку добавляют 200 мкл раствора Люголя. Пробирки инкубируют в течение 10 мин.

Проводят фотометрирование образцов при $\lambda=620$ нм. Полученные результаты представляют в виде таблицы 37.

Таблица 37– Фотометрирование образцов

№ про- бирки	A_{620}	
	№1 (без ингибитора)	№2 (с ингибитором)
1		
2		
3		
4		
5		

Строят график зависимости $V_{отн}$ от $[S]$ для первой и второй серий проб. Рассчитывают K_m и V_{max} для скорости реакции расщепления крахмала в отсутствие и присутствии ингибитора, пользуясь графиком Лайнуивера–Берка.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие вещества называются ингибиторами ферментов? Перечислите типы ингибирования. Применение ингибиторов в энзимологии и медицине.

2. Что такое необратимое ингибирование ферментов. Приведите пример веществ, являющихся необратимыми ингибиторами. Приведите примеры применения необратимого ингибирования ферментов в медицине.

3. Дайте определение обратимому ингибированию ферментов. Перечислите виды обратимых ингибиторов.

4. Дайте определение конкурентному ингибированию энзимов. Приведите примеры веществ, являющихся конкурентными ингибиторами. Приведите примеры действия лекарственных веществ как конкурентных ингибиторов.

5. Нарисуйте график Михаэлиса–Ментен для конкурентного ингибирования. Как изменяется константа Михаэлиса и максимальная скорость ферментативной реакции при конкурентном ингибировании?

6. Нарисуйте график Лайнуивера–Берка для конкурентного ингибирования.

7. Дайте характеристику неконкурентным ингибиторам ферментов. Как изменяется константа Михаэлиса и максимальная скорость ферментативной реакции при неконкурентном ингибировании?

8. Приведите примеры веществ, являющихся неконкурентными ингибиторами.

9. Ретроингибирование. Примеры.

10. Нарисуйте график Михаэлиса–Ментен и Лайнуивера–Берка для неконкурентного ингибирования.

Лабораторная работа № 17.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов крови.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Кровь более доступна для химического анализа, чем другие ткани. Поэтому об изменении в работе ферментов судят в первую очередь по содержанию их в крови. В настоящее время открывают и определяют присутствие в плазме крови более 50 различных ферментов. По происхождению ферменты плазмы крови можно разделить на секреторные и клеточные (индикаторные). Секреторные ферменты синтезируются в основном в печени, выходят из нее в кровь, где выполняют свои функции; к ним относят все ферменты свертывающей системы, холинэстеразу. Клеточные ферменты в плазме крови присутствуют в незначительных количествах (имеют низкую активность), основную функцию выполняют в клетках различных органов, но при патологических процессах в этих органах внутриклеточные ферменты могут проникать в кровь в значительных количествах, что используется в медицине с целью энзимодиагностики.

Энзимодиагностика заключается в определении ферментативной активности в биожидкостях с целью выявления определенных заболеваний.

Например, определение глюкозы только химическими методами приводило к ошибкам в результатах, поскольку применяемые реактивы вступали в реакцию и с глюкозой и с другими веществами, присутствующими в моче и крови. В связи с этим глюкозу определяют ферментативными методами.

Известно примерно 20 тестов количественного определения ферментативной активности, направленных на диагностику заболевания и выяснение эффективности лечения. Определение активности ферментов применяют для диагностики болезней сердца, печени, мускулатуры и др. Активность ферментов и их концентрация в крови коррелирует с уровнем клеточных повреждений.

Для здоровых людей характерна низкая и постоянная ферментативная активность в крови, поскольку соотношение скорости освобождения их из клеток и разрушения примерно одинаковы. Немногие ферменты (например, свертывания крови) принимают участие в процессах, идущих непосредственно в крови. В клетках концентрация ферментов

в 1000–100000 раз выше, чем в крови, но в случае заболевания или повреждения какого-то органа или ткани мембраны клеток становятся проницаемыми и ферменты попадают в биожидкости организма.

Трудностью использования результатов определения активности ферментов при постановке диагноза является отсутствие специфичности повышения активности ферментов для поврежденной ткани. Так как многие ферменты присутствуют в разных тканях, то возрастание их активности в крови может быть связано с повреждением любого из органов, содержащих этот фермент.

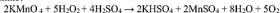
В некоторых случаях изменение уровня ферментативной активности не связано с тканевыми повреждениями. Например, нормальные значения ферментативной активности в крови у беременных или детей отличны от величин присущих здоровым взрослым людям. Тяжелый физический труд, внутримышечные инъекции могут привести к повышению активности креатинкиназы в крови. Ряд лекарственных веществ, например, фенитоин, фенобарбитал могут повышать уровень ферментов без возникновения заболевания. В связи с этим необходимо проведение комплексных исследований и определение более чем одного фермента; определение спектра изоферментов; определение ферментативной активности в динамике.

По происхождению ферменты плазмы крови можно разделить на секреторные и клеточные (индикаторные). Секреторные ферменты синтезируются в основном в печени, выходят из нее в кровь, где выполняют свои функции; к ним относят все ферменты свертывающей системы, холинэстеразу. Клеточные ферменты в плазме крови присутствуют в незначительных количествах (имеют низкую активность), основную функцию выполняют в клетках различных органов, но при патологических процессах в этих органах внутриклеточные ферменты могут проникать в кровь в значительных количествах, что используется в медицине с целью энзимодиагностики.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ КРОВИ

При количественном определении активности каталазы крови по методу Баха и Зубковой определяют количество оставшейся перекиси водорода, а активность каталазы выражают с помощью каталазного числа. Каталазное число равно разности между объемами 0,1 н KMnO_4 , израсходованными на титрование контроля и опыта, умноженной на 1,7.

1 мл 0,1 н KMnO_4 соответствует 1,701 мг H_2O_2 . Реакция идет по уравнению:



Содержание каталазы крови снижается при таких заболеваниях как анемия, туберкулез и т.д.

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, 0,9% раствор NaCl, кровь, 1% раствор H_2O_2 , 0,067 М фосфатный буфер pH 7,0, 10 % раствор H_2SO_4 , 0,1 и раствор $KMnO_4$.

Приборы и посуда: колбы, микропипетка, пипетки, пипетатор, бюретка, стаканы.

Ход работы

В мерную колбу на 50 мл наливают около 10 мл дистиллированной воды. Микропипетку ополаскивают 0,9 % раствором NaCl. 0,05 мл крови вносят в мерную колбу с водой. Пипетку промывают несколько раз водой, набирая и выпуская ее в мерную колбу. Объем в мерной колбе доводят до метки водой, при этом кровь разводится в отношении 1:1000. Получен основной раствор крови, в 1 мл которого содержится 1 мкл крови. В этом растворе крови проводят количественное определение активности каталазы.

В две конические колбы (опытную и контрольную) наливают по 7 мл дистиллированной воды и добавляют по 1 мл основного раствора крови. Содержимое контрольной колбы кипятят в течение 2 мин для разрушения каталазы, а опытную оставляют без изменения. После этого обе колбочки оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в каждую колбу вносят точно по 2 мл 1 % раствора H_2O_2 , приготовленного на 0,067 М фосфатном буфере pH 7,0, и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

В каждую колбу добавляют по 3 мл 10 % раствора H_2SO_4 (останавливают реакцию) и оттитровывают оставшуюся H_2O_2 0,1 и раствором $KMnO_4$ до розового окрашивания. Проводят расчет каталазного числа.

Пример расчета:

На титрование контроля пошло 11,1 мл 0,1 и $KMnO_4$.

На титрование опыта пошло 9,57 мл 0,1 и $KMnO_4$.

Находим разность между количеством мл 0,1 и $KMnO_4$, израсходованных на титрование контроля и опыта. Разность умножаем на 1,7.

$$11,1 - 9,57 = 1,53; 1,53 \cdot 1,7 = 2,6$$

Каталазное число равно 2,6. В норме каталазное число крови равно 6–8.

2. МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Активность липазы возрастает при острых воспалительных процессах поджелудочной железы, хронических панкреатитах, опухолях поджелудочной железы.

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, оливковое масло, Tris-буфер, сыворотка крови, 95 % этанол, тимолфталени, 0,05 н раствор NaOH.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат, биоретка, стакан, воронка, капельницы, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки наливают по 0,25 мл воды, по 0,3 мл стабилизированной эмульсии оливкового масла и по 0,1 мл Tris-буфера для создания pH в среде 8,0. В опытную пробирку добавляют 0,1 мл сыворотки крови. Вторая пробирка служит контролем. Содержимое пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37 °C на 60 мин. После этого в обе пробирки наливают по 0,3 мл 95 % этанола для прекращения действия фермента, а в контрольную пробирку – 0,1 мл сыворотки крови. Вводят по 1 капле тимолфталенина, перемешивают и титруют освободившиеся жирные кислоты 0,05 н раствором NaOH до светло-голубой окраски.

Активность липазы находят по разности объема щелочи, пошедшей на титрование опытной и контрольной проб:

$$X = (A - B) / 0,1$$

где A – объем 0,05 н раствора NaOH, пошедшего на титрование опыта, мл; B – объем 0,05 н раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля, мл; 0,1 – взятое в опыт количество сыворотки крови.

У здорового человека активность липазы составляет от 0,5 до 1,5 единицы.

3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ КРОВИ

Пероксидаза катализирует окисление фенолов и аминов при участии кислорода H_2O_2 . Метод определения активности пероксидазы основан на ее способности катализировать окисление бензидина и п-хинондимид.

Материалы и реактивы: 1 % раствор бензидина, 3 % раствор H_2O_2 , кровь, 30 % раствор NaOH, 95 % этиловый спирт.

Приборы и посуда: колба, спектрофотометр, пипетки, пипетаторы.

Ход работы

В чистую и сухую мерную колбу на 25 мл вносят 1 мл 1%раствора бензидина, прибавляют 1 мл 3 % раствора H_2O_2 и 0,5 мл основного раствора крови, который является источником пероксидазы.

Тщательно перемешивают и оставляют стоять ровно 3 мин. Через 3 мин в колбочку приливают 5 мл 30 % раствора NaOH и снова перемешивают. Выпадает окрашенный осадок п-хинондиимида, который растворяется при добавлении 10 мл абсолютного спирта. Доводят водой содержимое колбочки до 25 мл и колориметрируют на ФЭКе со стандартным раствором пероксидазы.

За единицу активности пероксидазы принимают такую активность, при которой пероксидаза в данной реакционной смеси за 3 мин дает окрашивание, равное интенсивности стандартного раствора. Активность пероксидазы в 0,1 мл крови вычисляют по формуле:

$$C = E_{cm} \cdot 5 / E_{on}$$

где $E_{ст}$ – величина поглощения стандартного раствора; $E_{оп}$ – величина поглощения опытного раствора; 5 – коэффициент разведения.

Активность фермента выражается в условных пероксидазных единицах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Ферменты крови, перечислите и напишите соответствующие уравнения реакций с их участием.
2. Содержание ферментов в крови в норме и при патологии.
3. Энзимопатии.
4. Энзимодиагностика.
5. Методы исследования ферментов крови.
6. Применение ферментов в аналитических целях.
7. Клинико-диагностическое значение определения отдельных ферментов.

Лабораторная работа № 18.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ

ФЕРМЕНТОВ ПЕЧЕНИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов печени.

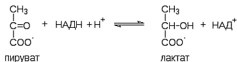
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В печени содержится много ферментов. Интерес представляют ферменты, действующие на один субстрат с образованием различных продуктов, например, глюкозо-6-фосфат в печени человека является субстратом для действия четырех энзимов: фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, фосфоглюкоизомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Их действие приводит к образованию четырех разных продуктов: глюкозо-1-фосфата, 6-фосфоглюконолактона, глюкозы и фруктозо-6-фосфата.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Лактатдегидрогеназа осуществляет реакцию превращения пировиноградной кислоты в молочную.

лактатдегидрогеназа



Активность лактатдегидрогеназы оценивается по скорости окисления НАДН, которая регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм.

Материалы и реактивы: 0,05 М К-фосфатный буфер (рН 7,5), содержащий $3 \cdot 10^{-4}$ моля пирувата (готовят перед экспериментом, растворяя навеску пирувата натрия в К-фосфатном буфере); $9 \cdot 10^{-3}$ М раствор НАДН (готовят непосредственно перед анализом), печень, 0,25 М раствор сахарозы содержащий 1 мМ ЭДТА рН 7,4 (разведение 1:9), дистиллированная вода.

Приборы и посуда: пробирки, кюветы, спектрофотометр, кюветы, гомогенизатор, центрифуга, весы.

Ход работы

Навеску печени массой 200 мг гомогенизируют при температуре 4 °С с 1,8 мл охлажденной средой выделения: 0,25 М раствор сахарозы,

содержащий 1 мМ ЭДТА pH 7,4 (разведение 1:9). Полученный гомогенат центрифугируют 15 минут при 14000 g, в супернатанте определяют активность фермента.

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают инкубационную среду, состоящую из 3,0 мл К-фосфатного буфера, содержащего пируват, и 0,05 мл раствора НАДН. Затем вводят 0,1 мл образца, содержащего фермент (гомогенат ткани, цитоплазматическая фракция или суспензия митохондрий), быстро перемешивают и измеряют исходную величину оптической плотности (E_1). Регистрацию показаний спектрофотометра проводят с интервалом 30 с в течение 3–5 минут рассчитывают среднее значение изменения оптической плотности пробы за 1 мин (ΔE).

Лактатдегидрогеназа активный фермент, поэтому предварительно необходимо подобрать соответствующее разведение анализируемых образцов (30 – 50 раз). Например, цитоплазматическую полученную из 10 % гомогената печени крысы после осаждения ядер и митохондрий, следует развести (дистиллированной водой – или К-фосфатным буфером) в 30–50 раз. Оптимальное разведение препарата такое, при котором $\Delta E/\text{мин}$ при длине волны 340 нм составляет 0,040 – 0,080.

Активность лактатдегидрогеназы вычисляют по формуле:

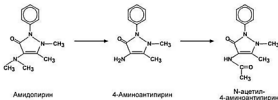
$$X = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot a},$$

где ΔE — среднее значение изменений оптической плотности пробы при длине волны 340 нм за 1 мин; V — конечный объем пробы в кювете (3,15 мл); 6,22 — коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм; a — содержание белка в пробе, определенное в параллельном образце методом Лоури или другим, мг.

Соотношение НАД/НАДН в цитозоле рассчитывают на основе константы равновесия энзиматической реакции катализируемой лактатдегидрогеназой равной $K = 1,11 \cdot 10^{-4}$ и концентраций ее субстратов: пирувата и лактата, применяя уравнение $[\text{пируват}]/[\text{лактат}] = K \cdot [\text{НАД}]/[\text{НАДН}]$.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МОНООКСИГЕНАЗ ПЕЧЕНИ

Определение активности монооксигеназ эндоплазматической сети клеток печени определяют по выделению метаболитов амидопирина с мочой. Метаболизм амидопирина идет двестадии.



Метод основан на способности 4-аминоантипирин (4-АП) – метаболита амидопирина, при взаимодействии с фенолом в щелочной среде в присутствии гексацианоферрата (III) калия образовывать соединение типа индофенола, имеющее розовую окраску.

Материалы и реактивы: моча, конц. соляная кислота, аммиачный буфер, трихлорукусная кислота, фенол, гексацианоферрат калия III.

Приборы и посуда: пробирки, дозатор, стеклянный фильтр, пробки, фольга, водяная баня, пипетки, пипетаторы, спектрофотометр, кюветы, фильтровальная бумага, воронка, стакан.

Ход работы

В 2 пробирки вносят по 1,5 мл профильтрованной мочи. В первую пробирку приливают 0,3 мл аммиачного буфера, во вторую – 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. Перемешивают пробы, осторожно встряхивая пробирки.

Содержимое первой пробирки через 15 минут фильтруют через стеклянный фильтр. Вторую пробирку закрывают пробкой, обернутой фольгой, помещают на 15 минут в кипящую водяную баню, затем охлаждают водой. Гидролизат фильтруют в другую пробирку. Затем прибавляют 0,6 мл аммиачного буфера, перемешивают и вновь профильтровывают. Из первой пробы отбирают 0,6 мл фильтрата в чистую пробирку и добавляют 0,5 мл раствора ТХУ, 2 мл раствора фенола и 0,1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Перемешивают и через 10 мин. фотометрируют при зеленом светофильтре в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля, содержащего все компоненты, кроме фенола, который

заменяется на 2 мл водф. Полученная экстинция E_1 соответствует содержанию в моче 4-АП. 2-я проба: отбирают 0,8 мл фильтрата, добавляют 0,2 мл H_2O , 2 мл раствора фенола, 0,1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, перемешивают и измеряют E_2 (содержание в моче 4-АП + его конъюгат).

По калибровочному графику находят: 1) общее количество 4-аминоантипиррина (по E_1), умножая содержание его в пробе (мкг/мл) на суточный объем мочи в мл; 2) по E_2 аналогичным образом определяют сумму метаболитов амидопиррина, выделенных за сутки с мочой.

Относительную активность монооксигеназы печени рассчитывают в % от введенного амидопиррина:

$$X_1 = \frac{A \cdot 100 \cdot \%}{B},$$

где, А – сумма метаболитов, выделенных за сутки, В – количество введенного амидопиррина

Ацетилирующую активность ферментных систем организма в % находят по формуле:

$$X_2 = \frac{(E_2 - E_1) \cdot 100}{E_2},$$

3.ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРОКАНИНАЗЫ ПЕЧЕНИ

Уроканиназа – специфический фермент печени, катализирующий реакцию расщепления уроканиновой кислоты (имидазол-4-акриловая кислота) с образованием глутаминовой кислоты и ряда других продуктов. Определение уроканиназы в крови представляет интерес для целей дифференциального диагноза и прогноза при заболеваниях печени и желчных путей. Об активности фермента можно судить по количеству уроканиновой кислоты, определяемому до и после инкубации с ферментом колориметрическим методом. В основе метода лежит способность уроканиновой кислоты давать реакцию Паули – образование окрашенных продуктов с сульфаниловой кислотой в щелочной среде.

Материалы и реактивы: печень, 0,01 М уроканиновой кислоты, раствор, 0,02 М раствор калийфосфатного буфера (рН 7,2); 3 М

раствор ацетатного буфера (рН 4,8); насыщенный раствор Na_2CO_3 , 96 % этиловый спирт, 0,5 % раствор сульфаниловой кислоты, 0,5 % раствор NaNO_2 .

Приборы и посуда: пробирки; пипетки; воронки, бумажные фильтры; водяная баня, баня со льдом; ФЭК.

Ход работы

Для приготовления экстракта ткани 2 г печени гомогенизируют в гомогенизаторе или растирают в фарфоровой ступке со стеклянным песком в 3 мл 0,02 моль/л калийфосфатного буфера. Затем гомогенат разводят тем же буфером в пропорции 1 к 20. Для удаления неразрушенных клеток и обрывков тканей гомогенат центрифугируют или отфильтровывают через бумажный фильтр. Полученный экстракт можно хранить 2 дня при температуре от -4°C до -8°C .

Определение активности урокиназы. В 3 пробирках готовят инкубационные смеси, как указано в таблице 38.

Таблица 38– Приготовление инкубационных смесей

Проба	Калий фосфатный буфер, мл	Урокининовая кислота, мл	Препарат фермента, мл
Опытная	1,7	0,15	0,15
Контрольная № 1	1,82	-	0,15
Контрольная № 2	1,7	-	0,15

Пробы инкубируют в термостате при температуре 37°C 20 мин. Затем в пробирку с контрольной пробой № 2 добавляют 0,15 мл 0,01 моль/л раствора уроканата и сразу во все пробирки для осаждения белков добавляют по 0,6 мл 3 моль/л раствора ацетатного буфера.

Все пробы хорошо перемешивают и помещают на 3 мин на кипящую водяную баню. Затем осадок белка удаляют фильтрованием через бумажный фильтр.

Для проведения цветной реакции ко всем пробам после удаления белка добавляют 0,5 мл раствора Na_2CO_3 , 0,5 мл 96 % этилового спирта и 0,6 мл свежеприготовленного диазореактива (растворы сульфаниловой кислоты и NaNO_2 в соотношении 1:2). Растворы смешивают на ледяной бане. После добавления диазореактива во всех пробирках появляется желто-оранжевое окрашивание, сохраняющееся благодаря добавлению спирта в течение нескольких часов.

Содержимое пробирок переносят в кюветы и измеряют оптическую плотность опытной и контрольной (№ 2) проб против контроль-

ной пробы № 1 на ФЭКе с синим светофильтром (длина волны 450-480 нм). Концентрацию уроканиновой кислоты в опытной пробе и контрольной пробе № 2 (субстрат добавляют перед остановкой ферментативной реакции) определяют по калибровочному графику.

Об активности уроканиназы судят по разности концентрации уроканиновой кислоты в контрольной пробе № 2 и опытной пробе.

Активность уроканиназы выражают в наномолях уроканиновой кислоты, расщепившейся за 1 мин, в расчете на 1 мг белка в ферментном препарате.

Пример расчета. Оптическая плотность контрольной пробы № 2 составляет 0,60, что соответствует по калибровочному графику 82 нмоль уроканиновой кислоты (исходное количество субстрата). Оптическая плотность опытной пробы 0,36, что соответствует 49 нмоль уроканиновой кислоты (остаточное количество субстрата после инкубации с ферментом); содержание белка в 0,15 мл препарата фермента равно 0,8 мг. Отсюда:

$$\text{Удельная активность фермента} = \frac{82 \text{ нмоль} - 49 \text{ нмоль}}{0,8 \text{ мг} \cdot 20 \text{ мин}} = 2,1 \text{ нмоль} / \text{мг} \cdot \text{мин}$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите известные вам ферменты печеночной ткани.
2. Напишите какие реакции они катализируют.
3. Активность каких ферментов печени учитывается в диагностических целях.
4. Причины повышения печеночных ферментов.
5. Экскреторные и инкреторные группы печеночных ферментов.

Лабораторная работа № 19.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ТКАНЕЙ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов тканей.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Различия ферментного состава тканей обуславливают различия в образуемых ими продуктах. Органоспецифичные ферменты катализируют химические превращения, характерные только для одного или немногих органов. Такие ферменты особенно ценны в диагностике, поскольку, зная их место локализации и определив их повышенную активность, можно четко отграничить участок развития патологического процесса. Например, органоспецифическим ферментом мышечной ткани – сердечной и скелетной, является креатинфосфокиназа.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТКАНЕВЫХ ПРОТЕИНАЗ

Количество гипосульфита, пошедшего на титрование йода характеризует количество аминокислот. При расчете количества аминокислот объем израсходованного на титрование гипосульфита умножают на 0,28 (1 мл 0,01 н раствора гипосульфита соответствует 0,28 мг аминного азота).

Материалы и реактивы: 2,73 % раствор CuCl_2 , фосфатный буфер, боратный буфер, 10 % раствор ТХУ, тимолфталенин, 1 н NaOH , 20 % раствор KI , конц. CH_3COOH , 0,01 н раствор гипосульфита, 1 % раствор крахмала.

Приборы и посуда: цилиндр, весы, ступка с пестиком, мерная пробирка, фильтр, воронка.

