

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «СЕВЕРО-ОСЕТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ КОСТА ЛЕВАНОВИЧА ХЕТАГУРОВА»

УТВЕРЖДЕНЫ  
Советом факультета  
химии, биологии и  
биотехнологии

Председатель совета  
факультета

Ф.А. Агаева



**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ  
ПО ТЕМЕ «ФЕРМЕНТЫ»**

**для студентов - бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки  
04.03.01 –Химия, 44.03.05 – Педагогическое образование (с двумя профилями  
подготовки)**

**Профили Химия, Биология**

УДК 542  
ББК 28.707.2  
М

Методические указания к лабораторному практикуму по теме «Белки» предназначены для студентов - бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки 04.03.01 –Химия, 44.03.05 – Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки) Профили Химия, Биология и рекомендованы для использования в учебном процессе советом факультета химии, биологии и биотехнологии (протокол № 12 от «30» июня 2019 г.)

**Составители:** канд. хим. наук, доц. **Н.А. Саламова,**  
канд. хим. наук, доц. **А.А. Арутюнянц**

**Научный редактор:** канд. хим. наук, доц. **И. М. Бигаева**

**Рецензент:** **докт. хим. наук, проф. Н.Ф. Бирагова**  
(ФГБОУ ВО «СКГМИ (ГТУ)»)

**Ферменты** (энзимы) - это вещества, которые присутствуют в тканях и клетках всех живых организмов и способны во много раз ускорять протекающие в них химические реакции.

Ферменты - самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Они могут быть простыми белками (например, гидролитические ферменты - протеазы, липазы, рибонуклеаза). Но в большинстве случаев ферменты - сложные белки. **Холоферменты** содержат наряду с белковой частью (**апоферментом**) небелковый компонент (**кофермент** или **простетическую группу**).

Небелковый компонент может быть связан с белковой частью молекулы ковалентными и нековалентными связями. В первом случае он называется простетической группой (например, ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота). Во втором случае кофермент взаимодействует с ферментом только на время химической реакции (например, НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>). Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях субстрата. В состав коферментов входит большинство водорастворимых витаминов.

Более 25 % всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Ионы металлов выполняют в ферментах разнообразные функции. Одни непосредственно участвуют в каталитическом акте, другие стабилизируют активный центр или поддерживают конформацию молекулы фермента; ионы двухвалентных металлов могут стабилизировать фермент-субстратный комплекс.

### Свойства ферментов

В отличие от большинства катализаторов неорганической природы ферменты обладают более высокой эффективностью и **специфичностью** действия.

Один и тот же неорганический катализатор может быть использован для ускорения многих реакций, в которых участвуют самые разнообразные вещества. Что же касается ферментов, то они воздействуют либо только на один субстрат (**абсолютная субстратная специфичность**), либо на определенный класс субстратов (**относительная субстратная специфичность**). Например, уреазы катализируют только гидролиз мочевины, а пепсин - только гидролиз белков. Субстратная специфичность объясняется пространственным соответствием активного центра фермента и его субстрата.

Ферменты **термолабильны** - нагревание до температуры 70-80°C приводит к инаktivации большинства ферментов за счет денатурации - разрушения вторичной и третичной структуры белка, т. е. потери пространственной конфигурации молекулы фермента, в том числе его активного центра.

Ферменты **чувствительны также к изменению pH среды**, при которой они действуют. Это связано с изменением пространственной конфигурации молекулы фермента при присоединении или отщеплении протонов. Для каждого

из ферментов существуют определенные **оптимальные значения температуры и pH среды**, при которых они проявляют свою максимальную активность. Например, пепсин наиболее активен при pH 1,5-2,0 (кислая среда), а трипсин - при 7,8-8,0 (слабощелочная среда). Если pH среды значительно отличается от оптимума, то фермент полностью или частично теряет свою активность.

Температура и pH относятся к неспецифическим факторам, так как в той или иной мере влияют на активность всех ферментов. Кроме того, существуют специфические факторы, которые в очень низких концентрациях повышают активность ферментов (**активаторы**) или, напротив, снижают ее (**ингибиторы**).

Регуляция активности ферментов в организме происходит через **аллостерический центр**, который обычно удален от активного центра. Этот процесс происходит чаще всего по принципу обратной отрицательной связи, когда продукт реакции аллостерически подавляет активность фермента.

Снижение активности фермента наблюдается и при конкуренции ингибитора с субстратом за активный центр фермента в случае их структурного сходства (**конкурентное ингибирование**). Это варианты обратимого ингибирования, при котором после удаления ингибитора активность фермента восстанавливается. Однако возможно и необратимое ингибирование вследствие химической модификации активного центра.

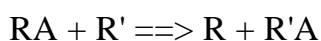
## Классификация и номенклатура ферментов

Основой принятой классификации является **тип катализируемой реакции**, который является специфичным для действия любого фермента.

Согласно Международной классификации, ферменты делят на **шесть главных классов**.

