**Занятие 3**

**Тема 1.3 :«Ферменты. строение И Общие**

**свойства ФЕРМЕНТОВ»**

УЧЕБНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ работа студентов (УИРС)

Обоснование темы.

Процессы метаболизма в организме осуществляются при участии ферментов. Любые проявления живого организма - дыхание, нервно-психическая деятельность, секреция, мышечное сокращение и другие непосредственно связаны с действием соответствующих ферментных систем.

Именно поэтому важно знать, что представляют собой ферменты, их строение, свойства, механизм действия, а также использование ферментов для диагностики и лечения заболеваний.

Цель занятия

1.Знать строение и свойства простых и сложных ферментов.

2.Научиться методам качественного обнаружения ферментов в биологических объектах.

3.Изучить некоторые свойства ферментов на примере фермента слюны – α-амилазы.

Необходимый исходный уровень

Из курса бионеорганической и биоорганической химии студент должен знать:

- понятие о ферментах, их строение и функции;

- свойства неорганических и органических катализаторов;

* принципы качественного обнаружения ферментов.

Основные понятия темы: ферменты, изоферменты, проферменты, мультиферментные комплексы, общие свойства ферментов. Качественные реакции на ферменты.

ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. История развития учения о ферментах.
2. Химическая природа ферментов. Изоферменты. Проферменты (зимогены). Мультиферментные комплексы.
3. Кофакторы ферментов: химическая природа, классификация, роль в биологическом катализе. Роль витаминов в построении кофакторов. Коферменты и простетические группы.
4. Общие свойства ферментов.
5. Зависимость активности ферментов от реакции среды и температуры: биологическое и медицинское значение этих свойств ферментов.
6. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности. Биологическое значение специфичности действия ферментов.
7. Принципы качественного определения ферментов.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ПрактическОЙ частИ занятия**

**Лабораторная работа 1**

***Обнаружение α-амилазы в слюне***

О присутствии фермента в том или ином биологическом объекте (слюна, кровь, моча и т.д.) судят по действию фермента на субстрат. Убыль субстрата или появление продуктов реакции свидетельствует о наличии фермента в исследуемом материале. При этом нужно обеспечить оптимальные условия для каталитического действия фермента: создать насыщенную концентрацию субстрата, оптимальные значения рН и температуры, внести необходимые кофакторы и исключить влияние ингибиторов.

*Принцип метода*: α-амилаза слюны катализирует гидролиз α–1,4 гликозидных связей в крахмале и гликогене, что приводит к расщеплению субстрата и появлению дисахарида мальтозы. Определяя убыль субстрата (крахмала) с помощью реакции с йодом судят о наличии в слюне фермента амилазы.

Химизм реакции:

(С6Н10О5)п + nН2О декстрины + nН2О  n мальтоза

###### 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  Изомальтоза | 342 | Желтая |

Ход работы: подготовка слюны: к 1 мл собранной слюны прибавляют 9 мл воды (разведение 1:10). В две пробирки вносят по 0,5 мл 1% раствора крахмала. В одну пробирку (опыт) приливают 1 мл разведенной в 10 раз слюны, в другую (контроль) - 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 минут в термостате при 400С. Затем в обе пробирки прибавляют по 1 капле раствора Люголя (раствор йода в растворе КI).

Отмечают результат (в виде таблицы).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №  Пр-ки | Субстрат  (крахмал) | Источник  Фермента - слюна | Реакция с I2  (окраска) | Превращения субстрата |
| 1 | 0,5 мл | + |  |  |
| 2 | 0,5 мл | - |  |  |

Вывод:

**Лабораторная работа 2**

***Влияние температуры на активность α-амилазы слюны (термолабильность фермента)***

Каталитическая активность ферментов зависит от температуры: при высокой температуре ферментативный белок денатурирует и теряет свои каталитические свойства. При низкой температуре (00С и ниже) фермент так же теряет свою активность вследствие холодовой денатурации, но эта потеря активности обратимая.

При температуре 30-400С активность ферментов максимальная.

Ход работы: в три пробирки вносят по 1 мл разбавленной в 10 раз слюны. Сразу же пробирку № 1 доводят до кипения на спиртовке, пробирку № 2 помещают в ледяную баню (t = 00С на 10 минут, полной холодовой денатурации при этом может не быть), пробирку №3 оставляют при комнатной температуре. Во все пробирки приливают по 0,5 мл 1% раствора крахмала; пробирки № 1 и 3 помещают в термостат при 400С на 10 минут, пробирка № 2 остается в ледяной бане на 10 минут. Во все пробирки прибавляют по 1 капле раствора Люголя (пробирки № 1 и 3 предварительно охлаждают).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  пр-ки | Фермент  (амилаза) | Субстрат  (крахмал) | Температура  0С | Реакция с I2 (окраска) | Активность  Фермента |
| 1 | + | + | 100 |  |  |
| 2 | + | + | 0 (снег или лед) |  |  |
| 3 | + | + | 40 |  |  |

Вывод:

**Лабораторная работа 3**

***Влияние рН на активность α-амилазы слюны***

Белковая природа ферментов подтверждается зависимостью их каталитической активности от рН среды. Все ферменты активны при рН, равном ИЭТ ферментов: смещение рН в кислую или щелочную сторону от ИЭТ вызывает изменение суммарного заряда белковой молекулы фермента, и, как следствие, изменение конформации и, следовательно, его ферментативной активности.

Ход работы: в 3 пробирки вносят по 1 мл буферных растворов с рН 2,0; 7,0; 9,0. Во все пробирки прибавляют по 0,5 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл разбавленной в 10 раз слюны. Содержимое пробирок перемешивают и помещают в термостат при 400С на 10 минут**.** Прибавляют в каждую пробирку по 1 капле раствора Люголя.

Отмечают результат (в таблице)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  пр-ки | Субстрат | Фермент | рН среды | Реакция с I2 | Активность  фермента |
| 1 | + | + | 2,0 |  |  |
| 2 | + | + | 7,0 |  |  |
| 3 | + | + | 9,0 |  |  |

Вывод:

**ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ**

I. Решите следующую ситуационную задачу: У больного, поступившего на обследование в клинику, обнаружилось в крови увеличение общей активности ЛДГ, которое характерно для болезни сердца, печени, почек. Какой вид современного анализа целесообразно использовать в этом случае для целей дифференциальной диагностики?

II. Дайте ответы на вопросы:

1. Изобразите графически зависимость активности фермента от температуры, рН среды.
2. Приведите примеры простых ферментов (ферментов-протеинов) и сложных - (ферментов - протеидов или холоферментов).

ОСНОВНАЯ УЧЕБНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Текст]: учебник / под ред. С.Е. Северина. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2012.-622 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия [Текст]: руководство к практическим занятиям / под ред. Н.Н. Чернова.- М.:ГЭОТАР - Медиа, 2009, 240 с.

2. Биохимия [Текст]: учеб. для вузов / Т.Л. Алейникова, Л.В. Авдеева, Л.Е. Андрианова и др.; под ред. Е.С. Северина. – 4-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007. -784 с.

3. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера. В трех томах. / Д.Нельсон, М Кокс. -М.: Бином. Лабораторные знания, 2011.- т.1 -682 с.

4.Николаев, А.Я. Биологическая химия [ Текст]: учеб. для студентов мед. вузов / А.Я. Николаев.- 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицинское информ. Агентство, 2007.- 568 с.