ГБОУ Гимназия № 1505

«Московская городская педагогическая гимназия – лаборатория»

# ДИПЛОМ

Активность фермента уреаза

*автор:* Шевченко Ольга, 10 класс «Б»

*руководитель:* Шипарева Г.А.

## Москва,

## 2016

**СОДЕРЖАНИЕ**

Введение…………………………………………………………………………...3

Глава 1. Строение и действие ферментов………………………..……………...5

* 1. Химическая реакция……………………………………………………….5
  2. Катализ……………………………………………………………………..8
  3. История открытия. Кристаллические ферменты……………………….12
  4. Строение ферментов………………………………………………………14
  5. Активные центры ферментов……………………………………….……17
  6. Классификация ферментов……………………………………………….19

Глава 2. Эксперимент………………………………………………………….… 23

Описание экспериментов, результаты ….……………………………….………23

Заключение……………………………………………………………………..….29 Список литературы…………….…………………….………………………..…..30

Приложение 1……………………………………………………..…………..…..31

Приложение 2…………………………………………………………….…….....32

**Введение**

**Актуальность:**

Ферменты – белковые молекулы, выполняющие в живой клетке функции биокатализаторов. Они играют важнейшую роль в регуляции химических превращений обмена веществ. Ферменты обнаружены у всех живых существ, даже у простейших. В настоящее время получено уже около 600 ферментов.  В настоящее время знания о работе ферментов человек широко использует в медицине, промышленности, сельском хозяйстве и других сферах жизни.

Для медика необходимо знать, что такое ферменты, их роль в организме, каковы механизмы влияния активаторов и ингибиторов ферментов, что обеспечивает адаптацию организма к изменяющимся условиям. Определение  уровня активности ферментов в сыворотке крови имеет важное значение в диагностике и в прогнозе заболеваний. В промышленности человек не обойдется без применения, например, дрожжей: в производстве хлеба, вина, молочных продуктов; в легкой промышленности различные ферменты применяют для обработки кожевенного сырья и т.д. Также в современном мире существует проблема загрязнения среды: в почву часто попадают вредные отходы с промышленных предприятий. Ферменты же могут помочь в определении уровня загрязнений[[1]](#footnote-2).

**Проблема:**

В последние 15 лет проблема ингибирования уреаз приобрела важное практическое значение для медицины. Оказалось, что уреаза продуцируемая многими микроорганизмами, непосредственным образом связана с такими патологиями, как язва двенадцатиперстной кишки и желудка, а также с целым рядом заболеваний мочевых путей человека и животных. Подавляющая часть белка таких микроорганизмов, как Helicobacter pilori, Klebsiella aerogenes и многих других, - уреазы, которые в кислых средах желудка гидролизуют мочевину пищи и создают “комфортную” среду для выживания и размножения патогенных микроорганизмов. В настоящее время общепризнанно, что кампилобактерподобные микроорганизмы - одна из главных причин язвенных болезней желудка, а хеликобактериоз желудка - одно из актуальных направлений исследований в гастроэнтерологии. Патогенность H. pilori при язвенной болезни и эффективность лечения данной формы патологии при эрадикации микроба H. pilori четко доказаны]. В настоящее время во многих лабораториях мира проводятся широкие исследования средств ингибирования микробных уреаз и механизма их действия.

**Объект:** химия фермента уреаза.

**Предмет:** фермент уреаза.

**Цель:** исследовать активность фермента урезы в растворах с разной концентрацией солей тяжелых металлов.

**Гипотеза:** активность фермента зависит от концентрации токсикантов (солей тяжелых металлов).

Задачи:

1. Рассмотреть что такое ферменты, химическая реакция.
2. Рассмотреть механизм катализа.
3. Осветит основные аспекты истории открытия ферментов.
4. Рассмотреть строение ферментов, в частности уреазы.
5. Рассмотреть классификацию ферментов и положение уреазы в ней.
6. Подобрать и провести ряд экспериментов, подтверждающих гипотезу.
7. Сделать выводы.

**Глава 1. Строение и действие ферментов**

§ 1. Химическая реакция

Ферменты – это некоторые белки с большой молекулярной массой, являющиеся активными катализаторами биологического действия: они ускоряют процесс химической реакции, однако при этом не расходуются.

Чтобы понять, как действуют ферменты, нужно представить себе, как идет химическая реакция, от каких факторов зависит скорость ее течения. Протекание химических реакций связано с энергией движения молекул, или с их кинетической энергией. Для химической реакции важна не общая энергия молекул, а лишь та часть ее (так называемая «свободная энергия»), которая может быть превращена в работу.

Если в ходе химической реакции энергия уменьшается, т. е. образуются продукты, свободная энергия которых меньше свободной энергии исходных веществ, то такая реакция может идти самопроизвольно, если нет, то для течения реакции нужно приложить энергию извне.

Таким образом, уменьшение свободной энергии молекул – это обязательное условие для возможности самопроизвольного протекания реакции, но это вовсе не значит, что всякая реакция, при которой происходит уменьшение свободной энергии, течет легко и быстро. Химик, который имеет дело с химическими реакциями в своей лаборатории, хорошо знает, что они идут по-разному. Одни вещества не вступают во взаимодействие друг с другом, и для того, чтобы вызвать реакцию между ними, их смесь приходится длительное время кипятить или помещать в специальный аппарат, где она подвергается действию огромного давления, или прибавлять концентрированную кислоту и т. д. Другие, наоборот, взаимодействуют настолько энергично, что при этом выделяется много тепла, может даже произойти взрыв.

Например: задача – разложить белок на составные части – аминокислоты. Для этого необходимо, чтобы произошла реакция между белком и водой, так как пептидные связи, соединяющие друг с другом остатки аминокислот в молекуле белка, разрушаются с присоединением воды (реакции такого типа называются гидролитическими). Если растолочь белок и добавить воду, ничего не произойдет. Реакция не идет и при нагревании: при кипении белок выпадает в осадок, но не гидролизуется. Следующие условия – в присутствии серной или или соляной кислот. К смеси приливается серная или соляная кислота, далее раствор несколько часов кипятят. Наконец, реакция происходит. Белок начинает взаимодействовать с водой и, постепенно разлагаясь, превращается в аминокислоты.

Другой пример. Горение бумаги. В этом случае также происходит химическая реакция. Органическое вещество, из которого состоит бумага – клетчатка – при горении соединяется с кислородом, превращаясь в про­дукты горения – углекислый газ и воду. Достаточно было в одном месте зажечь бумагу, т. е. начать процесс горения, чтобы он продолжался сам собой с выделением большого количества тепла.

Отсюда видно, что некоторые реакции протекают медленно, более того требуются особые условия. Другие реакции протекают легко и быстро, не требуя специальных условий. Для объяснения этого явления допускается упрощение.

Например, есть сосуд, в котором находятся молекулы, способные вступить в химическую реакцию. Допустим, что это молекулы перекиси водорода (Н2О2), которые разрушаются, превращаясь в воду (H2O) и молекулярный кислород (О2). Общее уравнение реакции: 2Н202→2Н20 + О2.

Это значит, что из двух молекул перекиси водорода образуются две молекулы воды и одна молекула кислорода. Для такого превращения нужно, чтобы две молекулы перекиси водорода столкнулись друг с другом с силой, достаточной для разрыва связей внутри молекулы и образования продуктов реакции. Число молекул в сосуде бесчисленно. Они находятся в постоянном движении и все время сталкиваются друг с другом. Но не всякое столкновение оказывается результативным: чаще всего молекулы, столкнувшись, снова разлетаются в разные стороны, но иногда столкновение сопровождается разрывом связей и реакция осуществляется. Таким образом, химическая реакция – это явление случайное, а точнее, вероятностное. И вероятность того, что в результате случайного столкновения двух молекул произойдет химическая реакция, зависит от соотношения двух обстоятельств: величины кинетической энергии движения молекул и прочности той связи между атомами в мо­лекуле, которая должна быть разорвана. Предположим, что сила связи между атомами во всех молекулах перекиси водорода одинакова, то единственным фактором, определяющим скорость реакции, остается кинетическая энергия движения молекул. Вот она-то далеко не одинакова для всех молекул. В каждой системе существуют молекулы, обладающие самой различной энергией: некоторые совсем слабые, малоподвижные, таких, конечно, немного, но есть чрезвычайно активные молекулы, с необычно высокой кинетической энергией. Их тоже мало. Большая часть моле­кул по своему энергетическому уровню занимает промежуточное положение между этими крайними значениями. Мы видим, что молекул с очень высокой (Е2) и очень низкой (Е1) энергией мало, а боль­шинству молекул свойственна некоторая промежуточная энергия, называемая средней энергией молекул (Еср). Она-то и определяет скорость химической реакции. Если средняя энергия намного превышает прочность связи, которая должна быть разрушена в ходе реакции, то реакция протекает очень быстро, так как подавляющее большинство столкновений молекул будет результативным. Если же средняя энергия значительно ниже проч­ности этой связи, то реакция течет очень медленно, поскольку столкновения мо­лекул практически всегда безрезультатны.

