**1.3.4. Биологические катализаторы**

**1. Организационный момент (5 мин)**

(СЛАЙД 1)

Цель занятия: сформировать знания о составе, строении и свойствах ферментов как биологических катализаторов белковой природы.

**2. Актуализация знаний и умений учащихся к изучению новой темы (3–5 мин)**

1. Что такое катализаторы и какую роль они выполняют в химических реакциях?

2. Что такое ферменты и где они находятся в организме животных?

3. Что было бы с организмом, если бы все реакции осуществлялись без участия катализаторов?

4. Почему при высоких температурах в тканях реакции не ускоряются, а наоборот замедляют свою скорость?

**3. Объяснение нового материала (37–40 мин)**

(СЛАЙД 2)

**Понятие о ферментах.** Ферменты – это специфические белки, образующиеся в клетках живых организмов и катализирующие происходящие в них химические реакции.

Еще с глубокой древности человек использовал ферментативные процессы в хлебопечении, виноделии, обработке кож и так далее, но не понимал их сущности.

Первые попытки сделать это относятся к XVII веку, когда, пытаясь объяснить механизм пищеварения, его сравнивали с процессом брожения – так появился термин «фермент», введенный Ян ван Гельмонтом (от латинского fermentatio – брожение).

(СЛАЙД 3)

В 1814 году русский химик К. Кирхгоф показал, что крахмал превращается в мальтозу под действием проросших зерен ячменя (солода).

(СЛАЙД 4)

В 1833 году А. Пайен и Ж. Пирсо это вещество выделили и назвали его диастазой (впоследствии оно получило название амилаза). Т. Шванн в 1836 году открыл в желудочном соке фермент пепсин.

(СЛАЙД 5)

В 1837 году Й. Берцелиус показал, что ферменты – это катализаторы, поставляемые живыми клетками. В 1862 году А. Я. Данилевский выделил из сока поджелудочной железы амилазу, липазу и трипсин. По мере открытия и изучения ферментов назрела необходимость объяснить природу их действия. Л. Пастер считал, что ферментативные процессы неотделимы от жизнедеятельности дрожжевой клетки, с другой стороны Ю. Либих отстаивал химическую природу брожения, считая, что ферменты могут проявлять свое каталитическое действие как вместе с клетками, так и вне их. Авторитет Пастера был велик, к тому же все экспериментальные данные того времени говорили, что брожения не может быть без живых дрожжевых клеток, и Пастер победил. После этого появились понятия «организованные» и «неорганизованные» ферменты. Организованными называли те ферменты, каталитическая активность которых проявляется лишь при наличии живых организмов (например, ферменты, вызывающие различные виды брожения), а неорганизованными – те, которые структурно не связаны с клетками (например, ферменты, содержащиеся в желудочном и кишечном соках). В 1878 году Ф. Кюне предложил неорганизованные ферменты называть энзимами, а за организованными сохранить название ферменты.

(СЛАЙД 6)

Спор между Пастером и Либихом был разрешен в результате работ М. Манассеиной и Э. Бухнера. Русский врач М. М. Манассеина в 1871 году показала, что дрожжевой сок обладал такой же способностью сбраживать углеводы, как и сами дрожжевые клетки. Эти опыты впоследствии были подтверждены Э. Бухнером. Термины «фермент» и «энзим» стали употребляться как синонимы.

В 1894 году Э. Фишер предложил гипотезу, объясняющую специфичность действия ферментов «ключ – замок». В начале XX века И. П. Павлов, работая с пищеварительными ферментами, впервые доказал, что они в живом организме могут существовать в неактивной форме – в виде проферментов, им также были предложены первые методы определения активности ферментов.

В 1913 году Л. Михаэлис и М. Ментен разработали теорию механизма действия ферментов и кинетику ферментативных реакций.