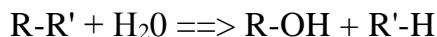
1. **Оксидоредуктазы** - ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. В активном центре оксидоредуктаз содержатся в качестве коферментов электронноакцепторные или электроннодонорные группы (например: гем, НАД<sup>+</sup> или ФАД). К числу оксидоредуктаз относятся дегидрогеназы, участвующие в энергетических процессах. Они катализируют реакции окисления биологических субстратов - углеводов, органических кислот, аминокислот, спиртов, а выделяющаяся при этом энергия затем аккумулируется в макроэргических связях аденозинтрифосфата (АТФ). Именно с НАД<sup>+</sup> или ФАД начинается последовательность оксидоредуктаз в митохондриях клетки, называемая цепью тканевого дыхания. Она включает в себя также ФМН, убихинон и цитохромы, а конечным акцептором электронов и протонов является O<sub>2</sub>.

2. **Трансферазы** - ферменты, которые катализируют обратимые реакции внутримолекулярного или межмолекулярного переноса атомов или группы атомов:



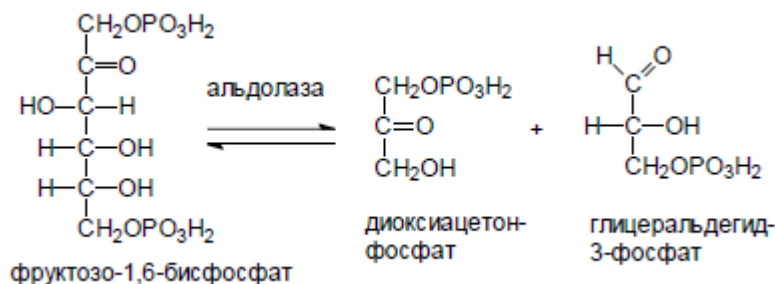
Трансферазы участвуют в реакциях метаболизма, связывающих процессы обмена углеводов, белков и липидов.

3. **Гидролазы** - ферменты, катализирующие реакции гидролиза, т.е. реакции расщепления веществ с присоединением элементов воды по месту расщепляемой связи:

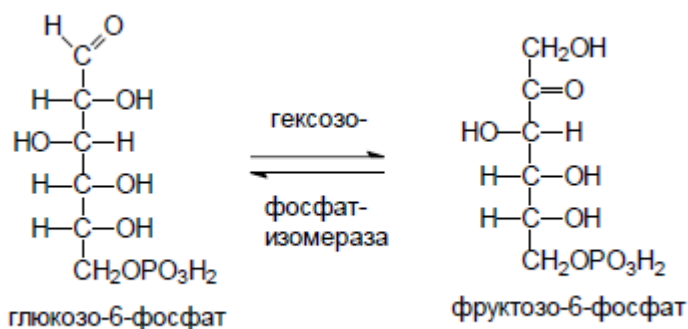


Гидролазы широко представлены в живых организмах. К ним относятся ферменты, участвующие в переваривании белков, углеводов и липидов в желудочно-кишечном тракте (протеазы, гликозидазы и липазы соответственно). Многие гидролазы применяются в пищевых технологиях.

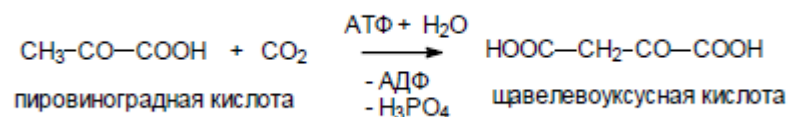
4. **Лиазы** - ферменты, катализирующие негидролитический разрыв связей C-C с образованием двойных связей. Примером такой реакции служит расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата с образованием двух фосфотриоз, катализируемое ферментом альдолазой:



5. **Изомеразы** - ферменты, которые катализируют реакции изомеризации. Например, фермент гексозофосфатизомераза катализирует изомерные превращения гексоз:



6. **Лигаза (синтетазы)** - ферменты, которые катализируют необратимые реакции синтеза. Эти реакции идут с затратой энергии, чаще всего в форме АТФ. Например, карбоксилирование пировиноградной кислоты под действием карбоксилазы:



Внутри основных классов выделяются **подклассы**, например, гидролазы по типу гидролизуемых субстратов делятся на ферменты, катализирующие гидролиз эфиров карбоновых кислот (подкласс 3.1), гликозидов (подкласс 3.2), простых эфиров и тиоэфиров (подкласс 3.3), пептидов (подкласс 3.4) и т.д. В свою очередь подклассы делятся на подподклассы, а внутри подподклассов каждый фермент получает порядковый номер. В соответствии с этим каждому ферменту присваивается четырехзначный цифровой шифр. Например, шифр ацетилхолинэстеразы КФ 3.1.1.7, где КФ - классификация ферментов, шифр алкогольдегидрогеназы - КФ 1.1.1.1.