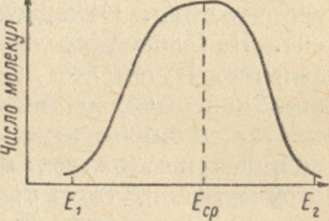


Рис. 1. Величина энергии.

Число молекул с очень низкой энергией (*E1*), так же как и с очень вы­сокой энергией (*E2*), невелико. *Eср —* средняя энергия, которой обладает большинство молекул.

Средняя энергия может быть искусственно повышена или понижена путем изменения условий среды. В первую очередь она зависит от температуры. При нагревании движение молекул ускоряется и их кинетическая энергия увеличивается. Охлаждение дает противоположный эффект. В газовой среде очень большое значение имеет давление. Путем его повышения энергию молекул тоже можно значительно увеличить.

Итак, в случае недостаточной величины средней энергии молекул существует некоторый энергетический барьер, который препятствует протеканию реакции, так как у реагирующих молекул не хватает сил, чтобы разорвать внутримолекулярные связи. Высота энергетического барьера – это не что иное, как разность между энергией, необходимой для нормального протекания реакции, и фактической величиной средней энергии молекул. Другими словами, это то количество энергии, которое нужно добавить к имеющейся, чтобы реакция пошла, та величина, на которую нужно активировать участвующие в реакции молекулы. Эта величина и называется *энергией активации*.

Совершенно очевидно, что преодолеть барьер активации можно двумя способами: либо увеличить до необходимого уровня среднюю энергию молекул, например повышая температуру или давление, либо снизить сам барьер, т. е. уменьшить энергию активации и создать такие условия, при которых имеющаяся энергия молекул окажется достаточной для течения реакции. А это достигается с помощью катализаторов.

§2 **Катализ**

Механизм катализа разбирается на примере реакции разложения перекиси водорода: 2Н2О2→2Н2О + О2.В обычных условиях она практически не идет, так как энергия активации этой реакции очень велика. Она составляет 18000 калорий на моль. Значит, результативными будут столкновения лишь тех молекул, энергия которых по крайней мере на 18000 калорий превышает среднюю энергию. А таких молекул в системе очень мало. Барьер ока­зывается слишком высоким.

Предположим, что на горе лежит камень. В принципе он может сам по себе скатиться вниз к подножию горы. Но этому мешает то обстоятель­ство, что он лежит не на самой вершине, а в углублении, и чтобы скатиться вниз, ему нужно преодолеть барьер, отделяющий его от вершины. Для преодоления барьера нужно затратить много энергии. Но ведь можно и не перебираться через барьер в самом высоком месте. Существуют обходные пути, пусть несколько более длинные, но зато не требующие затраты такой энергии. Правда, восполь­зоваться таким обходным путем можно лишь с помощью проводника, знающего дорогу и в случае необходимости могущего сделать привал на промежуточной площадке. Таким проводником и служит *катализатор*, действие которого сводится к снижению энергии активации.

Катализаторы – это удивительные вещества. В конечных продуктах реакции катализатор никогда не обнаруживается: он выходит из реакции таким, каким он в эту реакцию вступил. Количественно он тоже не связан с реакцией. Известно, что химическая реакция – это строго количественный процесс. Так, из двух молекул перекиси водорода образуются две молекулы воды и одна молекула кислорода. Других соотно­шений быть не может, как бы мы ни старались. Это точное соответствие реагирующих веществ называется в химии стехиометрией. Так вот, катализатор не находится в стехиометрических отношениях с компонентами реакции. Одна молекула катализатора может ускорить превращение очень большого числа молекул реагирующих веществ.

*Таблица*

**Влияние разных катализаторов на разложение перекиси водорода**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Катализатор | Энергии активации в калориях на моль | Число, показываю­щее во сколько раз данный катализатор ускоряет реакцию |
| Без катализатора | 18 000 | 1 |
| Ионы иода | 13 500 | 800 |
| Коллоидная платина | 11 600 | 20 тыс. |
| Фермент каталаза | 5500 | 300 млрд. |

Катализаторы различаются по силе каталитического действия: они в разной мере снижают величину энергии активации и в большей или меньшей степени ускоряют реакцию. Это иллюстрирует таблица, в которой показано, как разные катализаторы влияют на разложение перекиси водорода. Цифры, приведенные в таблице, не могут не произвести впечатления. Действие даже неорганического катализатора, например платины, само по себе поразительно – реакция ускоряется в 20 тыс. раз. Но действие биологического катализатора – фермента каталазы – настолько перекрывает эффект платины, что даже мысленно невозможно их соизмерить.

***Снижение энергии активации ферментом***

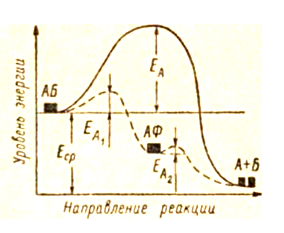
Ферменты снижают энергию активации, каким образом? Общий путь для этого состоит в том, что фермент образует с реагирующими веществами промежуточные соединения, благодаря чему изменяется путь реакции.

Представим себе, что вещество АБ необходимо разложить на составные части А и Б. Эту реакцию можно написать так: АБ → А+Б (1).

Сама по себе эта реакция течет медленно, так как энергия молекул АБ недостаточна, чтобы при столкновении вызвать разложение. С целью понизить энергетический барьер активации к веществу АБ прибавляют фермент Ф, и между ними протекает следующая реакция: АБ + Ф →АФ+Б (2).

Фермент вытесняет Б из молекулы АБ, а сам становится на его место. Уровень энергии молекул совершенно достаточен для протекания этой реакции, и она происходит с большой скоростью. Полученное промежуточное соединение непрочно. Оно в свою очередь разлагается:

АФ → А + Ф (3)

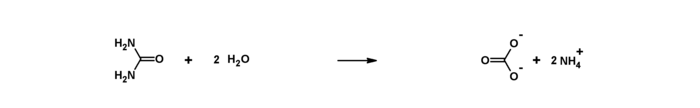


**Рис. 2.** Реакция разложения АБ.

Без катализатора (сплошная линия) реакция имеет очень высокую энергию активации (Еа) и поэтому течет крайне медленно. В присутствии катализатора (Ф) та же реакция течет через промежуточное соединение АФ и та­ким образом как бы распадается на две реакции Прерывистая линия). Энергия активации каждой из этих реакций (Еа1 и Еа2,) невелика и поэтому и присутствии катализатора (фермента) реакция идет быстро. Фермент снизил энергию активации. Еср — средняя энергия молекул АБ.

Эта реакция тоже протекает с достаточной скоростью, так как не нуждается в очень высоком уровне энергии молекул. Теперь посмотрим, что в результате. Реакция (1) сама по себе не протекала. С участием фермента происходит две реакции, каждая из которых шла с достаточно большой скоростью. Фермент принял в этих реакциях деятельное участие. Как видно из реакции (2), он вошел в состав промежуточного соединения. Но в дальнейшем, в реакции (3), это промежуточное соединение распалось.

Таким образом, в конце концов образовались то же вещества А и Б, которые должны были образоваться при реакции (1), а фермент из реакции вышел неизмененным. Теперь этот самый фермент Ф может способствовать раз­ложению второй молекулы АБ, потом третьей, четвертой и т. д. Энергетические соотношения, характерные для ферментативной реакции, изображены на графике. Главное, на что следует обратить здесь внимание, – это чрезвычайно низкие величины энергии активации обеих реакций, протекающих с участием фермента. Даже в сумме они значительно ниже энергии активации той реакции, в которой фермент не участвует. В этом и состоит сущность каталитического действия ферментов. Уреаза, например, как основной фермент рассматриваемый в данной работе, обладает специфичным свойством катализировать гидролиз [мочевины](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%BE%D1%87%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%B0) до [диоксида углерода](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A3%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D1%8B%D0%B9_%D0%B3%D0%B0%D0%B7) и [аммиака](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%BC%D0%B8%D0%B0%D0%BA):

Так, например, при [комнатной температуре](http://chem21.info/info/22443) половина от имеющегося количества мочевины разлагается водой за 3200 лет, а в [присутствии фермента](http://chem21.info/info/788442)  уреазы время ее полупревращения при той же температуре составляет 10 с[[2]](#footnote-3).

