

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра химии

ХИМИЯ

Лабораторный практикум

**Лабораторная работа
Ферменты.**

Лабораторная работа

Ферменты (энзимы) – это белки, синтезируемые клетками живых организмов и выполняющие специфичные функции катализаторов биохимических реакций. Изменяя количество или активность ферментов в клетке можно изменять (регулировать) течение обменных процессов в организме.

По строению ферменты, как все другие белки, бывают простые (однокомпонентные) – протеины и сложные (двухкомпонентные) – протеиды. При биосинтезе двухкомпонентных ферментов в качестве небелковой части организм может использовать витамины, ионы металлов, органические кислоты, фосфорные эфиры сахаров, нуклеотиды и т. д.

В зависимости от того, какие типы химических реакций катализируют ферменты, их делят на шесть классов:

- 1) оксидоредуктазы – катализируют биологические ОВР;
- 2) трансферазы – осуществляют перенос атомных группировок от одного соединения к другому;
- 3) гидролазы – осуществляют разрыв связей с участием воды;
- 4) лиазы – катализируют негидролитический разрыв связей с образованием двойных связей или присоединение по двойным связям;
- 5) изомеразы – катализируют реакции изомеризации веществ;
- 6) лигазы (синтеазы) – ускоряют реакции синтеза и требуют присутствия макроэргических соединений.

Название ферментов производят от названия вещества (субстрата), на которое действует фермент или от типа химической реакции, которую он катализирует с добавлением окончания – «аза».

Цель занятия. Изучить строение, механизм действия, свойства ферментов. Ознакомиться с методами исследования ферментов и применением этих методов в животноводческой практике.

Материалы и оборудование. Сахароза, 5% раствор; гидроксид натрия, 10% раствор; сульфат меди, 1% раствор; реактив Фелинга; фенолфталеин, 5% раствор; препарат уреазы или кристаллическая уреазы, 0,01% раствор; пероксид водорода, 1%; бензидин, 0,5% раствор; пероксид водорода, 3% раствор; пирогаллол, 2% раствор; крахмал, 1% раствор; 0,1% спиртовой раствор; фенолфталеин; гидроксид калия, 0,05 моль/л раствор; соляная кислота, 0,1% раствор; йод, 0,1% раствор в 0,2% растворе йодида калия; крахмал, 1% раствор, содержащий 0,3% хлорида натрия; слюна в разведении 1:9; кровь (1:500 и 1:10000); вод-

ная вытяжка корня хрена; растительное масло; NaOH, 10% раствор; препарат липазы; пробирки; штативы; пипетки градуированные на 1-2 мл; ступки; колбочки; шуттель-аппарат; термостат.

2.1. Обнаружение ферментов в биологическом материале

Ферменты, выступая в роли биокатализаторов, не смещают положения равновесия реакции, а ускоряют его достижения, сами при этом выходят из реакции в неизменном виде, поэтому могут использоваться организмом многократно. Для ферментативных реакций характерен почти 100% выход продуктов, без наблюдаемых побочных явлений. Ферментативная реакция протекает по следующей схеме:



Фермент (E) вступает во взаимодействие с субстратом (S) и образует с ним переходный фермент – субстратный комплекс (ES). Молекула субстрата в таком комплексе обладает более высоким запасом энергии или активизируется. Индуцируется напряжение разрываемых связей, они становятся менее стабильными, и происходит отделение конечных продуктов.

В реальных ферментативных реакциях переходных фермент-субстратных комплексов может быть несколько. Обнаружить фермент в биологическом материале можно по исчезновению субстрата (S) или по появлению продукта реакции (P) в реакционной смеси.

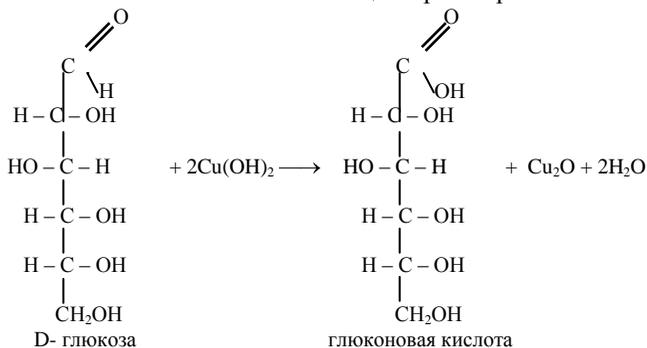
Для обнаружения и изучения действия ферментов необходимо выделить их из биологических материалов. Для этого выбирают легкодоступный материал, богатый ферментом, затем, путем гомогенизации (растирание с абразивом), автолиза, замораживания и оттаивания и другими методами, разрушают клеточные оболочки и фермент переводят в раствор.