Ход работы

В цилиндр отмеряют 10 мл 2,73 % раствора CuCl_2 и 20 мл фосфатного буфера, хорошо перемешивают и прибавляют 20 мл боратного буфера pH 8,9. Взвешивают 1 г ткани, переносят в ступку, хорошо растирают, добавляют 5 мл 10 % раствора ТХУ и экстрагируют 10 мин. Затем тканевую суспензию отфильтровывают в мерную пробирку. К 3 мл фильтрата добавляют 2 капли тимолфталенина, после чего прибавляют по каплям раствор 1 н NaOH до появления устойчивой голубой окраски. Объем доводят до 10 мл суспензией. Через 10 мин содержимое пробирки отфильтровывают в пробирку (фильтрат должен быть прозрачным). 5 мл фильтрата выливают в колбу с пробкой, добавляют 2 мл 20 % раствора KI и 0,5 мл конц. CH_3COOH . Колбу закрывают

пробкой и ставят в темное место на 10–15 мин. Далее выделившийся йод оттитровывают 0,01 н раствором гипосульфита. Индикатор – крахмал. Записывают принцип метода, расчет активности тканевых протеиназ, строят график хода автолиза белков в исследуемых тканях.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

2.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТКАНЕВОГО ГОМОГЕНАТА

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, мышечная ткань.

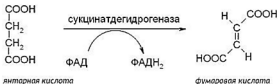
Приборы и посуда: весы, гомогенизатор, ступка и пестик, песок, марля, воронка, стеклянная палочка, пробирки, штатив, пипетка, пипетатор.

Ход работы

Навеску 2 г мышц тщательно измельчить, хорошо растереть в ступке, добавив песка, постепенно вносят 20 мл дистиллированной воды, отфильтровать через марлю, отжать. Содержимое марли перенести в пробирку и суспендировать стеклянной палочкой с 8 мл воды. 2 мл полученного гомогената перелить в другую пробирку и прокипятить. Охладить и использовать содержимое пробирок для опытов.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

Сукцинатдегидрогеназа катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую. Кофактором фермента является ФАД. Фермент прочно связан с внутренней мембраной митохондрий.



Материалы и реактивы: мышечная ткань, 3 % раствор янтарной кислоты, 10 % раствор NaOH, дистиллированная вода, 3 % яблочная кислота, 0,02 % раствор метиленовой сини.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стеклянная палочка, пипетка, пипетатор, термостат.

Ход работы

В 3 нумерованных пробирки помещают 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют в первую – 1 мл 3 % раствора янтарной кислоты,

нейтрализованной по лакмусу 10% раствором NaOH; во вторую – 1 мл дистиллированной воды; в третью – 1 мл 3 % яблочной кислоты.

В каждую пробирку добавляют 2–3 капли 0,02 % раствора метиленовой сини (до окрашивания смеси в голубой цвет), которая играет роль акцентора водорода. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки одновременно помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 20–25 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других.

Первую пробирку сильно взбалтывают, после обесцвечивания появляется вновь синее окрашивание, вследствие окисления лейкоокиснования метиленовой сини кислородом воздуха.

2.3. КОНКУРЕНТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты вследствие близости ее структуры к таковой янтарной кислоты и происходящей вследствие этого конкуренции за фермент.

Материалы и реактивы: мышечная ткань, дистиллированная вода, 1 % раствор метиленового синего, вазелиновое масло, 0,1 М раствор янтарной кислоты, 0,1 М раствор яблочной кислоты.

Приборы и посуда: весы, ступка и пестик, воронка, марля, пробирка, штатив, стеклянная палочка, термостат.

Ход работы

Навеску свежей мышечной ткани массой 1–2 г растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную кашку переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку, и промывают 50 мл воды. Промытую кашку отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой в 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки и добавляют реактивы согласно таблице 39.

Таблица 39 – Торможение активности СДГ

Пробирка	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Окраска	Вывод
Кипяченая	1	0,5	–		
Суспензия	1	0,5	–		
Суспензия	–	1,5	–		
Суспензия	1	–	0,5		

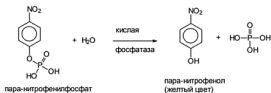
Во все пробирки добавляют по 2–3 капли 1 % раствора метиленового синего и после перемешивания по 3–4 капли вазелинового мас-

ла. Пробирки ставят в термостатирующую при температуре 40 °С. Через 3–5 мин наблюдают изменение окраски.

Полученные результаты внести в таблицу 39.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ

В ходе термической обработки мяса при изготовлении вареных колбас кислая фосфатаза полностью разрушается (для этого необходима температура 80 °С при выдержке в течение 20 мин). Поэтому обнаружение в вареной колбасе остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции. Метод определения кислой фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз пара-нитрофенилфосфата с образованием пара-нитрофенола, натриевая соль которого окрашена в желтый цвет по схеме:



Материалы и реактивы: мясо, вареная колбаса, ацетатный буферный раствор pH 5,4, который готовят смешением одного объема 1 н раствора уксусной кислоты и пяти объемов 1 н раствора ацетата натрия, 40 % раствор гидроксида натрия.

Приготовление раствора субстрата: растворяют 0,8 г бариевой соли пара-нитрофенилфосфата в 100 мл 0,001 н соляной кислоты, раствор фильтруют от осадка и, если он имеет желтую окраску, взбалтывают его 2–3 раза в делительной воронке с диэтиловым эфиром до получения бесцветного водного слоя, который отделяют от эфира. Раствор субстрата хранят на холоду в темной склянке.

Приборы и посуда: пробирки, термостат, воронки, фильтровальная бумага, весы, пипетки, пипетатор, ФЭК.

Ход работы

Растирают в ступке 2 г вареной колбасы с 5 мл воды. Также растирают в ступке с кварцевым песком 2 г мяса с 5 мл воды. Оба гомогената фильтруют через складчатый фильтр, наливают в две пробирки по

1 мл полученных фильтратов, прибавляют по 2 капли ацетатного буфера и по 0,5 мл субстратного раствора. Затем пробирки помещают в термостат при 40 °С на 1 ч. После этого в каждую пробирку добавляют по 1 капле 40 % раствора NaOH. При этом в пробирке с гомогенатом мяса появляется желтое окрашивание натриевой соли паранитрофенола, а в пробирке с гомогенатом колбасы в случае надлежащего технологического режима при ее производстве раствор остается бесцветным. Количественное определение активности фосфатазы может быть осуществлено фотоколориметрически с синим светофильтром. Ее определяют исходя из значения оптической плотности раствора по градуировочному графику, построенному для ряда растворов пара-нитрофенола.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Ферменты тканей, перечислите и напишите соответствующие уравнения реакций с их участием.
2. Локализация ферментов в клетке. Ферменты клеточных оргanelл (ядро, митохондрии, рибосомы, лизосомы, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, цитоскелет, клеточный центр).
3. Различия ферментного состава органов и тканей.
4. Органоспецифические ферменты. Их функции.
5. Какую реакцию катализирует сукцинатдегидрогеназа? Напишите уравнение реакции.

Лабораторная работа №20.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МОЧИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов мочи.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Повышение активности ферментов мочи происходит главным образом при заболеваниях поджелудочной железы. При остром панкреатите активность амилазы в крови и моче возрастает в 10–30 раз. Возрастание активности фермента выявляется при беременности, почечной недостаточности, кишечной непроходимости, заболеваниях желчных путей, диабетическом кетоацидозе, некоторых опухолях легких и яичников, поражении слюнных желез.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МОЧИ

Амилаза крови частично выделяется с мочой. Изменение содержания этого фермента в моче чаще всего встречается при заболевании поджелудочной железы, острых панкреатитах. Амилазную активность выражают в миллилитрах 0,1 % раствора крахмала, гидролизуемого одним миллилитром неразведенной мочи при 45 °С в течение 15 мин. В моче здорового человека активность амилазы составляет 16–64 мл (единиц).

Материалы и реактивы: физиологический раствор, моча, крахмал, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат.

Ход работы

Берут 6 пронумерованных пробирок и приливают в каждую по 1 мл физиологического раствора. Далее в первую пробирку приливают 1 мл исследуемой мочи, перемешивают содержимое и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку, перемешивают содержимое и 1 мл смеси переносят в третью пробирку и т. д. Из шестой пробирки 1 мл смеси выливают. Таким образом, получают следующие разведения мочи: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 и т. д. Затем в каждую пробирку наливают по 2 мл крахмала, взбалтывают и все пробирки помещают в термостат при 45 °С на 15 мин. Через 15 мин пробирки вынимают из термостата, охлаждают холодной водой и ставят в штатив по порядку.

Добавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора Люголя. В пробирке, где жидкость окрашивается в синий цвет, расщепление не произошло. Для расчета принимают во внимание последнее разведение, в котором после добавления крахмала не появился синий цвет.

Например, это третья пробирка, а в четвертой уже синее окрашивание, тогда разведение мочи соответствует 1/8.

Расчет: 1/8 мл мочи расщепляет 2 мл 0,1 % крахмала: $X = 2 \cdot 8 = 16$ единиц. Следовательно, 1 мл неразведенной мочи расщепляет за 15 мин 16 мл 0,1 % раствора крахмала.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МОЧИ

Метод основан на определении времени, необходимого для полного расщепления крахмала в присутствии 1 мл мочи. Условно за единицу активности амилазы мочи принимают количество фермента, расщепляющее 2 мг крахмала за 15 мин. Активность амилазы выражают количеством единиц в 1 мл мочи. В норме она составляет 1–2 ЕД.

Материалы и реактивы: 0,1 % раствор йода в йодиде калия, 0,1 % раствор крахмала, 0,85 % раствор хлорида натрия, моча.

Приборы и посуда: предметное стекло, капельницы, пробирки, штатив, пипетка, пипетатор, термостат.

Ход работы

На сухое предметное стекло капают в разных местах по одной капле 0,1 % раствора йода в йодиде калия (всего 8–10 капель). В пробирку вносят 2 мл 0,1 % раствора крахмала, 1 мл 0,85 % раствора хлорида натрия и помещают пробирку в термостат при температуре 37 °С на 2 мин.

Через 2 мин добавляют в нее 0,5 мл мочи, перемешивают и отмечают время начала реакции. Затем каждые 2–3 мин стеклянной палочкой переносят каплю смеси из пробирки на предметное стекло в каплю раствора йода и так продолжают до тех пор, пока окраска капли йода не перестанет изменяться, т. е. останется желтой. Отмечают время реакции в мин. Активность амилазы мочи рассчитывают по формуле:

$$ХЕД = \frac{15}{0,5 \cdot T},$$

где ХЕД – активность амилазы в 1 мл мочи; 15 – время, необходимое для полного расщепления 2 мг крахмала, мин; 0,5 – количество мочи, взятое в реакционную смесь, мл; T – время реакции, мин.

3. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ α -АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

У здорового человека в крови в небольшом количестве содержится амилаза двух изоферментных типов: панкреатический – Р-тип

(около 30%) и слюнной – S-тип (около 70%), которые попадают в кровь в результате естественного старения и отмирания клеток слюнных желез и поджелудочной железы. Фермент имеет относительно низкую молекулярную массу (около 48000 Д), фильтруется в почечных клубочках и присутствует в моче. Соотношение изоферментов в моче иное, чем в крови: P-тип – 70%, S-тип – до 30 %. α -Амилаза катализирует гидролиз нерастворимого цветного крахмального субстрата с образованием синего, растворимого в воде красителя. Количество освобожденного красителя пропорционально каталитической активности фермента.

Материалы и реактивы: суспензия субстрата, сыворотка, моча, осаждающий раствор.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, термостат, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Анализ проводят в соответствии с данными, приведенными в таблице 40. Активность фермента в сыворотке крови находят по приложенной калибровочной таблице 41, исходя из полученной оптической плотности.

При определении активности фермента в моче, полученную по таблице, каталитическую активность необходимо умножить на 2.

Если проба имеет высокую активность, ее разбавляют физиологическим раствором, определение проводят снова, а результат умножают на разведение.

Таблица 40 – Проведение анализа

Материал	ОПЫТ 1, мл	ОПЫТ 2, мл
Суспензия субстрата	1,0	1,0
	Инкубируют при 37°C в течение 5 мин	
Сыворотка	0,10	–
Моча	–	0,05
	Инкубируют точно 15 мин при 37°C	
Осаждающий раствор	2,0	2,0

Через 15 мин центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин (или фильтруют через вату). Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости против воды на зеленом светофильтре.

Таблица 41 –Калибровочная таблица

Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)	Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)
0,046	40	0,402	400
0,068	60	0,449	450
0,089	80	0,495	500
0,110	100	0,501	550
0,120	110	0,587	600
0,130	120	0,679	700
0,150	140	0,769	800
0,170	160	0,859	900
0,190	180	0,948	1000
0,210	200	1,037	1100
0,229	220	1,125	1200
0,259	250	1,212	1300
0,288	280	1,473	1600
0,307	300	1,645	1800
0,354	350	1,816	2000

Нормальные величины–сыворотка 140–350 Е/л, моча 1000–2000 Е/л.

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МОЧИ ПО ВОЛЬГЕМУТУ

Определение активности амилазы мочи и сыворотки крови широко используется в клинической практике для диагностики заболеваний поджелудочной железы.

Материалы и реактивы: физиологический раствор, моча, раствор крахмала, раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стеклограф, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

Берут десять пронумерованных пробирок и приливают в каждую по 1 мл физиологического раствора. Затем в 1–ю пробирку добавляют 1 мл исследуемой мочи. Содержимое этой пробирки перемешивают, несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси и переносят во 2–ю пробирку, процедуру повторяют вплоть до 10–й пробирки. Из 10–й пробирки 1 мл смеси отбрасывают. При этом получается следующее разведение мочи (таблица 42).

Таблица 41 –Калибровочная таблица

Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)	Оптическая плотность	Активность фермента (Е/л)
0,046	40	0,402	400
0,068	60	0,449	450
0,089	80	0,495	500
0,110	100	0,501	550
0,120	110	0,587	600
0,130	120	0,679	700
0,150	140	0,769	800
0,170	160	0,859	900
0,190	180	0,948	1000
0,210	200	1,037	1100
0,229	220	1,125	1200
0,259	250	1,212	1300
0,288	280	1,473	1600
0,307	300	1,645	1800
0,354	350	1,816	2000

Нормальные величины–сыворотка 140–350 Е/л, моча 1000–2000 Е/л.

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МОЧИ ПО ВОЛЬГЕМУТУ

Определение активности амилазы мочи и сыворотки крови широко используется в клинической практике для диагностики заболеваний поджелудочной железы.

Материалы и реактивы: физиологический раствор, моча, раствор крахмала, раствор йода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стеклогрaф, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

Берут десять пронумерованных пробирок и приливают в каждую по 1 мл физиологического раствора. Затем в 1–ю пробирку добавляют 1 мл исследуемой мочи. Содержимое этой пробирки перемешивают, несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси и переносят во 2–ю пробирку, процедуру повторяют вплоть до 10–й пробирки. Из 10–й пробирки 1 мл смеси отбрасывают. При этом получается следующее разведение мочи (таблица 42).

В каждую пробирку добавляют по 1 мл физраствора и по 2 мл 0,1 % раствора крахмала.

После перемешивания содержимого пробирки термостатируют 15 мин при температуре 45 °С.

После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой и ставят в штатив по порядку. Прибавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора йода и перемешивают.

Отмечают пробирку с наибольшим разведением мочи, при котором произошло полное расщепление крахмала с йодом. Полученные данные заносят в таблицу 40.

Активность амилазы можно рассчитать по формуле $2^{(n+1)}$, где n – количество светлых пробирок (в которых произошел гидролиз крахмала).

Так, если первые 3 пробирки обесцветились, активность амилазы мочи равна

$$2^{(3+1)} = 2^4 = 16 \text{ единицам.}$$

Сделать вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Ферменты мочи, перечислите и напишите соответствующие уравнения реакций с их участием.
2. Содержание ферментов в моче в норме и при патологии.
3. Методы определения ферментов в биологических жидкостях.
4. Методы количественного определения ферментов мочи.
5. Приведите примеры использования ферментов мочи в клинико-диагностических лабораториях.
6. Качественные реакции на присутствие ферментов.
7. Применение ферментов в медицине и фармации.
8. Перспективы применения ферментов.

Лабораторная работа № 21.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ СЛЮНЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов слюны.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В составе слюны человека выделено более 100 ферментов. Набор ферментов слюны включает амилазу, лизоцим, гликолитические ферменты, гиалуронидазу, ферменты цикла трикарбоновых кислот, ферменты тканевого дыхания, щелочную и кислую фосфатазы, аргиназу, липазу, ферменты антиоксидантного действия и др.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

Метод заключается в том, что слюну разводят в определенной последовательности, после чего одно и то же крахмала приливают, находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет все количество добавленного крахмала, затем производят расчет на 1 мл слюны.

Активность α -амилазы выражают количеством миллилитров 0,1 % раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при 37 °C в течение 30 мин до стадии эритродекстрина. Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской.

Материалы и реактивы: раствор слюны, 0,1 % раствор крахмала, вода, раствор йода, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетки, термостат.

Ход работы

В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. В первую добавляют 1 мл слюны, разведенной в 10 раз, перемешивают несколько раз, втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси из одной пробирки, переносят ее во вторую; из второй таким же образом в третью и т.д. до десятой пробирки, из последней пробирки 1 мл смеси выливают. В каждой последующей пробирке, таким образом, содержание фермента вдвое меньше, чем в предыдущей.

Во все 10 пробирок приливают по 1 мл воды и по 2 мл 0,1 % раствора крахмала. Перемешивают, встряхивают пробирки и помещают в термостат при температуре 37 °C на 30 мин. Затем пробирки вынима-

ют, охлаждают, во все добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают и отмечают окраску.

Данные занести в таблицу 43.

Таблица 43– Определение активности амилазы

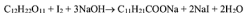
№	Разведение слюны	Окрашивание йодом	Активность ами- лазы
1	1:10		
2	1:20		
3	1:40		
4	1:80		
5	1:160		
6	1:320		
7	1:640		
8	1:1280		
9	1:2560		
10	1:5120		

Пример расчета: если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было добавлено 2 мл 0,1 % раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы в 160 раз больше 0,1 % раствора крахмала: 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл – 0,1% раствора крахмала, 1 мл слюны расщепляет x мл 0,1 % раствора крахмала, т. е. $x = 2 \cdot 1:1/160 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 мин при 37 °С 320 мл 0,1 % раствора крахмала. Условно это принимают за 320 единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A_{37^{\circ}/30'} = 320$ ед.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ ПО ПРИРОСТУ МАЛЬТОЗЫ

Данный метод определения активности амилазы основан на измерении прироста количества мальтозы, которая образуется при действии амилазы на полисахариды – крахмал и гликоген.

Крахмал и гликоген не обладают восстанавливающей способностью, тогда как продукт их гидролиза мальтоза – обладает этим свойством. Реакция идет по уравнению:



В результате реакции йод, добавленный в реакционную смесь, в щелочной среде восстанавливается под действием образующейся мальтозы, превращаясь в бесцветное соединение – соль NaI . Путем титрования определяют количество йода, эквивалентное данной величине мальтозы, и рассчитывают активность амилазы.

Материалы и реактивы: слюна, фосфатный буфер, 1 % раствор NaCl , 2 % раствор крахмала, 5 % HCl , 0,1 н раствор I_2 , 40 % раствор NaOH , 0,05 н раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Приборы и посуда: колбы, термостат, пипетки, пипетатор, стеклянная палочка, бюретка.

Ход работы

В две колбы (опытную и контрольную) вносят по 0,1 мл слюны, разведенной в 5 раз, по 0,5 мл фосфатного буфера pH 6,8 и по 0,1 мл 1 % раствора NaCl . В контрольную пробу вносят 0,5 мл 5 % раствора HCl и кипятят.

В обе колбы наливают 2 мл 2 % раствора крахмала, перемешивают и ставят на 30 мин в термостат при 37 °C.

Спустя 30 мин в опытную колбу вносят 0,5 мл 5 % HCl и нагревают до кипения. Затем в обе колбы, добавляя по 15 мл 0,1 н раствора I_2 и по каплям, все время перемешивая, добавляют 0,5 мл 40 % раствора NaOH .

Оставляют пробы стоять 15 мин, а затем в обе колбы вносят по 10 мл 5 % раствора HCl и выделившийся I_2 титруют 0,05 н раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до исчезновения сине-фиолетового окрашивания.

Расчет: 1 мл 0,05 н раствора I_2 эквивалентный 1 мл 0,05 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, соответствует 8,57 мг мальтозы. Количество образовавшейся мальтозы рассчитывают по формуле:

$$C = (B - D) \cdot 8,57,$$

где B – объем 0,05 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедший на титрование контрольной пробы, мл; D – объем 0,05 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедший на титрование опытной пробы, мл; 8,57 – коэффициент поправки на 0,05 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Активность амилазы будет равна:

$$A = \frac{C}{n},$$

где n – разведение пробы.

3. ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА α -АМИЛАЗОЙ СЛЮНЫ

α -Амилаза слюны относится к классу гидролаз. Специфическими субстратами α -амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген.

Для исследования действия α -амилазы слюны в качестве субстрата берут крахмал. Нерасщепленный крахмал образует с йодом комплекс синего цвета и не обладает восстановительной способностью, так как почти не имеет свободных альдегидных групп. α -Амилаза гидролизует α -1,4-глюкановые связи в крахмале, гликогене и олигосахаридах, которые разрываются без определенного порядка. И мальтоза, и глюкоза имеют свободные альдегидные группы, вследствие чего они обладают восстановительной способностью и открываются пробой Троммера.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, раствор йода, дистиллированная вода, раствор слюны, реактивы для реакции Троммера.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, термостат, пипетки, пипетатор.

Ход работы

К 5–10 каплям 1 % раствора крахмала добавляют 1–2 капли раствора йода в йодистом калии и убеждаются в том, что крахмал с йодом дает синее окрашивание.

Заготавливают 8–10 пробирок, куда наливают по 1–3 капли раствора йода в йодистом калии.

В две другие пробирки помещают приблизительно по 5 мл раствора крахмала. В одну из них добавляют около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт), а в другую – около 3 мл разбавленной слюны (основной опыт). Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в термостат при 37 °С.

Через 5–7 сек из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости в пробирки с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет появляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета

раствора йода, гидролиз считают завершенным и записывают время его окончания.

Пробы, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание, что свидетельствует о том, что в отсутствие гидролиз крахмала не происходит.

С частью растворов основного и контрольного опытов производят пробу Троммера. С раствором из пробирки со слюной проба Троммера будет положительная, вследствие образования конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Раствор контрольного опыта пробу Троммера не дает. Наблюдают, что в пробирке с основным опытом опалесценция раствора процессе гидролиза исчезает.

Результаты работы записать в таблицу 44.

Таблица 44—Гидролиз крахмала α -амилазой слюны

Название субстрата и продуктов гидролиза	Окраска с йодом	Время, затраченное на гидролиз	Температурные условия гидролиза	Реакция Троммера

В выводах обратить внимание на то, что гидролиз крахмала под влиянием α -амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела или близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

Слюна и другие пищеварительные соки животных и человека, являются концентрированными растворами ферментов. При гидролизе крахмала образуются последовательно промежуточные продукты: амилодекстрины (дают синее или фиолетовое окрашивание с йодом), эритродекстрины (красно-бурое окрашивание с йодом), ахродекстрины (не дают окрашивания с йодом), мальтодекстрины (не дают окрашивания с йодом). В качестве конечного продукта гидролиза под действием α -амилазы образуется смесь дисахарида мальтозы и моносахарида глюкозы.