§3 И**стория открытия. Кристаллические ферменты**

В 1926 г. американский биохимик Джеймс Б. Самнер[[3]](#footnote-4) опубликовал работу, в ко­торой сообщалось, что ему удалось из семян растения канавалии получить уреазу (фермент, разрушающий мо­чевину) в виде белковых кристаллов. Статья Самнера не обратила на себя достаточного внимания и доставила ее автору ряд неприятностей и упреков в недостаточно чистой работе. Однако уже в 1930 г. Джон Нортроп выделил в виде белковых кристаллов пепсин, а в 1931 г. Нортроп и Кунитц получили кристаллический трипсин (биографии исследователей см. в Приложении 1).

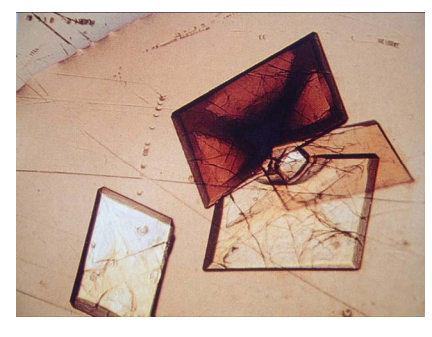
Этими работами было положено начало новой эры в развитии энзимологии. Белковые кристаллы были известны давно. Получают их из концентрированных белковых растворов, лучше при охлаждении. Для ускорения кристаллизации к охлажденным растворам белка добавляют холодный спирт или ацетон. Таким путем в конце XIX в. из крови разных животных был получен кристаллический гемоглобин.

Получение кристаллических ферментов произвело огромное впечатление на ученых. Все в этом деле было поразительно: и удивительная простота метода, которая позволяла путем использования обычных, известных каждому химику приемов получать превосходные кристаллы, и количество получаемых ферментов, которое могло из­меряться десятками и сотнями граммов. Все это настолько не укладывалось в привычные представления, что вызвало целую бурю протестов и по­пыток доказать ошибочность полученных результатов.

Достаточно привести лишь два высказывания видных и серьезных ученых, чтобы показать, с каким трудом новое пробивало себе дорогу, преодолевая старые устоявшиеся взгляды. В 1934 г. известный немецкий биохимик К. Оппенгеймер в книге «Химические основы жизненных процессов», разбирая работы, в которых ферменты рассматриваются как белковые тела, писал, что для признания этого у нас даже после появления выдающихся работ относительно строения уреазы, трипсина и пепсина нет никаких оснований. Другой немецкий биохимик Э. Абдергальден указывал, что остается еще решить вопрос, сам ли белок является в этих случаях ферментом, или же ферментативное действие вызывается каким-либо иным веществом, которое только связано с белком.

Тем временем накапливались новые факты, которые поддерживали точку зрения, что ферменты представляют собой белковые вещества и полученные кристаллы состоят именно из ферментов. Все больше и больше ферментов удавалось получить в кристаллическом виде. Заметили, что когда кристаллы выпадают из раствора, то в остав­шейся жидкости никакой ферментативной активности обнаружить не удается.

Однако, вскоре теория получила подтверждения. Оказалось, что если взять источники фермента – сырье, обладающее разной ферментативной активностью, то ко­личество кристаллов всегда будет больше там, где активность была выше. Так, например, бобы канавалии в 16 раз богаче уреазой, чем бобы сои, поэтому при выделении уреазы из канавалии удается получить гораздо больше кристаллов, чем из сои. Эти данные уже прямо говорили о том, что кристаллы представляют собой не что иное, как чистый фермент. Далее, было показано, что многократная перекристаллизация, т. е. повторное рас­творение и осаждение кристаллов, не сопровождается потерей активности что происходило бы, если бы фермент был только адсорбционно связан с кристаллами.



**Рис 3.** Полученные позднее кристаллы уреазы.

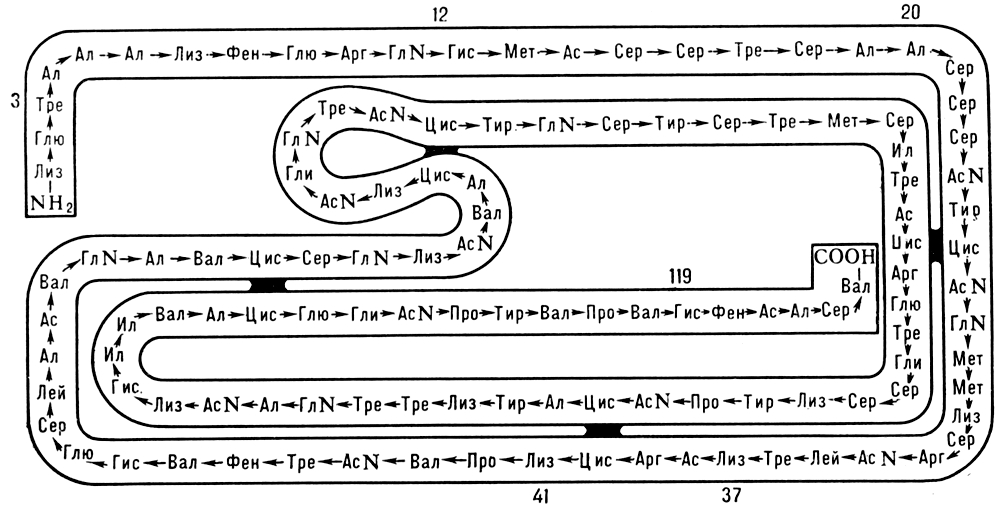
Наконец, было установлено, что всякое воздействие, повреждающее белок, приводило к нарушению фермен­тативной активности. При этом, если белок повреждался лишь частично, то точно в такой же степени уменьшалась активность фермента. Это в полной мере относилось и к физическим способам воздействия, таким как нагревание, встряхивание, облучение рентгеновскими лучами, и к обработке различными химическими реактивами. Интересные данные получились в опытах, где на кристаллы действовали ферментами, способными переваривать белки. Такие ферменты, как пепсин, трипсин и другие, способные расщеплять белки, разрушали и белковые кристаллы, и при этом строго пропорционально снижалась их ферментативная активность.

К концу 30-х гг. представление о ферментах как о белковых веществах получило всеобщее признание. В настоящее время кристаллические ферменты производят промышленным способом. Любопытно, что еще на рубеже XIX и XX вв., т. е. в то время, когда у биохимиков не было четких представлений по этому вопросу, русский физиолог И. П. Павлов, занимавшийся тогда проблемами пищеварения, совершенно ясно говорил о ферментах, как о белковых веществах.

**§ 4. Строение ферментов**

С тех пор как белковая природа ферментов стала обще­признанной, вопрос о строении ферментов перешел в об­ласть химии белков и слился с проблемой строения белка.

Свойства каждого белка определяются последовательностью расположения остатков аминокислот в его молекуле. Эта последователь­ность называется *первичной структурой* белка. Разработаны очень надежные и даже автоматизированные методы изучения первичной структуры, что дало возможность определить полную аминокислотную последовательность для многих белков, и в том числе для ферментов. На рисунке показана первичная структура рибонуклеазы – фермента, разрушающего рибонуклеиновую кислоту.



**Рис 4.** Рибонуклеаза

Этот белок представляет собой одну полипептидную цепь, со­стоящую из 124 остатков аминокислот. Следует обратить внимание на одну важную деталь – мостики, соединяющие между собой остатки цистеина. Они изображают связь, которая может возникать между двумя молекулами цистеина или двумя близко расположенными остатками цистеина в молекуле белка.