Важным шагом в изучении активности ферментов явилось их получение в кристаллическом виде – уреаза (Д. Самнер, 1926 г.), пепсин (1930), трипсин (1931, Д. Нортроп), что подтвердило белковую природу ферментов.

В 1960 году Д. Филлипс впервые расшифровал трехмерную структуру лизоцима с помощью рентгено-структурного анализа. В 1969 году была синтезирована рибонуклеаза (Р. Мерифилд).

Основными направлениями современной энзимологии являются:

исследования механизмов синтеза ферментов и регуляция их активности;

изучение более тонких деталей молекулярного механизма действия ферментов;

создание синтетических аналогов ферментов, наделенных аналогично нативным ферментам высокой активностью и специфичностью действия.

**Номенклатура ферментов.** Для названия ферментов используются тривиальная, рациональная и систематическая номенклатура.

Тривиальная номенклатура употребляется для ограниченного числа ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин и некоторых других). Ее достоинство – краткость.

Более распространенной и употребляемой в практике является рациональная номенклатура. Название ферментов по ней складывается из корня латинского названия субстрата с прибавлением суффикса -аза (амилаза, мальтаза и другие). В ряде случаев в названии фермента может быть отражен тип катализируемой реакции (лактатдегидрогеназа, пируватдекарбоксилаза и других). Достоинством этой номенклатуры является краткость, а недостатком – ограниченная информация, а в ряде случаев и отсутствие информации о химической природе субстрата и типе реакции.

В 1961 году была принята международная (систематическая) номенклатура, названия ферментов по которой складываются из названий субстратов, типа катализируемой реакции с прибавлением суффикса -аза.

Каждому ферменту присваивается шифр, основанный на четырехзначном десятичном коде. 1-я цифра указывает номер класса, к которому относится фермент, 2-я – номер подкласса, 3-я – номер подподкласса и 4-я – порядковый номер фермента в подподклассе. Вначале шифра ставятся буквы КФ (классификация ферментов).

Пример: COOH СООН

⏐ НАД+ ⏐

HO⎯ C⎯H ⎯⎯⎯⎯→ С=О

⏐ НАДН+Н+ ⏐

CH3  СН3

L-лактат пируват

Название фермента катализирующего вышеуказанную реакцию по рациональной номенклатуре – лактатдегидрогеназа (отщепление двух атомов водорода от молочной кислоты), а по международной – 1.1.1.27 L-лактат: НАД-оксидоредуктаза (в качестве субстратов выступает молочная кислота).

(СЛАЙД 7)

**Химическая природа ферментов.** По химической природе ферменты являются белками и подразделяются на простые и сложные. Простые ферменты при гидролизе расщепляются до аминокислот. Примеры простых ферментов: трипсин, уреаза, рибонуклеаза.

Большинство природных ферментов относится к сложным белкам, содержащим, кроме белкового компонента, и небелковую часть.

(СЛАЙД 8)

В зависимости от строения ферменты делятся на мономерные и олигомерные. Мономерные ферменты (например, рибонуклеаза, трипсин) содержат одну полипептидную цепь и имеют первичную, вторичную и третичную структуры. Олигомерные ферменты содержат 2 и более полипептидных цепей (субъединиц) и имеют, помимо вышеуказанных, и четвертичную структуру. Чаще всего встречаются олигомерные ферменты с четным числом субъединиц (лактатдегидрогеназа – 4, уреаза – 8).

(СЛАЙД 9)

**Функции ферментов.** Ферменты выступают в роли катализаторов практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах, ими катализируется около 4000 биохимических реакций. Ферменты играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности, направляя и регулируя обмен веществ организма.

(СЛАЙД 10)

**Местонахождение ферментов в организме.** В клетке часть ферментов находится в цитоплазме, но в основном ферменты связаны с определенными клеточными структурами. В ядре, например, находятся ферменты, ответственные за репликацию – синтез ДНК и за ее транскрипцию – образование РНК.