крахмал	синяя окраска с йодом
↓	
амилодекстрины	синяя окраска с йодом
↓	
эритродекстрины	красно-бурая окраска с йодом
↓	
ахродекстрины	отсутствие окраски с йодом
↓	
мальтоза	отсутствие окраски с йодом

В таблице 45 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица 45– Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Светло-желтая

Материалы и реактивы: 1 % раствор NaCl, раствор слюны, 1 % раствор крахмала, раствор Люголя.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, термостат, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Хорошо прополоскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой, набрать в рот 2–3 мл 1 % раствора NaCl и держать 4–5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения её активности, из полученного раствора отливают около 1 мл во вторую чистую пробирку и приливают двойной объем 1 % раствора крахмала и содержащее перемешивают путем плавного однократного переворачивания

пробирки, закрыв её пальцем. Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течении 10 мин.

По истечении указанного времени наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом: в пробирку вносят 1–2 капли раствора Люголя (по 1 капле на 1 мл содержимого) и встряхивают. По окраске появившейся в пробирке можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента.

По результатам реакции сделать вывод о глубине гидролиза и активности ферментов.

5. ДЕЙСТВИЕ АМИЛАЗЫ НА НАТИВНЫЙ И ВАРЕННЫЙ КРАХМАЛ

Податливость субстрата к действию фермента получила название атакуемости. Атакуемость крахмала амилазами зависит от степени повреждения структуры крахмального зерна. Неповрежденные или механически поврежденные крахмальные зерна устойчивы к действию амилазы, оклейстеренный крахмал расщепляется амилазами с большей скоростью.

Материалы и реактивы: 2 % раствор оклейстеренного крахмала, 2 % раствор сырого крахмала, разбавленная слюна, раствор Люголя.

Приборы и посуда: пробирки, термостат.

Ход работы

Берут две пробирки. В одну вносят 5 мл 2 % раствора оклейстеренного крахмала, в другую – 5 мл 2 % раствора сырого крахмала.

В каждую пробирку добавляют по 1 мл разбавленной (1:1) слюны. Содержимое перемешивают, и пробирки ставят в термостат на 20 мин при температуре 37–38 °С. По окончании инкубации в пробирки вносят по 3 капли раствора Люголя.

По результатам опыта делают вывод.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие ферменты слюны вы знаете?
2. Напишите уравнений реакции расщепления субстратов ферментами слюны.
3. Почему при длительном жевании вкус хлеба становится сладковатым?
4. Отличия ферментативного набора ферментов слюны у детей грудного периода жизни и взрослых людей.
5. особенности действия амилазы слюны и кишечника.

Лабораторная работа № 22.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов желудочного сока.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Большинство пищеварительных ферментов относится к классу гидролаз.

Пепсин – протеолитический фермент класса гидролаз, вырабатываемый главными клетками слизистой оболочки желудка, осуществляет расщепление белков пищи до пептидов. Пепсин вырабатывается слизистой желудка в виде неактивного предшественника – пепсиногена, который превращается в пепсин под влиянием HCl.

1. СТВОРАЖИВАНИЕ МОЛОКА ПЕПСИНОМ

Под действием нейтрализованного желудочного сока молоко створаживается. Свораживание молока обусловлено способностью пепсина превращать казеиноген молока в казеин, кальциевая соль которого нерастворима в воде.

Материалы и реактивы: желудочный сок, дистиллированная вода, порошок углекислого кальция, 0,2 % раствор соляной кислоты, молоко.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат, пипетки, пипетатор, лакмусовая бумага.

Ход работы

Берут 4 пробирки. В 1-ю наливают 2 мл желудочного сока. Во 2-ю – 1 мл желудочного сока, 1 мл дистиллированной воды и порошка углекислого кальция до нейтральной реакции на лакмус, жидкость фильтруют. В 3-ю – 2 мл желудочного сока с несколькими каплями 0,2% соляной кислоты. В 4-ю – 2 мл прокипяченного желудочного сока.

Во все пробирки наливают по 10 капель свежего молока и помещать в термостат при температуре 37 °С на 5–10 мин. Отметить изменение окраски.

Результаты занести в таблицу 46.

Таблица 46– Свораживание молока пепсином желудочного сока

Субстрат	Фермент	Изменения	Причина изменений

2. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ФИБРИНА ПЕПСИНОМ

Переваривание белков начинается в желудке под влиянием желудочного сока, главным компонентом которого является пепсин.

Пепсин вырабатывается слизистой желудка в виде неактивного предшественника пепсиногена. Превращение пепсиногена в пепсин так же происходит аутокаталитически в ходе ограниченного протеолиза при участии соляной кислоты, и связано с отщеплением пептида, состоящего из 44 аминокислот.

Пепсин расщепляет внутренние пептидные связи в белках (кроме склеропротеинов) с образованием пептидных фрагментов и отдельных аминокислот. Пепсин предпочитительно гидролизует связи между ароматическими аминокислотами тирозином и фенилаланином.

Материалы и реактивы: желудочный сок, 0,1 % раствор пепсина в 0,2 % соляной кислоте, 0,4 % раствор гидроксид натрия, 0,2 % раствор соляной кислоты.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, термостат.

Ход работы

В одну пробирку наливают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2 % соляной кислоте.

В другую пробирку помещают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2 % соляной кислоте, нейтрализованных содой.

В третью пробирку вливают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствор пепсина в 0,2 % соляной кислоте, предварительно подщелоченных 0,4 % раствором NaOH.

В четвертую пробирку закапывают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2 % соляной кислоте, предварительно подвергнутых кипячению.

В пятую пробирку отмеривают 20 капель 0,2 % раствора соляной кислоты.

Во все пять пробирок добавляют одинаковые небольшие кусочки фибрина, и пробирки помещают в термостат при 37 °С.

После переваривания (растворения) фибрина в первой пробирке (примерно через 30 мин от начала опыта) все пробирки вынимают из термостата и наблюдают за изменениями фибрина.

Содержимое каждой пробирки фильтруют и с фильтратом производят биуретовую реакцию. Положительная реакция обнаруживается только в первой пробе, где был активный пепсин, соляная кислота, фибрин, что указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка. Результаты вносят в таблицу 47.

Таблица 47 – Переваривание белков пепсином

№ пробы	Фермент	Субстрат	Реакция среды	Инактивация пепсина	Видимые изменения	Биуретовая реакция

Сделать вывод об оптимальных условиях для переваривания белка пепсином и роли соляной кислоты в этом процессе.

3. ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА НА БЕЛОК

Белки расщепляются под воздействием ферментов желудочного сока, которые действуют лишь при определенной температуре и в кислой среде.

Материалы и реактивы: желудочный сок, дистиллированная вода, белок куриного яйца.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня, лед, пипетки, пипетатор

Ход работы

Нумеруют 4 пробирки, в каждую вносят по 1 мл желудочного сока. Первую и четвертую пробирки оставить без изменений. Содержимое второй пробирки нагреть до кипения и охладить, в третьей пробирке нейтрализовать 0,5 % раствором NaOH (3–5 капель). Во все пробирки добавить небольшое количество приготовленного белка. Хлопья белка куриного яйца, получить при кипячении ½ белка куриного яйца в 0,5 л H₂O. Первые три пробирки несколько раз встряхнуть и поместить на водяную баню при температуре 37 °С; а четвертую пробирку в емкость со льдом.

Через каждые 8–10 мин содержимое пробирок взбалтывать. Через 30 мин отметить, какие изменения произошли с белком.

Результаты наблюдения записать в таблицу 48.

Таблица 48– Действие желудочного сока на белок

№	Содержимое пробирки	Температура, °С	Результат
1	Белок + 1мл желудочного сока	37	
2	Белок + 1мл прокипяченного желудочного сока	37	
3	Белок + 1мл нейтрализованного желудочного сока	37	
4	Белок + 1мл желудочного сока	0	

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПСИНА В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ПО ПЯТНИЦКОМУ

В основе метода лежит способность пепсина в желудочном соке створаживать белок – казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси при pH 4,9 и температуре 25 °C пепсином происходит строго параллельно его способности переваривать белки. За единицу активности пепсина принимают то его количество, которое при указанных условиях створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси за 60 сек (эта условная единица соответствует 0,010 г. кристаллического пепсина). Желудочный сок человека в норме содержит в 1 мл 40–60 ед. пепсина.

При ахилии пепсин в желудочном соке может полностью отсутствовать, а при язвенной болезни желудка количество пепсина резко увеличено.

Материалы и реактивы: ацетатный буфер с pH 4,9; молочно-ацетатная смесь; 2 н раствор хлористоводородной кислоты; желудочный сок или раствор пепсина.

Приборы и посуда: термостат; водяная баня; секундомер; микропипетки вместимостью 0,1 мл; термометр, пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

На дно пробирки с помощью микропипетки приливают 0,1 мл желудочного сока, а в другую пробирку наливают 5 мл молочно-ацетатной смеси. Помещают обе пробирки в водяную баню, нагретую до 25 °C на 5 мин. Быстро приливают молочно-ацетатную смесь в пробирку с испытуемым желудочным соком и одновременно включают секундомер, пробирку встряхивают. Момент приливания смеси отмечают по секундомеру. Пробирку со смесью держат в водяной бане, наклоняют ее и следят за появлением на ее стенках первых хлопьев казеина. В момент их появления секундомер останавливают и записывают время створаживания смеси в секундах.

Расчет. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят число 60 на количество найденных секунд, и таким путем находят количество единиц пепсина в 0,1 мл желудочного сока, а умножая на 10 – в 1 мл.

Например: створаживание смеси произошло за 15 сек, следовательно, в 0,1 мл желудочного сока будет 4 единицы пепсина ($60:15 = 4,0$ единицы), а в 1 мл – 40 единиц, или 0,40 мг кристаллического пепсина ($40 \cdot 0,010 = 0,4$ мг).

5. ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА ФЕРМЕНТАМИ ЖКТ

Различные ферменты в разной степени гидролизуют крахмал.

Материалы и реактивы: 0,5 % раствор крахмала, дистиллированная вода, желудочный сок, вытяжка поджелудочной железы, раствор йода, реактивы для пробы Фелинга.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, стекло, термостат, пипетки, нипетатор.

Ход работы

В три пробирки отмерить по 3 мл 0,5 % раствора крахмала. В первую пробирку добавить 1 мл воды, во вторую – 1 мл желудочного сока, в третью – 1 мл вытяжки из поджелудочной железы (5 % раствор панкреатина). Из всех трех пробирок взять по 1 капле на стекло и проделать йодную пробу.

Пробирки поместить в термостат при температуре 37 °С. Через каждые 5 мин проводить йодную пробу. Через 30 мин с содержимым трех пробирок проделать пробу Фелинга.

Результаты занести в таблицу 49.

Таблица 49 – Гидролиз крахмала

№	Жидкость	Окраска с йодом, мин						Реакция Фелинга
		0	5	10	15	20	25	30
1	Вода							
2	Пепсин							
3	Панкреатин							

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РЕНИНА

Ренин или сычужный фермент обладает способностью свертывать молоко и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при 35 °С в течение 40 мин.

Материалы и реактивы: молоко сырое, 1 % раствор сычужного фермента.

Приборы и посуда: стакан на 100 мл, пипетка градуированная на 1 мл, секундомер, термостат.

Ход работы

В химический стакан наливают 50 мл молока и ставят в термостат с температурой 35 °С. Через 3–5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 % раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачивани-

ем стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает началосвертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, то есть время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев. Активность сычужного фермента вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 40}{0,005 \cdot n},$$

где X – активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.); а – количество взятого молока, мл; n – продолжительность свертывания молока, минуты.

Пример. К 50 мл молока прибавляем 0,5 мл 1 % раствора сычужного фермента, что соответствует 0,005 г. Молоко свернулось в течение 4 мин. Активность фермента будет равна:

$$X = \frac{50 \cdot 40}{0,005 \cdot 4} = 100000 \text{ у.е.}$$

Следовательно, 1 г сычужного фермента свертывает 100 кг молока в течение 40 мин при температуре 35 °С.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какова роль энтеропептидаз ЖКТ?
2. Какова роль экзопептидаз ЖКТ?
3. Проферменты ферментов ЖКТ.
4. Какие ферменты ЖКТ вам известны? На что они действуют?
5. Как можно обнаружить фермент в биологическом материале?
6. Гидролиз белков. Протеолитические ферменты желудочного сока.
7. Состав желудочного сока.
8. Роль соляной кислоты в переваривании белков.
9. Проферменты.
10. Активирование проферментов.
11. Пепсиноген. Его функции. Активатор пепсиногена.
12. Применение пепсина.
13. Каков pH желудочного сока и почему?

Лабораторная работа № 23.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО СОКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов панкреатического сока.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Трипсин избирательно расщепляет связи, образованные лизинном и аргинином. Трипсин обладает противовоспалительным и противоотечным действием; избирательно расщепляет ткани, подвергшиеся некрозу. В медицинской практике его используют для лечения ран, ожогов и тромбозов.

Химотрипсин синтезируется в виде профермента химотрипсиногена, а под влиянием трипсина превращается в химотрипсин. Он действует преимущественно на связи, образованные тирозином, фенилаланином и триптофаном. Ферменты типа химотрипсина обнаружены у низших позвоночных животных и насекомых.

Эластаза расщепляет связей между остатками нейтральных аминокислот. Фермент особенно активен по отношению к эластину. Синтезируется в виде проэластазы, а под влиянием трипсина превращается в активную форму фермента.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО КУБЕЛЬКО

Материалы и реактивы: дистиллированная вода, вытяжка поджелудочной железы, раствор казеина, уксусно-спиртовой раствор.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Реактивы смешивают в количествах, указанных в таблице 50.

Таблица 50– Определение активности поджелудочной железы по Кубелько

№	Вода, мл	Вытяжка подж. жел., мл	Раствор казеина, мл
1	0,9	0,1	5,0
2	0,8	0,2	5,0
3	0,7	0,3	5,0
4	0,6	0,4	5,0
5	0,5	0,5	5,0
6	0,4	0,6	5,0

№	Вода, мл	Вытяжка подж. жел., мл	Раствор казеина, мл
7	0,3	0,7	5,0
8	0,2	0,8	5,0
9	0,1	0,9	5,0
10	–	0,1	5,0

Пробирки со смесью выдерживают при 37°C 30 мин, после чего охлаждают под струей холодной воды и затем в каждую из пробирок добавляют 0,5 мл уксусно-спиртового раствора. Активность исчисляется в так называемых казеиновых числах по формуле:

$$КЧ = \frac{1250}{A \cdot B},$$

где А – объем испытуемого вещества железа, взятого для приготовления 500 мл вытяжки, мл; В – объем вытяжки, находящейся в первой прозрачной пробирке, мл.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО ФУЛЬД-ГРОССУ

Материалы и реактивы: раствор казеина, ацетатная смесь, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Реагенты смешивают в количествах, указанных в таблице 51.

Таблица 51– Определение активности поджелудочной железы

Пробирки	Вытяжка поджелудочной железы, мл	Объем H ₂ O _{дис} , мл
1	5	–
2	4	1
3	3,2	1,8
4	2,5	2,5
5	2,0	3,0
6	1,5	3,5
7	1,0	4,0
8	0,5	4,5
9	0,25	4,75
10	0,15	4,85
11	0,1	4,9

Во все пробирки наливают по 5 мл раствора казеина и, смешав, ставят на водяную баню при 40 °С на 30 мин. Затем пробирки достают, вносят в каждую по 0,5 мл ацетатной смеси. Последняя прозрачная пробирка считается предельной.

Для определения активности ферментов железы число 50 делят на объем вытяжки, содержащейся в пробирке. Стандартным является препарат, отвечающий активности 25 единиц (5 пробирка).

3. КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ АМИЛАЗЫ В ВЫТЯЖКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Амилаза расщепляет 1,4-гликозидную связь крахмала с образованием мальтозы и глюкозы. Промежуточными продуктами гидролиза крахмала могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать, используя реакцию с йодом. Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп в мальтозе и глюкозе.

Материалы и реактивы: 0,1 % раствор крахмала, вытяжка поджелудочной железы, 10 % раствор гидроксида натрия, 2 % раствор сульфата меди.

Приборы и посуда: пробирки, штатив.

Ход работы

В большую пробирку помещают 2 мл 0,1 % раствора крахмала и добавляют 1 мл вытяжки поджелудочной железы. Пробирку оставляют стоять при комнатной температуре, отбирая пипеткой в отдельные пробирки через каждые 2 мин по 5–6 капель гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Отметить время, прошедшее на изменение окраски в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 5 капель 10 % раствора гидроксида натрия, а затем по каплям 2 % раствора сульфата меди, пока не прекратится его растворение. Полученный раствор осторожно нагреть. Появление желто-красного окрашивания говорит о положительной реакции Троммера.

4. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКА ТРИПСИНОМ

Под действием трипсина происходит гидролитическое расщепление пептонов, а также белков. Гидролиз под действием трипсина идет глубоко до частичного образования некоторых свободных аминокислот (триптофана). Оптимум действия трипсина лежит при слабощелочной реакции pH 8–8,7.

Материалы и реактивы: раствор трипсина или панкреатина, соляная кислота, фибрин.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, водяная баня, пипетки, пипетатор, лакмусовая бумага.

Ход работы

Пронумеровать три пробирки и налить в первую пробирку 4 мл раствора трипсина или панкреатина, во вторую – 4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус, в третью – 4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

Поместить в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины. Все пробирки с содержимым одновременно поставить в водяную баню при 37 °С.

Через 30 мин вынуть пробирки из бани и наблюдать результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место растворение фибрина; во 2-й пробирке растворение не наблюдается; в третьей пробирке наблюдается лишь набухание фибрина.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с трипсином.

Материалы и реактивы: раствор казеина, раствор трипсина, 0,1 н раствор гидроксида натрия, раствор формалина (формол), 1 % раствор фенолфталеина.

Приборы и посуда: колбы, пипетка, пипетатор, водяная баня, термостат.

Ход работы

В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до 37 °С и прибавляют 2 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования. Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота. Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – время инкубации). Вычисляют активность A в мкмоль/мин по формуле:

$$A = \frac{V_3 - V_0}{0,18},$$

Определение аминного азота методом формольного титрования

К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором NaOH до слабо-розового окраши-

вания. Затем в раствор добавляют 2 мл формола и вновь титруют 0,1 н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания, фиксируя затраченный на титрование объем щелочи. Количество израсходованной щелочи после добавления формола умножают на 1,4 и получают количество аминного азота в мг (1 мл 0,1 н раствора NaOH соответствует 1,4 мг аминного азота).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Химическая природа протеолитических ферментов.
2. Строение и структура протеолитических ферментов.
3. Модели фермент-субстратного взаимодействия.
4. Какие ферменты кишечного сока вам известны, их функции.
5. Роль и применение трипсина.
6. Биологическая роль химотрипсина.
7. Практическое применение химотрипсина.

Лабораторная работа № 24.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МОЛОКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов молока.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Молоко представляет собой секрет молочных желез. В его состав входит около 200 различных веществ, в том числе различные ферменты, например, рибонуклеазы, щелочной фосфатазы, липазы, ксантиноксидазы и др.

1. ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ МОЛОКА

Альдегидоксидаза относится к классу оксидоредуктаз. Окисляемыми субстратами, на которые действуют оксидоредуктазы, могут быть спиртовая группа ($-\text{OH}$), альдегидная ($-\text{CHO}$), кетонная ($-\text{CO}$), этильная ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) и др., а также восстановленные формы пиридиновых коферментов – никотинамид–адениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) и др.

Материалы и реактивы: молоко, 0,4 % раствор формалина, дистиллированная вода, 0,01 % раствор метиленового синего, вазелинового масла.

Приборы и посуда: пипетки, пипетатор, пробирки, штатив, термостат.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5 мл свежего молока. Первую пробирку кипятят в течение 2–3 мин и охлаждают. В первую и вторую пробирки наливают по 1 мл 0,4 % раствора формалина, а в третью – 1 мл воды. Во все три пробирки приливают по 1 мл 0,01 % раствора метиленового синего.

Содержимое пробирок хорошо перемешивают и вносят в каждую по 3–4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирки помещают в термостат при температуре до 40 °С. Через 15–30 мин в одной из них происходит обесцвечивание жидкости. В какой и почему? Почему не происходит обесцвечивание в двух других?

Сделайте вывод.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ МОЛОКА

Активность каталазы в молоке, выражаемую каталазным числом, представляющим собой объем кислорода (мл) выделившийся за 2 часа при 25 °С из добавленных к 15 мл молока 5 мг раствора с массовой до-

лей H_2O_2 1 %. Молоко, полученное от здоровых животных, выделяет 0,7–2,5 мл кислорода, т.е. каталазное число натурального молока составляет не более 2,5. Молоко, полученное от больных животных (мастит и др.), и молозиво имеют повышенные каталазные числа, достигающие до 15.

Материалы и реактивы: 1 % раствор H_2O_2 , молоко, 3 % раствор H_2O_2 , раствор слюны.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки наливают по 2 мл молока. Одну прокипятить, вторую оставить без изменений. Прилить в каждую по 1 мл 3 % раствора H_2O_2 .

В какой пробирке происходит выделение кислорода? Сделайте вывод.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ МОЛОКА ПО МЕТОДУ А.Н. БАХА И С.Р. ЗУБКОВОЙ

Материалы и реактивы: молоко сырое, разведенное в 2 раза, 1 % раствор перекиси водорода, 10 % раствор серной кислоты, 0,1 н раствор перманганата калия.

Приборы и посуда: конические колбы, пипетки градуированные на 5 и 10 мл, пипетки на 1 мл, пипетаторы.

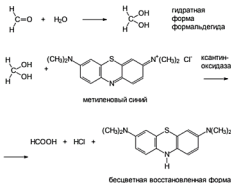
Ход работы

В две конические колбы отбирают по 7 мл дистиллированной воды. Затем в одну из них прибавляют 1 мл разведенного в 2 раза сырого молока, а в другую 1 мл разведенного молока, но предварительно прокипяченного. В обе колбы добавляют по 1 мл 1 % раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 % серной кислоты для прекращения действия каталазы и оттитровывают остаточное количество пероксида водорода 0,1 н раствором перманганата калия до появления светло-розового окрашивания. По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству расщепленного с участием фермента пероксида водорода.

Пример. Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 8 мл, опытной – 2 мл 0,1 н раствора KMnO_4 . Количество пероксида водорода, разложенного каталазой, содержащейся в 1 мл разведенного в 2 раза молока, составит $8 - 2 = 6$ мл, или $6 \cdot 1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1 н раствора KMnO_4 эквивалентен 1,7 мг пероксида водорода). Следовательно, в 1 мл сырого молока содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $10,2 \cdot 2 = 20,4$ мг пероксида водорода.

4. ОТКРЫТИЕ КСАНТИНОКСИДАЗЫ В МОЛОКЕ

Ксантиноксидаза относится к группе окислительно-восстановительных ферментов, называемых оксидазами. Оксидазы катализируют окисление многих органических веществ с участием кислорода. Так, содержащаяся в крови и в коровьем молоке ксантиноксидаза окисляет пуриновые основания (гипоксантин и ксантин) до мочевой кислоты, а также различные альдегиды до соответствующих карбоновых кислот, например, формальдегид до муравьиной кислоты. При этом акцептором атомов водорода окисляющегося субстрата может быть как кислород, так и другие вещества, например метиленовый синий в соответствии со схемой:



Материалы и реактивы: молоко сырое и кипяченое, 1,5 % раствор формальдегида, 0,02 % раствор метиленового синего.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетка, пипетатор, термостат.

