

**Государственное общеобразовательное учреждение средняя общеобразовательная
школа №53 Приморского района Санкт-Петербурга**

Исследовательская работа

«Изучение термолабильности окислительных ферментов»

Басалаевой Татьяны и
Мильбергер Маргариты

Научный руководитель:
Злобина Людмила Дмитриевна

Санкт-Петербург

2009 год

Введение.

Ферменты – биологические катализаторы.

В основе всех жизненных процессов лежат тысячи химических реакций. Они идут в организме без применения высокой температуры и давления, т.е. в мягких условиях. Вещества, которые окисляются в клетках человека и животных, сгорают быстро и эффективно, обогащая организм энергией и строительным материалом. Но те же вещества могут годами храниться как в консервированном виде, так и на воздухе в присутствии кислорода. Возможность быстрого переваривания продуктов в живом организме осуществляется благодаря присутствию в клетках особых веществ – ферментов.

Ферменты – это специфические белки, входящие в состав всех клеток и тканей живых организмов, играющие роль биологических катализаторов. Катализатор – вещество, ускоряющее реакцию, но не входящее в состав продуктов реакции. Количество катализатора, в отличие от других реагентов, при реакции не изменяется. Обеспечивая более быстрый путь для реакции, катализатор реагирует с исходным веществом, получившееся промежуточное соединение подвергается превращениям и в конце расщепляется на продукт и катализатор. Затем катализатор снова реагирует с исходным веществом, и этот каталитический цикл многократно повторяется. Чтобы лучше это понять, представим себе работу брокера по операциям с недвижимостью. Брокер находит и собирает вместе людей, желающих продать какое – либо имущество, и людей, желающих его купить, таким образом, способствуя его продаже и передаче другому владельцу. При этом сам брокер в ходе сделки ничего реально не покупает и не продает. Так же и катализатор, или фермент, способствует протеканию реакции между двумя веществами, но к концу реакции остается в первоначальном виде.

История исследования ферментов.

О ферментах люди узнали давно. Еще в начале прошлого века в Петербурге К.С. Кирхегов выяснил, что проросший ячмень способен превращать крахмал в мальтозу, а экстракт дрожжей расщеплял свекловичный сахар на глюкозу и фруктозу. Это были первые исследования ферментологии. Хотя на практике применения ферментативных процессов было известно с незапамятных времен.

В разных изданиях применяются два понятия: «ферменты» и «энзимы». Эти названия идентичны. Они обозначают одно и то же – биологические катализаторы. Первое слово переводится как «закваска», второе – «дрожжах».

Долгое время не представляли, что же происходит в дрожжах, какая сила, присутствующая в них, заставляет вещества разрушаться и превращаться в более простые. Только после изобретения микроскопа было установлено, что дрожжи – это скопление большого количества микроорганизмов, которые используют сахар в качестве своего основного питательного вещества.

Иными словами, каждая дрожжевая клетка «начинена» ферментами способными разлагать сахар. Но в то же время были известны и другие биологические катализаторы, не заключенные в живую клетку, а свободно «обитающие» вне ее. Например, они были найдены в составе желудочных соков, клеточных экстрактов. В связи с этим в прошлом

различали 2 типа катализаторов: считалось, что собственно ферменты «неорганизованные» катализаторы, которые могут работать вне клетки, называли энзимами. Такое противопоставление «живых» ферментов и «неживых» энзимов объяснялось влиянием виталистов, борьбой идеализма и материализма естествознания. Точки зрения ученых разделились. Основоположник микробиологии Л. Пастер утверждал, что деятельность ферментов определяется жизнью клетки. Если клетку разрушить, то прекратится действие ферментов. Химики в главе с Ю. Либихом развивали чисто химическую теорию брожения, доказывая, что активность ферментов не зависит от существования клетки.

В 1871 году русский врач М.М. Манассейн разрушила дрожжевые клетки, растирая их речным песком. Клеточный сок, отделенный от остатков клеток сохранял свою способность сбраживать сахар. Через четверть века немецкий ученый Э. Бухнер получил бесклеточный сок прессованием живых дрожжей под давлением $5 \cdot 10$ Па. Этот сок, подобно живым дрожжам сбраживал сахар с образованием спирта и углекислого газа. Работы А.Н. Лебедева по исследованию дрожжевых клеток и труды других ученых положили конец виталистическим представлениям в теории биологического катализа, а термины «фермент» и «энзим» стали применять как равнозначные.

В наши дни ферментология – это самостоятельная наука. Выделено и изучено около 2000 ферментов.

Свойства ферментов.