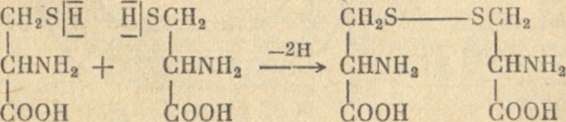


Рис 5. Дегидрирование цистеина

Цистеин содержит в своей молекуле группу SН, называемую сульфгидрильной, или тиоловой, группой. Две тиоловые группы способны реагировать друг с другом путем отщепления водорода. В результате возникает связь между атомами серы и образуется своеобразный мостик, который так и называют дисульфидным (двухсернистым) мостиком. Когда цистеин находится не в свободном состоянии, а в составе полипептидной цепи, то образование дисульфидных мости­ков придает всей цепи дополнительную прочность и позволяет ей сохранять определенную форму.

Помимо первичной структуры, определяемой последо­вательностью расположения аминокислот, для проявле­ния специфических свойств белка (в том числе фермента­тивной активности) важную роль играют более высокие уровни – *вторичная и третичная* структуры, сущность которых заключается в определенном располо­жении полипептидпых цепей в пространстве.

Вторичная и третичная структуры белков поддержи­ваются сравнительно слабыми внутримолекулярными связями, и поэтому легко могут быть разрушены разными физическими и химическими воздействиями. Такое нарушение высших структур белка без повреждения его первичной структуры составляет сущность денатурации. При денатурации белок нередко утрачивает свои биологи­ческие свойства, в случае ферментов исчезает ферментативная активность.

Современные методы исследования позволяют получить представление не только о первичной структуре белков. Есть ферменты, для которых полностью выяснено *про­странственное* расположение каждого атома, со­ставляющего их молекулу, т. е. расшифрованы вторич­ная и третичная структуры. Это достигнуто благодаря применению рентгеноструктурного анализа.

Некоторым белкам свойствен еще более высокий уро­вень структуры – *четвертичная* структура. Это уже надмолекулярпый уровень: функционирование такого белка нуждается не в одной, а в нескольких молекулах (чаще всего в двух или четырех), которые вместе образуют комплекс, обладающий специфическими свойствами. Каждая отдельная молекула такого белка, составляющая четвертичный комплекс, называется субъединицей. Многие ферменты построены из субъединиц. В одних случаях субъединицы сами обладают активностью, в дру­гих субъединицы по отдельности неактивны. Субъединицы, составляющие молекулу фермента, могут быть одинако­выми, но могут и отличаться друг от друга.

Представление о молекуле фермента как структуре, состоящей из субъединиц, позволяет нам объяснить одно очень интересное и практически важное явление. Сущест­вуют ферменты, различающиеся по строению, но катали­зирующие одну и ту же реакцию, они называются *изоферментами*. Такие ферменты довольно широко распространены в организме, и их выявление имеет боль­шое значение в медицине.

§ 5 **Активные центры ферментов**

Все белки построены из аминокислот, но не во всех случаях составными частями белка являются только аминокислоты. В сложных белках помимо аминокислот содержатся различные небелковые группы, которые придают им особые свойства. Типичным примером сложного белка может служить гемоглобин крови, который представляет собой соединение простого белка – глобина с небелковой группиров­кой, содержащей железо, – гемом, придающим гемоглобину красный цвет.

И среди ферментов встречаются простые и сложные белки. Химическая природа небелковой группы может быть очень различной, и прочность ее связи с белковой частью тоже неодинакова в разных случаях. Иногда небелковую часть совсем легко отделить от белка, тогда ее называют *коферментом.* У других фермен­тов эта группировка, наоборот, очень прочно связана с бел­ком. Независимо от прочности связи небелковая группа непосредственно участвует в катализируемой ферментом реакции и вместе с определенным участком белковой части образует так называемый *активный центр* фермента. Роль активного центра состоит в том, что именно он обеспечивает связь фермента с *субстратом*, т. е. с тем веществом, на которое действует фермент. В ферментах – сложных белках – кофермент как раз и является главной группировкой активного центра. Часто разные ферменты имеют один и тот же кофермент, благодаря чему они вызывают однотипные превращения разных субстратов.

А как же обстоит дело с ферментами – простыми белками, не содержащими небелковые группы? Есть ли у них активный центр? Разумеется, есть. Но он образован хи­мическими группами самих аминокислот, составляющих ферментный белок. С помощью специальных реактивов, обладающих избирательным действием, во многих случаях удалось выяснить, каковы эти химические группы. Ока­залось, что активной группой многих ферментов тиоловая группа — SH, входящая в состав цистеина. Для других ферментов эту роль вы­полняет гидроксильная группа — ОН, содержащаяся в аминокислоте серине. Выявлены и другие химические группировки, принадлежащие аминокислотам и входящие в состав активного центра ферментов.

Существует термин – абсолютная спецефичность фермента. Он означает действие каждого фермента на вещества строго определенного химического состава.

Например, [фермент уреаза](http://chem21.info/info/29895) катализирует лишь [гидролиз мочевины](http://chem21.info/info/272231), [пепсин](http://chem21.info/info/899861) — только расцепление белков, [каталаза действует](http://chem21.info/info/103454) только на пероксид водорода.

Таким образом,  [фермент уреаза](http://chem21.info/info/29895) [гидролизует карбамид](http://chem21.info/info/201220) СО(NH2) в 10 раз быстрее, чем ион водорода, и не [оказывает влияния](http://chem21.info/info/1246563) на [реакции гидролиза других](http://chem21.info/info/118185) родственных [карбамиду соединений](http://chem21.info/info/1457606). В [настоящее время](http://chem21.info/info/1707373) известно около тысячи ферментов, одни из которых катализируют только [окислительно-восстановительные](http://chem21.info/info/587548) процессы, [другие—реакции](http://chem21.info/info/114052) с [переносом групп](http://chem21.info/info/97132), [третьи —реакции](http://chem21.info/info/9363)  гидролиза и т. д[[4]](#footnote-5).

[Активные центры](http://chem21.info/info/5969) имеют строго [определенную структуру](http://chem21.info/info/103892), что позволяет [ферменту присоединять](http://chem21.info/info/951971) только [молекулы определенного строения](http://chem21.info/info/960335). Самое сложное строение имеет уреаза, выделенная у *Helicobacterpylori.* Активный центр уреазы состоит из полипептидной цепи с уникальной комбинацией аминокислотных остатков цистеина HS – CH2 – CH – (NH2) – COOH и гистидина С6Н9N3O2. Кофактором является ион двухвалентного никеля Ni2+.

Если у большинства выделенных растительных уреазы четвертичная структура состоит из двух субъединиц, соединенных в димеры, которые, в свою очередь, соединяются друг с другом в триммеры, то уреаза*Helicobacterpylori*имеет самое сложное строение: 4 из 6 обычных субъединиц фермента объединены в общий комплекс из 24 субъединиц (нужен рис Не могу найти). Относительная молекулярная масса уреазы представленная в литературе различна и зависит от растительного источника, из которого она выделена[[5]](#footnote-6).

§ 6 Классификация ферментов

Первые ферменты, открытые в начале XIX в., полу­чали названия, предложенные их авторами. Так появи­лись диастаз, пепсин, трипсин и другие. По­степенно число ферментов возрастало и возникла необхо­димость как-то рационально их называть. Впервые прин­цип номенклатуры ферментов предложил французский ученый Пьер Эмиль Дюкло в 1898 г. Принцип этот очень прост: фермент называют по наименованию субстрата, на который он действует, прибавляя окончание «аза». Например, фермент, действующий на тирозин, называют тирозиназой, на мочевину (urea) – уреазой, на саха­розу — caxapaзой, на крахмал (amylurn) — амилазой и т. п. Система Дюкло дожила до наших дней, но по мере увеличения числа известных ферментов и расшире­ния знаний о них она потребовала усовершенствования. Оказалось, что на один и тот же субстрат могут действовать разные ферменты, катализирующие со­вершенно различные реакции. Пришлось усложнять названия, вводя в них еще и указание на характер катализируемой реакции. Это делали по-разному, не всегда достаточно точно, и стала возникать путаница, которая все увеличивалась, так как количество вновь открытых ферментов беспрерывно воз­растало.

Было решено разработать рациональную международную классификацию и номенклатуру ферментов, которой могли бы пользоваться ученые всех стран. Для этой цели в 1956 г. была создана Международная комиссия по ферментам, включающая крупнейших энзимологов мира. От Советского Союза в нее вошли академики А. Е. Браунштейн и В. А. Энгельгардт. Потребовалось несколько лет упорного труда, чтобы выполнить эту задачу. Первый вариант Номенклатуры был опубликован в 1964 г. Он включал список из 874 индивидуальных ферментов. На этом работа не окончилась. После исправлений и дополнений в 1972 г. вышел второй вариант уже с 1770 ферментами, который снова был дополнен. Это объемистая книга – более 300 страниц со списком, в котором перечислено около 2000 ферментов.