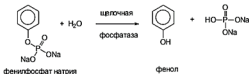
Ход работы

Берут две пробирки, в одну наливают около 5 мл сырого молока, в другую – 5 мл кипяченого молока. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора формальдегида и 4 капли раствора метиленового синего. Смесь взбалтывают и ставят в термостат с температурой 37 °С. Через некоторое время молоко в первой пробирке обесцветится вследствие катализируемого ксантиноксидазой восстановления метиленового синего в неокрашенную восстановленную форму. При этом формальде-

гид окисляется в муравьиную кислоту. Во второй пробирке с кипяченым молоком обесцвечивания метиленового синего не произойдет вследствие тепловой денатурации фермента.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В МОЛОКЕ

Щелочная фосфатаза полностью инактивируется при температуре 63 °С с выдержкой в течение 30 мин, т.е. в условиях, применяемых для пастеризации молока, сливок или кисломолочных продуктов. Поэтому обнаружение в этих продуктах остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции. Метод определения щелочной фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз динатриевой соли фенолфосфорной кислоты с образованием фенола, который дает с индикатором 4-аминоантипирином окрашенный в розовый цвет комплекс по схеме:



Материалы и реактивы: Молоко пастеризованное и сырое, раствор субстрата (смесь динатрийфенилфосфата с 4-аминоантипирином, для его приготовления непосредственно перед определением смешивают растворы А и Б в соотношении 1:9). Раствор А: 1,25 г динатриевой соли фенолфосфата растворяют в 100 мл буферного раствора (40 г хлорида аммония растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 348 мл 25 %-го водного аммиака и общий объем доводят водой до 1 л). Раствор Б: 0,8 г 4-аминоантипирина растворяют в 900 мл дистиллированной воды), осадитель белков системы цинк-медь (растворяют 30 г сульфата цинка и 6 г сульфата меди в 1 л дистиллированной воды).

Приборы и посуда: пробирки, термостат, воронки, фильтровальная бумага, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

В две пробирки наливают по 3 мл сырого и пастеризованного молока, добавляют по 2 мл раствора субстрата, содержимое пробирок

перемешивают и ставят в водяную баню (или термостат) с температурой 40 – 45 °С на 30 мин.

Затем в каждую пробирку добавляют по 5 мл осадителя белков системы цинк-медь, перемешивают, ставят в термостат на 10 мин, вынимают пробирки из термостата и отмечают окраску раствора над осадком белка.

При наличии фосфатазной активности (сырое молоко или плохое качество пастеризации) раствор окрасится в розовый или красный цвет, а при хорошем качестве пастеризации – останется бесцветным.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие ферменты молока вам известны.
2. Химический состав молока.
3. Способы открытия ферментов молока.
4. Роль ферментов молока для организма.
5. Методы количественного определения ферментов молока.
6. Особенности ферментативного набора у грудных детей для переваривания молока.

Лабораторная работа № 25.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МЕДА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность ферментов меда.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

До недавнего времени предполагалось, что в меде имеется только один фермент – инвертаза, гидролизующая сахарозу. Сейчас же известно большое количество ферментов, избирательно действующих на определенные сахара. Вырабатываются ферменты слюнными железами пчелы и в нектарниках растений (инвертаза, диастаза, ингибин и др.). Ингибин – один из ферментов предотвращающий порчу меда. Это консервант, вырабатываемый организмом пчел и нектарниками растений, предотвращающий распад таких высокопитательных продуктов, как пыльца и мед.

Амилаза, или, как ее еще называют, диастаза, имеет также двойное происхождение – растительное и животное. Это обязательный компонент натурального меда. Обнаружить амилазу более просто, чем другие ферменты.

Хотя диастаза считается наиболее стойким ферментом, она может разрушаться при нагревании, длительном хранении и порче меда. При брожении меда количество амилазы может увеличиваться прямо пропорционально степени его разложения. В данном случае рост диастазного числа, или увеличение амилалитической способности меда, происходит за счет образования амилазы дрожжами, вызвавшими брожение меда.

1. ОТКРЫТИЕ АМИЛАЗЫ В МЕДЕ

Материалы и реактивы: раствор слюны, разведенной в 20 раз, 1 % раствор крахмала, 0,5 % раствор йода, пчелиный мед, 2,5 % раствор пищевой соды, 7 % уксусная кислота, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, пипетки, пипетатор, стеклоглаф.

Ход работы

Пронумеровать стеклоглафом десять пробирок, в каждую из которой внести по 5 мл 1 % раствора крахмала. В пробирки 1, 4 и 7 внести по 5 капель уксусной кислоты, а в пробирки 2, 5 и 8 по 5 капель раствора соды. В остальные пробирки прибавьте по 5 капель дистиллированной воды. Содержимое всех пробирок перемешайте и в каждую внесите по 10 капель разбавленной слюны.

Через 10 мин в пробирки 1, 2 и 3 прибавьте 1–2 капли раствора йода и перемешайте смесь. Наблюдайте за изменением окраски. Еще через 15 мин прибавьте такую же порцию йода в пробирки 4, 5 и 6, а еще через 10 мин – в остальные пробирки.

Крахмал и декстрины, дают различную окраску с йодом, и по мере разрушения крахмала амилазой цвет меняется. Так можно судить не только о распаде крахмала, но и о том, какая среда – кислая, нейтральная или щелочная – более благоприятна для этого процесса.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАСТАЗНОГО ЧИСЛА АКТИВНОСТИ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Диастазное число – это основной показатель натуральности и зрелости мёда. Чем выше этот показатель, тем лучше мёд. Диастазное число характеризует активность амилолитических ферментов меда. Диастазное число выражают количеством кубических сантиметров раствора крахмала массовой долей 1 %, которое расщепляется за 1 ч амилолитическими ферментами, содержащимися в 1 г безводного вещества меда. 1 мл раствора крахмала массовой долей 1 % соответствует 1 ед. активности.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, 0,58 % раствор хлорида натрия, йод в йодиде калия, дистиллированная вода, 10 % раствор меда.

Приборы и посуда: пробирки, стеклогрaф, штатив, термостат, резиновые пробки, пипетки, штатив, пипетатор.

Ход работы

В десять пробирок вносят компоненты согласно таблицы 52.

Таблица 52 – Компоненты реакции для определения диастазного числа

Компонент, мл	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Раствор меда	1,0	1,3	1,7	2,1	2,8	3,6	4,6	6,0	7,7	11,1
Дистиллированная вода	9,0	8,7	8,3	7,9	7,2	6,4	5,4	4,0	2,3	—
Раствор поваренной соли	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Раствор крахмала	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Диастазное число (ед. Готе)	50	38	29,4	23,8	17,9	13,9	10,9	8,0	6,5	4,4

Пробирки закрывают резиновыми пробками, перемешивают и помещают в термостат при температуре 40 °С на один 60 мин. По истечении этого времени пробирки извлекают из водяной бани, охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры, после чего в каждую пробирку добавляют по одной капле раствора йода.

В тех пробирках, где крахмал остался неразложившимся, появляется синяя окраска. При расщеплении ферментом диастаза крахмала окраска раствора йода не изменяется (желтоватая), с частичным разложением крахмала (до амилодекстринов) – фиолетовая. Последняя пробирка со слабоокрашенным в фиолетовый цвет содержимым перед рядом пробирок с желтоватым оттенком соответствует диастазному числу.

Диастазное число вычисляют по формуле

$$D = Y \cdot 10 / A$$

где D – диастазное число, Y – количество крахмала, мл; A – количество раствора мёда, влитого в пробирку, соответствующее диастазной силе исследуемого мёда; 10 – коэффициент пересчета 10 % раствора мёда на неразведенный.

Пример расчета. Слабая окраска раствора наблюдалась в пробирке 4, где было 2,1 мл 10 % раствора мёда и 5 мл раствора крахмала

$$D = 5 \cdot 10 / 2,1 = 23,8$$

В настоящее время диастазные числа регламентированы для каждого региона, но во всех зонах оно должно быть не ниже 5.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие ферменты мёда вам известны. Какие реакции они катализируют?
2. Химический состав мёда. Роль ферментов мёда.
3. Способы открытия ферментов мёда.

Лабораторная работа № 26.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ

ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить активность препаратов на основе ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В норме активность амилазы сыворотки, определенная амило-кластическим методом, составляет 15–30 г/(ч·л). Источником сывороточной амилазы служит поджелудочная железа и слюнные железы. У здорового человека количество слюнной и панкреатической амилазы примерно одинаково. Возрастание активности амилазы крови (гиперамилаземия) наблюдается при остром панкреатите, когда она повышается в 10–30 раз, достигая максимума через 24 ч после начала заболевания, а затем постепенно приходит к норме на 2–6 день. При хронических панкреатитах гиперамилаземия умеренная. Она встречается также при поражении слюнных желез. Гиперамилаземия отмечается при недостатке внешнесекреторной функции поджелудочной железы, заболеваниях печени (гепатит, цирроз, интоксикации), расстройствах питания (токсические диспепсии), сахарном диабете.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ В ТАБЛЕТКАХ «ХОЛЕНЗИМ»

Определение амилолитической активности амилазы необходимо для установления качества соответствующих ферментных препаратов (панкреатин, ораза, панзинорм, панкурмен, дигестал, трифермент, холензим, фесталидр.), для наблюдения за процедурой получения очистки ферментов. Холензим содержит высушенные порошки поджелудочной железы и слизистых оболочек, а также сухую желчь убойного скота. Препарат содержит ферменты амилазу и трипсин.

Материалы и реактивы: фосфатный буфер с pH 6,8; 1 % раствор хлорида натрия; 1 % раствор крахмала; 0,5 н раствор соляной кислоты; раствор йода в калия иодиде, таблетки препарата «Холензим».

Приборы и посуда: фарфоровая ступка с пестиком, центрифужные пробирки, центрифуга, термостат, колбы, пипетки, спектрофотометр, холодильник.

Ход работы

Навеску массой 0,1 г таблеток препарата тщательно растирают в ступке с 0,5 мл фосфатного буфера pH 6,8, ополаскивая пестик и ступ-

ку 9,5 мл фосфатного буфера, содержимое переносят в центрифужную пробирку вместимостью 10 мл, оставляют в холодильнике на 30 мин.

Затем содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин при 6000 об/мин.

Надосадочную жидкость отбирают осторожно пипеткой и хранят в холодильнике. Полученный раствор с концентрацией препарата, равной 10 мг/мл, разводят 1 % раствором хлорида натрия до концентрации 4 мг/мл.

В опытную и контрольную пробирки вносят по 2 мл 1 % раствора растворимого крахмала и по 1 мл фосфатного буфера pH 6,8, и ставят их в термостат на 5 мин при 37 °С. Затем в опытную пробирку приливают 1 мл раствора препарата и инкубируют ещё 10 мин. После чего в опытную пробирку прибавляют ещё 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты. В контрольную пробирку вносят 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты и 1 мл раствора препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и отбирают по 1 мл в мерные колбы вместимостью 100 мл, в которые было предварительно налито по 2 мл 0,5 н раствора соляной кислоты. В колбу приливают 80–90 мл воды и 2 мл рабочего раствора йода. Растворы доводят водой до метки, после чего их перемешивают и колориметрируют на спектрофотометре при длине волны 580 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Активность амилазы в таблетке (X, ед) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_k - D_0 \cdot 20 \cdot B}{D_k \cdot C \cdot 10}$$

где: D_k, D₀ – оптическая плотность растворов в контрольных и опытных пробирках; B – средняя масса таблетки, мг; C – количество препарата в пробе, мг; 10 – время инкубации, мин; 20 – количество крахмала, внесённого в опытную и контрольную пробирки, мг.

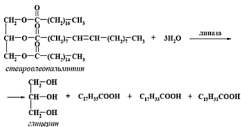
За единицу активности принимают количество препарата, которое расщепляет 1 мг крахмала в течение 1 мин.

Активность амилазы в одной таблетке должна быть не менее 50 ЕД.

2. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ГИДРОЛИЗА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПАНКРЕАТИЧЕСКУЮ ЛИПАЗУ

Гидролиз липидов удобно наблюдать с использованием липазы панкреатического сока. В качестве субстрата можно использовать мо-

локо, липиды которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты, которые можно оттитровать щелочью.



Определение активности липазы применяется в клинической практике после взятия кишечного сока с помощью зонда для установления причины патологии переваривания липидов.

Метод исследования активности липазы необходим для контроля качества лекарственных препаратов: «Панкреатин», «Фестал», «Панзинорм», «Микразим» и др.

Метод основан на титриметрическом определении с помощью гидроксида натрия с индикатором фенолфталеином жирных кислот, освобождающихся из триацилглицеринов молока в процессе их гидролиза панкреатической липазой в присутствии и в отсутствии желчи.

Материалы и реактивы: молоко; желчь; 0,1 М раствор гидроксида натрия; 0,5 % раствор в 76 % этаноле фенолфталеина, панкреатин, свежеприготовленный 5 % раствор на 1 % растворе гидрокарбоната натрия pH 8,0, желчь.

Приборы и посуда: штатив, пробирки, фильтр, цилиндр, колбы, термостат, пипетки, пипетатор, капельницы, бюретка.

Ход работы

В три пронумерованные пробирки отбирают по 5 мл молока и добавляют: в №1 – 1 мл воды; в №2 – 1 мл раствора панкреатина; №3 – 1 мл раствора панкреатина + 5 капель желчи.

Помещают пробы с молоком на 15–20 мин в термостат при 37 °С. После инкубации в пронумерованные стаканчики для титрования отбирают по 3 мл инкубационной смеси, добавляют по 10 мл дистиллированной воды из бюретки и по 2 капли спиртового раствора фенолфталеина. Хорошо перемешивают и титруют 0,1 М раствором натрия

гидроксида до появления слабо-розовой окраски жидкости. Записывайте объемы гидроксида натрия, пошедшие на титрование проб.

Пробы № 1, № 2, № 3 вновь ставят в термостат при 37 °C на 10–15 мин. В процессе гидролитического расщепления жира происходит образование жирных кислот, которые оттитровывают затем 0,1 н раствором NaOH.

Сравнивают объемы 0,1 н щелочи, пошедшие на титрование всех трех пробы откладывая их по времени, вычерчивают кривые титрования.

Изобразить графически динамику расщепления жира липазой для каждой пробы, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат количество 0,1 н раствора NaOH (в мл), израсходованного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данное время.

На основании хода кривых на графике и полученных данных концентрации карбоксильных групп сделать вывод о зависимости активности липазы от присутствия желчных кислот. Отметить зависимость количества образовавшихся свободных жирных кислот от продолжительности ферментативного действия.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие препараты на основе ферментов вам известны, примеры и назначение.
2. Какие ферменты содержат препараты Холензим и Вобэнзим? Показания к их применению.
3. Влияние лекарственных средств на активность ферментов.
4. Химическая модификация ферментов. Виды ферментных препаратов.
5. Прикладная энзимология, основные направления развития и области практического использования ферментов.

Лабораторная работа № 27.

ПОЛУЧЕНИЕ

ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: получить иммобилизованные ферменты.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Широкомасштабное использование ферментов затрудняется тем, что ферменты из-за белковой природы неустойчивы при хранении, термолабильны и их многократное повторное применение затруднительно из-за проблем отделения от продуктов ферментативной реакции. Эти трудности были преодолены с появлением иммобилизованных ферментов.

С появлением иммобилизованных ферментов в медицине были созданы препараты продолжительного действия, с пониженной аллергенностью и решены многие проблемы направленного действия лекарственных веществ.

Например, бинты с иммобилизованными ферментами протеиназами применяются для заживления ран, ожогов; в разработке протезов кровеносных сосудов, сердечных клапанов используются иммобилизованные тромболитические ферменты; применение иммобилизованных ферментов для лечения почечной недостаточности, фенилкетонурии и др.

Иммобилизованные ферменты применяют в качестве избирательных реагентов для определения компонентов биожидкостей, в производстве полусинтетических пенициллинов, в синтезе преднизолона, для удаления лактозы из продуктов для людей с лактазной недостаточностью, в производстве ферментных электродов, для удаления эндотоксинов, при лечении онкологических заболеваний и др.

1. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПАНКРЕАТИНА

Одними из перспективных веществ, которые можно использовать в качестве основы для иммобилизации ферментов, являются полисахариды, например метилцеллюлоза. Глицерин и желатин улучшают пластические свойства и придать его структуре конечного материала прочность.

Материалы и реактивы: глицерин, метилцеллюлоза, панкреатин, желатин, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: рН-метр – милливольтметр, весы электронные, качалка, дозатор, термостат электрический суховоздушный,

колориметр фотоэлектрический концентрационный ФЭК-КФК-2, электролитка.

Ход работы

Приготовление 3 % раствора метилцеллюлозы. Метилцеллюлозу вносят в дистиллированную воду с температурой 55 °С, перемешивают и выдерживают 1,5 часа.

Приготовление 3 % раствора желатина. На 100 мл раствора используют 3 г желатина и 97 мл воды. Желатин заливают небольшим количеством воды, чтобы он набух. Когда желатин набухнет, добавляют оставшуюся воду и нагревают раствор на электролитке до полного растворения желатина при постоянном перемешивании раствора, не допуская кипения. После того, как желатин полностью растворился, раствор охлаждают и далее хранят в холодильнике в течение нескольких суток.

Раствор фермента панкреатина с концентрацией 10 мг/мл.

Приготовление композиции. В полученный коллоидный гель метилцеллюлозы вводят желатин в концентрации от 3 до 8 %, пластификатор—глицерин в концентрации от 0,5 до 1 % от общей массы составляющих композиции.

Затем вносят раствор фермента и перемешивают для равномерного распределения фермента в смеси. Полученную смесь наносят на стеклянную поверхность желаемой формы толщиной от 1 до 3 мм и оставляют при температуре 20 °С до полного высыхания.

2. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПЕПСИНА

Студенты получают сорбенты на основе аэросила и поливинилпирролидона. Получение композиционных сорбентов осуществляют методом формирования пористой структуры кремнезема в присутствии полимера.

Материалы и реактивы: аэросил марки А-380, поливинилпирролидон, пепсин, дистиллированная вода, 0,01 % раствор хлоргексидина биглюконата, 2 % раствор пепсина.

Приборы и посуда: весы технические, шкаф сушильный, колбы и посуда лабораторная, ступки и пестики, сито.

Ход работы

Навеску аэросила А-380 массой 5,0 г смешивают с 2,5 г поливинилпирролидона и по каплям прибавляют 10 мл дистиллированной воды, для образования гидрогеля и оставляют на несколько суток для созревания гидрогеля и выделения лишней воды в результате синерезиса.

Застывший гель ставят в сушильный шкаф и высушивают при температуре 150 °С до получения пористой массы, при этом формиру-

ется корпускулярная структура, состоящая из частиц кремнезема, покрытых органическим полимером, связанных друг с другом в едином пространственном каркасе.

Полученную массу измельчают в ступке и отсеивают фракцию меньше 0,25 мм. Готовят 5% водную суспензию сорбента в количестве 50 мл, добавляют антисептик – 0,01 % хлоргексидина биглюконат и 2 % пепсина. Получают аппликационный препарат фермента.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ФЕРМЕНТОВ К АДСОРБЦИИ

Особенное распространение получили так называемые иммобилизованные ферменты, которые фиксированы, закреплены на каком-либо носителе. В качестве таких носителей применяют разнообразные вещества – целлюлозу и ее производные, частички пористого стекла, гель полиакриламида, сефадексы, нейлон, коллодий, крахмал, алюмосиликаты, окислы металлов и др. Иммобилизация приводит к существенному изменению таких свойств фермента, как стабильность, специфичность, кинетические характеристики.

Материалы и реактивы: слюна, активированный уголь, 1 % раствор крахмала, реактив Фелинга.

Приборы и посуда: ступка и пестик, пробирки, штатив, пипетка, пипетатор, воронка, фильтровальная бумага, термостат.

Ход работы

Разбавить 3 мл слюны в 3 раза и разлить поровну в 2 пробирки. Первую оставить без изменений, а во вторую внести 0,2 г измельченного активированного угля и встряхивать около 5 мин. Затем содержимое обеих пробирок отфильтровать и добавить в каждую по 2 мл 1 % раствора крахмала. Поставить пробирки в термостат при 37 °C на 20–30 мин для гидролиза крахмала. Прodelать с содержимым пробирок пробу Фелинга. Сделать вывод.

4. ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ПЛЕНОК С ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗОЙ

Ферментные пленки можно создавать, либо адсорбируя фермент на готовой пленке и уже на месте вызывая в нем формирование, поперечных сшивок, либо непосредственно сшивая молекулы фермента, что приводит к образованию пленки. Оба метода требуют использования какого-либо бифункционального, реактива, например глутарового альдегида. Пленки поперечно сшитого белка можно приготовить путем сшивания глутаровым альдегидом смеси фермента с инертным белком. Инертный белок применяется для увеличения объема пленки. Ферментные пленки, полученные на основе уже готовых пленок из ацетата

целлюлозы или нитрата целлюлозы, имеют преимущество, так как они могут иметь определенные размеры пор.

4.1. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА В ФОРМИРУЕМУЮ ПЛЕНКУ

Материалы и реактивы: щелочная фосфатаза, бычий сывороточный альбумин, раствор, 60 мг/мл в 0,02 М фосфатном буфере (pH 6,8), глутаровый альдегид, 2,5 % раствор, глицин, 0,1 % раствор с pH 9,0, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: весы, стакан, пипетки, цилиндр, преклянная палочка, стеклянная пластинка, холодильник, ФЭК.

Ход работы

20 мг щелочной фосфатазы растворяют в 13,5 мл раствора бычьего сывороточного альбумина. Добавляют 15 мл раствора глутарового альдегида и осторожно перемешивают. Когда вязкость раствора начинает повышаться, его осторожно наносят на горизонтально расположенную стеклянную пластинку, стараясь, чтобы в раствор не попали пузырьки воздуха. Пласту оставляют при 4 °C на ночь или до тех пор, пока не образуется пленка. Пленку отделяют от стеклянной пластинки, погрузив ее в раствор глицина. Пленку тщательно отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока промывная вода не перестанет поглощать спектр при 280 нм. Пленку хранят при 4 °C.

4.2. ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПРИГОТОВЛЕННЫХ ПЛЕНКАХ

Материалы и реактивы: ацетатцеллюлоза, лист толщиной 30 мкм, щелочная фосфатаза, раствор, 10 мг/мл в 0,02 М фосфатном буфере (pH 6,8), глицин, 0,1 М раствор с pH 9,0 глутаровый альдегид, 2,5 % раствор, который разводят до 2,5 % 0,02 М фосфатным буфером (pH 6,8), дистиллированная вода.

Приборы и посуда: пипетки, цилиндр, холодильник, ФЭК, чашки Петри.