Общепринятыми являются названия ферментов с окончанием «аза», прибавляемым к названию субстрата, превращение которого ускоряется данным ферментом (например, амилаза от греч. *Amylon* - крахмал, или липаза от греч. *Lypos* - жир и т.д.). Ферменты, кроме того, имеют названия, которые разделяются на рабочие и систематические. Рабочее название образуется из объединения названия субстрата, типа реакции и окончания «-аза».

Например: лактат + дегидроген(изация) + аза = лактатдегидрогеназа.

Систематическое название фермента формируется следующим образом: (название субстратов (через дробь), название типа химического превращения + аза). Лактатдегидрогеназа будет иметь систематическое название «L-лактат:NAD<sup>+</sup> оксидоредуктаза».

Разделение ферментов на классы строгое и не допускает произвольного изменения номеров.

### Единицы активности ферментов

Как правило, ферменты присутствуют в биологических объектах в ничтожно малых концентрациях, поэтому больший интерес представляет не количественное содержание ферментов, а их активность по скорости ферментативной реакции. Скорость реакции измеряется по убыли субстрата или накоплению продукта за единицу времени.

**Международная единица активности ферментов (Е)** соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в оптимальных для данного фермента условиях.

В Международной системе единиц (СИ) единицей активности фермента является катал (**кат**) - количество фермента, необходимое для каталитического превращения 1 моля субстрата за 1 с.

Характеристикой ферментативной реакции является величина «число оборотов фермента», показывающая, сколько молекул субстрата подвергается

превращению за единицу времени в расчете на одну молекулу фермента.

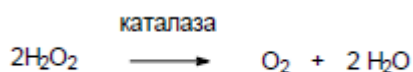
Регуляция активности ферментативных реакций многообразна. Она может осуществляться за счет изменения факторов, влияющих на активность фермента, в том числе pH, температуры, концентрации субстратов, активаторов и ингибиторов.

### Качественные реакции на присутствие ферментов

Присутствие ферментов в тканях животного и растительного происхождения можно обнаружить по их активности при помощи качественных реакций.

### Обнаружение активности каталазы в крови

**Каталаза** - окислительно-восстановительный фермент, широко встречающийся в животных и растительных тканях. Биологическая роль каталазы заключается в расщеплении токсичного для тканей пероксида водорода, образующегося в ходе физиологических окислительно-восстановительных процессов, и в повышенных количествах - в условиях патологии



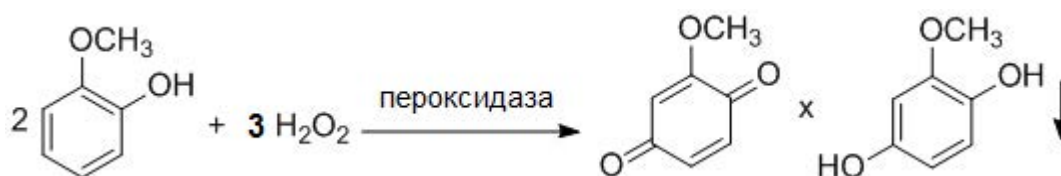
**Материалы исследования и реактивы.** Кровь дефибринированная, 1 %-й раствор пероксида водорода.

**Приборы.** Пробирки, пипетки.

**Ход определения.** В пробирку наливают около 1 мл крови и затем добавляют 10-20 капель раствора пероксида водорода. Происходит бурное выделение кислорода, жидкость в пробирке вспенивается. Повторяют пробу с прокипяченной кровью. Отмечают различие.

### Обнаружение активности пероксидазы в картофеле

Окислительно-восстановительный фермент **пероксидаза** широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных тканях (хрен, картофель и др.). В организме животных пероксидаза содержится преимущественно в крови, мышечной ткани, молоке. В молочной промышленности с помощью реакции на пероксидазу контролируют эффективность пастеризации молока. Пероксидаза катализирует с помощью перекиси водорода окисление многих фенолов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и др.). Так, при окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета:



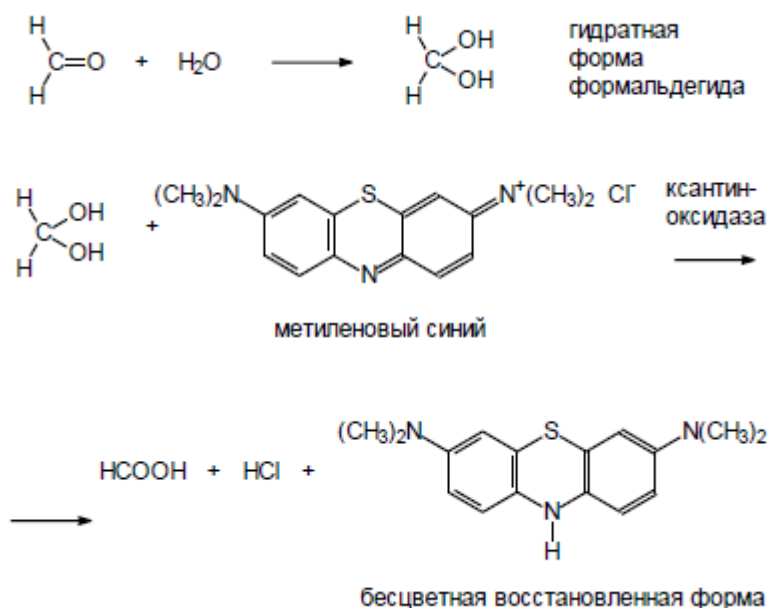
**Материалы исследования и реактивы.** Сырой и вареный картофель, 5 %-й спиртовой раствор гваякола, 1 %-й раствор пероксида водорода.