Принцип классификации сравнительно прост. Ферменты делят на классы в зависимости от того, какой тип реакции они катализируют. Таких классов всего шесть: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы, или синтетазы.

*Оксидоредуктазы* катализируют окислительно-восстановительные реакции. *Трансферазы* катализируют перенос той или иной химической группы с одного соединения па другое. *Гидролазы* катализируют реакции гидролиза, т. е. расщепления молекулы с присоединением воды. *Лиазы* — это ферменты, раз­рывающие различные связи (преимущественно между уг­леродом и другими элементами) без присоединения воды. *Изомеразы* катализируют изомерные превращения, т. е. изменения только структуры молекулы при сохранении ее элементарного состава. JIигазы, или синтетазы, катализируют реакции синтеза, т. е. соединения друг с другом двух молекул. Такие синтезы проте­кают, как правило, с поглощением энергии; поэтому в реакциях, катализируемых лигазами, участвует универсаль­ный источник энергии в обмене веществ — АТФ. Итак, первое подразделение ферментов па самые крупные группы (6 классов) основано не на названии субстрата, а на природе химической реакции, которую ферменты катализируют.

Далее, внутри классов ферменты делят на подклассы, руководствуясь строением субстратов. В подклассы объединяют ферменты данного класса, действующие на сходно построенные субстраты. На этом деление не заканчивается. Ферменты каждого подкласса разбивают на подподклассы, в которых еще строже уточняют структуру химических групп, отличающих субстраты друг от друга. Подподкласс — это последняя, низшая ступень классификации. Внутри подподклассов перечисляют уже отдельные, инди­видуальные ферменты. Таким образом, вся система проста и достаточно стройна: Класс→Подкласс→Подподкласс→Индивидуальный фермент.

В соответствии с этим принципом классификации предложена очень удобная система нумерации (индексации) ферментов. Каждый индекс состоит из четырех цифр, разделенных точками: первая обозначает номер класса, вторая – номер подкласса в данном классе, третья – номер подподкласса и, наконец, четвертая — номер, присвоенный данному индивидуальному ферменту этого подподкласса. Например, амилаза — фермент, гидролизующий крахмал, имеет индекс 3.2.1.1.

Система классификации включает также и вновь разработанную номенклатуру ферментов, которая строится по специальным принципам. Рациональное (систематическое) название каждого фермента включает наименование субстрата, часто – наименование кофермента, иногда содержит указание па способ действия и всегда заканчивается названием класса, к которому относится данный фермент. Так, систематическое название амилазы – 1,4-а-D-глюкан-глюканогидролаза. Систематические названия ферментов нередко громоздки и длинны. Поэтому наряду с систематическими Комиссия по ферментам дает рекомендации упрощенных (рабочих) названий, которыми обычно пользуются, указывая индекс фермента. Среди рабочих названий нередко встречаются те, которые сложились исторически и прочно вошли в обиход на всех языках. К ним относятся та же амилаза, пепсин, трипсин и ряд других.

Классификация ферментов построена так, что в ней оставлены свободные места для еще не открытых ферментов. Благодаря этому по мере развития наших знаний в области энзимологии основные принципы классификации и номенклатуры пересматривать не придется, а нужно будет лишь периодически дополнять список ферментов, который составлен в порядке возрастания индексов и дает возможность легко найти любой нужный фермент.

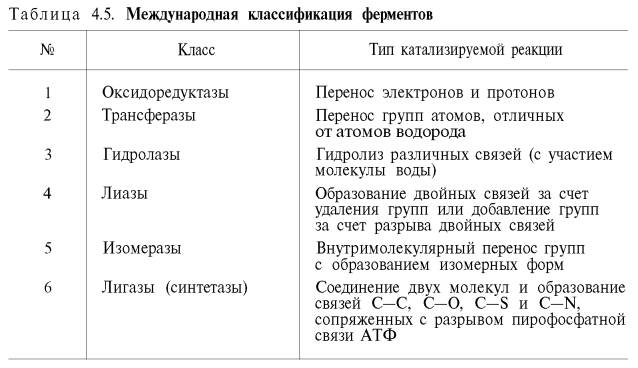


Рис. 3 Классификация ферментов

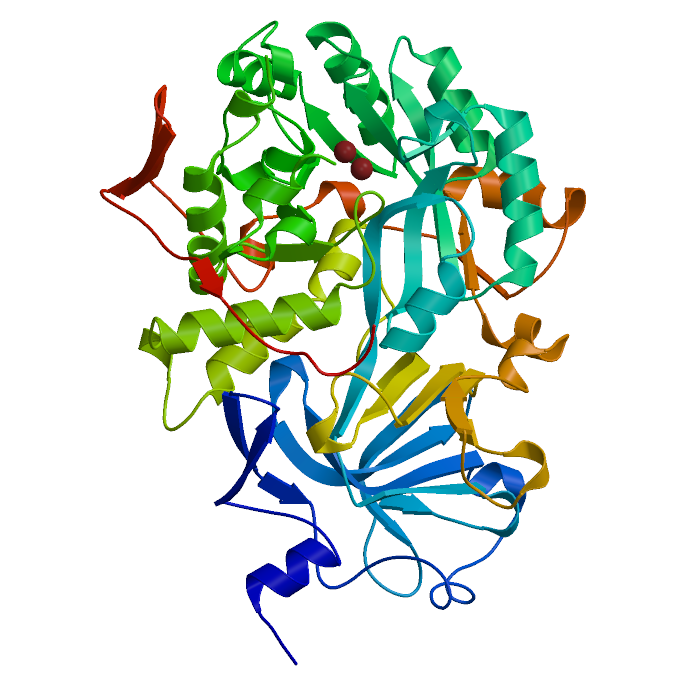


Рис.4 Уреза. Взят с официального сайта МГУ.

Таким образом, фермент уреаза будет классифицироваться следующим образом: уреаза катализирует гидролиз, следовательно относиться к классу гидролаз. Гидролазы – КФ3. В молекуле уреазы присутствует непептидная углерод-азотная связь, следовательно, она относится к подклассу КФ 3.5: амидазы. Отсюда вытекает полное название: 3.5.1.5. Гидролаза; действующая на амидные группы; действующая на линейные амиды; уреаза

**Глава 2. Экспериментальное изучение фермента уреазы**

Главный объект данного исследования я пробовала выделить из нескольких растительных объектов: соевых бобов, семян дыни, арбуза, кабачков, огурца, рисовой муки. Эксперимент состоит в том, что готовиться суспензия из семян, приливаются мочевина и фенолфталеин. Розовое окрашивание свидетельствует о том, что произошла реакция гидролиза мочевины, следовательно, содержиться уреаза. Методика обнаружения фермента представлена в Приложении 2.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Объект | Семена арбуза | Семена дыни | Семена кабачка | Семена огурца | Рисовая мука | Соевые бобы |
| Наличие/отсутствие окаршивания | Интенсивное розовое | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует | Отсутствует |

Результат: данным методом фермент был обнаружен только в арбузных семечках.

В данной работе проверялась возможность обнаружения в жевательной резинке наличие карбамида. Методика для обнаружения приводиться в приложении. Однако ни в одной и взятых нескольких видов жвачки карбамида не было найдено. Далее проверялась возможность измерения изменения активности фермента в разных условиях, таких как низкая и высокая и низная температура, длительные условия хранения. Результат: В школьных условиях этими условиями снизить активность фермента не удалось.

Фермент уреаза предположительно может быть инактивирован солями тяжелых металлов или другими токсикантами. Это объясняется тем, что щелочной металл никель, входящий в состав активного центра может быть заменен на тяжелый металл, в связи с которым уреза более не активна. В этом случае реакция, ранее упомянутая в 1 главе(CO(NH2)2 + H2O → CO2 + 2NH3) не катализируется и соответственно, ввиду длительности процесса, ее невозможно увидеть. В современном мире существует проблема загрязения окружающего мира: газы, вырабатываемые машинами или крупными промышленными предприятиями, выбрасываются в атмосферу, несмотря на закон, отходы часто сливаются в реки и отравляют водоемы и почты. Один из возможных способов проверить уровень тяжелых металлов в почве предложен здесь. Следует взять почву на анализ, а далее просто провести реакцию гидролиза мочевины в присутствии уреазы и образца, который, предположительно, содержит соли тяжелых металлов.