Ход работы

5 мл раствора щелочной фосфатазы наносят на кусок ацетата целлюлозы площадью 10 см² в чашке Петри. Оставляют раствор при 4 °C до высыхания. На пленку наносят 5 мл раствора глутарового альдегида и выдерживают при 4 °C до высыхания. Промывают пленку дистиллированной водой до тех пор, пока промывная вода не перестанет поглощать свет при 280 нм. Пленку хранят во влажном состоянии при 4 °C.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Имобилизованные ферменты. Области применения.
2. Свойства иммобилизованных ферментов.
3. Применение иммобилизованных ферментов.
4. Иммуноферментный анализ.
5. Биосенсоры, их использование.
6. Инженерия биокатализаторов и биокаталитических систем.
7. Что такое рекомбинантные ферменты? Приведите примеры.
8. Методы иммобилизации ферментов (перечислить) и их характеристика. Преимущества и недостатки.
9. Носители, применяемые для иммобилизации биообъектов.
10. Ферментные электроды на основе иммобилизованных ферментов.

Лабораторная работа № 28.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ

ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: рассчитать удельную активность иммобилизованного фермента, сделать вывод о сохранение активности после иммобилизации.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Абсолютная специфичность некоторых ферментов, отличающая их от неорганических катализаторов, обуславливает их уникальность как аналитических реактивов. С помощью ферментов можно определить в смеси наличие конкретного вещества. Ферментативные методы определения концентрации веществ в различных биожидкостях используются в клинической лабораторной диагностике. Так, определяют содержание молочной кислоты, холестерина, глюкозы, мочевины, триацилглицеринов и других веществ.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТА

Материалы и реактивы: натрий фосфорнокислый, 1-замещ., ЧДА, 2-водн., натрий фосфорнокислый, 2-замещ., 12-водн., соляная кислота, панкреатин, хлорид натрия, дистиллированная вода, гидроксид натрия, 0,1 % раствор крахмала.

Приборы и посуда: весы, дозатор, термостат, колориметр фотоэлектрический концентрационный ФЭК-КФК-2, кюветы.

Ход работы

К 0,1 мл раствора фермента панкреатина (15 мг в 500 мл дистиллированной воды) добавляют 1,6 мл фосфатного буферного раствора pH 6,9 и термостатируют 30 минут при температуре 37°C. Параллельно термостатируют 0,1 % раствор крахмала, в 0,9 % растворе хлорида натрия. Для постановки ферментативной реакции к анализируемому раствору панкреатина добавляют 1 мл 0,1 % раствора крахмала в 0,9 % растворе хлорида натрия, смесь термостатируют в течение 5 минут при температуре 37 °C. В качестве контроля используют смесь, в состав которой вместо раствора фермента вносят 0,1мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Ферментативную реакцию останавливают, добавляя 0,1 мл 1М раствора соляной кислоты. Остаточное количество крахмала оценивают по сине-фиолетовой окраске с раствором йода на ФЭК-КФК-2 при длине волны 670 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Исходя из оптической плотности, определяют количество крахмала в растворе и рассчитывают удельную активность фермента. Количество расщепленного крахмала определяют по разности экстинкции контрольной и опытной проб с учетом калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/количество крахмала (мг). Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{1000 \cdot m_{\text{кр}}}{m_{\text{ф}}} \text{ мг крахмала/г фермента,}$$

где, $m_{\text{кр}}$ – масса расщепленного крахмала, мг; $m_{\text{ф}}$ – масса фермента, мг; 1000 – единица перевода мг в г.

Приготовление фосфатного буферного раствора: смешивают 100 мл 0,1 М раствора Na_2HPO_4 и 100 мл 0,1 М раствора NaH_2PO_4 , разводят в 4 раза 0,1 М раствором NaCl .

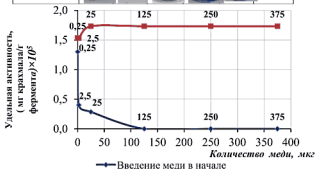
Приготовление раствора йода: раствор готовят разведением в 50 раз 0,2 н раствором соляной кислоты основного раствора, состав которого: 2 г йода, 0,66 г йодида калия в 20 мл воды.

Для анализа иммобилизованного фермента панкреатина используют несколько экспериментальных серий препарата. Исследуемые пробы имеют состав: 1 мл 0,1 % раствора крахмала в 0,9 % растворе хлорида натрия; 1,6 мл фосфатного буферного раствора (pH 6,9). В одни пробы добавляют по 0,1 мл раствора композиционного материала (композиционный материал ($m = 36$ мг), содержащий панкреатин ($m = 0,3$ мг), растворяют в 10 мл дистиллированной воды). В другие пробы добавляют по 0,1 мл раствора растворимого фермента (15 мг в 500 мл дистиллированной воды). В опытную пробу добавляют 1 мл 0,0001 % раствора CuSO_4 в начале реакции, а в контрольную – в конце реакции. Полученные образцы термостатируют 5 минут при температуре 37 °С.

Определяют активность панкреатина. Для этого в анализируемую пробу ($V = 2,75$ мл) помещают композиционный материал ($m = 33$ мг) с иммобилизованным ферментом ($m = 0,003$ мг) и термостатируют 30 минут при 37 °С. Затем прибавляют буферный раствор (pH = 6,9, $V = 1,6$ мл) и раствор субстрата ($V = 1$ мл 0,1 % раствора крахмала) и инкубируют в течение 5 минут. По истечении времени реакцию останавливают подкисленным раствором индикатора йода. Содержание меди определяют качественно по окраске раствора (табл. 53, рис. 4) и количественно на ФЭК-КФК-2 при $\lambda = 670$ нм в кювете толщиной 10 мм.

Таблица 53 – Шкала цветности панкреатина

Концентрация ионов меди, мг /л	1	10	100	500	1000	1500
D, при $\lambda = 670$ нм	0,740	1,070	1,100	1,198	1,200	1,200
Цвет раствора						

Рис. 4. Влияние количества ионов Cu^{2+} на панкреатин

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Адсорбция ферментов на инертных носителях и ионообменных смолах как вариант их стабилизации и использования в различных процессах.
2. Иммобилизация индивидуальных ферментов, ферментных комплексов и клеток продуцентов, ее значение.
3. В чём сущность метода иммобилизации ферментов путем включения в структуру геля.
4. Гелеобразующие вещества органической и неорганической природы.

5. Иммобилизация биообъектов путем включения в структуру геля.
6. Иммобилизация лекарственных средств и ее особенности. Ассортимент применяемых в медицине иммобилизованных препаратов.
7. Использование иммобилизованных ферментов в разделении рацематов аминокислот, в лечебном питании (иммобилизованная бета-галактозидаза, иммобилизованная глюкоизомераза).
8. Использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических бета-лактамных антибиотиков.
9. Использование иммобилизованных ферментов при трансформации стероидов, биокаталитическом получении простаноидов.

Лабораторная работа № 29.

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить технику получения микрокапсул с ферментами, освоить основные способы получения липосом и методы их исследования.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Микрокапсулирование заключается в отделении фермента от субстрата полупроницаемой мембраной, пропускающей маленькие молекулы субстрата, и не пропускает крупные молекулы фермента.

Микрокапсулы с включенными в них ферментами можно получить различными способами. При двойном эмульгировании водная эмульсия полимера содержит мелкие капли водного раствора фермента. Со временем полимер твердеет, образуя частицы с иммобилизованным ферментом. В случае использования водонерастворимого отверждающего полимера, метод заключается во включении фермента в жидкие мембраны.

1. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Материалы и реактивы: бычий панкреатический α -химотрипсин (ХТР), поли-L-лизин (PLL), бычий трипсин, альгинат натрия (Alg), N-Benzoyl-L-tyrosineethyl ester (BTTEE); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); трис-буфер; хлорид кальция; 0,33 М карбонат натрия; ,33 М хлорид натрия.

Приборы и посуда: весы технические, шкаф сушильный, колбы и посуда лабораторная, ступки и пестики, центрифуга, сито, шейкер, спектрофотометр.

Ход работы

1.1. ПОЛУЧЕНИЕ ПОРИСТЫХ КАРБОНАТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ

Водный 0,33 М раствор карбоната натрия (15 мл) добавляют при быстром перемешивании (400–900 об/мин) к 15 мл 0,33 М водного раствора хлорида кальция. После перемешивания в течение 60 сек, суспензию образовавшихся сферических микрочастиц оставляют на 5 минут до кристаллизации карбоната кальция. Далее осадок CaCO_3 промывают трижды дистиллированной водой и фильтруют, затем промывают еще раз этиловым спиртом или ацетоном, после чего сушат 1,5 ч

при 50–60 °С. Полученные микрочастицы CaCO_3 хранят в герметично закрытой пробирке при комнатной температуре.

1.2. ВКЛЮЧЕНИЕ ХИМОТРИПСИНА В КАРБОНАТНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ МЕТОДОМ СОРБЦИИ В ПОРАХ

Микрочастицы CaCO_3 (50–100 мг, средний диаметром 5 мкм) суспендируют в 1 мл раствора фермента (1, 5 или 10 мг/мл) в воде. После инкубации на шейкере (1200 мин⁻¹) в течение 2 часов, микрочастицы осаждают центрифугированием (1600 g, 5 мин) и отделяют супернатант. Далее частицы дважды промывают водой (1 мл), используя центрифугирование (1600 g, 5 мин)/ресуспендирование.

1.3. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

Микрокапсулы получают на CaCO_3 частицах последовательной адсорбцией Alg (2 мг/мл) и PLL (2 мг/мл) в 0,02 N NaCl. Для этого 100 мг микрочастиц CaCO_3 помещают в 2 мл раствора Alg в 0,02 M NaCl, встряхивают в течение 15 минут на шейкере (1200 мин⁻¹), отделяют центрифугированием и дважды промывают в 0,02M NaCl. Затем полученные частицы помещают в 2 мл раствора PLL и снова инкубируют на шейкере, как описано выше. При агрегации частиц между собой в процессе адсорбции ПЭ, суспензию микрочастиц подвергали обработке ультразвуком на генераторе УЗДН-А в течение нескольких секунд. После последовательного нанесения 3-х слоев Alg и 3-х слоев PLL, полученные микрочастицы помещают в 2 мл 0,2 M ЭДТА, pH 7,0 на 5 мин, интенсивно встряхивают и осаждают центрифугированием. Манипуляцию повторяют несколько раз до полного растворения карбонатной матрицы, промывали 3 раза водой в течение 5 минут и хранят в виде суспензии при 4 °С.

1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В МИКРОЧАСТИЦАХ И РАСТВОРА

Определения концентрации белка в растворах проводят спектрофотометрически с учетом коэффициента экстинкции для ХТР (E2801 % = 20,4). Эффективность включения (иммобилизации) белка определяли по разности оптической плотности в исходном растворе и супернатанте после сорбции белка в микрочастицах.

1.5. ИЗМЕРЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХИМОТРИПСИНА

Определение протеолитической активности нативного ХТР и ХТР, иммобилизованного в микросферах (Alg/PLL)3, проводят по методике, используя в качестве субстрата BTEE. Для этого к 0,3 мл раствора субстрата добавляют 40 мкл раствора ХТР или 40 мкл суспензии

микросфер с включенным в них ХТР, содержащих равное количество белка. Прирост оптической плотности регистрируют спектрофотометрически при длине волны 256 нм через 5 минут. Пробу с суспензией осторожно перемешивают и перед измерением плотности отделяли микрокапсулы от супернатанта.

2. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Другим вариантом включения ферментов в мембраны являются липосомы. Липосомы представляют собой сферы построенные из двойных фосфолипидных слоев. Липосомы применяют в медицине в фундаментальных исследованиях в качестве системы, имитирующей клетки, являются средствами доставки биоактивных молекул, лекарственных средств, противоопухолевых и противомикробных препаратов, гормонов, ферментов, вакцин и др. Преимуществом липосом как лекарственной формы является постепенное освобождение лекарственных веществ заключенных в них, это пролонгирует время действия лекарства. Преимущество липосом – биосовместимость, обусловленная сходством химического состава липосомы с мембранами клеток. Еще одно важное свойство липосом – это их универсальность. Можно варьировать размеры, характеристики и состав поверхности липосом в широких пределах.

2.1. ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЦ ПУТЕМ ВНЕШНЕГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ

Материалы и реактивы: 1,5 % раствор фукоидана, 0,5 М растворы CaCl_2 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnCl_2 , BaCl_2 , и 0,5 М взвесь CaCO_3 , трипсин, 0,1 М HCl , 200 мМ Tris-HCl , 0,85% NaCl , 10 % раствор сахарозы, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: шейкер, колба, центрифуга, центрифужные пробирки, весы, пипетка, пипетатор.

Ход работы

Раствор фукоидана, с растворенным в нем ферментом, вносят в раствор сшивающего агента по каплям при постоянном перемешивании 600 об/мин в течение 30 мин. Частицы центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин, промывают. Для определения стабильности взвешивают 0,1 г частиц и вносят в 10 мл буферного раствора (0,1 М HCl , 200 мМ Tris-HCl , 0,85 % NaCl , 10 % сахарозы, вода).

2.2. ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЦ ПУТЕМ ВНЕШНЕГО И ВНУТРЕННЕГО ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ В ГИДРОФОБНОЙ СРЕДЕ

Материалы и реактивы: раствор полисахарида, раствор фермента, гексан, циклотетикон, 0,1 М HCl , 200 мМ Tris-HCl , 0,85 % NaCl , 10 % раствор сахарозы, дистиллированная вода.

Приборы и посуда: шейкер, колба, пипетка, пипетатор, центрифуга, весы.

Ход работы

Раствор полисахарида, с растворенным в нем ферментом, вносят в 25 мл гексана, при постоянном перемешивании в течение 5 мин, добавляют 0,25 мл стабилизатора (циклометикон / Salcare SC 80) и продолжают перемешивание в течение 30 мин. Центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин, промывают. Для определения стабильности взвешивают 0,1 г частиц и вносят в 10 мл буферного раствора (0,1 М HCl, 200 мМ Tris-HCl, 0,85 % NaCl, 10 % сахарозы, H₂O).

2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМИЗ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА

Метод основан на экстракции горячим этанолом фосфатидилхолина из яичного желтка с последующим осаждением ацетоном и на способности фосфолипидов образовывать на поверхности раздела двух фаз (вода – липиды) тонкий бимолекулярный липидный слой сферической формы.

Материалы и реактивы: 96 % спирт; ацетон; фосфатный буфер, яичный желток; спиртовой раствор фосфатидилхолина, трипсин.

Приборы и посуда: пробирки, водяная баня, термометр, фильтровальная бумага, воронка, стакан, микроскоп, предметные стекла, весы, шейкер.

Ход работы

Поместить в пробирку 1г яичного желтка, добавить 5 мл кипящего спирта (для этого спирт предварительно помещают в водяную баню с температурой 75–78 °C), перемешивать содержимое пробирки 10 минут на шейкере.

По окончании извлечения жидкость фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят реакцию на фосфатидилхолин с ацетоном, для чего к 10 каплям ацетона прибавляют по каплям фильтрат. Постепенно жидкость мутнеет вследствие осаждения нерастворимого в ацетоне фосфатидилхолина.

К 3–4 мл полученного ранее спиртового раствора фосфатидилхолина добавляют равный объем фосфатного буфера с pH 6,8, с растворенным в нем ферментом и интенсивно диспергируют (встряхивают) в течение не менее 10 минут.

Каплю полученной жидкости – взвеси липосом – наносят на предметное стекло и микроскопируют при малом увеличении (объектив №8). Наблюдают липосомы с включенным в них ферментом в виде везикул.

Приборы и посуда: шейкер, колба, пипетка, пипетатор, центрифуга, весы.

Ход работы

Раствор полисахарида, с растворенным в нем ферментом, вносят в 25 мл гексана, при постоянном перемешивании в течение 5 мин, добавляют 0,25 мл стабилизатора (циклометикон / Salcare SC 80) и продолжают перемешивание в течение 30 мин. Центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин, промывают. Для определения стабильности взвешивают 0,1 г частиц и вносят в 10 мл буферного раствора (0,1 М HCl, 200 мМ Tris-HCl, 0,85 % NaCl, 10 % сахарозы, H₂O).

2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМИЗ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА

Метод основан на экстракции горячим этанолом фосфатидилхолина из яичного желтка с последующим осаждением ацетоном и на способности фосфолипидов образовывать на поверхности раздела двух фаз (вода – липиды) тонкий бимолекулярный липидный слой сферической формы.

Материалы и реактивы: 96 % спирт; ацетон; фосфатный буфер, яичный желток; спиртовой раствор фосфатидилхолина, трипсин.

Приборы и посуда: пробирки, водяная баня, термометр, фильтровальная бумага, воронка, стакан, микроскоп, предметные стекла, весы, шейкер.

Ход работы

Поместить в пробирку 1г яичного желтка, добавить 5 мл кипящего спирта (для этого спирт предварительно помещают в водяную баню с температурой 75–78 °C), перемешивать содержимое пробирки 10 минут на шейкере.

По окончании извлечения жидкость фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят реакцию на фосфатидилхолин с ацетоном, для чего к 10 каплям ацетона прибавляют по каплям фильтрат. Постепенно жидкость мутнеет вследствие осаждения нерастворимого в ацетоне фосфатидилхолина.

К 3–4 мл полученного ранее спиртового раствора фосфатидилхолина добавляют равный объем фосфатного буфера с pH 6,8, с растворенным в нем ферментом и интенсивно диспергируют (встряхивают) в течение не менее 10 минут.

Каплю полученной жидкости – взвеси липосом – наносят на предметное стекло и микроскопируют при малом увеличении (объектив №8). Наблюдают липосомы с включенным в них ферментом в виде везикул.

Лабораторная работа № 30.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ В НЕТРАДИЦИОННЫХ СРЕДАХ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить процесс гидролиза масла панкреатической липазой включенной в обращенные мицеллы ПАВ.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Широкому использованию ферментов на практике мешает то, что, они приспособлены для функционирования в водных растворах. Известно, что многие химические реакции термодинамически направлены в сторону желаемого продукта лишь в определенных органических растворителях. Вследствие этого в последние годы сильно возрос интерес к проблемам биокатализа в неводных средах.

1. ГИДРОЛИЗ ОЛИВКОВОГО МАСЛА ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗОЙ

Многие ферменты сохраняют ферментативную активность при включении их в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях.

Материалы и реактивы: раствор детергента, 1 % панкреатическая липаза, оливковое масло; 0,02 н спиртовой раствор NaOH; 1 % спиртовой раствор фенолфталеина, ПАВ (АОТ, Твин-20, Бридж, Тритон-100).

Посуда и приборы: пробирки или бюксы с крышками; пипетки; цилиндры; бюретка; термостат; термометр, пипетатор, автоматический дозатор.

Ход работы

Для приготовления раствора субстрата готовят 0,1 М/л раствор оливкового масла, используя в качестве растворителя гексан или петролейный эфир (возможно также использование в качестве растворителя пентана, гептана или октана), который содержит ПАВ в концентрации 0,05 М.

Для включения фермента в обращенные мицеллы в ряд пробирок помещают по 1 мл раствора субстрата, в каждую добавляют из дозатора по 10 мкл 1 % раствора фермента в трис-HCl-буфере (рН 8,0, концентрация буфера 0,1 М). Смесь интенсивно встряхивают и выдерживают в течение 60 мин при температуре 37 °С. Отбор проб осуществляют каждые 15 мин. Для этого часть пробирок вынимают из термостата и охлаждают до температуры 20 °С, содержимое пробирок тщательно перемешивают и определяют количество выделившейся кисло-

ты титриметрическим методом. Образовавшуюся в ходе реакции олеоновую кислоту оттитровывают спиртовым раствором NaOH (0,02 н раствор в 80 % этиловом спирте) с фенолфталеином до устойчивой (не исчезающей в течение 1 мин) розовой окраски.

Контроль не содержит фермента, фермент добавляют в контрольную пробу непосредственно перед титрованием.

Выход жирных кислот определяют следующим по формуле:

$$B = \frac{20 \cdot K \cdot q}{C},$$

где В – выход жирных кислот, мкмоль/мг; К – коэффициент титрования; q – количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование ЖК, выделившихся в процессе реакции за время t (мин); 20 – коэффициент пересчета в мкмоль жирных кислот, найденный расчетным путём; С – количество фермента, мг.

$$q = A - B$$

где А – количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование опытной пробы, мл; В – количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл.

Липолитическую активность рассчитывают по следующей формуле:

$$V = \frac{20 \cdot K \cdot q}{C \cdot t},$$

где V – липолитическая активность, мкмоль/(мг·единица времени); К – коэффициент титрования; q – количество раствора щёлочи, пошедшее на титрование ЖК, выделившихся в процессе реакции за время t; 20 – коэффициент пересчета в мкмоль жирных кислот, найденный расчетным путём; С – количество фермента, мг.

Полученные данные занести в таблицу 54.

Таблица 54 – Результаты гидролиза

ПАВ	Выход жирных кислот мкмоль/мг фермента за время реакции:			
	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин

Определить какой ПАВ позволяет максимально сохранить активность фермента. Сделать выводы.

2. СИНТЕЗ ВОСКОПОДОБНЫХ ЭФИРОВ С ПОМОЩЬЮ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ В СРЕДЕ ОРГАНИЧЕСКОГО РАСТВОРИТЕЛЯ

Материалы и реактивы: гексан, петролейный эфир; панкреатическая липаза в порошке; цетиловый спирт; 0,05 М раствор лауриновой кислоты в органическом растворителе; 0,02 н раствор NaOH в 80 % этиловом спирте; смесь для ТСХ – гексан (петролейный эфир):диэтиловый эфир:уксусная кислота (лед) в соотношении 80:20:1; 1 % раствор фенолфталеина в 80 % этиловом спирте; 20 % раствор сульфата аммония.

Посуда и приборы:пробирки,пипетки, цилиндры; бюретка; термостат; термометр; пластины для ТСХ; камера для ТСХ, штатив.

2.1. СИНТЕЗ ЭФИРА ЛАУРИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЦЕТИЛОВОГО СПИРТА В ГЕКСАНЕ

Для изучения возможности синтеза воскоподобных эфиров, с помощью панкреатической липазы, в качестве среды реакции подходят гексан или петролейный эфир.

Ход работы

В 4 пробирки помещают по 10 мг гидрофильно высушенного фермента и добавляют по 2 мл субстратной смеси, содержащей цетиловый спирт и лауриновую кислоту в концентрациях 0,05 М. Контроль не содержит фермента. Фермент добавляют непосредственно перед титрованием.

Пробирки тщательно закрывают, перемешивают и выдерживают в термостате в течение 6, 12 и 24 ч при температуре 30 °С. По истечении времени выдержки проводят титрование контрольной и опытной пробы 0,1 н раствором NaOH в 80 % спирте, с использованием в качестве индикатора фенолфталеина (1 % раствор в 80 % спирте), до появления устойчивой розовой окраски.

Количество образовавшегося эфира (в %) определяют исходя из количества кислоты, пошедшей на реакцию по формуле:

$$K = \frac{(A - B) \cdot 100}{A}$$

где А – количество раствора щелочи (мл) пошедшее на титрование контрольной пробы; В – количество раствора щелочи, пошедшее на титрование опытной пробы; 100 –коэффициент пересчета в %.

2.2. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ВОСКОПОДОБНОГО ЭФИРА МЕТОДОМ ТСХ

Тонкослойная хроматография – это один из методов хроматографии, основанный на разделении анализируемых компонентов при перемещении подвижной фазы в тонком слое сорбента, нанесенного на подложку. К преимуществам метода ТСХ относится быстрота выполнения анализа, простота, доступность, использование небольших количества анализируемого вещества, что делает ТСХ приемлемым методом при идентификации различных веществ. На проведение ТСХ влияют растворитель, тип сорбента, вид проявителя и условия анализа. Разделяемые компоненты образуют на поверхности сорбента пятна или полосы, положение которых на хроматограмме характеризуется величиной R_f . Идентификацию компонентов проводят по величине R_f , форме, окраске пятен и их свечения в ультрафиолетовом свете. Для идентификации при ТСХ наносят образцы веществ-свидетелей, стандартов. На рисунке 5 приведены схемы и техника выполнения анализа ТСХ.