(СЛАЙДЫ 11, 12)

**Основные свойства ферментов.** Ферменты обладают высокой каталитической активностью, ускоряя химические реакции в миллионы раз. Так, фермент карбоангидраза за 1 с способен гидратировать 105 молекул СО2. Скорость этой реакции в отсутствии фермента в 107 раз ниже. Активность фермента можно определить по скорости убыли субстрата или по интенсивности образования продукта реакции.

Ферменты ускоряют наступление химического равновесия, катализируют как прямую, так и обратную реакцию.

Ферменты проявляют высокую специфичность действия в отношении катализируемой реакции и субстрата. Фермент катализирует строго определенную химическую реакцию или несколько очень сходных химических реакций. Если фермент катализирует превращение только одного субстрата, то он обладает абсолютной специфичностью (например, уреаза расщепляет только мочевину). Если же фермент действует на несколько сходных по строению субстратов, то он обладает относительной специфичностью (например, алкогольдегидрогеназа катализирует окисление одноатомных спиртов, а фермент пепсин расщепляет определенные пептидные связи в белках как растительного, так и животного происхождения).

Активность ферментов регулируется. Ряд ферментов синтезируется в неактивной форме и переходит в активное состояние в физиологически соответствующем месте и времени. Например, неактивный трипсиноген, образующийся в поджелудочной железе, активируется в тонком кишечнике в результате отщепления гексапептида.

Ферменты осуществляют трансформацию различных видов энергии.

Например, при фотосинтезе энергия света превращается в химическую энергию. При мышечном сокращении энергия АТФ превращается в механическую энергию.

(СЛАЙД 13)

**Общее представление о катализе и биокатализе.** Ферменты и небиологические катализаторы, подчиняясь общим законам катализа, имеют следующие общие признаки:

они катализируют только энергетически возможные реакции;

не изменяют направления реакции;

ускоряют наступление равновесия обратимой реакции и не сдвигают его;

не расходуются в процессе реакции.

Однако ферменты обладают особыми качествами, отличающими их от небиологических катализаторов. Эти отличия связаны с особенностями строения ферментов как веществ белковой природы:

(СЛАЙДЫ 14, 15)

скорость ферментативного катализа намного выше, чем небиологического, так как ферменты сильнее снижают энергию активации. Так, например, энергия активации реакции разложения пероксида водорода без катализатора составляет 75,6 кДж/моль, с участием катализатора платины – 49,14 кДж/моль, а с участием фермента каталазы – 23,1 кДж/моль;

ферменты обладают высокой специфичностью действия;

ферменты катализируют реакции в «мягких» условиях, то есть при обычном давлении, температуре тела и рН, близкому к нейтральной среде, в то время как небиологические катализаторы действуют при высоком давлении, температуре и крайних значениях рН;

активность ферментов регулируется, что позволяет изменять скорость превращения веществ в организме, то есть приспосабливаться к действию различных факторов;

скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента, тогда как для небиологического катализатора не существует строгой зависимости скорости реакции от количества катализатора, поэтому недостаток фермента означает низкую скорость превращения вещества в организме, и наоборот, одним из путей приспособления клеток организма является образование дополнительных количеств фермента.

Для каждого фермента существует свой оптимум рН (таблица 1), при котором скорость катализируемой им реакции максимальна. Для большинства ферментов оптимум рН близок к нейтральному, хотя имеются ферменты, функционирующие при других значениях рН.

(СЛАЙДЫ 16, 17)

Таблица 1 – Оптимальные значения рH для некоторых ферментов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Фермент** | **pH** | **Фермент** | **pH** |
| Пепсин | 1,5–2,5 | Уреаза | 7,0–7,2 |
| Сахараза кишечника | 5,8–6,2 | Липаза панкреатина | 7,0–8,5 |
| Амилаза слюны | 6,8–7,0 | Трипсин | 7,5–8,5 |
| Каталаза | 6,8–7,0 | Аргиназа | 9,5–10,0 |

Изменение рН среды влияет на ионизацию кислотных (-СООН) и основных (-NH2, -SH, N имидазольного кольца гистидина) групп аминокислотных остатков активного центра фермента, что сопровождается изменением активности фермента.