**Приборы.** Нож, пипетки или капельницы.

**Ход определения.** На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят по 1-2 капли растворов гваякола и пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется. Необходимо отметить результаты и объяснить различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

### Обнаружение активности ксантиноксидазы в сыром молоке

**Ксантиноксидаза** относится к группе окислительно-восстановительных ферментов, называемых **оксидазами**. Оксидазы катализируют окисление многих органических веществ с участием кислорода.



Так, содержащаяся в крови и в коровьем молоке ксантиноксидаза окисляет пуриновые основания (гипоксантин и ксантин) до мочевой кислоты, а также различные альдегиды до соответствующих карбоновых кислот, например, формальдегид до муравьиной кислоты. При этом акцептором атомов водорода окисляющегося субстрата может быть как кислород, так и другие вещества, например метиленовый синий.

**Материалы исследования и реактивы.** Молоко сырое и кипяченое,



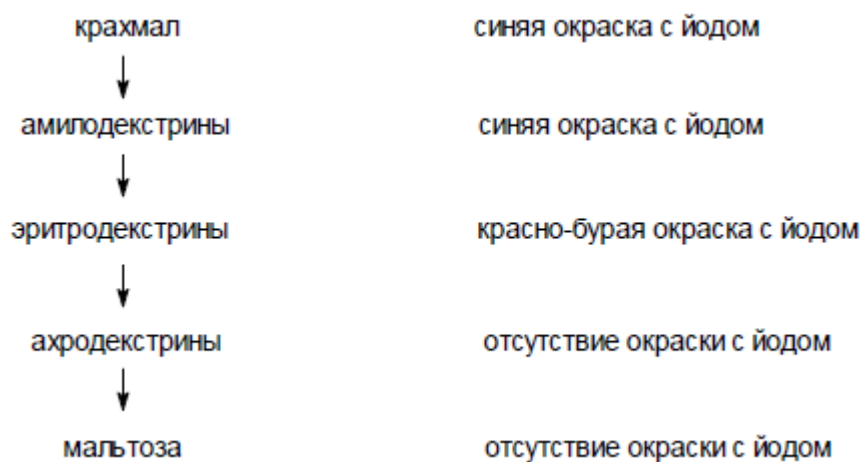
1,5%-й раствор формальдегида, 0,02 %-й раствор метиленового синего.

**Приборы.** Штативы с пробирками, пипетка объемом 1 мл, водяная баня.

**Ход определения.** Берут две пробирки, в одну наливают около 5 мл сырого молока, в другую - 5 мл кипяченого молока. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора формальдегида и 4 капли раствора метиленового синего. Смесь взбалтывают и ставят в водяную баню с температурой 37—40°C. Через некоторое время молоко в первой пробирке обесцветится вследствие катализируемого ксантиноксидазой восстановления метиленового синего и превращения последнего в неокрашенную восстановленную форму. При этом формальдегид окисляется в муравьиную кислоту. Во второй пробирке с кипяченым молоком обесцвечивания метиленового синего не произойдет вследствие тепловой денатурации фермента.

### Обнаружение активности амилазы в слюне

Гидролитический фермент слюны  *$\alpha$ -амилаза* катализирует реакцию гидролиза  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей крахмала с образованием дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов гидролиза, называемых декстринами, которые дают с раствором йода различное окрашивание:



Декстрины, близкие по строению к крахмалу (амилодекстрины), дают сине-фиолетовое окрашивание с йодом, эритродекстрины - красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза вообще не дают окрашивания.

**Материалы исследования и реактивы.** Слюна, разбавленная в 10-20 раз, 1 %-й раствор крахмала, раствор йода.

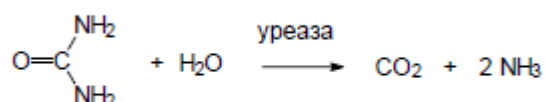
**Приборы.** Пробирки, стеклянные палочки, часовые стекла.

**Ход определения.** В пробирку наливают 5-10 мл 1 %-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10-20 раз слюны. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню с температурой 37—40°C. Затем

через 2, 4, 6 и 8 мин стеклянной палочкой из пробирки отбирают 1-2 капли раствора крахмала и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость с йодом будет давать синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться йодом в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, перестанут окрашиваться совсем (останется желтый цвет йода).

