|  |
| --- |
| ОТДЕЛ ОБРАЗОВАНИЯ, СПОРТА И ТУРИЗМА  ВОЛКОВЫССКОГО РАЙОННОГО  ИСПОЛНИТЕЛЬНОГО КОМИТЕТА |
| Государственное учреждение образования  «Гимназия № 2 г. Волковыска» |
| 231900, Гродненская обл., г.Волковыск ул. Социалистическая,10, |
| тел. (01512) 2 00 66 эл. почта: gimn2\_volk @mail.ru |

ПРОЕКТНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

**ТЕМА ПРОЕКТА**

**Сравнительный анализ влияния внешних факторов на ферментативную активность оксиредуктаз овощных соков**

**Руководители проекта:**

Даньковский Роман Иосифович,

учитель химии

**Работу выполнили:**

Бенько Елизавета Алексеевна, учащаяся 10 «А» класса

**г.Санкт-Петербург**

**2017**

**Содержание**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Введение . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | 3 |
|  | Глава I.Теоретическая часть. Ферменты оксиредктазы. . .. . . . . .. . . . | 5 |
|  | 1.1. Характеристика объекта исследования. Ферменты каталаза и пероксидаза . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | 5 |
|  | 1.2. Содержание химических соединений в исследуемых образцах овощ овощей . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .. . . . | 7 |
|  | Глава II. Экспериментальная часть. Экспериментальное определение активности ферментов газометрическим методом. . . . | 9 |
|  | 2.1. Методика определение активности ферментов газометрическим методом . . ………………………………………. . | 9 |
|  | 2.2. Обработка результатов исследования . .. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | 12 |
|  | Глава III. Анкетирование учащихся гимназии №2. г. Волковыска и его анализ . . . . ………………………………………………………… | 18 |
|  | Заключение . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | 20 |
|  | Список использованных источников . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . | 22 |
|  |  |  |

**Введение**

В осуществлении биохимических процессов в живых организмов основная роль принадлежит разнообразным ферментам, обширной группе биокатализаторов, без которых невозможна жизнедеятельность животных, растений и микроорганизмов. Благодаря своей каталитической функции разнообразные ферменты обеспечивают быстрое протекание в живых организмах и вне их огромного числа химических реакций, составляющих основу процессов жизнедеятельности.

В своей работе я решила провести исследование влияния различных химических соединений на скорость ферментативной реакции, которая определяется количеством прореагировавшего субстрата или образовавшегося продукта в единицу времени в единице объёма при определённых условиях.

**Гипотеза:** ферментативная система живых организмов подвергается изменениям под действием факторов внешней среды.

**Объект исследования**: ферменты группы оксиредуктаз - каталаза и пероксидаза соков картофеля, моркови, редьки, капусты, хрена.

**Предмет исследования:** ферментативная активность каталазы и пероксидазы растений в модельно созданной среде под влиянием воздействия растворов различных химических веществ.

**Актуальность исследования:**изучение ферментативной активности оксиредуктаз разных овощей поможет выявлению наиболее полезных из них для человека, а установление характера влияния химических соединений на активность ферментов может быть использована как фактор экологического мониторинга окружающей среды.

**Цель:**изучить характер влияние различных внешних факторов на ферментативную активность каталазы и пероксидазы исследуемых образцов овощных соков.

**Задачи:**

**-** анализ публикаций по проблеме исследования;

**-**определение методики выполнения химического эксперимента по теме исследования;

**-**проведение эксперимента и отражение его результатов в форме диаграмм и таблиц;

- проведение социологического опроса по теме исследования среди учащихся гимназии;

- формулировка основных выводов по итогам работы.

**Методы исследования:**

**-** анализ источников информации;

**-** выполнение химического эксперимента;

**-** анализ результатов, полученных в ходе поставленных химических опытов.

- анализ результатов анкетирования учащихся.

**Глава 1. Теоретическая часть. Обзор литературы по тематике исследования**

**1.1. Характеристика объекта исследования. Ферменты каталаза и пероксидаза.**

Ферменты содержатся в каждой животной и растительной клетках. Большая часть ферментов связана с определенными клеточными структурами (ядро, цитоплазма, пластиды, лизосомы и т. д.), где и осуществляется их функция.

**Каталаза** широко распространена в тканях животных, человека, растений и в микроорганизмах (исключение - некоторые анаэробные микроорганизмы). В клетках каталаза находится в специальных органеллах — пероксисомах и представляет собой гемопротеин, простатической группой которого является гем, содержащий ион трехвалентного железа. Молекула каталазы состоит из четырех, по-видимому, идентичных субъединиц с молекулярной массой 60 000 и имеет соответственно четыре простатические группы. Оптимальная величина рН для каталазы находится в интервале значений 6,0—8,0. Расщепляя Н2О2, каталаза обезвреживает данное токсичное вещество, которое непрерывно образуется в клетке в процессе жизнедеятельности. Пероксид водорода (Н2О2) в больших концентрациях оказывает губительное действие для всего живого. Каталаза препятствует накоплению Н2О2 , расщепляяпероксид водородана воду и кислород, и играет защитную роль в клетке.