При оптимуме рН функциональные группы фермента и субстрата находятся в наиболее реакционно-способном состоянии.

Знание оптимумов рН ферментов имеет важное значение для практической медицины. Например, пепсин, расщепляющий пептидные связи в белках, функционирует в сильно кислой среде, поэтому для восстановления нарушенной активности эндогенного пепсина применят препарат пепсина с соляной кислотой, создающей нужный рН.

Оптимумом температур для большинства ферментов является температура тела 37–40оС. Более высокие температуры приводят к денатурации ферментов, так как по химической природе они являются белками.

Влияние температуры на активность ферментов имеет существенное значение для понимания процессов жизнедеятельности. При понижении температуры скорость ферментативных реакций снижается, в результате снижается активность клеточных функций. Повышение температуры тела, например, при инфекционных заболеваниях, ускоряет химические реакции в организме, что влечет за собой расточительное использование эндогенных субстратов в клетках больного организма.

Термозависимость ферментов широко используется в практике (искусственное охлаждение организма при проведении хирургических операций; хранение спермы, необходимой для искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, осуществляется при температуре –196оС; сохранность пищевых продуктов при низких температурах является результатом низкой активности ферментов микроорганизмов, способных вызвать порчу этих продуктов).

(СЛАЙДЫ 18, 19)

**Применение ферментов в ветеринарной медицине и в животноводстве.** Ферменты широко применяются в различных отраслях народного хозяйства, в том числе в ветеринарной медицине и в животноводстве.

В связи с высокой специфичностью действия ферменты используются в диагностических целях. Разделом клинической биохимии является энзимология, которая изучает изменение ферментного спектра организма и активности ферментов при патологических процессах. Так, например, при паренхиматозной желтухе в сыворотке крови резко возрастает активность аланинаминотрансферазы, а при механической желтухе и патологии костной ткани – щелочной фосфатазы, при заболеваниях поджелудочной железы – амилазы, при патологии печени и миокарда – лактатдегидрогеназы и аминотрансфераз.

(СЛАЙД 20)

Широко распространено в медицине применение ферментативных препаратов при лечении различных заболеваний (энзимотерапия). Например, гиалуронидаза применяется при артритах, глазных заболеваниях, она также ускоряет всасывание различных солевых растворов, вводимых подкожно, так как происходит деполимеризация мукополисахаридов и увеличивается проницаемость тканей и сосудистых стенок. Препараты трипсина в сочетании с антибиотиками используют для лечения хронических воспалений конечностей. Панкреатическая ДНК-аза применяется для лечения некоторых респираторных заболеваний. При лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта применяются ферментативные препараты пепсина, трипсина, химотрипсина и их смеси. РНК-аза, гиалуронидаза, эластаза, коллагеназа применяются для обработки ран, воспалительных очагов, ожогов, устранения отеков, гематом. Аспарагиназа, расщепляющая аспарагин, необходимый для синтеза белков раковыми клетками, используется при лечении злокачественных образований.

Использование очищенных индивидуальных ферментов длительное время сдерживалось их дороговизной и невысокой устойчивостью. Применение ферментов, достаточно прочно связанных (иммобилизованных) с нерастворимыми полимерными материалами, прежде всего, сделало процессы более технологичными. Появилась возможность использовать непрерывные процессы, основанные на пропускании раствора субстрата через колонку с иммобилизованным ферментом. Исчезла проблема отделения прореагировавших компонентов от фермента, резко повысилась эффективность использования фермента. Оказалось так же, что связывание с носителем часто повышает термическую устойчивость фермента.