Я провела эксперимент, чтобы выяснить какие вещества являются ингибиторами фермента уреаза. В этом эксперименте к суспензии арбузных семечек приливается мочевина и некоторое количество раствора ингибитора. Далее добавляется фенолфталеин. Отсутствие окрашивание означает, что вещество является ингибитором уреазы. Методика для этого эксперимента представлена в приложении 2. Для эксперимента я брала: отвар зеленого чая, раствор фторида натрия (0,01М), раствор хлорида натрия (0,01М), раствор нитрата серебра (0,01М), раствор пероксида водорода (1 объем 3% раствора разбавляют 10 объемами воды), раствор сульфата никеля (0,01М), раствор ацетата свинца (0,01М).

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Название вещества | Отвар зеленого чая | Нитрат серебра (р-р) | Пероксид водорода | Сульфат никеля (р-р) | Ацетат свинца (р-р) | Фторид натрия (р-р) | Хлорид натрия (р-р) |
| Наличие/ отсутствие окрашивания | розовое | розовое | розовое | розовое | отсутствует | розовое | розово |

Результат: ингибиторами фермента являются соли тяжелых металлов.

Для составления шкалы, по которой можно примерно определить уровень загрязнения, я использовала нитрат свинца. Используем ту же методику проверки, что этот нитрат является ингибитором.

Результат: раствор не изменил окраску при добавлении соли свинца. Это свидетельствует о том, что нитрат свинца является ингибитором фермента уреазы.

Далее составляется некоторая шкала для определения концентрации. Так как шкала основана на визуальном эффекте, различимом человеческим глазом, то логично для нее выбрать три параметра: интенсивная окраска, при наименьшей рассматриваемой концентрации, средняя окраска, при средней рассматриваемой концентрации, отсутствие окраски при наибольшей рассматриваемой концентрации. Первая концентрация выбрана в соответствии с рекомендацией из практикума (источник 1).

Результаты:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Окраска | интенсивная | средняя | отсутствие |
| Концентрация в моль/л | 1х10 -6 | 1х10 -4 | 1 х 10-2 |

**Заключение**

Итак, ферменты – это высокомолекулярные белки, являющиеся катализаторами биологического действия. Катализаторы - это вещества, которые ускоряют процесс химической реакции, однако не расходуются. В своем исследовании я рассмотрела классификацию ферментов. Уреаза является ферментом, катализирующим гидролиз мочевины, следовательно, она относиться к КФ3: гидролазам, подкласс 5 – амидазы. В настоящее время знания о работе ферментов человек широко использует в медицине, промышленности, сельском хозяйстве и других сферах жизни. Так как сейчас существует проблема загрязнения окружающей среды, то ферменты могут быть использованы и для определения загрязнения. Например, при помощи уреазы можно определять уровень тяжелых металлов в почве.

В данном исследовании я проводила эксперименты, подтверждающие гипотезу. Сначала был проведен эксперимент по обнаружению активного фермента уреазы в арбузных семечках. Далее я провела эксперимент по инактивации уреазы тяжелыми металлами, а так же создала краткую шкалу для определения концентрации токсиканта (ацетата свинца). Так же я проверяла наличие фермента уреазы в различных растительных, относительно доступных объектах и пришла к выводу, что фермент присутствует в достаточном количестве только в арбузных семечках. Также я провела серию опытов по определению ингибиторов уреазы. Исходя из результатов, ингибиторами уреазы являются соли тяжелых металлов.

**Источники:**

1. Артюхина А. И., «Разработка химического эксперимента с экологическим содержанием»// Химия в школе 2006. - №8 - 72-74 с.
2. Применение биосенсоров. URL: <http://chem.kpfu.ru/text/nikolskaya/potentiometric5.htm> (дата обращения: 13.03.2016).
3. Самнер Дж. Химия ферментов и методы их исследования. Пер. с англ. / Под ред. В. А. Энгельгардта. – М., 1948.
4. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. URL: <http://chem21.info/info/142676/> (дата обращения: 15.03.2016).
5. Строение и классификация фермента уреза: URL: <http://www.enzyme.chem.msu.ru/hcs/+/enzymes/urease.html>

(дата обращения 15.03.2016)

1. Уреаза Helicobacter pylori. URL: <http://www.helicobacter.ru/index.php?i=59> (дата обращения: 13.03.2016).
2. Цыганов А. Р. Биохимия. Практикум: Учебное пособие. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007.

**Приложение 1.**

*Джеймс Бетчеллер Самнер* ([англ.](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) James Batcheller Sumner) ([19 ноября](https://ru.wikipedia.org/wiki/19_%D0%BD%D0%BE%D1%8F%D0%B1%D1%80%D1%8F) [1887](https://ru.wikipedia.org/wiki/1887), [Кантон](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9A%D0%B0%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%BD_(%D0%9C%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B0%D1%87%D1%83%D1%81%D0%B5%D1%82%D1%81)&action=edit&redlink=1), [Массачусетс](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%B0%D1%87%D1%83%D1%81%D0%B5%D1%82%D1%81), [12 августа](https://ru.wikipedia.org/wiki/12_%D0%B0%D0%B2%D0%B3%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B0) [1955](https://ru.wikipedia.org/wiki/1955), [Буффало](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%83%D1%84%D1%84%D0%B0%D0%BB%D0%BE),[Нью-Йорк](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D1%8C%D1%8E-%D0%99%D0%BE%D1%80%D0%BA_(%D1%88%D1%82%D0%B0%D1%82))) — американский биохимик. Член [Национальной АН США](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%B0%D0%BA%D0%B0%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F_%D0%BD%D0%B0%D1%83%D0%BA_%D0%A1%D0%A8%D0%90) и [Американской академик искусств и наук](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BD%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D0%B0%D0%BA%D0%B0%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F_%D0%B8%D1%81%D0%BA%D1%83%D1%81%D1%81%D1%82%D0%B2_%D0%B8_%D0%BD%D0%B0%D1%83%D0%BA). Окончил [Гарвардский университет](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B0%D1%80%D0%B2%D0%B0%D1%80%D0%B4%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%83%D0%BD%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82) ([1910](https://ru.wikipedia.org/wiki/1910)). Доктор философии ([1914](https://ru.wikipedia.org/wiki/1914)). В 1914—1929 годах преподавал биохимию в [Корнеллском университете](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B5%D0%BB%D0%BB%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%83%D0%BD%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82) ([Итака](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D1%82%D0%B0%D0%BA%D0%B0_(%D0%9D%D1%8C%D1%8E-%D0%99%D0%BE%D1%80%D0%BA)), [США](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%A8%D0%90)); с [1929](https://ru.wikipedia.org/wiki/1929) года директор лаборатории химии ферментов там же. 1926 г. Джеймс Самнер впервые выделил чистый кристаллический фермент – уреазу и доказал, что это белок Активность ферментов была обнаружена в 1814 году К.С.Кирхгофом. Затем была открыта активность пищеварительных соков, вытяжки из семян миндаля и некоторых других материалов. Л.Пастер обнаружил, что дрожжи и бактерии могут сбраживать сахара – этот процесс тоже был подобен каталитическому. Позже пришло понимание того, что ферменты находятся и в клетках, где выполняют многочисленные реакции обмена веществ. Этому способствовало открытие Э.Бюхнера – способность бесклеточного экстракта дрожжей сбраживать раствор сахаров. Однако с каким химическим соединением связана ферментативная активность, долгое время было неясно. В 1926 году американец Джеймс Самнер впервые получил в кристаллическом виде фермент уреазу из семян канавалии. Самнер убедился в том, что кристаллы уреазы состоят только из белка и предположил, что все ферменты– белки. Против этого возражал известный немецкий биохимик Рихард Вильштеттер. Он доказывал, что ферменты – низкомолекулярные вещества, а обнаруженный белок не имеет отношения к ферментативной активности. В 1930-е годы Джон Нортроп и его сотрудники получили в кристаллическом виде ферменты пепсин из желудочного сока и трипсин из сока поджелудочной железы. Они тоже оказались белками, и после этого мнение о белковой природе ферментов стало всеобщим. Кристаллы ферментов можно исследовать методом рентгеноструктурного анализа, чтобы узнать их трехмерную структуру – расположение атомов в их молекулах.