Важнейшим свойством ферментов является специфичность, т. е. преимущественное ускорение одной из нескольких теоретически возможных реакции. В зависимости от условий ферменты способны катализировать как прямую, так и обратную реакцию. Это свойство ферментов имеет большое практическое значение.

Другое важнейшее свойство ферментов – термолабильность, т.е. высокая чувствительность к изменениям температуры. Так как ферменты являются белками, то для большинства из них температура выше 70 градусов $^{\circ}\text{C}$ приводит к денатурации и потере активности. При увеличении температуры до 10 градусов $^{\circ}\text{C}$ реакция ускоряется в два - три раза, а при температурах близких к нулю градусов $^{\circ}\text{C}$ скорость ферментативных реакций замедляется до минимума.

Действие ферментов.

Чтобы понять действие ферментов, необходимо знать, что для взаимодействия сложных органических молекул недостаточно их простого контакта. Чтобы реакция протекала, определенные атомы в сближающихся молекулах должны быть правильно сориентированы друг относительно друга (так же как ключ определенным образом должен быть вставлен в замок), только тогда смогут образоваться химические связи.

Однако, крайне мала вероятность того, что 2 сложные молекулы, предоставленные сами себе, случайно окажутся друг относительно друга в правильной ориентации, необходимой для взаимодействия. Чтобы такая реакция протекала с ощутимой скоростью, нужна помощь молекул определенного типа – ферментов. Фермент притягивает к себе 2 другие молекулы и удерживает их в правильном положении, чтобы взаимодействие

состоялось. Так как только реакция произошла, фермент освобождается и повторяет те же действия с другим набором молекул. Все ферменты в биологических системах представляют собой белки, которые могут принимать разнообразные сложные формы. Как и все белки, они закодированы в ДНК и в качестве ферментов управляют скоростью протекания химических реакций.

Предмет нашего исследования.

Предметом нашего исследования являются оксидазы и пероксидазы – ферменты, которые ускоряют окисление органических веществ. Они присутствуют во многих живых тканях, потому что окисление лежит в основе процессов дыхания. В результате окисления веществ выделяется энергия, необходимая для жизнедеятельности. Но действуют эти ферменты по-разному: оксидазы окисляют органические вещества кислородом воздуха, а пероксидазы для той же цели «добывают» кислород из пероксидов. Конечно, вещества медленно окисляются и без помощи ферментов, но ферменты ускоряют превращения веществ во много тысяч раз.

Для изучения многих биохимических процессов нужны сложные приборы и множество реактивов. Однако некоторые явления можно наблюдать, как говорится, и невооруженным глазом. При окислении некоторых веществ, например, фенола, образуются окрашенные продукты реакции. Появление окраски говорит о том, что фермент сработал. Интенсивность окраски позволяет судить о количестве продуктов окисления. Если окраска вообще не появляется, значит, фермент неактивен.

Цель нашего исследования заключается в изучении явления термолабильности окислительных ферментов.

Задачи нашего исследования:

1) Используя реакцию окисления фенола, определить наличие в различных растительных объектах оксидаз и пероксидаз.

2) Определить, в каких растительных объектах окислительные ферменты наиболее активны.

3) Выяснить, как различные температурные режимы влияют на активность окислительных ферментов, а также какой температурный режим наиболее благоприятен для их работы.

Опыт №1

Оборудование: капустная кочерыжка, яблоко, клубень картофеля, луковица, холодная кипячёная вода, фенол, аптечная перекись водорода, тёрка для овощей, спиртовка, пробирки, чистые пипетки, марля.

Ход опыта: кусочек капустной кочерыжки (яблока, клубня картофеля, мясистой чешуи луковицы) мы измельчили на тёрке, полученную кашицу отжали через два слоя марли, сок собрали в стакан и разбавили водой в десять раз (при исследовании других растительных объектов сок нужно разбавлять не более чем в 2-3 раза).



Заполнили пробирки согласно таблице №1. Содержимое пробирок тщательно перемешали.



Таблица №1.

1 пробирка	1 мл сока	Нагревание	фенол	5 капель воды
2 пробирка	1 мл сока	Нагревание	фенол	5 капель пероксида водорода
3 пробирка	1 мл сока		фенол	5 капель воды
4 пробирка	1 мл сока		фенол	5 капель пероксида водорода
5 пробирка	1 мл воды		фенол	5 капель воды
6 пробирка	1 мл воды		фенол	5 капель пероксида водорода

Пробирки 1 и 2 нагрели на пламени спиртовки до кипения для разрушения (инактивации) ферментов, а затем охладили до комнатной температуры.