### Обнаружение активности уреазы в соевой муке

**Уреаза** - фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака:



Уреаза содержится в соевых бобах, синтезируется некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

**Материалы для исследования и реактивы.** Соевая мука, 2 %-й раствор мочевины, 1 %-й раствор фенолфталеина.

**Приборы.** Штатив с пробирками, пипетка емкостью 5 мл, водяная баня.

**Ход определения.** В две пробирки наливают по 5 мл раствора мочевины и вносят по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавляют 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхивают и пробирки ставят на 5-10 мин в водяную баню с температурой 37—40 °С. Активность уреазы определяют путем обнаружения аммиака. Выделение аммиака в первой пробирке определяют по характерному запаху или по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака.

### Специфичность действия ферментов

Ферменты специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов, на которые они действуют. Так, амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на белки. Сычужный фермент воздействует на казеин молока, но не влияет на полисахариды и т. д.

**Материалы исследования и реактивы.** 1 %-й раствор крахмала, молоко, слюна, разбавленная в 5-10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-м растворе йодида калия, 1 %-й раствор сычужного фермента.

**Приборы.** Пробирки, водяная баня, пипетки емкостью 1 и 5 мл.

**Ход определения.** Берут четыре пробирки, нумеруют их. В пробирки 1 и 2 наливают по 5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 - по 5 мл молока.

Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 1 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 - по 1 мл раствора сычужного фермента. Все 4 пробирки на 10-15 мин ставят в водяную баню с температурой 37—40 °С. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирках с молоком, а расщепление крахмала проверяют добавлением в пробирки 2-3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в таблицу

#### Определение специфичности ферментов

Субстраты и ферменты	Номера пробирок			
	1	2	3	4
Крахмал	+	+	-	-
Казеин молока	-	-	+	+
Амилаза	+	-	+	-
Сычужный фермент	-	+	-	+
Изменение цвета раствора				

Результаты опыта объясняются тем, что створаживание белка молока происходит вследствие частичного гидролиза казеина при участии сычужного фермента, а крахмал расщепляется только под действием амилазы слюны.

#### Термоллабильность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является **термоллабильность**, т. е. чувствительность фермента к небольшим изменениям температуры среды. Большинство ферментов при нагревании выше температуры 70°С утрачивают свои каталитические свойства - инактивируются. Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. В термоллабильности ферментов можно убедиться при исследовании гидролиза крахмала с помощью **амилазы**.

**Материалы исследования и реактивы.** 1 %-й раствор крахмала, слюна, разбавленная в 10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-м растворе йодида калия.

**Приборы.** Пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 5 мл.

**Ход определения.** В одну из пробирок наливают около 1 мл прокипяченной в течение 5-8 мин разбавленной слюны, в другую - около 1 мл некипяченной разбавленной слюны. В обе пробирки наливают по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки помещают на 10 мин в водяную баню с температурой 37—40°С.

Затем в обе пробирки прибавляют по 2-3 капли раствора йода и по окраске смесей делают выводы о протекании гидролиза крахмала.

## Влияние pH среды на активность ферментов

Для разных ферментов существуют определенные значения pH (кислотности раствора), при котором фермент наиболее активен (оптимум pH).

Например, для пепсина оптимум pH 1,5-2,5, для щелочной фосфатазы pH 9-10 и т.д. Для амилазы слюны оптимум pH 6,8; в кислой и щелочной среде активность амилазы снижается. Оптимум pH для амилазы слюны можно установить при определении степени гидролиза крахмала при различных значениях pH. О расщеплении крахмала судят по его реакции с раствором йода. При определенном значении pH расщепление крахмала произойдет полностью, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет частично или же крахмал совсем не будет расщепляться.

**Материалы исследования и реактивы.** Слюна, разбавленная в 10-20 раз, 1 %-й раствор крахмала, раствор йода, буферные растворы с pH 3,0, 7,0 и 9,0.

**Приборы.** Штатив с пробирками, термостат или водяная баня температурой 37—40°C.

**Ход определения.** В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В пробирки соответственно добавляют 1 мл буферного раствора с pH 3,0; 7,0 и 9,0 и по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню. Через 10 мин пробирки вынимают, добавляют в каждую по 2-3 капли раствора йода и по окраске жидкости судят о степени гидролиза крахмала. Результаты наблюдений заносят в таблицу и делают вывод об оптимальном значении pH для действия фермента амилазы.

Определение оптимума pH амилазы

Номер пробирки	pH раствора	Окраска с йодом
1	3,0	
2	7,0	
3	9,0	

## Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Активаторы и ингибиторы прямо или косвенно (аллостерически) влияют на активный центр фермента и изменяют его каталитическую активность. Активаторами часто служат ионы металлов I или II групп, некоторые анионы, трипептид глутатион и др. Ингибиторами могут быть соли тяжёлых металлов, промежуточные или конечные продукты реакции, структурные аналоги субстратов, некоторые белки и другие вещества. Действие активаторов и ингибиторов можно наблюдать на примере активности амилазы.