Применение иммобилизованных ферментов вместо растворимых оказалось в ряде случаев предпочтительным и при использовании ферментов в качестве медицинских препаратов, которые в силу большей устойчивости дольше удерживаются в организме. Иммобилизованные ферменты в качестве лекарственных средств начали применять в специальных аппаратах типа «искусственной почки». Такое лечение полностью исключает нежелательные воздействия чужеродного белка и может проводиться в течение длительного времени.

Кроме того, можно создавать разнообразные удобные для применения формы иммобилизованных ферментов. Например, иммобилизация протеаз на целлюлозе позволяет получать обладающие протеолитической активностью повязки и тампоны, что удобно при использовании таких ферментов для заживления ран, язв и прочих повреждений тканей.

В клинической практике, кроме ферментов, используют и их ингибиторы. Например, для снижения свертываемости крови применяют ингибитор фибринолизина – ε-аминокапроновую кислоту. При лечении острых панкреатитов применяют препарат тразилол, который ингибирует протеолитические ферменты.

В животноводстве ферментные препараты используются для повышения эффективности использования питательных веществ корма. Эти ферментные препараты дополняют выделяемые организмом ферменты и значительно ускоряют расщепление питательных веществ корма, повышая полноту усвоения компонентов корма.

Знакомство с профессией – мастер производства цельномолочной и кисломолочной продукции. Это люди с широким кругом должностных обязанностей. Они полностью ведут процесс производства пастеризованного молока, кисломолочной продукции, творога, сырково-творожных изделий, сметаны и других продуктов. Они осуществляют учет поступающего сырья (молока, сливок, масла и других) по количеству и качеству, распределяют сырье по видам производства в зависимости от его качества. Мастер производства кисломолочной продукции контролирует приготовление заквасок и раствора сычужного фермента для вырабатываемых видов продукции, регулирует температурный режим процесса сквашивания молока, контролирует процессы сквашивания, охлаждения, определяет готовность созревания по лабораторным анализам. Эти специалисты участвуют в маркировке затаренной продукции и ее отгрузке, оформлении документации, руководят и организуют технологический процесс, ведут технологический журнал учета расхода молока, сливок, основных и вспомогательных материалов, химикатов.

(СЛАЙД 21)

Просмотр видеофильма «Ферменты» (13 мин).

**4. Практическая работа (37–40 мин)**

Цель: обнаружение дегидрогеназ и пероксидаз в растительных и животных материалах; изучение влияния температуры и рН среды на активность ферментов.

Оснащение (дополнительно к общему оборудованию): свежий 3-процентный раствор пероксида водорода, пробирки, пинцет, ткани растений (кусочки сырого и вареного картофеля) и животных (кусочки сырого и вареного мяса), песок, ступка и пестик.

Порядок выполнения работы.

Приготовьте четыре пробирки, прилейте в них по 3 мл 3-процентного раствора пероксида водорода, затем поместите в первую пробирку кусочек свежего картофеля, во вторую – кусочек вареного картофеля, в третью – кусочек сырого мяса, в четвертую – кусочек вареного мяса. Пронаблюдайте, что будет происходить в каждой пробирке. Запишите свои наблюдения в таблицу. Сделайте вывод об активности фермента пероксидазы в тканях и переработанных (вареных) продуктах питания.

|  |  |
| --- | --- |
| **Вид ткани** | **Признаки** |
| Свежий картофель |  |
| Вареный картофель |  |
| Свежее мясо |  |
| Вареное мясо |  |

**5. Подведение итогов факультативного занятия (5 мин)**

1. Что имеют общего и чем различаются неорганические катализаторы и ферменты?

2. Какими свойствами обладают ферменты как биологические катализаторы белковой природы?

3. Чем отличается строение простых и сложных ферментов?

4. Что такое специфичность действия ферментов и на чем она основана?

5. Как применяются ферменты в сельском хозяйстве и ветеринарии?