Рис. 5. Проведение хроматографического анализа

где 1 – крышка хроматографической камеры; 2 – хроматографическая камера; 3,4,5 – различные участки хроматографической пластины; 6 – подвижный растворитель (система)

Ход работы

Хроматографию смеси с полученными воскоподобными эфирами проводят по восходящему методу в системе растворителей – гек-

сан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (ледяная) 80:20:1 используя пластинки «Silufol», «Сорбифол».

На стартовую линию силикагелевой пластинки «Silufol» наносят 10 мкл анализируемого раствора и 10 мкл контрольного раствора. Элюирование проводят по восходящему методу до высоты 110 мм (продолжительность элюирования 25–35 мин).

Пластинки подсушивают при комнатной температуре в течение нескольких минут, затем обрызгивают 20 % раствором сульфата аммония и нагревают в сушильном шкафу при температуре 160–180 °С в течение 5–15 мин. Липиды образуют темные пятна. Рассчитывают значение R_f по формуле:

$$R_f = a/b$$

где a – расстояние, пройденное веществом от места нанесения (старта) до границы растворителя; b – расстояние, пройденное фронтом растворителя

Идентификацию проводят, сравнивая опытную пробу с контрольной и по значениям R_f , описанным в таблице 55.

Таблица 55– Характерные значения R_f воскоподобных эфиров в системе гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (ледяная) 80:20:1

Вещество	R_f
Цетиловый спирт	0,19–0,22
Жирная кислота	0,38–0,39
Воскоподобный эфир	0,88–0,9

Сделать выводы по проделанной работе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое биокатализ в неводных средах? Растворители, используемые для проведения ферментативных реакций в неводных средах.
2. Микрогетерогенные системы. Мицеллярные системы.
3. Макрогетерогенные системы (системы жидкость:жидкость).
4. Макрогетерогенные системы (системы жидкость:твердая фаза).
5. Применение ферментов в неводных средах.
6. Ферменты в органическом синтезе.
7. Ферментативный микроанализ.

А

АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление молекулы АТФ. Мембранные АТФ-азы, например, ведут гидролиз АТФ, обеспечивающей энергией процессы активного транспорта. Описаны Na^+ и K^+ – зависимые АТФ-азы, «работающие» только в присутствии этих ионов и обеспечивающие перенос K^+ внутрь клеток и выход из них Na^+ . АТФ-азной ферментативной активностью обладает и белок мышц – миозин. Свойства миозиновой АТФ-азы необычны. В различных условиях она функционирует либо как K^+ – АТФ-аза, либо Mg^{2+} – АТФ-аза, либо Ca^{2+} – АТФ-аза. Механохимическая реакция миозина на АТФ и его АТФ-азная активность были открыты советскими учеными В.А. Энгельгардом и М.Н. Любимовой.

Активаторами мышечной А. являются ионы кальция, ингибиторами – тяжелые металлы (медь, ртуть).

АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ – химические вещества, присутствие которых в среде повышает каталитическую активность ферментов. А.ф. либо увеличивает число активных групп в каталитическом центре фермента, либо противодействует ингибиторам. А.ф. являются чаще всего ионы металлов. Один микроэлемент может активировать работу различных ферментов. И наоборот один фермент может быть активирован различными микроэлементами.

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА – способность фермента изменять определенное количество субстрата за единицу времени. За единицу активности фермента считать такое количество фермента, которое изменяет 1 мкмоль (1 моль = 10⁶ мкмоль) субстрата за 1 мин при 25 С.

АКТИВНЫЙ ЦЕНТР – участок молекулы фермента, с которым связывается субстрат. За счет этой связи и происходит изменение субстрата.

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА – фермент класса оксидоредуктаз. В роли кофакторов в А. выступает НАД и Zn^{2+} . Например, в заключительной реакции спиртового брожения ацетальдегид восстанавливается до этанола под действием фермента алкогольдегидрогеназы, роль восстановителя играет при этом $\text{НАДН} + \text{H}^+$.

Повышенное содержание А. отмечается в дрожжах, печени быка, зернах высших растений.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР – ингибитор, вызывающий обратимые изменения в форме активного центра молекулы фермента, за счет чего последняя временно теряет свою активность.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТ – фермент, действие которого «по определению» (аллос – иной, стереос – форма) связано с изменением формы.

АЛЬДОЛАЗА – фермент класса лиаз, катализирующий обратимое расщепление фруктозо-1,6-дифосфата с образованием фосфоглицеринового альдегида и фосфодиацетона.

Данная реакция протекает при гликолизе и брожении. А. катализирует реакцию альдольной конденсации (например: фосфодиацетона с уксусным альдегидом).

А. встречается в клетках всех живых организмах, наиболее богаты А. дрожжи, мышцы, почки и печень. Молекулярный вес альдолазы из скелетной мышцы равен 150000. Молекула этого фермента состоит из 4 субъединиц. В кислой среде фермент диссоциирует на неактивные субъединицы; при нейтрализации среды субъединицы легко и самопроизвольно восстанавливаются, образуя активный фермент. А. содержит свободные –SH– группы; некоторые из них играют важную роль в ее каталитической активности.

АМИЛАЗЫ (альфа- и бета-амилазы) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз гликозидных связей полисахаридов (крахмала, гликогена и продуктов их расщепления).

альфа-А. являются металлопротеидами, в их состав входят кальций и цинк. альфа-А. гидролизует альфа-1,4-гликозидные связи в полисахаридной цепи, при этом главным продуктом расщепления являются α -декстрины.

бета-А. гидролизует альфа-1,4-гликозидные связи в крахмалоподобных полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от передущих концов цепи.

АМИНОПЕПТИДАЗА – фермент, который при действии на полипептидные цепи поочередно освобождает N-концевые аминокислоты. А. содержится в панкреатическом соке тонкого кишечника и экскретах слизистой.

АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ – группа ферментов, катализирующих перенос аминогруппы с альфа-аминокислоты на альфа-кетокислоту (реакция переаминирования). А. – двухкомпонентные ферменты, содержащие в качестве кофермента пиридоксальфосфат

А. содержатся во всех тканях живого организма. Повышенное содержание А. в сыворотке крови характеризует протекание патологи-

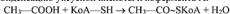
ческих процессов (заболевания печени, поджелудочной железы, мышц).

АНТИВИТАМИНЫ – группа органических соединений, близкие по химическому строению соответствующим витаминам и занимающие их место в биологических процессах, в которых участвуют данные витамины. Характерными представителями А. являются сульфаниламидные препараты.

АПОФЕРМЕНТ – белковая составная часть двухкомпонентного фермента, неактивная в отсутствии кофактора. А. определяет субстратную специфичность, т.е. выбор субстрата, превращение которого будет катализировать данный фермент.

АСКОРБИНАТОКСИДАЗА – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий реакцию окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую. Акцептором водорода является кислород. А. катализирует также окислительно-восстановительные реакции с участием ди- и полифенолов. А. металлопротеид (содержит медь).

АЦЕТИЛ-КоА-СИНТЕТАЗА – фермент класса лигаз, катализирующий конденсацию уксусной кислоты и кофермента А.



Б

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА – органические молекулы, активность которых связана с конформационными особенностями их структуры. БАВ принимают участие в регуляции обменных процессов, являются носителями информации о состоянии нервных и гуморальных регуляторных систем при различных состояниях организма. Любая модификация структуры изменяет активность БАВ. К основным БАВ относятся ферменты, витамины, гормоны, нуклеиновые кислоты, различные метаболиты.

БИОТИН (*витамин Н*) – водорастворимый витамин, ростовой фактор дрожжей и некоторых других микроорганизмов. В основе строения Б. лежит тиоловое кольцо, к которому присоединена мочевиная, а боковая цепь представлена валерьяновой кислотой.

Б. представляет собой кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и спирте. Это очень устойчивое соединение, биологическая активность которого не меняется при кипячении растворов и при доступе кислорода. Б. необходим для синтеза пуринов на стадии фиксации CO_2 . Б. участвует в реакциях обратимого карбоксилирования пировиноградной кислоты, декарбоксилирования сукцинилкофермента А и др.

В

ВИТАМИНЫ – незаменимые для жизни органические вещества разнообразной структуры, являющиеся биологическими катализаторами химических реакций или реагентами биохимических процессов, протекающих в клетке, и участвующие в обмене веществ, как правило, в соединении со специфическими белками в составе ферментных систем.

Г

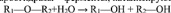
ГЕКСОКИНАЗА – фермент класса трансфераз, катализирующий перенос фосфатных групп с аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) или др. полифосфатов на гексозы. При этом образуются эфиры гексозо-6-фосфаты и АТФ. Эти реакции – начальная стадия гликолиза. Активатор – Mg^{2+} .

Катализирует образование глюкозо-6-фосфата из глюкозы в ходе гликолиза. Приставка гексо означает, что фермент катализирует фосфорилирование не только глюкозы, но и других гексоз.

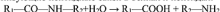
ГИДРОЛАЗЫ – класс ферментов, катализирующих процессы расщепления сложных органических веществ с участием воды (гидролиз). Различают 9 подклассов, из которых наиболее значимы: эстеразы, карбогидразы, пептидгидролазы, амидазы. Эстеразы – ферменты, расщепляющие сложноэфирные связи:



К этому подклассу относятся липазы, фосфатазы, пектинэстеразы. Карбогидразы – ферменты, катализирующие гидролиз углеводов:



К карбогидразам относятся альфа- и бета-глюкозидазы, альфа- и бета-галактозидазы, амилазы др. Пептидгидролазы – ферменты, гидролизующие пептидные связи в белках и пептидах:



К ним относятся пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, аминопептидаза, дипептидазы. Амидазы – гидролитические ферменты, действующие на C—N связи, отличные от пептидных. Например, уреазы катализируют реакцию:



ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗА – фермент, катализирующий образование глутамина из глутаминовой кислоты. Г. строго специфична в отношении глутаминовой кислоты. Активаторы: Mg^{2+} , Mn^{2+} .

Д

ДЕГИДРОГЕНАЗЫ – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие окислительно-восстановительные реакции в организме, протекающие с отнятием водорода от окисляемых субстратов. Содержатся во всех живых клетках. Аэробные Д., передающие водород непосредственно кислороду, называют оксидазами (ксантиноксидаза, цитохромоксидаза). Аэробные Д. передают водород промежуточным акцепторам. В состав Д. входят коферменты НАД, НАДФ, ФАД, ФМН. Д. катализируют реакции окисления различных субстратов при гликолизе, в цикле трикарбоновых кислот, при β -окислении жирных кислот и др.

ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ – ферменты, катализирующие отщепление CO_2 от карбоксильной группы аминокислот или кетокислот. Коферментами их являются пиридоксаль-5-фосфат (D-аминокислот) и тиаминпирофосфат (D-кетокислот). Д. обладает специфичностью и процесс, который протекает с их участием называют декарбоксилированием. Декарбоксилирование бывает прямое и окислительное. В результате прямого Д. происходит распад аминокислот в тканях и кишечнике с образованием аминов.

Важное значение в процессах обмена веществ имеет окислительное Д. (после Д. происходит дегидрирование). Таким путем расщепляются α -кетокислоты, образующиеся в организме при обмене углеводов, жиров, аминокислот. В результате окислительного Д. выделяется энергия, которая запасается в макроэргических связях АТФ.

Е

ЕНОЛАЗА – фермент, катализирующий обратимую реакцию превращения 2-фосфоглицериновой кислоты в фосфоенолпировиноградную кислоту с отщеплением воды от молекулы кислоты. Эта реакция является важным этапом в процессе анаэробного распада углеводов в организме. В тканях животных Е. активизируется ионами Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Е. – белок, выделенный в виде кристаллов.

И

ИЗМЕНЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА – все изменения активности фермента, происходящие при его постоянном количестве в системе.

ИЗОМЕРАЗА – класс ферментов, катализирующих реакции внутримолекулярного перемещения различных групп, связей, взаимопревращение различных изомеров: цис-, транс- изомеров, кетоенольных таутомеров и др.

К И. например относится триозофосфатизомераса (катализирует обратимую реакцию между 3-фосфоглицериновым альдегидом и фосфодиоксиацетоном).

ИЗОФЕРМЕНТЫ (*ИЗОЭНЗИМЫ*, *ИЗОЗИМЫ*) – множественные формы одного и того же фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по физико-химическим и др. свойствам. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц. Комбинация различных типов субъединиц дает 5 И. лактатдегидрогеназы.

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА (pI) – кислотность среды (pH), при которой определённая молекула или поверхность не несёт электрического заряда. Каждый фермент обладает своим значением pI, и оно является константой.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ – ферменты, адсорбированные на твердом носителе, образующем нерастворимый комплекс с данным ферментом. И.ф. могут храниться в течение длительного времени при повышенной температуре без потери активности. В качестве инертного носителя используют крахмальный или полиакриламидный гель, агарозу, сефадекс, модифицированные силикагели. При подборе соответствующего носителя можно получить И.ф. с высокой активностью устойчивой к действию различных денатурирующих агентов. Колонка, наполненная И.ф., может быть многократно использована для проведения соответствующей ферментативной реакции. Имобилизованные препараты трипсина или химотрипсина дают возможность выделять специфические ингибиторы этих ферментов на колонках, содержащих И.ф., а также разделять специфические антитела к ферментам в иммунных химических исследованиях. И.ф. используются в биохимическом анализе и биохимической технологии.

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ – химические вещества или факторы, замедляющие или полностью останавливающие биохимические реакции. Некоторые ингибиторы имеют строение, сходное с нормальным субстратом. Молекулы фермента взаимодействуют с такими И.ф., образуя прочный комплекс, и не могут по этой причине реагировать с нормальным субстратом. Ингибирование может быть конкурентным и бесконкурентным. Конкурентные И.ф. затрудняют присоединение субстрата к активному центру фермента, так как обладают иногда более высоким сродством к нему. Степень ингибирования определяется соотношением молекул И.ф. и субстрата. Классическим примером служит малоновая кислота – трехуглеродная дикарбоновая кислота. Она выступает в качестве конкурентного ингибитора сукци-

натдегидрогеназы, субстратом которой является янтарная – дикарбоновая, трехуглеродная кислота. Ингибитор оказывается очень сильным: достаточно присутствия в среде в 50 раз меньшего количества малоновой кислоты по сравнению с янтарной, чтобы ингибирование достигло 50%.

Ферменты, для активности которых необходимы ионы металлов, неконкурентно ингибируются агентами, связывающими эти ионы. Так, например, некоторые ферменты активны лишь в присутствии ионов Fe^{2+} или Fe^{3+} , ингибируются цианидом вследствие образования комплексов типа ферро- или феррицианида.

Часто И.ф. являются продукты катализируемой реакции. Этим предотвращается возможность накопления продуктов реакции в излишне большой концентрации.

К

КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ – ферменты, катализирующие гидролитическое отщепление $COOH$ – концевых аминокислотных остатков в пептидах. **К.** выделяются поджелудочной железой и попадают в кишечник в виде неактивных предшественников – прокарбоксипептидаз, которые активируются до **К. А** и **В** (активатор – трипсин). **К. А** гидролизует все $COOH$ –концевые пептидные связи, за исключением тех, которые образованы аминогруппами дикарбоновых аминокислот или пролина. **К.В** отщепляет от пептидов $COOH$ –концевые остатки лизина и аргинина. **К.** обеспечивает расщепление промежуточных продуктов переваривания белков до свободных аминокислот. Коферментом **К. А** является Zn^{2+} , в отсутствие которого активность **К.** полностью утрачивается, но восстанавливается при введении в среду Zn^{2+} .

КАТАЛАЗА – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода.

К. разлагает перекись водорода, образующийся в живой клетке, и защищает организм от неблагоприятного его действия. **К.** сложный белок, содержащий ферропротопорфирин в виде гема, прочно связанного с белком. Оптимальные значения pH 6,8–8,0. Ингибиторы – сульфиды, цианиды, азиды и гидроксиламин. **К.** встречается во многих клетках растений и животных, в т. ч. в эритроцитах, клетках печени, обнаружена почти у всех бактерий – аэробов.

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ или удельная активность фермента – задается отношением активности фермента к его массе, вступившей в реакцию.

КОЛИЧЕСТВО ОБОРОТОВ – количество молекул субстрата измененных с помощью одной молекулы фермента за 1 секунду.

КОМПАРТМЕНТАЦИЯ – разделение метаболических процессов так, чтобы они происходили независимо друг от друга и не вмешивались в процессы, происходящие в каждом из них.

КОНСТАНТА СКОРОСТИ РЕАКЦИИ – коэффициент пропорциональности, выражающий скорость химической реакции при концентрации реагирующих веществ, равной 1 моль/л.

КОФЕРМЕНТ А (КоА, КоА-SH или *Коэнзим А*) – название это дано потому, что кофермент А входит в состав ферментов, катализирующих процесс активирования, а также перенос ацетильного радикала $-COCH_3$. Позже было установлено, что КоА активирует и переносит также другие кислотные остатки (ацилы). В основе его структуры лежит остаток 3-фосфоаденозин-5-дифосфата, соединенный с остатком пантотеновой кислоты, азот которой в свою очередь связан с остатком тирозиламина:

Реакционноспособным участником молекулы КоА в биохимических реакциях выступает SH-группа. Отсюда принято сокращенное обозначение КоА в виде КоА – SH. КоА принимает участие:

- в окислении и биосинтезе жирных кислот;
- в окислительном декарбоксилировании α -кетокислот;
- в цикле трикарбоновых кислот;
- в процессе биосинтеза нейтральных липидов, фосфатидов;
- в процессе биосинтеза стероидных гормонов;
- в синтезе гема гемоглобина;
- в синтезе ацетилхолина.

КОФЕРМЕНТЫ – дополнительная группа, которая легко отделяется от апофермента при диссоциации. Ферменты, у которых связь между кофактором и пептидной цепью является слабой, диссоциирует и изолированные белковый компонент оказывается лишенным ферментативной активности, пока не будет вновь добавлен извне кофактор. Представителями таких К. являются производные витаминов В₁, В₂, В₆, РР. Следует учитывать, что разницу между простетической группой и коферментом нельзя абсолютизировать, так как в одних случаях, кофактор может быть легко отделен от апофермента (оксидазы D-аминокислот), а в других случаях тот же фактор прочно (ковалентно) связан с ферментами тканевого дыхания, выполняя функцию простетической группы (ФАД).

Многие двухвалентные металлы (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) так же выполняют роль кофакторов, хотя их не относят ни к коферментам, ни к простетическим группам. В настоящее время уже имеется ряд примеров, когда ионы металлов прочно связаны с белковой молекулой, выполняя

функцию простетической группы. Так, кофермент аскорбатдегидрогеназа, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты в дезоксиаскорбиновую кислоту, содержит 8 атомов меди на молекулу, и все они прочно связаны с белковой молекулой. По химическому строению

К. можно разделить на несколько групп:

- 1) алифатического ряда (глутатион, липоевая кислота);
- 2) ароматического ряда (убихинон, нафтохиноны);
- 3) гетероциклические соединения (пиридоксальфосфат, пиридоксаминфосфат, производные тиамина и фолиевой кислоты, биотин);
- 4) производные нуклеозидов (АТФ, др. нуклеотиды, КоА, никотинамидные, флавиновые и железопорфириновые **К.**);
- 5) ионы металлов.

КСАНТИНОКСИДАЗА – фермент класса оксидоредуктаз. Осуществляет прямое окисление гипоксантина и ксантина с участием кислорода. По химической природе является флавопротеидом.

Л

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ЛДГ) – мультимерный фермент, катализирующий обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную.

Пять изоферментов ЛДГ образуются из 4 субъединиц примерно одинакового размера, но двух разных типов, условно обозначаемых: Н-тип (от heart – сердце) и М-тип (от muscle – мышца).

Установлено, что изоферменты ЛДГ обладают одинаковой ферментативной активностью, но отличаются по ряду физико-химических свойств: молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, отношением к активаторам и ингибиторам и др. В тканях человека, зависящих от энергии, образующихся в процессе гликолиза (скелетные мышцы), главными изоферментами являются ЛДГ₅ и ЛДГ₄. Активность ЛДГ₅ наибольшая при тех концентрациях пирувата, которые ингибируют ЛДГ₁. Преобладание изофермента ЛДГ₄ и ЛДГ₅ обуславливает интенсивный анаэробный гликолиз с быстрым превращением пирувата в молочную кислоту. ЛДГ сосредоточено главным образом в цитоплазме клетки и является индикаторным (клеточным) ферментом. Это обстоятельство широко используется в клинике, поскольку изучение изоферментов в сыворотке крови может представлять интерес для дифференциальной диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей.

ЛАКТАЗА – фермент гидролизующий дисахарид сахарозу, содержащий остатки D-глюкозы и D-галактозы, связанные бета-1,4-гликозидной связью.

Лактоза содержится исключительно в секрете молочной железы млекопитающих и человека. В кишечнике гидролизруется под влиянием бета-галактозидазы. Сбраживается молочнокислыми и др. микроорганизмами с образованием молочной и ряда других кислот

ЛИАЗЫ – класс ферментов, катализирующих отщепление от субстрата негидролитическим путем различных групп с образованием двойных связей или обратные реакции присоединения групп по двойным связям. К Л. относятся пируватдекарбоксилаза, альдолаза, фумараза и др.

ЛИГАЗЫ (синтетазы) – класс ферментов, катализирующих синтез органических соединений из активированных за счет распада АТФ (или ГТФ, УТФ, ЦТФ) исходных веществ. Для ферментов этого класса сохраняется также тривиальное название синтетазы. В связи с этим, согласно рекомендациям IUBMB, термин "синтетазы" не должен применяться для ферментов, в действии которых не участвуют нуклеозидтрифосфаты. Например синтез карбамонлфосфата при участии фермента карбамонлфосфатсинтетазы.

ЛИЗОЦИМ – простой фермент, катализирующий гидролиз специфических гликозидных связей между остатками аминсахаридов. Молекула Л. состоит из одной полипептидной цепи, построенной из 129 аминокислотных остатков. Трехмерная конформация Л. поддерживается четырьмя дисульфидными мостиками. Л. содержится в печени, селезенке, лейкоцитах, яичном белке, слизистых оболочках, коже и некоторых жидкостях организма (слюна, слезы). Основное свойство Л. – способность растворять, (лизировать), оболочки некоторых бактерий. Фермент расщепляет в мукополисахаридах, составляющих основу клеточных оболочек микроорганизмов, 1,4-бета-гликозидную связь, вызывая тем самым лизис бактерий. Л. защищает слизистые оболочки глаз, полости рта, кишечника и носоглотки от инфекции.

ЛИПАЗЫ – группа ферментов, катализирующих гидролитическое расщепление сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот (глицеридов). Полный гидролиз триглицеридов под действием Л. происходит поэтапно: вначале быстро гидролизуются α и α' -связи, а затем уже идет медленный гидролиз β -моноглицерида. Эти реакции активируются под действием солей желчных кислот. Л. играют важную роль в переваривании жиров и содержатся в пищеварительных соках и грудном молоке. Л. найдены в тканях животных, растений, микроорганизмов, поджелудочной железе, печени, сыворотке крови.