**Материалы для исследования и реактивы.** Слюна, разбавленная в 3-5

раз, 1 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор хлорида натрия, 1 %-й раствор сульфата меди, раствор йода.

**Приборы.** Штатив с пробирками, пипетки объемом 1 и 5 мл.

**Ход определения.** В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В первую пробирку добавляют 1 мл раствора хлорида натрия, во вторую 1 мл 1 %-го раствора сульфата меди, в третью - 1мл воды. Затем в каждую пробирку отмеривают по 1 мл раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

Далее из каждой пробирки отбирают по 0,5 мл содержимого в другие пробирки, добавляют туда по капле раствора йода и наблюдают окраску. То же самое проделывают дважды с интервалом в 5 мин. Результаты заносят в таблицу и делают выводы.

Определение активатора и ингибитора амилазы

Время реакции, мин	Окраска с йодом		
	NaCl	CuSO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O
5			
10			
15			

## Методы количественного определения активности ферментов

Активность фермента обычно определяют по скорости убыли субстрата или по скорости накопления продуктов реакции. За единицу активности фермента принят **катал** (кат), равный количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 с. Кроме того, применяются кратные единицы, например, 1 нкат (нанокатал), равный  $1 \cdot 10^{-9}$  катала. Более широко употребляется международная единица активности ферментов. Активность в международных единицах соответствует количеству субстрата в микромолях, превращенного за 1 мин:  $1\text{Е} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ . Удельная активность - это отношение активности к массе очищенного фермента или к массе белка. Она выражается в кат/кг или Е/мг.

## Определение активности липазы

Гидролитический фермент **липаза** широко распространен в тканях животных и растений. Особенно много его содержится в поджелудочной железе, тканях мышц, семенах различных растений; также в значительных количествах его образуют плесневые грибы и некоторые бактерии. Липаза катализирует реакцию расщепления жиров на глицерин и жирные кислоты, которая начинается обычно с отщепления остатка жирной кислоты в первом положении:



Полученные при этом жирные кислоты можно нейтрализовать щелочью. По количеству щелочи, пошедшей на титрование свободных жирных кислот, образующихся за определенный промежуток времени, судят об активности липазы.

**Материалы исследования и реактивы.** Молоко пастеризованное, липаза поджелудочной железы, 0,1 н. и 0,01 н. растворы гидроксида натрия, 0,1 %-й раствор фенолфталеина.

**Приборы.** Колбы конические объемом 100 мл, градуированная пипетка емкостью 1 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

**Ход определения.** В колбу отмеривают 50 мл пастеризованного молока, прибавляют 3-5 капель фенолфталеина и нейтрализуют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Затем колбу ставят на 3-5 мин в водяную баню с температурой 37-40 °С и после этого в нее добавляют 3 мл раствора липазы (замечая при этом время). Содержимое колбы тщательно перемешивают, отбирают в коническую колбу 5 мл смеси, охлаждают под струей водопроводной воды и титруют из микропипетки 0,01 н. раствором NaOH. Полученные результаты выражают графически, откладывая по вертикали количество пошедшего на титрование 0,1 н. раствора NaOH, а по горизонтали - время инкубации. Вычисляют активность (А) в мкмоль/мин по формуле

$$A = (V_1 - V_0) 50 / (5 t)$$

где А - активность липазы в мкмоль/мин;  $V_0$  - объем раствора щелочи, пошедший на нейтрализацию молока в начале эксперимента;  $V_1$  - объем раствора щелочи, пошедший на титрование 5 мл смеси в конце опыта; 50 - объем молока, взятый на анализ; 5 - объем реакционной смеси, взятый на титрование;  $t$  - время эксперимента.

### Определение активности трипсина

**Трипсин** относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в реакционной среде, где в качестве субстрата используется казеин.

**Материалы исследования и реактивы.** Раствор казеина, раствор трипсина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, раствор формалина (формол), 1%-й раствор фенолфталеина.

**Приборы.** Колбы конические емкостью 100 мл, пипетка объемом 10 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

**Ход определения.** В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до температуры 35-37 °С и прибавляют 1 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования. Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при температуре 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота.

### Определение аминного азота методом формольного титрования

К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5-6 капель фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (не записывая объем). Затем в раствор добавляют 2 мл формола и вновь титруют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (записывая объем).

Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали - время инкубации. Активность трипсина (А) в мкмоль/мин вычисляют по формуле

$$A = (V_1 - V_0) 50 / (10 t),$$

где А - активность трипсина в мкмоль/мин;  $V_0$  - объем раствора щелочи, пошедший на титрование реакционной смеси в начале эксперимента;  $V_1$  - объем раствора щелочи, пошедший на титрование 10 мл смеси в конце опыта; 50 - объем молока, взятый на анализ; 10 - объем реакционной смеси, взятый на титрование;  $t$  - время эксперимента.