*Джон Го́вард Но́ртроп* ([англ.](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D0%B3%D0%BB%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) John Howard Northrop; [5 июля](https://ru.wikipedia.org/wiki/5_%D0%B8%D1%8E%D0%BB%D1%8F) [1891](https://ru.wikipedia.org/wiki/1891_%D0%B3%D0%BE%D0%B4), [Йонкерс](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%99%D0%BE%D0%BD%D0%BA%D0%B5%D1%80%D1%81), [Нью-Йорк](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D1%8C%D1%8E-%D0%99%D0%BE%D1%80%D0%BA_(%D1%88%D1%82%D0%B0%D1%82)) — [27 мая](https://ru.wikipedia.org/wiki/27_%D0%BC%D0%B0%D1%8F) [1987](https://ru.wikipedia.org/wiki/1987_%D0%B3%D0%BE%D0%B4), [Викенбург](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%92%D0%B8%D0%BA%D0%B5%D0%BD%D0%B1%D1%83%D1%80%D0%B3&action=edit&redlink=1), [Аризона](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D1%80%D0%B8%D0%B7%D0%BE%D0%BD%D0%B0)) — американский [биохимик](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F). Лауреат [Нобелевской премии по химии](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%BE%D0%B1%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F_%D0%BF%D0%BE_%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D0%B8) [1946 года](https://ru.wikipedia.org/wiki/1946_%D0%B3%D0%BE%D0%B4). Основные труды по биохимии ферментов. Впервые (совместно с сотрудниками) выделил в кристаллическом виде протеолитические ферменты: [пепсин](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B5%D0%BF%D1%81%D0%B8%D0%BD) ([1930](https://ru.wikipedia.org/wiki/1930)), [трипсин](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D0%BF%D1%81%D0%B8%D0%BD) ([1932](https://ru.wikipedia.org/wiki/1932)) и др., а также один из [вирусов](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B) и [дифтерийный антитоксин](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%94%D0%B8%D1%84%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B9%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D1%82%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BD&action=edit&redlink=1). Вслед за [Дж. Самнером](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B0%D0%BC%D0%BD%D0%B5%D1%80,_%D0%94%D0%B6%D0%B5%D0%B9%D0%BC%D1%81_%D0%91%D0%B5%D1%82%D1%87%D0%B5%D0%BB%D0%BB%D0%B5%D1%80) доказал [белковую](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D0%B8) природу ферментов.

*Эми́ль Абдерга́льден* (Emil Abderhalden; [9 марта](https://ru.wikipedia.org/wiki/9_%D0%BC%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B0) [1877](https://ru.wikipedia.org/wiki/1877_%D0%B3%D0%BE%D0%B4), [Оберуцвиль](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D0%B1%D0%B5%D1%80%D1%83%D1%86%D0%B2%D0%B8%D0%BB%D1%8C) – [5 августа](https://ru.wikipedia.org/wiki/5_%D0%B0%D0%B2%D0%B3%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B0) [1950](https://ru.wikipedia.org/wiki/1950_%D0%B3%D0%BE%D0%B4), [Цюрих](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D1%8E%D1%80%D0%B8%D1%85)) – [швейцарский](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A8%D0%B2%D0%B5%D0%B9%D1%86%D0%B0%D1%80%D0%B8%D1%8F) [биохимик](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F) и [физиолог](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D0%B7%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F). Отец швейцарского физиолога [Рудольфа Абдергальдена](https://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%90%D0%B1%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%B4%D0%B5%D0%BD,_%D0%A0%D1%83%D0%B4%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D1%84&action=edit&redlink=1). Иностранный член-корреспондент [Академии наук СССР](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BA%D0%B0%D0%B4%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D1%8F_%D0%BD%D0%B0%D1%83%D0%BA_%D0%A1%D0%A1%D0%A1%D0%A0) с [1925 года](https://ru.wikipedia.org/wiki/1925_%D0%B3%D0%BE%D0%B4). Изучал [медицину](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D0%B4%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD%D0%B0) в университете [Базеля](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%B7%D0%B5%D0%BB%D1%8C), где получил ученую степень доктора в [1902 году](https://ru.wikipedia.org/wiki/1902_%D0%B3%D0%BE%D0%B4). Затем он обучался в лаборатории [Эмиля Фишера](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B8%D1%88%D0%B5%D1%80,_%D0%AD%D0%BC%D0%B8%D0%BB%D1%8C) и работал в университете [Берлина](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D1%80%D0%BB%D0%B8%D0%BD). В [1911 году](https://ru.wikipedia.org/wiki/1911_%D0%B3%D0%BE%D0%B4) переехал в университет [Галле](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B0%D0%BB%D0%BB%D0%B5_(%D0%A1%D0%B0%D0%BA%D1%81%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D1%8F-%D0%90%D0%BD%D1%85%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D1%82)), в котором преподавал физиологию. Во время [Первой мировой войны](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B5%D1%80%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%B2%D0%BE%D0%B9%D0%BD%D0%B0) он создал детскую больницу и организовал эвакуацию недоедающих детей в Швейцарию. Впоследствии он возобновил свои исследования в физиологической химии и начал изучать [метаболизм](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%BC) и химию продуктов. С [1931](https://ru.wikipedia.org/wiki/1931) по [1950 годы](https://ru.wikipedia.org/wiki/1950_%D0%B3%D0%BE%D0%B4) был президентом немецкой академии естественных наук «[Леопольдина](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B5%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%8C%D0%B4%D0%B8%D0%BD%D0%B0)». После [Второй мировой войны](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B0%D1%8F_%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%B2%D0%BE%D0%B9%D0%BD%D0%B0) вернулся в [Швейцарию](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A8%D0%B2%D0%B5%D0%B9%D1%86%D0%B0%D1%80%D0%B8%D1%8F) и продолжил работу в [Цюрихском университете](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D1%8E%D1%80%D0%B8%D1%85%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%83%D0%BD%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%82).

*Пьер Эмиль Дюкло* ([фр.](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%86%D1%83%D0%B7%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) Emile Duclaux, [1840](https://ru.wikipedia.org/wiki/1840_%D0%B3%D0%BE%D0%B4) — [1904](https://ru.wikipedia.org/wiki/1904_%D0%B3%D0%BE%D0%B4)) — французский физик, химик и биолог. В 1862 году окончил Высшую нормальную школу, после чего был принят [Пастером](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80,_%D0%9B%D1%83%D0%B8) в его лабораторию препаратором. В 1885 году получил кафедру в Сорбонне и в Пастеровском институте, где начал издание «Annales de l’lnstitut Pasteur».

*Браунштейн Александр Евсеевич* (род. в 1902 г.) — советский био-химик, доктор биол, наук (1937), академик АМН (1945) и АН СССР (1964), лауреат Государственной премии СССР (1941), Герой Социалистического Труда (1972). Окончил в 1926 г. Харьковский государственный мед. ин-т. Научную деятельность начал в Биохимическом ин-те Наркомздрава СССР (Москва) под руководством В. А. Энгельгардта. В 1936 г. возглавил лабораторию промежуточного азотистого обмена в ВИЭМ (с 1945 г.— в составе Ин-та биол, и мед. химии АМН СССР, Москва). С 1959 г. руководит лабораторией хим. основ биол, катализа в Ин-те молекулярной биологии АН СССР.

*Алекса́ндр Никола́евич Энгельга́рдт* (1832—1893) — русский публицист-народник и агрохимик.

**Приложение 2.**

**Опыт 1. Качественная реакция на фермент уреазу**

(Ферментативное разложение мочевины)

Цель работы: провести разложение мочевины в присутствии фермента уреазы.

Уреаза относится к классу гидролитических ферментов. Реакция, катализируемая уреазой, протекает следующим образом:

H2N-CO-NH2 + H2O → 2NH3 + CO2

Оборудование и реактивы:

|  |  |
| --- | --- |
| Фарфоровая ступка и пестик  Мерный цилиндр  Пробирки (2 шт.) | Арбузные семечки (4-5 шт.)  Вода дистиллированная  Мочевина (1%-ный раствор)  Фенолфталеин (0,1%-ный спиртовой раствор) |

Методика проведения опыта.

1.​ Разотрите в ступке очищенные от кожуры арбузные семечки с 10 мл воды до получения однородной суспензии.

2.​ Перелейте полученную суспензию в 2 пробирки.