М

МАЛЬТАЗА – фермент катализирующий гидролиз дисахарида мальтозы на два остатка глюкозы.

МЕТАБОЛИТЫ – соединения, вовлекаемые в процессы метаболизма.

МУТАРОТАЗА является представителем стереоизомераз, этот фермент ускоряет реакцию превращения α -D-глюкопиранозы в β -D-глюкопиранозу:

Н

НИКОТИНАМИД – амид никотиновой кислоты. Обладает витаминной активностью. Входит в состав коферментов НАД и НАДФ. **Н.** широко распространен в растительных и животных тканях, где встречается в виде сложных соединений – нуклеотидов.

НИКОТИНОВАЯ КИСЛОТА (*витамин PP*) – витамин, относящийся к комплексу витаминов группы В, необходимый человеку и другим млекопитающим. В виде амида **Н.к.** входит в состав коферментов дегидрогеназ – НАД и НАДФ. Содержится в продуктах растительного и животного происхождения (молоко, мясо, рыба, дрожжи). **Н.к.** может синтезироваться в организме некоторых животных из триптофана. Суточная потребность человека в **Н.к.** – 15–20 мг.

НУКЛЕАЗЫ – групповое название ферментов, катализирующих расщепление нуклеиновых кислот до мононуклеотидов. **Н.** разделяются на рибонуклеазы (расщепляют РНК) и дезоксирибонуклеазы (катализируют распад ДНК). При действии **Н.** наблюдается гидролиз основных фосфозфирных связей нуклеиновых кислот. **Н.** широко распространены в животном, растительном мире и у микроорганизмов, играют важную роль в процессах расщепления нуклеиновых кислот, особенно при переваривании их в желудочно-кишечном тракте.

О

ОБНОВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ – сочетание процессов синтеза и распада фермента.

ОКСИДАЗЫ (*аэробные дегидрогеназы*) – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие окисление субстратов путем переноса водорода непосредственно на молекулярный кислород. Например, аскорбатоксидаза катализирует окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую; альдегидоксидаза ускоряет реакции окисления альдегидов с образованием соответствующих кислот и пероксида водорода.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ – класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные процессы, протекающие в клетке и

связанные с переносом протонов и электронов. Различают следующие основные **О.**: аэробные дегидрогеназы или оксидазы и анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, а не на кислород, цитохромы, катализирующие перенос только электронов.

П

ПЕПСИН – протеолитический фермент желудочного сока. **П.** секретируется железами слизистой оболочки желудка в виде профермента пепсиногена. Кроме аминокислот, **П.** содержит остаток фосфорной кислоты. Оптимум pH для **П.** составляет 1,0–2,0. **П.** гидролизует преимущественно пептидные связи, образованные аминокетонами ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин). Он расщепляет практически все природные белки. Исключение составляют: кератины, протамины, гистоны и мукопротеиды. Пепсиноген и **П.** получены в кристаллическом виде. Наиболее детально изучены ферменты из желудочного сока свиньи.

ПЕПТИДАЗЫ – см. ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ

ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ (*протеазы, протеолитические ферменты*) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз пептидных связей в белках и пептидах. Различают пептидазы: экзопептидазы, аминопептидазы, дипептидазы. Активаторами являются ионы двухвалентных металлов Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и др.

ПЕРОКСИДАЗЫ – ферменты, класса оксидоредуктаз, катализирующие соответственно перенос двух атомов водорода с одной молекулы пероксида водорода на другие молекулы и с субстратов (включая восстановленные пиридиновые и флавиновые ферменты) на пероксид водорода. **П.** – сложные белки, содержащие гем (гемопротениды). Они широко распространены в растительных и микробных клетках; в тканях млекопитающих встречается редко. Содержатся в молоке (лактопероксидаза). Глутатионпероксидаза участвует в инактивации пероксида водорода в эритроцитах, печени и некоторых других тканях.

ПИРИДОКСАЛЬ (*витамин В₆*) – альдегидное производное пиридоксина.

В виде фосфорного эфира **П.** входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования альфа-аминокислот.

ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТ – фосфорилированное производное пиридоксали. Фосфатный остаток присоединяется к оксиметиловой группе у 5-го углеродного атома пиридинового кольца. Фосфорилирование пиридоксали является ферментативной реакцией, катализируе-

мой специфической киназой. Наиболее активна пиридоксалькиназа в мозговой ткани. В настоящее время установлено, что в реакциях переаминирования аминокислот в животных тканях происходят взаимопревращения **П.** и пиридоксаминфосфата. Таким образом, фосфорилированные производные витамина **В₆** участвуют в процессах азотистого обмена. Уже известно более 20 пиридоксальных ферментов, катализирующих основные реакции азотистого метаболизма во всех живых организмах.

ПИРИДОКСИН (витамин **В₆**) – термин «Витамин **В₆**» применяется ко всем трем производным 3-оксипиридина, которые обладают витаминной активностью: пиридоксину, пиридоксалью и пиридоксамину.

Витамин **В₆** широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Источником этого витамина для человека являются горох, фасоль, хлеб, картофель, мясо и др. Суточная потребность для человека точно не установлена, т.к. частично он синтезируется микрофлорой кишечника.

ПРОВИТАМИНЫ – органические вещества, предшественники витаминов, которые не синтезируются в организме, но в процессе обмена веществ или фотосинтеза, переходящие в витамины. **П.** витамина **А** – каротиноиды, витамина **Д** – стерины.

Р

РЕТИНОЛ (витамин **А**) – жирорастворимый витамин, молекула которого состоит из бета-иононового ядра и боковой изопреновой цепи.

Р. обладает высокой специфичностью строения. Изменения в боковой цепи приводят к снижению или полной потере витаминной активности у полученных производных. Действие света, нагревание растворов, плавление кристаллов **Р.**, контакта с ПАВ приводит к цис-транс-изомерным переходам. Провитаминами **Р.** являются каротиноиды. **Р.** необходим для нормального роста молодых организмов, обладает противомикробным действием, участвует в процессе восприятия света и выполняет ряд других биологических функций. Содержится в больших количествах в жире печени морских рыб и наземных животных. Наибольшее содержание каротиноидов в моркови, в абрикосах, томатах, перце и др.

РИБОФЛАВИН (витамин **В₂**) – водорастворимый витамин. В основе его строения лежит система изоаллоксазина, в боковой цепи – пятиатомный спирт рибитол.

Биологическая активность **Р.** определяется его окислительно-восстановительными свойствами. **Р.** присоединяя 2 атома водорода, об-

ратимо восстанавливается, переходя в бесцветное лейкосоединение. Входит в состав флавиновых дегидрогеназ. Из пищевых продуктов **Р** богаты хлеб (из муки грубого помола), семена злаков, яйца, молоко, мясо, свежие овощи и др. В печени и почках животных связан с белками в составе ФМН и ФАД. Из организма человека и животных **Р** выделяется с мочой в свободном виде. Суточная потребность человека 2–4 мг.

С

СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ – изменение количества вещества одного из реагирующих веществ в единицу времени в единице реакционного объема. Измеряется в молях на литр на секунду [моль/л·с].

СУБСТРАТ – вещество, подвергающееся превращениям при участии фермента. Например, в реакции восстановления пировиноградной кислоты в молочную кислоту при участии фермента пируватдегидрогеназы, субстратом является пировиноградная кислота. Любой экзогенный и эндогенный метаболит в организме животных и человека может выступать в роли субстрата.

СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА – фермент класса оксидоредуктаз, флавопротеид, в молекуле которого белок ковалентно связан с флавинадениндинуклеотидом (ФАД). Фермент содержит также негеминное железо и мобильный атом серы. Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию:

Т

ТИАМИН (витамин *B₁*) – водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой, витамин *B₁* содержит атом серы и поэтому он получил название – тиамин. В химической структуре он содержит два кольца – пиридиновое и тiazоловое, соединенные метиленовой (–CH₂) – группой.

При недостаточности **Т** развивается тяжелое заболевание – бери–бери. В настоящее время уже имеются данные для подтверждения мнения, что это заболевание представляет собой комбинированный авитаминоз, при котором организм испытывает потребность и в других витаминах – рибофлавине, пиридоксине, витаминах РР, С и др. Из биохимических нарушений при авитаминозе *B₁* следует отметить развитие отрицательного азотистого баланса, увеличение выделения с мочой аминокислот и креатина, а также резкое повышение в крови концентрации α -кетокислот (в основном пировиноградной). Показано, что содержание **Т** в сердечной мышце и печени больных бери–бери в 5–6 раз ниже нормы. **Т** широко распространен в природе. Содержится в пшеничном хлебе, в сое, горохе, а также в продуктах животного проис-

хождения – в печени, в почках, в мозге. Суточная потребность от 1,3 до 0,9 мг.

ТОКОФЕРОЛЫ (витамины группы E) – группа жирорастворимых витаминов, имеющая гидроксилсодержащую систему ароматических колец и изопреноидную боковую цепь.

В настоящее время известно 8 природных соединений, которые обладают биологической активностью витамина E. Все они выделены в чистом виде из растительных масел и обозначаются альфа-, бета-, гамма-, δ -токоферолы. Выполняя в организме антиокислительную функцию, T. предохраняют полиненасыщенные жирные кислоты от окисления. Важнейшим биохимическим проявлением недостаточности витамина E служит снижение интенсивности дыхания. Витамины группы E широко распространены в природе. Источником витамина E для человека является растительное масло, салат, капуста, мясо, сливочное масло и др. Суточная потребности в витамине E составляет 20–30 мг.

ТРАНСФЕРАЗЫ – класс ферментов, катализирующих реакции внутри и межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и радикалов. Например – метил- и формилтрансферазы, ацилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы и др. Например, одним из наиболее важных ферментов переаминирования является алаанинаминотрансфераза, катализирующая реакцию:

ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА – фермент, катализирующий обратимую реакцию между 3-фосфоглицериновым альдегидом и фосфодиацетатом, т.е. триозофосфатами.

Фермент содержится в селезенке, мышцах, сыворотки крови.

ТРИПСИН – протеолитический фермент смешанного кишечного сока. В 1931 году Нортрон и Кунитц получили кристаллический T.T., как и все др. протеиназы, вырабатывается в поджелудочной железе в неактивной форме – в виде трипсиногена. В организме человека трипсиноген превращается в T. под действием фермента энтерокиназы, а в дальнейшем аутокаталитически – под влиянием полученного трипсина. Процесс превращения химически сводится к отщеплению с N-конца полипептидной цепи 6 аминокислотных остатков (гексапептида), что приводит к формированию у T. активного центра и образованию трехмерной структуры, при которой проявляется максимальная активность фермента. T. ускоряет гидролиз связей, образованных остатками лизина и аргинина, т.е. основными аминокислотами. Молекулярная масса 23800, оптимум pH 7,5–8,5.

ТРИПСИНОГЕН – неактивный предшественник (профермент) трипсина. T. активируется в начале энтерокиназой, образующийся

трипсин катализирует дальнейшее активирование Т., при этом отщепляется гексопептид – Вал – (Асп)₄–Лиз.

ТРОМБИН – активный фермент свертывания крови. Проферментом Т. является протромбин. Концентрация протромбина в плазме крови 1,4 – 2,1 мкмоль/л, он является гликопротеидом. Синтезируется этот белок в печени, в его синтезе принимает участие витамин К. Протромбин переходит в активный фермент тромбин под влиянием тромбиназы, которая содержится в тромбоцитах, и ионов кальция. Одна молекула тромбина способна связать около 12 ионов кальция.

У

УБИХИНОН – компонент дыхательной цепи. Как всякий хинон, У. может существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме. Этот кофермент был открыт Муртоном. Учитывая его повсеместное распространение в клетках, он был назван убихиноном (старое название КоQ). У. является производным бензохинона с длинной боковой цепью, которая в тканях млекопитающих состоит из 10 изопреновых единиц (КоQ₁₀). Установлено, что У., также как НАД и ФАД, участвует в промежуточном переносе водородных атомов, т.е. электронов и протонов на цитохромную систему.

УРЕАЗА – первый кристаллический фермент, полученный Самнером в 1926 г. Имеет молекулярную массу – 480000. Относится к классу гидролаз и обладает абсолютной специфичностью. У. катализирует гидролиз мочевины.

Ф

ФЕРМЕНТ – биологический катализатор обычно белкового происхождения, осуществляющий биохимические реакции.

ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕИДИД – см. **ФЛАВИНОВЫЕ КОФЕРМЕНТЫ**

ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИД – см. **ФЛАВИНОВЫЕ КОФЕРМЕНТЫ**

ФЛАВИНОВЫЕ КОФЕРМЕНТЫ – прочно связанные с ферментными белками коферменты оксидоредуктаз. Различают флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД).

Ф.к. содержат в своем составе рибофлавин, изохлорозининовая циклическая система которого претерпевает превращения при окислительно–восстановительных реакциях.

Флавиновые дегидрогеназы входят в состав ферментов дыхательной цепи, катализирующих перенос от первого промежуточного переносчика (НАД) к убихинону. Установлено, что многие из этих ферментов содержат, помимо нескольких белковых субъединиц, ФАД

или ФМН, также атомы металлов – чаще всего негеминное железо. Это обстоятельство сближает их с типичными электронотранспортными. Такой специфический флавопротеид функционирует в микросомальной цепи окисления.

ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗА – фермент гликолиза, катализирующий реакцию превращения 1,3-дифосфоглицерата в 3-фосфоглицерат.

Подобные реакции фосфорилирования АДФ с образованием АТФ, сопряжённые с превращением субстрата (а не с переносом электронов в дыхательной цепи), получили название реакций субстратного фосфорилирования. Роль этих реакций в клетке значительно возрастает при недостатке кислорода в тканях.

ФОСФОГЛИЦЕРОМУТАЗА – фермент гликолиза, катализирующий обратимый переход 3-фосфоглицериновой кислоты в 2-фосфоглицериновую кислоту. Фермент относится к классу изомераз. Активатор Mg^{2+} , кофактор глюкозо-1,6-дифосфат.

ФОСФОГЛЮКОИЗОМЕРАЗА – фермент гликолиза, катализирующий обратимые превращения глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат.

ФОСФОЛИПАЗЫ (А, В, С, D) – ферменты, гидролизующие фосфоглицериды.

Ф. группы А специфически катализирует гидролитическое расщепление эфирной связи в бета-положении. При этом образуются лизофосфатиды, токсичные продукты, вызывающие расщепление клеточных мембран. **Ф.** В – катализирует отщепление второго остатка жирной кислоты. **Ф.С.** – вызывает гидролиз связи между глицерином и фосфорной кислотой, а фосфолипаза D – расщепляет эфирную связь между азотистым основанием и фосфорной кислотой с образованием свободного основания и фосфатидной кислоты.

ФОСФОФРУКТОКИНАЗА – фермент гликолиза, катализирующий реакцию фосфорилирования фруктозо-6-фосфата. Реакция идет в присутствии ионов Mg^{2+} . Фермент относится к числу аллостерических. Он ингибируется АТФ, цитратом и активируется АДФ и АМФ. Так, при работе мышц происходит интенсивное потребление АТФ и активность фосфофруктокиназы повышается, что сопровождается усилением процесса гликолиза.

ФУМАРАЗА – фермент цикла трикарбоновых кислот, обратимо катализирующий реакцию взаимопревращения фумарата в малат. Молекула фермента состоит из 4 идентичных субъединиц, каждая из которых в отдельности ферментативной активностью не обладает и содержит по три SH- группы. Молекулярный вес фермента 200000.

Х

ХИМОТРИПСИН – протеолитический фермент кишечного тракта. Фермент синтезируется поджелудочной железой в виде профермента химотрипсиногена. **Х.** – энтеропептидаза; он катализирует гидролиз пептидных связей, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот (тирозина, триптофана, фенилаланина). Оптимум действия при pH 7,0–9,0. Активатор – Ca^{2+} . **Х.** является одним из наиболее изученных ферментов, для которого расшифрован механизм ферментативного катализа.

ХИМОТРИПСИНОГЕН – белок, неактивный предшественник (профермент) химотрипсина. **Х.** активируется трипсином и химотрипсином, при этом образуется ряд активных форм химотрипсина. Механизм активации заключается в отщеплении пептидного фрагмента (гексапептида) от полипептидной цепи, в результате снимаются препятствия для формирования активного центра фермента. Доказана важность для катализа гидроксильной группы серина и остатка гистидина в активном центре этого фермента.

Ц

ЦИАНКОБАЛАМИН (витамин B_{12}) – водорастворимый витамин, по химическому строению напоминает гемин крови, в отличие от которого он содержит кобальт, а не железо. Это единственный витамин, содержащий в своей молекуле металл. Источником витамина для человека является мясо, говяжья печень, почки, молоко, яйца. **Ц.** проявляет биологическую активность в виде кофакторных форм – в качестве простетических групп метилтрансферазы и метилмалонин-КоА-мутазы.

Недостаток **Ц.** у человека и животных приводит к развитию злокачественной анемии. Наблюдается также расстройство нервной системы и резкое снижение кислотности желудочного сока. Суточная потребность для взрослого человека составляет 2,5–5 мкг.

Э

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ – энергия, необходимая для того, чтобы вещество вступило в реакцию.

ЭНТЕРОКИНАЗА – протеолитический фермент, катализирующий превращение трипсиногена в активный трипсин. **Э.** вырабатывается стенками кишечника в форме неактивного предшественника – киназогена, который переходит в активную форму под действием трипсина. Активная **Э.** представляет собой гликопротеид.

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат
АДФ – аденозиндифосфат
АДГ – алкогольдегидрогеназа
ЖК – жирные кислоты
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
КоQ – убихинон
КоА – кофермент А
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
МЕ – международные единицы (ферментативной активности)
НАД – никотинамидадениндинуклеотид
НАД⁺ – никотинамиддинуклеотид окисленный
НАДН – никотинамиддинуклеотид восстановленный
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПАВ – поверхностно-активные вещества
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СДГ – сукцинатдегидрогеназа
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ТСХ – тонкослойная хроматография
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФМН – флавиномононуклеотид
ФПФаз – фосфопротеинфосфатаза
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Литература

1. Авдеева Л.В. Биохимия: Учебник / Л.В. Авдеева, Т.Л. Алейникова, Л.Е. Андрианова. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2013. – 768 с.
2. Айвазов, Б. В. Практическое руководство по хроматографии: Учебник. М.: Высшая школа, 1968. – 280 с.
3. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В., Павлова Н.А. Руководство к практическим занятиям по биохимии: Учебн. Пособие / под ред. Е.С. Северина. М.: Медицина, 2000. – 128 с.
4. Андрусенко С.Ф., Денисова Е.В. Краткий словарь биохимических терминов. Саарбрюккен: LambertAcademicPublishing, 2019. – 88 с.
5. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. – 740 с.
6. Ауэрман Т.Л., Генералова Т.Г., Сусликов Г.М. Основы биохимии. М.: ИНФРА-М, 2013. – 399 с.
7. Бакланов А.В. Химическая кинетика. Учебное пособие. Новосибирск: Редакционно-издательский центр НГУ, 2009, – 100 с.
8. Белясова Н.А. Биохимия и молекулярная биология: учебное пособие. Минск: Книжный дом, 2004. – 415 с.
9. Бендер М., Бергерон Р., Комияма М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. Пер. с англ. М.: Мир, 1987. – 352 с.
10. Березин И.В. Инженерная энзимология. Серия Биотехнология. М.: Высшая школа, 1987. 143 с.
11. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976. – 320 с.
12. Березин И.В., Мартинск К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высш. школа, 1977. – 280 с.
13. Березин И.П. Имобилизованные ферменты / И.П. Березин Н.Л. Клячко, А.В. Левашов и др. М.: Высш. школа, 1987. – 159 с.
14. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. М.: Медицина, 2004. – 704 с.
15. Березовская В.А. Биохимия. Лабораторный практикум. Петропавловск-Камчатский: Камчат ГТУ, 2005. – 83 с.
16. Берхард С. Структура и функции ферментов. М.: Мир, 1971. – 334 с.
17. Бидей С.П. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы / С.П. Бидей, П. Броделиус, И.М.А. Кабрал и др. М.: Мир, 1988. – 215 с.

18. Биологическая химия: Учебник., перераб и доп / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова. Ереван: МИА, 2015. – 469 с.
19. Биологическая химия: учебное пособие для студентов вузов / Ю.Б. Филиппович и др. / под ред. Н. И. Ковалевской. М.: Academia, 2008. – 254 с.
20. Биосенсоры: основы и приложения / под ред. Э. Тернера и др. М.: Мир, 1992. – 614 с
21. Биотехнология: Учебное пособие для вузов. В 8 кн. / под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7: Иммунизированные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов и др. М.: Высшая школа, 1987. – 159 с.
22. Биохимические основы патологических процессов / под ред. Е.С. Северина. – М.: Медицина, 2000. – 304 с.
23. Биохимия / под ред. В.В. Меньшикова, Н.И. Волкова. М.: Физкультура и спорт, 1986. – 384 с.
24. Биохимия / под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР–МЕД, 2004. – 779 с.
25. Биохимия растений / Л.А. Красильникова. Ростов–на–Дону, Харьков: Феникс, Торсинг, 2004. – 224с.
26. Биохимия: сборник лабораторных работ / В.В. Шапкарин, А.П. Королев, С.Б. Гридина, Е. П. Зинкевич. Кемерово, КемТИПП, 2005. – 84 с.
27. Биохимия: учебник / под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2013. – 759 с.
28. Биохимия: учебник: [для медвузов / Авдеева Л.В., Алейникова Т.Л., Андрианова Л.Е. и др.]; под ред. Е.С. Северина. 5–е изд. М. : ГЭОТАР–Медиа, 2009. – 759 с.
29. Биссвангер Х. Практическая эргизмология. М.: Бином. Лаборатория знаний, 3–е изд, 2017. – 331 с.
30. Бондаренко Т.И., Сорокина И.А., Сагакиц, А.Б. Методические указания к проведению практических занятий по биохимии. Ростов-на-Дону, 2001. – 48 с.
31. Бородин А.П. Биохимия животных: Учебное пособие / А.П. Бородин. СПб.: Лань, 2015. – 384 с.
32. Брей Дж., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М.: Изд–во иностр. лит, 1959. – 380 с.
33. Бышевский А.Ш., Терсеев О.А. Биохимия для врача. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. – 383 с.
34. Вавилова Т.П., Медведев А.Е. Биологическая химия: учебник / Т.П. Вавилова, А.Е. Медведев. М.: ГЭОТАР–Медиа, 2014. – 560 с.