Опыт 1. Получение сахарозы и обнаружение продуктов гидролиза. В ступке тщательно растирают 20 г сухих дрожжей, постепенно добавляя 100 мл воды. Полученную смесь переносят в колбочку и встряхивают в шуттель-аппарате в течение 1-2 часов, затем фильтруют и фильтрат используют в качестве раствора сахарозы.

В две пробирки берут по 1 мл экстракта сахарозы. Одну пробирку нагревают до кипения, чтобы разрушить фермент. После охлаждения в обе пробирки прибавляют 2-3 мл 5% раствора сахарозы и ставят в термостат на 30 мин. В пробирке должен произойти гидролиз сахарозы.

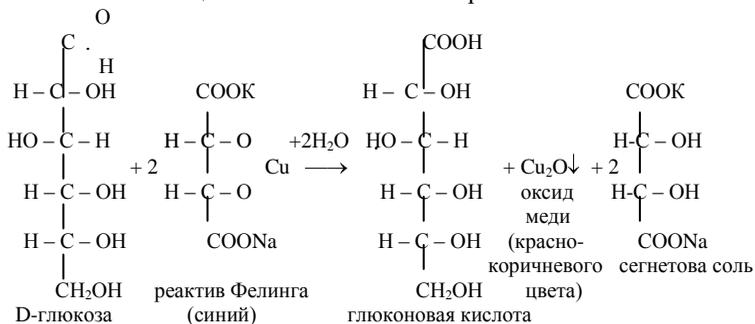
Под действием сахаразы в растворе появится глюкоза и фруктоза, наличие которых открывают с помощью реакции Троммера.

Реакция Троммера:



Обнаружить продукты гидролиза можно с помощью реактива Фелинга.

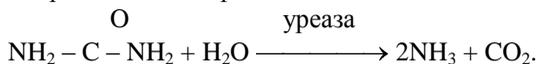
Реакция окисления глюкозы реактивом Фелинга:



В пробирки вносят 0,5-1 мл 10% раствора гидроксида натрия и прибавляют по каплям 1% раствор сульфата меди. Образующийся гидроксид меди окрашивает раствор в голубой цвет. Верхнюю часть жидкости нагревают до появления желтого, переходящего в красный цвет осадка. Изменение цвета и появление осадка говорит об окислении глюкозы и восстановлении меди.

Опыт 2. Обнаружение уреазы. Уреаза – фермент, катализирующий расщепление мочевины с образованием углекислого газа и аммиака. В преджелудках жвачных уреаза выделяется микроорганизма-

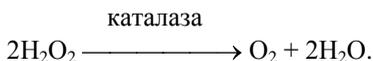
ми и способствует использованию мочевины, вводимой с кормами, как источника азота при синтезе микробияльного белка.



В две пробирки наливают по 1 мл 5% раствора мочевины и по 5 капель 1% спиртового раствора фенолфталеина. В одну пробирку вносят 5 мл препарата уреазы или 0,01% раствор кристаллической уреазы и встряхивают. В пробирке с уреазой образующийся аммиак сдвигает pH среды в щелочную сторону, и раствор окрашивается в розовый цвет. В пробирке без уреазы цвет раствора не изменяется.

Препарат уреазы готовят заранее. К 8 г соевой муки приливают 46 г воды, 2 мл 0,1 моль/л раствора HCl и несколько капель толуола, перемешивают и оставляют на 10-12 часов. Фильтрат используют как препарат уреазы.

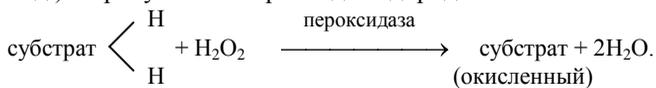
Опыт 3. Обнаружение каталазы в крови. Каталаза – фермент, катализирующий окисление пероксида водорода с образованием кислорода и воды



Фермент присутствует во многих тканях и эритроцитах крови, где обезвреживает постоянно образующийся в процессе окисления веществ пероксид водорода.

В две пробирки вносят по 10 капель 1% раствора пероксида водорода. В одну из них добавляют 5 капель крови (разведение 1:500), в другую 5 капель воды. При наличии каталазы происходит выделение пузырьков газа – кислорода.