3.​ В первую пробирку налейте 5 мл раствора мочевины , во вторую - 5 мл дистиллированной воды.

4.​ В каждую из пробирок добавьте по 2-3 капли спиртового раствора фенолфталеина.

5.​ Содержимое пробирок перемешайте.

6.​  Отметьте происходящие изменения.

Результаты:

Опишите свои действия и наблюдения. Объясните результаты опыта.

Выводы:

Сформулируйте выводы. Используйте результаты опыта для записи выводов.

**Опыт 2. Определение фермента уреазы в различных растительных объектах**

Цель работы: определить наличие фермента уреазы в различных растительных объектах.

Оборудование и реактивы:

|  |  |
| --- | --- |
| Фарфоровая ступка и пестик  Мерный цилиндр  Пробирки (2 шт.) | Вода дистиллированная  Мочевина (1%-ный раствор)  Фенолфталеин (0,1%-ный спиртовой раствор)  Соевые бобы  Семена дыни  Семена огурцов  Семена кабачков  Рисовая мука |

Методика.

1.​ Разотрите в ступке очищенные от кожуры семечки (бобы или муку) с 5 мл воды до получения однородной суспензии.

1.​ Перелейте полученную суспензию в пробирку.

1.​ В пробирку налейте 5 мл раствора мочевины.

1.​ В пробирку добавьте по 2-3 капли спиртового раствора фенолфталеина.

1.​ Содержимое пробирок перемешайте и оставьте при комнатной температуре на 15-20 минут.

1.​ Отметьте происходящие изменения.

Результаты:

Занесите результаты эксперимента в таблицу

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Соевые  бобы | Семена дыни | Семена  огурцов | Семена кабачков | Рисовая мука |
| Наличие уреазы |  |  |  |  |  |

Выводы.

Сформулируйте выводы. Используйте результаты опыта для записи выводов.

**Опыт 3. Инактивация фермента уреазы**

Цель работы: Определение ингибиторов фермента уреазы.

Оборудование и реактивы:

|  |  |
| --- | --- |
| Пробирки (3 шт.) | Водная суспензия арбузных семечек  Мочевина (1%-ный раствор)  Фенолфталеин (0,1%-ный спиртовой раствор)  Отвар зеленого чая  Раствор фторида натрия(0,01М)  Раствор хлорида натрия(0,01М)  Раствор нитрата серебра(0,01М)  Раствор пероксида водорода(1 объем 3% раствора разбавляют 10объемами воды)  Раствор сульфата никеля(0,01М)  Раствор ацетата свинца(0,01М) |

Методика проведения опыта.

1.​ К суспензии арбузных семечек объемом 3 мл приливают равный объем предполагаемого ингибитора, тщательно перемешивают смесь и приливают 4 мл раствора мочевины и 1-2 капли раствора фенолфталеина .

2.​ Через 5 минут наблюдают за изменением окраски раствора. Если произошло изменение окраски в той или иной пробирке, то считают, что данное вещество не является ингибитором фермента.

Результаты опыта занесите в таблицу.

Выводы:

Сформулируйте выводы.

**Опыт 4. Приготовление раствора токсиканта**

1. В качестве токсиканта готовиться раствор нитрата свинца Рb(NO3)2. Вначале приготовим базовый раствор токсиканта с концентрацией 1 х 10 -2 моль/л.

2. Растворы меньшей концентрации готовятся следующим образом. Из колбы с помощью пипетки отбираются по 1 мл раствора концентрации соли1х10 -2 моль/л и помещаются в пробирку и добавляется 9 мл воды. Таким образом, получаются растворы токсиканта с концентрацией в 10 раз меньшей предыдущей, т.е. 1 х 10 -3 моль/л.

3. Используя этот приём, готовили ещё более разбавленные растворы ацетата свинца: 1х 10 -3; 1х10 -4; 1х10 -5; 1х10 -6 моль/л.

**Опыт 5. Влияние температуры на активность фермента уреазы**

Цель работы: Изучить влияние температур на активность фермента уреазы

Оборудование и реактивы:

|  |  |
| --- | --- |
| Фарфоровая ступка с пестиком  Мерный цилиндр  Пробирки (3 шт.)  Спиртовка  Пробиркодержатель  Стакан с охлаждающей смесью льда и поваренной соли | Арбузные семечки (8-10 шт.)  Вода дистиллированная  Мочевина (1%-ный раствор)  Фенолфталеин (0,1%-ный спиртовой раствор) |

Методика проведения опыта.

1.​ Разотрите в ступке очищенные от кожуры арбузные семечки с 15 мл воды до получения однородной суспензии.

2.​ Перелейте полученную суспензию в 3 пробирки.

3.​ Первую пробирку поставьте в стакан с охлаждающей смесью до полного замерзания суспензии. Когда суспензия замерзнет, прилейте к ней 5 мл раствора мочевины и несколько капель фенолфталеина.

4.​ Во вторую пробирку добавьте 5 мл раствора мочевины и 2-3 капли раствора фенолфталеина. Оставьте ее в качестве контроля.

5.​ Суспензию в третьей пробирке нагрейте до кипения. После охлаждения до комнатной температуры ( можно опустить пробирку в холодную воду) добавьте 5 мл раствора мочевины и несколько капель раствора фенолфталеина.

Результаты:

Занесите результаты эксперимента в таблицу

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № пробирки | Суспензия арбузных семечек (мл) | Раствор мочевины (мл) | Производимые изменения t | Наблюдения за изменением цвета фенолфталеина |
| 1 | 5 | 5 | охлаждение |  |
| 2 | 5 | 5 | Комнатная температура |  |
| 3 | 5 | 5 | Нагревание до кипения |  |

Сформулируйте выводы. Используйте результаты опыта для записи выводов.

Многие вещества ингибируют действие фермента уреазы. Известно, что фенолы, его производные, спирты в высокой концентрации, формальдегид вызывают денатурацию белковой части фермента. Определенные изменения происходят в ферментах и под действием ионов. Необходимо отметить, что в некоторых напитках, например, в чае содержатся вещество эпигаллокатехин-3-галлат, которое ингибирует уреазу.

**Опыт 6. Определение мочевины в жевательных резинках**

*Цель работы: определить наличие мочевины в жевательных резинках.*

*Оборудование и реактивы:*

|  |  |
| --- | --- |
| *Фарфоровая ступка и пестик*  *Фарфоровая чашка*  *Мерный цилиндр*  *Пробирка* | *Арбузные семечки (2-3 шт.)*  *Вода дистиллированная*  *Фенолфталеин (0,1%-ный спиртовой раствор)* |

*Методика проведения опыта.*

*1. Разотрите в ступке очищенные от кожуры арбузные семечки с 5 мл воды до получения однородной суспензии.*

2.​ *Перелейте полученную суспензию в пробирку.*

3.​ Приготовьте вытяжку из жевательной резинки. Для этого положите измельченную резинку в фарфоровую чашку, залейте 5-7 мл горячей дистиллированной воды. Для лучшей экстракции перемешивайте содержимое. Охладите смесь до комнатной температуры.

4.​ Полученную вытяжку налейте в пробирку суспензией арбузных семян.

5.​ Прилейте к содержимому пробирки несколько капель раствора фенолфталеина и перемешайте.

6.​  Отметьте происходящие изменения.

Результаты оформите в виде таблицы

Выводы.

1. Применение биосенсоров. URL: <http://chem.kpfu.ru/text/nikolskaya/potentiometric5.htm> (дата обращения: 13.03.2016). [↑](#footnote-ref-2)
2. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. URL: <http://chem21.info/info/142676/> (дата обращения: 15.03.2016). [↑](#footnote-ref-3)
3. Самнер Дж. Химия ферментов и методы их исследования. Пер. с англ. / Под ред. В. А. Энгельгардта. – М., 1948. [↑](#footnote-ref-4)
4. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. URL: <http://chem21.info/info/142676/> (дата обращения: 15.03.2016).

   Уреаза Helicobacter pylori. URL: <http://www.helicobacter.ru/index.php?i=59> (дата обращения: 13.03.2016). [↑](#footnote-ref-5)
5. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. URL: <http://chem21.info/info/142676/> (дата обращения: 15.03.2016).

   Уреаза Helicobacter pylori. URL: <http://www.helicobacter.ru/index.php?i=59> (дата обращения: 13.03.2016). [↑](#footnote-ref-6)