

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Методические рекомендации для
самостоятельной работы обучающихся по дисциплине**

Б1.В.ОД.4.2 Энзимология

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

Направленность программы Биохимия

Нормативный срок обучения 4 года

Форма обучения очная

Квалификация (степень) Исследователь. Преподаватель-исследователь

СОДЕРЖАНИЕ

1. Организация самостоятельной работы.....	3
2. Методические рекомендации по самостоятельному изучению вопросов.....	4
3. Методические рекомендации по подготовке к занятиям.....	5
3.1. Лабораторная работа 1. Обнаружение действия пероксидазы, липазы, сахаразы, уреазы, амилазы.....	5
3.2. Лабораторная работа 2. Кинетика действия липазы. Влияние желчи на активность липазы.....	5
3.3. Лабораторная работа 3. Определение активности каталазы.....	5
3.4. Лабораторная работа 4. Определение амилалитической активности экстракта поджелудочной железы.....	5
3.5. Лабораторная работа 5. Количественное определение активности α-амилазы.....	5
3.6. Лабораторная работа 6. Количественное определение активности липазы.....	5
3.7. Лабораторная работа 7. Количественное определение протеолитической активности экстракта поджелудочной железы.....	6
3.8. Лабораторная работа 8. Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы, сахаразы, уреазы, амилазы.....	6
3.9. Лабораторная работа 9. Исследование термолабильности ферментов.....	6
3.10. Лабораторная работа 10. Активаторы и ингибиторы ферментов.....	6

1. ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1.1. Организационно-методические данные дисциплины

№ п.п.	Наименование темы	Общий объем часов по видам самостоятельной работы (из табл. 5.1 РПД)				
		подготовка курсового проекта (работы)	подготовка реферата/эссе	индивидуальные домашние задания (ИДЗ)	самостоятельное изучение вопросов (СИВ)	подготовка к занятиям (ПкЗ)
1	2	3	4	5	6	7
1	Тема 1. История открытия и исследования ферментов. Общие представления о ферментах, ферментативном катализе.	-	-	-	4	4
2	Тема 2. Принципы классификации и номенклатуры ферментов.	-	-	-	4	4
3	Тема 3. Кинетика действия ферментов. Константа Михаэлиса. Скорость ферментативной реакции.	-	-	-	6	6
4	Тема 4. Кофакторы и коферменты.	-	-	-	4	6
5	Тема 5. Регуляция биосинтеза и активности ферментов. Участие ферментов в метаболизме.	-	-	-	6	4
6	Тема 6 Энзимодиагностика. Энзимопатия.	-	-	-	4	6
7	Тема 7 Генная инженерия ферментов. Инженерная энзимология.	-	-	-	6	4
	Итого	-	-	-	34	34

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САМОСТОЯТЕЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВОПРОСОВ

2.1. История открытия и исследования ферментов. Общие представления о ферментах, ферментативном катализе.

Следует упомянуть следующих ученых, стоящих у истоков энзимологии: химик ванн Гельмонт, Луи Пастер, Э.Бухнер, Дж. Самнер, Томас Чек. При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что ферменты обычно проявляют высокую специфичность по отношению к своим субстратам (субстратная специфичность). Это достигается частичной комплементарностью формы, распределения зарядов и гидрофобных областей на молекуле субстрата и в центре связывания субстрата на ферменте.

2.2. Принципы классификации и номенклатуры ферментов.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что каждый фермент имеет 2 названия. Первое - короткое, так называемое рабочее, удобное для повседневного использования. Второе (более полное) - систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента.

2.3. Кинетика действия ферментов. Константа Михаэлиса. Скорость ферментативной реакции.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что одним из характерных проявлений жизни на Земле является уникальная способность живых организмов кинетически регулировать течение химических реакций, тем самым подавляя стремление к достижению термодинамического равновесия. Основная цель изучения кинетики ферментативных реакций — получение информации, способствующей выяснению молекулярного механизма действия фермента.

2.4. Кофакторы и коферменты.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что многие ферменты являются конъюгированными белками, содержащими простетические группы, не имеющие в своем составе аминокислот. Конъюгированный белок принято называть холоферментом, он может диссоциировать на белковый компонент — апофермент и небелковую простетическую группу — кофактор. Некоторые органические кофакторы ферментов действуют как акцепторы или доноры атомов или функциональных групп, которые удаляются от субстрата или присоединяются к нему. Такие кофакторы часто легко диссоциируют из комплекса с ферментом, и в этом случае их принято называть коферментами.

2.5. Регуляция биосинтеза и активности ферментов. Участие ферментов в метаболизме.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что активность ферментов в клетке непостоянна во времени. Ферменты чутко реагируют на ситуацию, в которой оказывается клетка, на факторы, воздействующие на нее как снаружи, так и изнутри. Главная цель такой чувствительности ферментов — отреагировать на изменение окружающей среды, приспособить клетку к новым условиям, дать должный ответ на гормональные и иные стимулы.