### Определение активности амилазы

#### Определение активности амилазы методом серийных разведений

Метод основан на определении наименьшего количества **амилазы**, полностью расщепляющей при стандартных условиях (оптимальном значении рН и температуры) весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается в условных единицах (у.е.) по количеству ОД %-го раствора крахмала, расщепляемого 1 мл неразведенной слюны при температуре 37 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160-320 у.е.

**Материалы исследования и реактивы.** Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,1 %-й раствор крахмала, раствор йода в йодиде калия.

**Приборы.** Штатив с пробирками, пипетка объемом 1 мл, термостат на 37 °С.

**Ход определения.** В 10 пробирок наливают по 1 мл воды. Далее в первую пробирку добавляют 1 мл разбавленной в 10 раз слюны и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку и также тщательно перемешивают. В третью пробирку из второй переносят 1 мл жидкости и т. д. Из последней (десятой) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 1 мл раствора крахмала и перемешивают. Все пробирки помещают на 30 мин в термостат при температуре 37 °С. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой и добавляют по 1-2 капли раствора йода. Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвет. Результаты наблюдений заносят в таблицу

Окраска с йодом (номера пробирок)	Разведение слюны в пробирках									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
Желтая										
Розовая										
Фиолетовая										

Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской жидкости, где гидролиз крахмала прошел полностью, и делают расчет амилазной активности слюны.

**Пример.** Допустим, что желтая окраска появилась в четвертой пробирке, где слюна была разбавлена в 160 раз. Умножив величину разведения на 2 (раствор крахмала в опыте в миллилитрах), получим амилазную активность для данного раствора:  $160 \cdot 2 = 320$ , т. е. под влиянием амилазы, содержащейся в 1 мл неразбавленной слюны, произошло расщепление 320 мл 1 %-го раствора крахмала.

### ***Определение активности альфа-амилазы фотокolorиметрическим методом***

**Материалы исследования и реактивы.** Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,15 %-й раствор крахмала-индикатора, раствор йода в йодиде калия ( $D_{400} = 0,22 \pm 0,01$ ). Приготовление раствора крахмала: взвесить 1,5 г крахмала-индикатора, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавить около 30 мл дистиллированной воды, поместить в кипящую водяную баню при постоянном перемешивании до появления опалесценции. Колбу охладить, добавить 10 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,7), объем в колбе довести до 100 мл дистиллированной водой.

**Приборы.** Штатив с пробирками, колбы емкостью 50 мл, пипетки объемом 1 и 10 мл, термостат на 37 °С, фотоэлектроколориметр.



**Ход определения.** 5 мл исследуемого раствора фермента выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение 5-7 мин, затем добавляют 10 мл раствора крахмала. Инкубируют в термостате при температуре 30 °С в течение 10 мин. Из смеси отбирают по 0,25 мл, помещают в колбу, куда заранее вносят 25 мл йодного реагента ( $D_{400} = 0,22 \pm 0,01$ ). Измеряют оптическую плотность ( $A$ ,  $\lambda = 670$  нм) на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Активность  $\alpha$ -амилазы ( $A$ ) рассчитывают по формуле

$$(D_k - D_0) / D_k \cdot 0,1 = C,$$

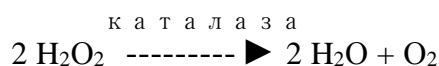
здесь  $D_k$  - оптическая плотность контрольного раствора;  $D_0$  - оптическая плотность опытного раствора;  $C$  - безразмерная величина, выражающая соотношение оптических плотностей опытного и контрольного растворов ( $0,02 < C < 0,07$ ).

$$A = (7,26 \cdot C - 0,03766) / a$$

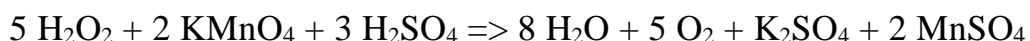
где  $A$  - активность альфа-амилазы;  $a$  - разведение.

### Определение активности каталазы

Фермент каталаза содержится в сыром молоке, особенно много каталазы находится в молозиве и в молоке, полученном от животных, больных маститом. Каталаза присутствует также в крови человека и животных и в любых растительных и животных тканях, являясь одним из компонентов антиоксидантной системы организма. Каталаза вызывает разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород:



Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграммов перекиси водорода, разрушенной за 30 мин при определенных условиях опыта. Для определения наличия перекиси водорода используется титрование ее раствором перманганата калия в кислой среде:



### Определение активности каталазы молока по методу А.Н. Баха и С.Р. Зубковой

**Материалы исследования и реактивы.** Молоко сырое, разведенное в 2 раза (5 мл молока смешивают с 5 мл воды), 1 %-й раствор перекиси водорода,

10 %-й раствор серной кислоты, 0,1 н. раствор перманганата калия.