Через 10-15 минут мы наблюдали результаты опытов, на основании которых составили выводы.



Выводы:

1) После сильного нагревания активность ферментов в соке подавляется: в пробирке №1 и №2 следов окисления нет. Это неудивительно, т.к. при высокой температуре белки сворачиваются: после кипячения сока мы наблюдали в этих пробирках появление хлопьев, которые осели на стенках пробирки.



Очевидно, что, например, молоко кипятят для того, чтобы инактивировать ферменты, выделяемые микроорганизмами, и замедлить процесс окисления, приводящий к скисанию молока.

2) В пробирке №3 изменения цвета не наблюдалось ни с одним из образцов сока, т.е. под действием кислорода фенол не окислился. Значит, оксидаз мы в соке не обнаружили.



3) В пробирке №4 всех образцов сока, через несколько минут наблюдалось потемнение растворов. Интенсивнее это происходило в опыте с соком капустной кочерыжки: изменение происходило буквально спустя две минуты, в то время как с соком других образцов – спустя 15 – 25 минут. На основании этих наблюдений можно сделать вывод: в соках данных растений содержатся пероксидазы, т.к. именно они ускоряют процесс окисления фенола пероксидом водорода. Последнее подтверждается опытами в пробирке №6: в ней изменений нет. Значит, в отсутствие сока пероксид водорода не может окислить фенол при комнатной температуре.

Опыт №2

Оборудование: капустная кочерыжка, холодная кипячёная вода, фенол, аптечная перекись водорода, тёрка для овощей, электрочайник, 2 термометра, пробирки, чистые пипетки, марля, 4 банки ёмкостью около 1л, лёд или снег.

Ход опыта: кусочек капустной кочерыжки мы измельчили на тёрке.



Полученную кашу отжали через два слоя марли, сок собрали в стакан и разбавили водой в десять раз. Заполнили пробирки согласно таблице №2.

Таблица №2.

1 пробирка	1 мл сока	фенол	Поставить в банку со льдом	5 капель пероксида водорода
2 пробирка	1 мл сока	фенол	Поставить в банку с тёплой водой (40 ⁰)	5 капель пероксида водорода
3 пробирка	1 мл сока	фенол	Поставить в банку с горячей водой (60 ⁰)	5 капель пероксида водорода
4 пробирка	1 мл сока	фенол	Оставить на столе при комнатной температуре	5 капель пероксида водорода
5 пробирка	1 мл воды	фенол	Поставить в банку с кипящей водой	5 капель пероксида водорода
6 пробирка	1 мл воды	фенол	Оставить на столе при комнатной температуре	5 капель пероксида водорода



Через 5 минут после того, как пробирки были расставлены по банкам, во все пробирки, начиная с более холодных, мы влили по 5 капель пероксида водорода. Смесь осторожно взболтали и заметили время начала реакции. Ещё через 5 минут вынули пробирки из банок и записали полученные результаты опыта.



Выводы:

1) При повышенной температуре реакция окисления ускоряется и без добавления ферментов. Мы наблюдали это на опыте в пробирке №5. Фенол окислился в воде с добавлением пероксида водорода после погружения пробирки в банку с горячей водой. В пробирке №6 с теми же составляющими, но при комнатной температуре, изменений нет.

2) Проведя опыт в пробирке №1, которую мы поместили в банку со льдом, мы увидели, что цвет раствора не изменился. Из этого следует, что ферменты действуют медленно при низкой температуре.

Многим известен тот факт, что пищевые продукты портятся под действием ферментов, которые содержатся в них или выделяются микроорганизмами. На холоде активность ферментов снижается - вот почему в холодильнике продукты хранятся дольше.

3) Интенсивное потемнение растворов мы наблюдали в пробирках под номерами 2,3,4, где фенол окислился пероксидом водорода в присутствии ферментов сока соответственно при 40°, 60° и при комнатной температуре.

Особенно быстро окисление произошло в пробирках №2 и №3. Можно сделать вывод, что наиболее оптимален для работы ферментов-пероксидаз температурный интервал 35-55°C.

Вот почему теплокровные животные – наиболее приспособленные на Земле, ведь у них постоянная температура тела, оптимальная для действия ферментов, благодаря которым происходят химические реакции в организме животного.

Список первоисточников:

1) <http://elementy.ru/trefil/81>

2) <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80>

3) http://www.baby-info.ru/chemistry/book4_53.htm

4) <http://www.cultinfo.ru/fulltext/1/001/008/088/375.htm>

5) О. Ольгин. Опыты без взрывов. М. Химия. 1995.