Опыт 4. Обнаружение пероксидазы. Пероксидаза – фермент, ускоряющий реакцию окисления веществ (фенолов, аминов, альдегидов и т. д.) в присутствии пероксида водорода по схеме:



Фермент содержится во многих тканях, в молоке, лейкоцитах, корне хрена. Обнаружить пероксидазу крови можно бензидином, который в присутствии пероксидазы окисляется до соединения оранжевого цвета.

В две пробирки вносят по 1 мл 0,5% раствора бензидина и по 2 мл 3% раствора пероксида водорода. В одну из пробирок капают 1 каплю крови и наблюдают изменение цвета.

Пероксидазу, содержащуюся в корне хрена, можно обнаружить реакцией окисления пирогаллола. Пирогаллол в присутствии пероксидазы окисляется в пурпурогаллин – соединение красного цвета.

В две пробирки вносят по 5 мл вытяжки хрена. Вытяжку хрена готовят заранее. Измельчают 100 г хрена, заливают 100 мл 0,05% раствора карбоната натрия, настаивают 4 часа, фильтрат используют как раствор пероксидазы. В обе пробирки вносят по 1 мл 3% раствора пероксида водорода. В одну из пробирок вносят 2 мл 2% раствора пирогаллола и наблюдают изменение окраски.

Результаты опытов по обнаружению ферментов в биоматериале перенести в таблицу.

№ опыта	Субстрат	Фермент	Второй реагент	Наблюдаемые изменения	Вывод
1					
2					
3					
4					

2.2. Свойства ферментов

Помимо общих свойств, для ферментов характерны специфические свойства, отличающие их от небиологических (химических) катализаторов. Важнейшими из них являются: высокая специфичность действия, термолабильность, влияние реакции среды, активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Опыт 1. Специфичность действия ферментов. Ферменты оказывают каталитическое действие на конкретное вещество (субстрат) или группу сходных веществ. Различают:

1) Абсолютную (индивидуальную) специфичность. В этом случае фермент катализирует превращение конкретного вещества и не действует ни на какие другие. Например, уреазы гидролизуют мочевины.

2) Относительная (групповая) специфичность характерна для ферментов, катализирующих превращение группы сходных веществ. Например, амилазы гидролизуют 1-4 гликозидгликозные связи у крахмала и гликогена, пепсин гидролизует пептидные связи любых белков, липаза гидролизует сложноэфирные связи жиров.

3) Стерическая специфичность наблюдается тогда, когда фермент катализирует превращение одного из стереоизомеров α - или β -, цис- или транс-, L- или D-изомера.

В четыре пробирки вносят по 2 мл субстрата и 2 мл ферментного препарата согласно таблице.

Препарат сахаразы готовят по схеме, изложенной в разделе 2.1, опыт 1 с. 13.

Препарат амилазы здесь и далее готовит каждый студент индивидуально. Для этого следует 1 раз тщательно ополоснуть ротовую полость дистиллированной водой, набрать новую порцию воды и подержать ее во рту 2-3 минуты, стимулируя отделение слюны, порцию выпускают в стаканчик и используют как препарат амилазы и мальтазы (при необходимости слюну, разведенную водой, можно отфильтровать).

№ пробирки	Раствор субстрата	Ферментный препарат	Наблюдаемые явления в присутствии реактива Фелинга	Выводы
1	Сахароза	Сахараза (дрожжи)		
2	Сахароза	Амилаза (слюна)		
3	Крахмал	Сахараза (дрожжи)		
4	Крахмал	Амилаза (слюна)		

Пробирки помещают в термостат на 25-30 минут при температуре 37-40°C. Затем вынимают, добавляют по 0,5 мл реактива Фелинга и ставят на водяную баню на 5-10 минут. По окончании нагревания убеждаются в гидролизе субстратов в 1 и 4 пробирках и отсутствии гидролиза во 2 и 3 пробирках.

Таблицу оформить в тетради. Опыты подтвердить написанием реакций гидролиза крахмала и сахарозы.

Опыт 2. Термолабильность ферментов. Каталитическая активность ферментов проявляется в условиях нормальной температуры (температура тела) и давления. Большинство ферментов проявляют высокую каталитическую активность в границах от 30 до 50°C. Увеличение температуры до 60°C и выше приводит к тепловой денатурации белка, следовательно, ферменты, являясь белками, теряют свою активность (инактивируются). Сухие препараты ферментов способны выдерживать нагревание до 100°C без заметной потери своей активности. Низкие температуры, как правило, вначале снижают, затем прекращают каталитическое действие ферментов, но не инактивируют их.