**Приборы.** Конические колбы вместимостью 100 мл, пипетки градуированные емкостью 5 и 10 мл, пипетки объемом 1 мл.

**Ход определения.** В две конические колбы отбирают по 7 мл дистиллированной воды. Затем в одну из них прибавляют 1 мл разведенного в 2 раза сырого молока, а в другую 1 мл разведенного молока, но предварительно прокипяченного. В обе колбы добавляют по 1 мл 1 %-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и оттитровывают 0,1 н. раствором перманганата калия остаточное количество пероксида водорода до появления светло-розового окрашивания. Расчет результата анализа проводится по формуле

$$A = ((V - V_0) 0,5 \cdot 2) / t = (V - V_0) / t,$$

где  $A$  - активность каталазы в ммоль/мл-мин;  $V$  - объем раствора перманганата, пошедший на титрование контрольной пробы;  $V_0$  - объем раствора перманганата, пошедший на титрование опытной пробы; 0,5 - фактор эквивалентности пероксида водорода; 2 - коэффициент, учитывающий разведение молока;  $t$  - время эксперимента, 30 мин.

### Определение активности сычужного фермента

Сычужный фермент обладает способностью свертывать молоко и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при температуре 35 °С в течение 40 мин.

**Материалы исследования и реактивы.** Молоко сырое, 1 %-й раствор сычужного фермента (порошка).

**Приборы.** Химический стакан емкостью 100 мл, пипетка градуированная объемом 1 мл, секундомер, водяная баня (температура бани в течение всего опыта должна быть равна 35 °С).

**Ход определения.** В химический стакан наливают 50 мл молока и ставят в водяную баню с температурой 35 °С. Через 3-5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает начало свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, т. е. время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев. Активность сычужного фермента вычисляют по формуле

$$A = (a \cdot 40) / (0,005 \cdot n),$$

где  $A$  - активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.);  $a$  - количество взятого молока, мл; 40 - стандартное время свертывания молока (минуты); 0,005 - масса сычужного фермента, взятого на анализ;  $n$  - продолжительность свертывания молока в эксперименте (минуты).

### Контрольные вопросы

1. Ферменты и их химическая природа.
2. Строение молекулы фермента. Активные и регуляторные центры.
3. Ферменты четвертичной структуры. Изоферменты.
4. Общие свойства ферментов с другими катализаторами.
5. Отличия ферментов от небелковых катализаторов.
6. Механизм действия ферментов. Схема ферментативной реакции.
7. Влияние температуры и pH среды на активность ферментов.
8. Оптимумы pH и температуры, их значение для определения ферментативной активности.
9. В каких единицах выражается активность ферментов?
10. Принципы и методы определения активности ферментов.
11. Оксидоредуктазы. Биологическое значение.
12. Трансферазы. Особенности катализируемых реакций и их роль в обмене веществ.
13. Гидролазы. Примеры катализируемых реакций, промышленное применение.
14. Лиазы. Примеры реакций и их механизм. Изомеразы. Примеры реакций и их значение в обмене веществ.
15. Синтетазы. Особенности катализируемых реакций и их биологическая роль.
16. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции.
17. Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции.
18. Перечислите источники ферментов.
19. Приведите примеры использования ферментных препаратов в пищевой промышленности.

## **Литература**

### **а) основная литература:**

1. Антина Е.В., Химия биологически активных веществ и жизненных процессов : учебное пособие / Антина Е.В. - Иваново : Иван. гос. хим.-технол. ун-т., 2015. - 303 с. - ISBN -- - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : [http://www.studentlibrary.ru/book/ghtu\\_023.html](http://www.studentlibrary.ru/book/ghtu_023.html)
2. Коваленко Л.В., Биохимические основы химии биологически активных веществ : учебное пособие / Коваленко Л. В. - 3-е изд. (эл.). - М. : БИНОМ, 2015. - 232 с. (Учебник для высшей школы) - ISBN 978-5-9963-2625-9 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента": [сайт]. -URL: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785996326259.html>
3. Ершов, Ю. А. Биохимия : учебник и практикум для академического бакалавриата / Ю. А. Ершов, Н. И. Зайцева ; под редакцией С. И. Щукина. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 323 с. — (Бакалавр. Академический курс). — ISBN 978-5-534-07505-2. — Текст : электронный // ЭБС Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/433688>
4. Биохимия, под ред. Е.С.Северина. Гриф УМО, 2015.
5. Биологическая химия. Ситуационные задачи и тесты, учебное пособие, под ред. А.Е.Губаревой, 2016.

### **б) дополнительная литература**

6. Тебиев А.К. Биологическая химия в вопросах и ответах, учебно-методическое пособие, 2010.
7. Под ред. Е.С.Северина и А.Я.Николаева Биохимия (краткий курс с упражнениями и задачами). М. 2002
8. Николаев А. Я. Биологическая химия: учебное пособие для студентов медицинских вузов, - М., 2004.
9. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М. 2004
10. Филиппович Ю. Б. Биохимические основы жизнедеятельности человека М.: «ВЛАДОС». 2005. 404 с.