2.6 Энзимодиагностика. Энзимопатия.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что для энзимодиагностики имеют большое значение знания о субклеточной локализации ферментов. Так, появление в плазме крови ферментов, имеющих только цитозольную локализацию, свидетельствует о воспалительном процессе; при обнаружении митохондриальных или ядерных ферментов можно говорить о более глубоких повреждениях клетки, например о некрозе.

2.7 Генная инженерия ферментов. Инженерная энзимология.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на то, что создание биокатализаторов нового поколения - мобилизованных, т.е. связанных ферментов открыло

перед прикладной энзимологией новые перспективы. Иммобилизация фермента - это методический прием, при котором молекулу биокатализатора включают в какую либо фазу, отделенную от фазы свободного раствора, но способную обмениваться с ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЗАНЯТИЯМ

3.1. Лабораторная работа 1. Обнаружение действия пероксидазы, липазы, сахаразы, уреазы, амилазы.

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что 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.

3.2. Лабораторная работа 2. Кинетика действия липазы. Влияние желчи на активность липазы.

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что гидролиз жира легко наблюдать под влиянием липазы поджелудочной железы. Удобным субстратом является молоко, жир который находится в эмульгированном состоянии. Активатором липазы является желчь. Степень гидролиза жира можно определить по изменению pH за счет образования свободных жирных кислот или количества этих кислот, определяемых титрованием раствором щелочи отдельных проб молока.

3.3. Лабораторная работа 3. Определение активности каталазы.

Приступая к выполнению данной работы, необходимо знать, что выделяют ферменты так же, как и другие белки. Тем не менее есть приемы, применяемые преимущественно для ферментов – это экстракция глицерином для сохранения нативных свойств ферментов, метод ацетоновых порошков (осаждение и быстрое обезвоживание при температуре -10°C тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты), адсорбция с последующей элюцией с адсорбента, метод ионообменной хроматографии, метод молекулярных сит, электрофорез и изоэлектрофокусирование

3.4. Лабораторная работа 4. Определение амилалитической активности экстракта поджелудочной железы.

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что амилаза содержится не только в поджелудочной железе, но и в слюнных железах, печени, тонкой кишке, почках и маточных трубах. Поэтому повышение ее активности в сыворотке может быть обусловлено поражением этих органов.

3.5. Лабораторная работа 5. Количественное определение активности α -амилазы.

При подготовке к занятию необходимо помнить, что для определения фермента нельзя использовать оксалатную или цитратную кровь, т.к. соли щавелевой и лимонной кислот являются ингибиторами α -амилазы.

3.6. Лабораторная работа 6. Количественное определение активности липазы.

При подготовке к занятию необходимо знать что, Концентрация липазы увеличивается при приеме некоторых лекарственных средств: барбитуратов, гепарина, наркотических анальгетиков, индометацина и др., а также при перитонитах и перфорациях желудка и кишечника. Эпидемический паротит («свинка») сопровождается повышением уровня липазы в крови только в случае одновременного поражения железистых органов и поджелудочной железы в их числе. Активность липазы снижается при онкологических заболеваниях (за исключением карциномы поджелудочной железы), а также при повышении уровня триглицеридов в крови. Последнее может объясняться неправильным питанием, в частности избыточным употреблением жиров.

3.7. Лабораторная работа 7. Количественное определение протеолитической активности экстракта поджелудочной железы.

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что поджелудочная железа вырабатывает и выделяет необходимые ферменты, которые расщепляют самые основные компоненты, входящие в состав практически всех продуктов питания: жиры, углеводы и белки. Этими ферментами являются липаза, протеаза и амилаза.

3.8 Лабораторная работа 8. Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы, сахаразы, уреазы, амилазы.

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называют субстратом. В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата.

3.9 Лабораторная работа 9. Исследование термолабильности ферментов

При выполнении данной работы необходимо обратить внимание на то, что ферменты обладают таким свойством как - термолабильность, т. е. высокой чувствительностью к изменениям температуры. Так как ферменты являются белками, то для большинства из них температура выше 70 °C приводит к денатурации и потере активности. При увеличении температуры до 10 °C реакция ускоряется в 2-3 раза, а при температурах близких к 0 °C скорость ферментативных реакций замедляется до минимума.

3.10 Лабораторная работа 10. Активаторы и ингибиторы ферментов.

Выполняя работу следует помнить о конкурентном ингибировании, которое может быть вызвано веществами, имеющими структуру, похожую на структуру субстрата, но несколько отличающуюся от структуры истинного субстрата. Такое ингибирование основано на связывании ингибитора с субстратсвязывающим (активным) центром.

Разработал профессор

В.Н.Никулин