35. Вальтер О.А., Пиневич Л.М., Варасова Н.Н. Практикум по физиологии растений с основами биохимии. М. –Л.: Сельхозгиз, 1957. – 341 с.
36. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Академия, 2005. 472 с.
37. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
38. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1982. – 345 с.
39. Варфоломеев, С. Д. Химическая энзимология: Учебник. М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 480 с.
40. Василенко Ю.К. Биологическая химия: Учебное пособие / Ю.К. Василенко. М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 432 с.
41. Васильева Е.А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. М.: Россельхозиздат, 1974. – 192 с.
42. Введение в прикладную энзимологию: Учеб. Пособие/ под ред. И В. Березина и К. Мартинька. М.: МГУ, 1982. – 384 с.
43. Вистур У.Э. Системы ферментации / У.Э. Вистур, А.М. Кузнецов, В.В. Савенков. Рига, Зинатне, 1986. – 368 с.
44. Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии / Д. Вилкинсон; Пер. с англ. К. Г. Овчинникова, И. Д. Стальной. М.: Медицина, 1981. – 624 с.
45. Войцековская С.А. Биохимия и основы биорегуляции организмов. Томск: ТГУ, 2002. – 186 с.
46. Волобуева В.Ф., Шатилова Т.И. Практикум по биохимии овощных, плодовых, ягодных, эфирноносных и лекарственных культур. М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2008. – 135 с.
47. Волькенштейн М.В. Физика ферментов. М.: Наука, 1967. – 200 с.
48. Вольф М. Лечение ферментами / М. Вольф, К. Рансбергер; Пер. с англ. Ю.И. Лашкевича; под ред. и с предисл. проф. В.З. Горкина. Москва: Мир, 1976. – 232 с.
49. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов / И.П. Галич. Киев, 1987. 192 с.
50. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е. Ферменты. Лабораторный практикум. СПб: «Проспект Науки», 2011. – 256 с.
51. Гидранович В.И., Гидранович А.В. Биохимия: учебное пособие. М.: ТетраСистемс, 2012. – 528 с.

52. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов : учеб.пособие. М.: Элевар, 2000. 512 с.
53. Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно - методическое пособие/ СПб.: СПбГТУРП. 2014. – 47 с.
54. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. В 3 т. М.: Мир, 1982. – 1120 с.
55. Димитриев А.Д., Амбросьева Е.Д. Биохимия. М.: ИТК «Дашков и К», 2013. – 165 с.
56. Добрынина В. И. Учебник по биологической химии. М.: Гос. изд-во мед.лит-ры, 1963. – 447 с.
57. Доне Э. Количественные проблемы биохимии. М.: Мир, 1983. – 376 с.
58. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. – 544 с.
59. Дроздов Н.С., Матеранская Н.П. Практикум по биологической химии. М.: Высшая школа. 1970. – 256 с.
60. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. М.: Мир, 1983. – 512 с.
61. Ермаков А.Н., Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И., Мирри И. К. Методы биохимического исследования растений. М., 1952. – 520 с.
62. Ермолаев М.В. Биологическая химия: Учебник / М.В. Ермолаев, Л.П. Ильичев. М.: Альянс, 2015. – 320 с.
63. Ершов Ю.А. Биохимия человека / Ю.А. Ершов. Люберцы: Юрайт, 2016. – 374 с.
64. Ершов Ю.А., Мушамбаров Н.Н. Кинетика и термодинамика биохимических и физиологических процессов. М.: Медицина, 1990. – 208 с.
65. Жеребцов Н.А., Артюхов В.Г., Попова Т.Н. Биохимия. М.: Изд.: ДеЛи, 2002. – 689 с.
66. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Фараджаева С. Д. Ферменты и их роль в технологии пищевых продуктов. Воронеж: ВГУ, 1999. – 120 с.
67. Загребельный С.Н. Биотехнология. Ч.2. Инженерная энзимология // С.Н. Загребельный.Новосибирск, 2001. – 138 с.
68. Зайцев С.Ю. Биохимия животных. Фундаментальные и прикладные аспекты / С.Ю. Зайцев, Ю.В. Конопатов. Краснодар: Лань, 2005. – 382 с.
69. Збарский Б.И., Иванов И.И., Мордашев С.Р. Биологическая химия. М.: Просвещение, 1972. – 247с.

70. Зезеров Е.Г. Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая). Ереван: МНА, 2014. – 456 с.
71. Землянухин А.А. Практикум по биохимии. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1975. – 144 с.
72. Имобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. – 215с.
73. Имобилизованные ферменты / под ред. И.В. Березин и др. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976, Т.1. – 296 с; Т.2. – 357 с.
74. Имобилизованные ферменты / под ред. Н.С. Егорова, И.В. Березин [и др.]. М.: Высш. школа, 1987. – 159 с.
75. Инженерная энзимология / под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова / И. В. Березин [и др.]. М.: Высш. школа, 1987. – 159 с.
76. Инихов Г. С., Брюн Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов: Учебник. М.: Пищевая промышленность, 1971. – 424 с.
77. Каган З.С. Аллостерическая регуляция ферментов и регуляторные энзимопатии. М., 1989. Т. 28. – 146 с.
78. Калинин М.И., Рогозкин В.А. Биохимия мышечной деятельности. Киев: Здоровья, 1989. – 144 с.
79. Канская Н.В. и др. Интерпретация результатов основных лабораторных методов исследования в клинической практике. Учебно-методическое пособие. Томск: СибГМУ, Ацтек, 2006. – 154 с.
80. Капилевич Л.В. Биохимия человека: Учебное пособие для вузов / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова Е.В. Кошельская. Люберцы: Юрайт, 2016. – 151 с.
81. Карубе И., Тёрнер Э., Уилсон Дж. Биосенсоры. М.: Мир, 1992. – 614 с.
82. Карузина И. А. Биоорганическая и биологическая химия: учебное пособие. Издание второе переработанное и дополненное. Павлодар, Павл. гос. ун-т им. С. Торайгырова, 2006. – 68 с.
83. Келети Т. Основы ферментативной кинетики, М.: Мир, 1990. 350 с.
84. Киселев Т., Помозова В., Гореньков Э. Ферменты. Лабораторный практикум. СПб: Проспект Науки, 2011. – 416 с.
85. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи. – М.: ДеЛипринт, 2002. – 236 с.
86. Кленова Н.А. История биологии и химии (с древнейших времен до конца XX века). Самара: Самарский университет, 2013 – 301 с.

87. Клесов А.А. Инженерная энзимология на промышленном уровне. Биотехнология. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1989. – С. 184–191.
88. Клесов А.А. Ферментативный катализ. Ч. 2. М.: Изд-во МГУ, 1984. – 264 с.
89. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. Ч. 1. М.: Изд-во МГУ, 1980 – 264 с.
90. Клячко Н.Л. Катализ водорастворимыми ферментами в органических растворителях ламеллярной (слоистой) и цилиндрической (гексагональной) / Клячко Н.Л., Левашов А.В., Пшежецкий А.В., Богданова Н.Т., Кабанов А.В., Березин И.В., Хмельницкий Ю.Л., Жаринова И.Н., Мартинек К. // Докл. АН СССР – 1986. Т. 289. – С. 1266–1270.
91. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – 456 с.
92. Коваленко Л.В. Биохимические основы химии биологически активных веществ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 229 с.
93. Кольман Я., Рём К.–Г. Наглядная биохимия. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 469 с.
94. Комов В.П. Шведова В.Н. Биохимия: Учебник. Люберцы: Юрайт, 2015. – 640 с.
95. Конопатов Ю.В. Васильева С. Биохимия животных: Учебное пособие. СПб.: Лань, 2015. – 384 с.
96. Корниш–Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. – 277 с.
97. Коровкин Б.Ф. Ферменты в жизни человека. М.: Медицина, 1972. – 770 с.
98. Королев А. П. Руководство к лабораторным занятиям по биохимии. Кемерово: ЛМТ КемТИПП, 1994. – 96 с.
99. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984. – 261 с.
100. Кочетков Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
101. Кози Ф. Регуляция ферментативной активности. М.: Мир, 1986. – 148 с.
102. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Высшая школа, 1986. – 267 с.

103. Куделина О.В. Общая биохимия: учебное пособие для вузов. Томск: издательство ТГПУ, 2003. – 46 с.
104. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс: Мокслал, 1981. – 200 с.
105. Кунижев С.М., Денисова Е.В., Андрусенко С.Ф. Краткий словарь биохимических терминов, 4-е изд. Москва: Вузовская книга, 2016 – 86 с.
106. Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. – 198 с.
107. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов: 46 е Баховское чтение. М.: Наука, 1992. – 62 с.
108. Кухта В.К. Биологическая химия: Учебник. М.: Бином, 2008. – 688 с.
109. Кухта В.К. и др. Основы биохимии. М.: Медицина, 1999. – 416 с.
110. Кучеренко Н.Е. Биохимический справочник /Н.Е. Кучеренко, Р.П. Виноградова, А.Р. Литвиненко и др. Киев: Вицашкола, 1978. – 304 с.
111. Кучеренко Н.Е. Биохимия: Практикум. Киев: Выща школа, 1988. – 128 с.
112. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.: «Медицина», 1983. – 272 с.
113. Лабораторные работы по энзимологии / сост. Н.Г. Луценко. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2006. – 64 с.
114. Лабораторный практикум по биологической химии для студентов фармацевтического факультета. Учебное пособие. / И.А. Позднякова, В.В. Иванов, Н.В. Канская, О.А. Тимин, Н.И. Колесова / под ред. проф. В.Ю. Сереброва и проф. Т.С. Федоровой. Томск: Сиб. гос. мед.ун-т, 2009. – 250 с.
115. Лабораторный практикум по биохимии: Методические указания к выполнению лабораторных работ для студентов дневной и заочной форм обучения / Сост. Л.А. Яковичин. Севастополь: Изд-во СевНТУ, 2007. – 80 с.
116. Левашов А.В. Катализ ферментами в агрегатах поверхностно-активных веществ. //Биотехнология (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), М.: 1987, Т. 4. – С. 112-158.

117. Левашов А.В., Клячко Н.Л. Мицеллярная энзимология: методы и техника // Известия Академии Наук. Сер. Хим., 2001, №10. – С. 1638-1651.
118. Левашов А.В. Кинетическая теория реакций, катализируемых ферментами, солюбилизованными в органических растворителях с помощью поверхностно-активных веществ / Левашов А.В., Пантин В.И., Мартинек К., Березин И.В. // Докл. АН СССР - 1980. Т. 252. – С. 133-136.
119. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3 т. М.: Мир, 1985. – 1055 с.
120. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. М.: Мир, 1980 – 368 с.
121. Малахов А.Г. Биохимия сельскохозяйственных животных. М.: «Колос», 1984, – 336 с.
122. Марри Р. Биохимия человека в 2-х томах т.1 и т.2 /Р. Марри. М.: Мир, 2009. – 796 с.
123. Маршалл В.Дж., Бангерт С.К. Клиническая биохимия. М.: Бином-пресс, 2011. – 408 с.
124. Медицинская энзимология: учебник /А.Д. Таганович, Э.И. Олецкий, Н.Ю. Коневалова, В.В. Лелевич; под ред. А.Д. Таганович. Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с.
125. Метревели Т.В. Биохимия животных: Учебник для вузов. / Т.В. Метре-вели. СПб.: «Лань», 2005. – 370 с.
126. Мещлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. В 3 т. М.: Мир, 1980. – 972 с.
127. Митякина Ю.А. Биохимия. М.: РИОР, 2012. – 113 с.
128. Москвичев Б.В., Поляк М.С. Имобилизованные ферменты. Серпухов: Наука, 1992. 112 с.
129. Мосс Д.В. Энзимология и медицина / Д.В. Мосс, П. Дж. Баттерворт; Пер. с англ. Л.П. Коржовой. Москва: Медицина, 1978. – 287 с.
130. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. М.:Москва.– 1985. – 314 с.
131. Мызина С.Д., Халимская Л.М. Биологически активные соединения. Витамины, гормоны и биорегуляторы. Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2006. – 72 с.
132. Наградова Н.В, Муронец И.Н. Мультидоменная организация ферментов. М., 1991. – Т.38. – 168 с.

133. Нейландс Дж. Очерки по химии ферментов / Дж. Нейландс, П. Штумпф. М.: Государственное издательство иностранной литературы, 1958. – 391 с.
134. Нельсон Д., Кохс, М. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т.1. Основы биохимии. Строение и катализ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 694 с.
135. Николаев А.Я. Биологическая химия: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 568 с.
136. Николаев Л.А. Металлы в живых организмах / Л.А. Николаев. М.: Просвещение, 1986. – 127 с.
137. Новиков Н.Н. Биохимия растений / Н.Н. Новиков. М.: Ленанд, 2014. – 680 с.
138. Номенклатура ферментов. М.: ВИНТИ, 1979. – 321 с.
139. Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты. М.: Издательство иностранной литературы, 1950– 346 с.
140. Овчинников Ю.А. Строение и функции белков. М.: Педагогика, 1983. – 128 с.
141. Орбелис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука, 2008. – 543 с.
142. Основы биохимии / под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. – 551 с.
143. Остерман, Л.А., Диксон, М., Узбб, Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. – 1117 с.
144. Петров К.П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М.: Издательство «Пищевая промышленность», 1965. – 330 с.
145. Плакунов В.К. Основы энзимологии: учебное пособие. М.: Издательская группа «Логос», 2011. – 127 с.
146. Плакунов В.К., Николаев Ю.А. Основы динамической биохимии: учебное пособие. М.: Издательская группа «Логос», 2010. – 213 с.
147. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений: Учебник. М.: Агропромиздат, 1985. – 255 с.
148. Полягалина Г.В., Чередищенко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М.: ДеЛипринт, 2003. – 375 с.
149. Попова Т.Н., Рахманова Т.И., Попов С.С. Медицинская энзимология. Воронеж: Воронежский государственный университет, 2008. – 64 с.

150. Практикум по биохимии / О.А. Петров, С.Г. Пуховская. Иваново: Иван.гос. хим. технол. ун-т, 2006. – 60 с.
151. Практикум по биохимии / под ред. Н.П. Мешковой и С. Е. Северина. М.: МГУ, 1979. – 430 с.
152. Практикум по биохимии / под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. М.: МГУ, 1989. – 509 с.
153. Практикум по общей и экологической биохимии. Ч. II. Ферменты. Ферментативная кинетика / С.Б. Бокуть и др. М.:Межд. гос. экол. ун-т им. А.Д. Сахарова, 2002. – 45 с.
154. Применение иммобилизованных ферментов / Итоги науки и техники, серия Биотехнология. Глав. Ред. Ю.А. Овчинников.М.: ВИНТИ, 1986. – 187 с.
155. Проскурина И.К. Биохимия: учебник для студентов учреждений высшего профессионального образования. М.: Академия ИЦ, 2012. – 334 с.
156. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
157. Пустовалова Л.М. Практические работы по биохимии. Ростов-на-Дону: Феникс, 2004. – 319 с.
158. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты / Пер. с англ. и предисл. М.Д. Гроздовой. М.: Мир, 1983. – 107 с.
159. Рансбергер К. Энзимы – ключ к здоровью и долголетию / К. Рансбергер, С. Нойн др. СПб: Питер, 1999. – 189 с.
160. Рансбергер К. Энзимы и энзимотерапия / К. Рансбергер, С. Ной. Мюнхен: Мед.рук-во по изучению энзимов. 1994. – 243 с.
161. Резанов А.Я. Механизмы регуляции биокатализа: Учеб.пособие. Киев: Выща школа, 1989. – 240 с.
162. Реннеберг Р. Эликсиры жизни. Новейшие результаты в области исследования ферментов. М.: Мир, 1987. – 152 с.
163. Рогожин В.В. Биохимия животных. СПб.: ГИОРД, 2009. –552 с.
164. Рогожин В.В. Биохимия растений. М.: «ГИОРД», 2012. – 432 с.
165. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: Гиорд, 2004. – 240 с.
166. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: Учебно-методическое пособие. СПб.: Лань, 2006. – 256 с.
167. Розенгарт В.И. Ферменты – двигатели жизни / В. И. Розенгарт. Л.: Наука: Ленингр. отд-ние, 1983. – 160 с.
168. Руководство к практическим занятиям по биохимии / под ред. Л.Л. Петровой, Л. В. Труфановой. Красноярск: КрасГМА. 2003. – 311 с.

169. Руководство по лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т. Березова. М.: Медицина, 1976. – 294 с.
170. Румянцев Е.В., Антина Е.В., Чистяков Ю.В. Химические основы жизни: Учеб. пособие для вузов. М.: Издательство "КолосС", 2007. – 560 с.
171. Северин С.Е., Кочетов Г.А. Молекулярные основы действия ферментов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. – 189 с.
172. Сковорова Р.И. Биологическая химия: Методические указания к выполнению лабораторных работ. Кемерово: РИО КемТИП-Па, 1989. – 98с.
173. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. – 358 с.
174. Слесарев В.И. Химия: Основы химии живого. СПб.: Химиздат, 2001. – 784 с.
175. Соловьев Н.А. Лабораторные работы по биологической химии. Методическая разработка. СПб., 1996. – 70 с.
176. Сорвачев К.Ф. Биологическая химия. М.: Просвещение, 1971. – 432 с.
177. Справочник биохимика: Пер. с англ./ Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991. – 544 с.
178. Страйер Л. Биохимия: в 3-х т. М.: Мир, 1984–1985. Т. 1–3. – 936 с.
179. Строев Е.А., Макарова В.Г. Практикум по биологической химии. М.: Высш. шк., 1986. – 232 с.
180. Строев Е.А., Макарова В.Г., Матвеева И.В. Практикум по биологической химии: учебное пособие. М.: МИА, 2012. – 377 с.
181. Таганович А.Д. Биологическая химия: Учебник. Минск: Высшая школа, 2013. – 672 с.
182. Таганович А.Д. Патологическая биохимия / А.Д. Таганович. М.: Бинум, 2013. – 448 с.
183. Тамкович С.Н., Тамкович Н.В., Буракова Е.А., Королева Л.С., Мызина С.Д. Практикум по биохимии. Новосибирск: Изд-во НГУ. 2010. – 84 с.
184. Токарева М.И., Селезнева И. С. Биохимия. В 3 частях. Екатеринбург ГОУ ВПО УГТУ–УПИ, 2005. – Ч.2. – 32 с. – Ч. 3. – 26 с.
185. Тривен М.Д. Иммуобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. – 213 с.
186. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. М.: Медицина, 2008 г. – 542 с.

187. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: В 3-х т. М.: Мир, 1981.
188. Уолтер Ч. Кинетика ферментативных реакций. М.: Мир, 1969. – 128 с.
189. Узбе Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966. – 864 с.
190. Уэстли Дж. Ферментативный катализ. М.: Мир, 1972. – 267 с.
191. Фердман Д.Л. Биохимия. М.: Высшая школа, 1966. – 643 с.
192. Ферментативный катализ как альтернатива органического синтеза / А.М. Безбородов. М.: Агропромиздат, 1991. – 234 с.
193. Ферменты и витамины. Лабораторный практикум по биохимии: Пособие / А.Г. Шлейкин, В.И. Шаробайко, А.Н. Бландов, В.А. Смирнов. СПб.: СбГУНиПТ, 2004. – 50 с.
194. Ферменты и нуклеиновые кислоты: Учеб. пособие / под ред. С.Н. Лызловой, В.Г. Владимирова. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1997. – 152 с.
195. Ферменты. Лабораторный практикум: Учебное пособие / В.С. Гамазорова, М.Е. Зиновьева. СПб.: Проспект Науки, 2018. – 256 с.
196. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. – 432 с.
197. Физическая химия биопроцессов / С.Д. Варфоломеев, А.В. Луковенков, Н.А. Семенова и др. Москва: КРАСАНД, 2014. – 800 с.
198. Филиппович Ю.Б. Биологическая химия: Учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. М.: ИЦ Академия, 2013. – 320 с.
199. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянов Г.А. Практикум по общей биохимии: Учебник. М.: Просвещение, 1982. – 311 с.
200. Филиппович Ю.Б., Коничев А.С., Севастьянова Г.А., Кутузова Н.М. Биохимические основы жизнедеятельности человека: Учебное пособие для вузов. М.: Владос, 2005. – 406 с.
201. Филиппович Ю.Б., Коничев А.С., Севастьянова Г.А., Кутузова Н.М. Биохимические основы жизнедеятельности человека: Учебное пособие для вузов. М.: Владос, 2005. – 406 с.
202. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М.: Мир, 1986. – 374 с.
203. Хазипов Н.З. Биохимия животных с основами физколлоидной химии. М.: Издательство «КолосС», 2010. – 328 с.

204. Хайдеров А. Развитие отечественной энзимологии. Душанбе: Донни, 1990 – 156 с.
205. Хельд Б. Биохимия растений. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.
206. Химическая и биологическая кинетика / под ред. Н.М. Эмануэля. М.: Изд-во МГУ, 1983.– 296 с.
207. Химическая энзимология / ред. И.В. Березин. М., 1980. – 278 с.
208. Цыперович А. С. Ферменты. М.: Техника, 1971. – 360 с.
209. Чечеткин А.В. Биохимия животных / А.В. Чечеткин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский. М.: Высшая школа. 1982. – 511 с.
210. Чиркин А.А. Практикум по биохимии. Минск: Новое знание, 2002. – 516 с.
211. Шамин А.Н. Биокатализ и биокатализаторы. Исторический очерк. М.: КомКнига, 2006. – 192 с.
212. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. Минск: «Вышэйшая школа», 1976. – 288 с.
213. Шапкарин В.В. Биологическая химия: Методические указания к выполнению лабораторных работ. Кемерово, ЛМТ КемТИПП, 1992. – 40 с.
214. Шведова В.Н., Комов В.П. Биохимия. М.: Дрофа, 2008. – 640 с.
215. Шидловская В.П. Ферменты молока: Учебник. М.: Агропромиздат, 1985. – 152 с.
216. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов Н.Н. Прикладная энзимология. СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.
217. Шугалей В.С., Кесслер Р.М. Ферментология. Ростов-на-Дону: РГУ, 1986. – 96 с.
218. Щербак И.Г. Биологическая химия: учебник. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2005. – 480 с.
219. Щипарев С.М., Медведев С.С., Шарова Е.И., Танкелон О.В. Практикум по биохимии растений / под ред. В. В. Полевого, С. М. Щипарева. СПб.: Изд. С.-Пб.ун-та, 1996. – 200 с.
220. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИ Биомед. химии РАМН, 2002. – 446 с.
221. Энзимология: лабораторный практикум / Сост. Н.М. Титова, Т.Н. Субботина. Красноярск: Сиб. Федер. ун-т, 2012. – 103 с.
222. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. –248 с.

Интернет-ресурсы:

- <http://biomolecula.ru> Сайт «Биомолекула»
- <http://elibrary.ru> Научная электронная библиотека
- <http://isir.ras.ru> Интегрированная Система Информационных Ресурсов Российской Академии Наук
- <http://molbiol.edu.ru> Практическая Молекулярная Биология
- <http://pharmacologylib.ru> Библиотека по фармакологии
- <http://ru.wikipedia.org/wiki> Свободная энциклопедия «Википедия»
- <http://window.edu.ru> Библиотека. Единое окно доступа к образовательным ресурсам
- <http://www.biochemistry.terra-medica.ru> Новая медицинская энциклопедия
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb> Биохимическая классификация и номенклатура
- <http://www.chemport.org> Научные издания в области биохимии, химии и смежных наук
- <http://www.edu.ru> Российское образование – Федеральный портал
- <http://www.elbib.ru> Российская электронная библиотека
- <http://www.febs.org> Официальный сайт Федерации европейских биохимических обществ
- <http://www.humbio.ru/humbio/biochem> Биохимия. Справочник (он-лайн)
- <http://www.library.ru> Виртуальная библиотека
- <http://www.molbiol.ru> Классическая и молекулярная биология
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed> База научных данных в области биомедицинских наук
- <http://www.nlr.ru> Российская национальная библиотека
- <http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/index.htm> Каталог научно-образовательных ресурсов
- <http://www.viniti.msk.ru> Всероссийский Институт Научной и Технической Информации (ВИНИТИ РАН)