**Тема 1.2 Ферменты. Строение. Общие свойства ферментов.**

***Цель занятия***

- изучить строение и свойстваферментов как биокатализаторов;

-знать строение и свойства простых и сложных ферментов;

- научиться методам качественного обнаружения ферментов в биологических объектах;

- изучить некоторые свойства ферментов на примере фермента слюны – 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 этапы процесса катализа;

-механизмы активации и ингибирования ферментативной активности;

- теорию катализа;

- кинетику ферментативных реакций.

**Вопросы для самоподготовки**

1. История становления и развития энзимологии.
2. Сходство и различия ферментативного и не ферментативного катализа.
3. Химическая природа простых и сложных ферментов. Изоферменты. Проферменты (зимогены). Мультиферментные комплексы.
4. Кофакторы ферментов: химическая природа, классификация, роль в биологическом катализе. Роль витаминов в построении кофакторов. Коферменты и простетические группы.
5. Общие свойства ферментов.
6. Зависимость активности ферментов от реакции среды и температуры: биологическое и медицинское значение этих свойств ферментов.
7. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности. Биологическое значение специфичности действия ферментов.
8. Принципы качественного обнаружения ферментов и количественного определения активности ферментов. Единицы активности.

**Практическая часть 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)n + n Н2О **** декстрины + n Н2О n мальтоза

*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 ферментов***

***(термолабильность ферментов)***

Каталитическая активность ферментов зависит от температуры: при высокой температуре ферментативный белок денатурирует и теряет свои каталитические свойства. При низкой температуре, активность ферментов также снижается, но это снижение активности обратимое, т.к. при понижении температуры до 00С фермент не денатурирует.

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 кипятят на спиртовке в течение 2 минут, пробирку № 2 помещают в ледяную баню (t0 = 00С) на 10 минут, 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 рH на активность α - амилазы***

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 степени ионизации ионогенных групп боковых радикалов аминокислот, и, как следствие, изменение конформации белковой структуры фермента и, соответственно, 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:*

**Практическая значимость работы.**

Работа знакомит с основными свойствами ферментов как биокатализаторов белковой природы.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Привести примеры кофакторов витаминного происхождения.
2. Написать названия кофакторов, являющихся коферментами, простетическими группами.
3. Привести примеры простых, сложных ферментов

***Решить следующие ситуационные задачи****:*

1. Больной поступил в клинику с жалобами на боли в области сердца. Предположительный диагноз - инфаркт миокарда. Как изменится ЛДГ и ее изоферментный спектр в крови у такого больного?
2. Каков механизм действия сульфаниламидных препаратов, ингибирующих рост патогенных бактерий, нуждающихся в парааминобензойной кислоте.

3. При остром панкреатите происходит внутриклеточная активация трипсиногена и химотрипсиногена, в результате чего происходит разрушение тканей поджелудочной железы. Такие лечебные препараты как трасилол, контрикал, гордокс являются структурными аналогами субстратов этих ферментов. На чем основано лечебное действие трасилола?

4. Здоровые клетки способны амидировать аспарагиновую кислоту и превращать ее таким образом в аспарагин. Некоторые лейкозные клетки лишены этого свойства.

а) Напишите реакцию, катализируемую аспарагиназой.

б) Как изменится синтез белка в лейкозных клетках при введении в кровь больных лейкозом аспарагиназы и почему?

5. Амилаза - фермент поджелудочной железы, участвующей в процессе пищеварения. Какую реакцию катализирует амилаза? Какова амилазная активность в сыворотке крови и моче здорового человека? Как можно подтвердить диагноз острого панкреатита?

***Ответить на следующие вопросы:***

1. Назвать ферменты, которые используются в клинике в лечебных целях. Указать, при каких патологических состояниях используются такие ферменты как пепсин, гиалуронидаза, нуклеазы. Каковы биохимические основы применения ферментов с лечебной целью?
2. Привести примеры, демонстрирующие диагностическое значение определения активности ферментов (трансаминаз, α - амилазы, кислой и щелочной фосфатаз, изоферментов ЛДГ) в крови.

***Основная учебная литература***

1. Чиркин, А.А. Биохимия: Учебное руководство/ А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. - М.: Мед. лит., 2010.-624 с.

***Дополнительная литература***

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами : учебник / под

ред. С. Е. Северина. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 624 с.

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