Активность фермента очень высока. Такая высокая скорость реакции необходима для удаления активного кислорода, чтобы предохранить компоненты клеток от окислительного действия. Абсолютная специфичность фермента каталазы проявляется в превращении только одного субстрата- перекиси водорода. Каталаза разлагает перекись водорода на воду и кислород. Но когда концентрация перекиси водорода становится незначительной, каталаза начинает катализировать реакцию окисления перекисью водорода спиртов, формальдегидов и нитратов.

Есть еще один фермент, содержащий железо, который также катализирует реакцию разложения перекиси водорода, это **пероксидаза**. В отличие от каталазы перкосидаза катализирует не только разложение пероксида водорода, но и другие реакции. Особой активностью отличается пероксидаза корней хрена. Молекула фермента имеет массу 44 100 и содержит один атом железа.

Определение количественного содержания [ферментов](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4751.html) в биологических объектах представляет известные трудности, поскольку, за редким исключением, [ферменты](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4751.html) в [тканях](http://www.xumuk.ru/biospravochnik/53.html) присутствуют в ничтожно малых [концентрациях](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2115.html). Поэтому о количестве [ферментов](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4751.html) судят по скорости катализируемой [реакции](http://www.xumuk.ru/bse/2325.html) в определенных, согласованных условиях измерения. При оптимальных условиях [температуры](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4344.html), рН среды и полном насыщении [фермента](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4751.html) [субстратом](http://www.xumuk.ru/biospravochnik/5.html) скорость катализируемой [реакции](http://www.xumuk.ru/bse/2325.html) пропорциональна [концентрации](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2115.html) [фермента](http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2/4751.html). Скорость ферментативной реакции (равно активность ферментов) определяется присутствием в среде ингибиторов и активаторов, среди которых могут быть как посторонние для организма вещества, так и природные продукты обмена [1, с. 249].

**Ингибиторами** называют вещества, вызывающие частичное или полное торможение химических реакций, включая и ферментативные. Ферменты теряют каталитическую активность при воздействии различных факторов, вызывающих денатурацию (нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов и другие факторы). Наряду с ингибиторами существует целый ряд **активаторов** ферментов – веществ, усиливающих их каталитическую активность. О скорости ферментативной [реакции](http://www.xumuk.ru/bse/2325.html) судят или по скорости убыли [субстрата](http://www.xumuk.ru/biospravochnik/5.html), или по скорости образования продукта [реакции](http://www.xumuk.ru/bse/2325.html). Важным свойством ферментов является их зависимость активности от условий среды: концентрации фермента и субстрата, температуры, активаторов и ингибиторов, кислотности среды. Влияние кислотности среды на активность ферментов объясняется непосредственным действием концентрации водородных ионов на свойства каталитического центра, которые определяют образование фермент-субстратного комплекса, на степень ионизации субстрата и ферментативного белка [4, с.238]. Каждый фермент проявляет свою наибольшую активность только в определенном, характерном для него интервале рН. При отклонении кислотности среды в любую сторону от оптимального значения, активность ферментов снижается. Для большинства растительных ферментов оптимальной является ней​тральная или слабокислая среда.

1.**2. Содержание химических соединений в исследуемых образцах овощей.**

Наличие некоторых химических соединений в исследуемых растениях отразим в виде таблицы [6]:

**Таблица 1. Химические соединения исследуемых образцов.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Растение | Химический состав |
| 1 | Хрен | Сок хрена включает витамины группы «В», лизоцим, алкалоиды, жирные масла. Среди химических элементов в наибольшей степени - фосфор, железо, калий, кальций и другие элементы. В корнях хрена содержится множество различных пероксидаз, высоко содержание лизоцина - уникального натурального вещества антибиотического действия. |
| 2 | Картофель | Содержит в большом количестве фермент ***каталазу*** и другие ферменты. Картофельный сок содержит жиры, протеины, клетчатку, органические кислоты, пектины, крахмал, азотистые соединения, гликоалкалоиды, нуклеиновые кислоты, витамины – С, Е, РР, витамины группы В, каротин, микроэлементы |
| 3 | Капуста | Содержит углеводы, жиры, сахара (глюкозу и фруктозу), минеральные вещества, клетчатку (1,5 %), фитонциды. Из ферментов - лактозу, липазу, пероксидазу и другие. |
| 4 | Морковь | В моркови содержатся такие ферменты, как **каталаза**, **пероксидаза**, и др. разнообразные микро- и макроэлементы, почти все группы витаминов, бэта-каротин, флавоновые и азотистые соединения. |
| 5 | Редька | В редьке присутствует каротин, витамины группы В, С, и никотиновая кислота. В редьке имеются серосодержащие вещества, который и обуславливают необычный запах и вкус этого корнеплода. В составе редьки присутствует фермент, растворяющий стенки клеток множества бактерий. |