Возвращение фермента в оптимальные температурные условия (37-40°C) восстанавливает его активность.

Нумеруют 4 пробирки, вносят в них по 1-2 мл раствора слюны. 1 и 2 пробирки охлаждают в сосуде со снегом, криостате или холодильной камере в течение 15-20 минут. Содержимое 3 пробирки кипятят в течение 1-2 минут. В 3 и 4 пробирки вносят по 2-3 мл 1% раствора крахмала и ставят в термостат при температуре 37-40°C на 20-30 минут.

В 1 и 2 пробирки после охлаждения тоже вносят по 2-3 мл раствора крахмала, первую пробирку возвращают в холод, вторую ставят в термостат на 20-30 минут. По окончании времени охлаждения и термостатирования во все четыре пробирки вносят 1 мл реактива Фелинга и производят пробу на восстанавливающие сахара. При правильно выполненной работе в 1 и 3 пробирках реакция должна быть отрицательной, во 2 и 4 пробирках – положительной.

Результаты опыта и выводы оформить в виде таблицы.

№ пробирки	Раствор амилазы (слюна), мл	Субстрат (крахмал), мл	Производимые действия	Реагент на восстанавливающие сахара, мл	Выводы
1	1-2 охлаждают	2-3	охлаждение	1	
2	1-2 охлаждают	2-3	термостатирование	1	
3	1-2 кипятят	2-3	-«-	1	
4	1-2	2-3	-«-	1	

Опыт 3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов. Активаторы – вещества, повышающие активность ферментов или приводящие ферменты в активное состояние из неактивного. Многие ферменты синтезируются в неактивной форме в виде проферментов (зимогенов) – пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, панкреатическая липаза и т. д. и только в присутствии активаторов преобразуются в активные, способные к каталитическому действию формы. Механизм активации большинства ферментов, особенно пищеварительных, заключается в расщеплении пептидных связей и отщеплении от фермента низкомолекулярного пептида. При этом происходит открытие и формирование активного центра фермента.

Активаторами могут выступать минеральные соли, кислоты, органические вещества (желчные кислоты), специальные ферменты, ионы металлов. Иногда для активации требуется присутствие сразу нескольких активаторов.

Ингибиторы – вещества, способные снижать или полностью прекращать активность ферментов. В большинстве случаев действие ингибиторов сводится к блокированию или изменению конформации активного центра фермента. В качестве ингибиторов могут выступать яды, медпрепараты, промежуточные продукты метаболизма.

Одни и те же вещества могут выступать как ингибиторами, так и активаторами для различных ферментов.

Желчь содержит поверхностно активные соли желчных кислот, которые выступают активаторами липазы. Кроме этого, желчь способствует диспергированию жиров с образованием эмульсии, что увеличивает площадь соприкосновения субстрата (жира) и фермента (липазы) и облегчает их взаимодействие.

В две колбочки помещают по 2 мл растительного масла. В первую вносят 6 мл дистиллированной воды, во вторую – 6 мл 10% раствора желчи. В обе колбочки вносят по 4 мл препарата липазы и ставят в термостат при температуре 37-40°C на 25-30 минут. По окончании инкубирования в колбы вносят по 3-4 капли фенолфталеина и титруют 0,05 моль/л раствором гидроксида калия. В присутствии желчи на титрование расходуете больше раствора гидроксида калия. Объясните наблюдаемое явление и сделайте вывод.

Опыт 4. Влияние реакции среды на активность амилазы. Образование фермент-субстратного комплекса в ходе ферментативной реакции зависит от степени ионизации функциональных групп активного центра фермента и субстрата. В свою очередь степень ионизации ионогенных групп зависит от реакции среды, в которой находится фермент и субстрат. Большинство ферментов максимально активны в зоне pH близкой к нейтральной. Значение pH, при котором скорость ферментативной реакции максимальна, называют оптимумом pH данного фермента. Например, оптимум pH для амилазы слюны лежит в пределах 6,8-7,0, пепсина – 1,5-2,5, липазы панкреатической – 7,0-8,5. Смещение pH в любую сторону от этого значения снижает активность фермента. Значение pH, соответствующее оптимальному, не всегда совпадает со значением pH, характерным для внутриклеточной среды организма и может быть одним из факторов, характеризующим и отвечающим за регулирование активности ферментов внутри клетки.

В шесть пронумерованных пробирок наливают пипеткой по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку вносят 1 мл 0,1 % раствора соляной кислоты. Перемешивают жидкость, затем переносят 1 мл полученной смеси из первой пробирки во вторую. Перемешивают содержимое второй пробирки и переносят 1 мл полученной смеси в третью и т. д. Из шестой пробирки 1 мл смеси выливают. В итоге получают различное разбавление соляной кислоты во всех шести пробирках.

Во все пробирки наливают по 2 мл раствора крахмала и по 1 мл слюны, разбавленной в 10 раз (условно). Затем содержимое пробирок перемешивают и ставят их в термостат при 37°. Через 30 мин пробирки вынимают из термостата, охлаждают и добавляют в каждую из них по 2-3 капли раствора йода, перемешивают содержимое и наблюдают окраску жидкости в пробирках. Выясняют, при какой концентрации кислоты начинается гидролиз крахмала.

Данные опыта сводят в таблицу.

Влияние реакции среды на активность амилазы

Кислотность раствора	№ пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Концентрация раствора, %						
Концентрация раствора, г-экв.						
Концентрация ионов водорода (Сн ⁺)						
Вычисленное значение рН						
Окраска раствора с йодом						

Расчет значения рН производят по формуле $pH = -\lg C_{H^+}$.

Вывод: Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны происходит при значении рН =

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Барковский, Е. В. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: учеб. пособие / Е. В. Барковский, С. В. Ткачев, Г. Э. Атрахимович и др. – М.: Высшая школа, 1997. – 126 с.
2. Биохимия животных: Учебник для студ. зооинженер. и ветеринарн. ф-тов с/х вузов / А.В. Четкин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский /Под ред. проф. А.В.Четкина. – М., Высш. школа, 1982. – 511 с.
3. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов обучающихся по агрономическим специальностям 6-ое изд, стереотипное. – Дрофа:– 2004. – 672 с.
4. Князев Д. А. Неорганическая химия/ Д. А. Князев, С. Н. Смарыгин. – М.: Высш. шк., 1990. - 425 с.
5. Кононский, А.И. Биохимия животных: учебник пособие для вузов/ А. И. Кононский. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. – 432 с.
6. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие/А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная, И. В. Ковалева, Т. В. Булак.–Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
7. Химия. Общая химия с основами аналитической : учебно-методическое пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Горки : БГСХА, 2012. – 204 с. ISBN 978-985-467-393-6.
8. Цыганов, А.Р. Биохимия практикум: учебное пособие / А.Р. Цыганов, И.В. Сучкова, И.В. Ковалева. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
9. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии : учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск : ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

Дополнительная

1. Алешин, В.А. и др. Практикум по неорганической химии - М.: Издат. Центр "академия", 2004. – 384 с.
2. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. - 704 с.
3. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
4. Введение в лабораторный практикум по неорганической химии: Учеб. пособие / В.В. Свиридов, Г.А.Попкович и др. – Мн: Выш. шк., 2003. – 96с.
5. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 382с.
6. Кудряшов Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 160 с.
7. Ленский, А. С. Введение в биоорганическую и биофизическую химию / А. С. Ленский. – М.: Высшая школа, 1989.
8. Метревели, Т.В. Биохимия животных. Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 295с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцепродуктов. /Под ред. Дж. К.Мида; пер. с англ. И.С.Горожанкиной.- М.: Профессия, 2009. - 384с.
10. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. - 566 с.
11. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов: учебник для вузов/ Ю.А. Ершов, В.А. Попков и др. 6-е изд.,стер. М.: Высш. шк., 2007. – 560с.
12. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб: Химиздат, 2001.
13. Угай, Я. А. Общая и неорганическая химия: учеб. для вузов. 4-е изд. - М.: Высш. шк., 2004. – 440 с.

14. Хазипов, Н.З. Биохимия животных: учебник / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.

Справочники

1. Кольман, Я., Рем, К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. - 469 с.

2. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ/ Под ред. Р.А. Лидина. – 5-е изд., стер. – М.: КолосС, 2008, - 480 с.: ил.

Составители

Поддубная Ольга Владимировна

Ковалева Ирина Владимировна

Мохова Елена Владимировна