**Глава 2. Экспериментальное определениеактивности ферментов газометрическим методом.**

**2.1.Методика определение активности ферментов газометрическим методом.**

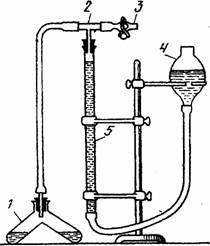
**Оборудование:** фарфоровые ступки с пестиками, пипетки на 5 мл, мерные цилиндры на 25 мл, прибор для определения активности каталазы, песочные часы на 3 мин, весы с разновесами, терка, пробирки, спиртовки, колбы, марля.

**Растительные объекты**: клубни картофеля; корнеплоды моркови, редьки чёрной, капуста белокочанная, корни хрена;

**Реактивы:** 3%-ый пероксид водорода, 2% -ные растворы хлорида натрия, гидроксида натрия, мочевины, хлорида железа(III), ацетата свинца, сульфат меди (II).

**Ход работы:**

Принцип метода определения активности ферментов (каталазы) основан на учете количества кислорода, выделяющегося при разложении перексида водорода. Если непосредственно измеряется объем газа, то такой метод называется газометрическим. При определении активности ферментов газометрическим методом нужно использовать прибор «каталазник».



**Рис. 1. Устройство прибора для определения активности каталазы.**

Условные обозначения: 1 – каталазник, 2 – выпускная трубка, 3 – зажим Мора, 4 – колба с водой, 5 – градуированная бюретка

**Проверка герметичности прибора**.

При определении активности каталазы газометрическим методом использовала прибор «каталазник» (Рис. 1). Он состоит из реактора - соединенных двух пробирок, где происходит расщепление перекиси водорода за счет каталазы изучаемого субстрата. Реактор резиновой трубкой соединяем с бюреткой, с помощью которой будем измерять объем кислорода. Бюретку заполняем водой, слегка подкрашенной метиленовой синью, чтобы заметнее был её мениск. По вытеснению воды из бюретки можно судить о количестве освобождающегося в реакторе кислорода. Для установления мениска на определенном уровне к бюретке присоединена резиновой трубкой стеклянная груша. Бюретка и груша являются сообщающимися сосудами.

Обязательным условием работы прибора служит его герметичность. Для проверки на герметичность присоединить к прибору реактор, закрыть зажим у бюретки и поднять вверх грушу. Если мениск в бюретке не поднимается до мениска воды в груше, то прибор герметичен, и на нем можно работать.

**Определение активности ферментов.**

​ После проверки герметичности прибора необходимо открыть кран – уровень воды в бюретке установится на ноль, после чего кран снова закрыли.

Приготовили 2% растворы солей: NaCl, CuSO4,NaOH, (NH2)2CO,Pb(CH3COO)2, FeCl3.Отвесили 2,0 г растительного материала исследуемых образцов овощей, поместили их в ступку, добавили для нейтрализации естественной кислотности 0,5 г СаСО3 и тщательно растирали. Затем в ступку прилила 5 мл воды и продолжали расти​рать растительную массу до однородного состояния. Растертый мате​риал аккуратно, без потерь, используя стеклянную палочку, перенесли в коническую колбочку прибора, трижды обмывая ступку и пестик водой (по 5 мл). Притертую поверхность конической колбочки очищали от растертого материала влажной фильтровальной бумагой. В пробирку прибора через боковое отверстие наливали 5 мл 3 %-ного раствора пероксида водорода, заполняем колбу водой и с помощью штатива установили уровень воды напротив нулевой отметки на градуированной бюретке. Зажим Мора на выпускной трубке плотно закрывали. Заполнили каталазник следующим образом: одну часть каталазника наполнили 3 мл вытяжки растения и 2 мл воды - контрольная проба, в другое колено каталазника поместили 3% раствор Н2О2 в объеме 5 мл. При изучении влияния химических веществ в одну часть каталазника поместили 3мл. вытяжки и 2мл раствора 2% -го раствора исследуемых соединений. Соединили каталазник с прибором, плотно закрывая резиновой пробкой со шлангом. Для запуска ферментативной реакции расщепления перекиси каталазник переворачивали таким образом, чтобы перекись смешать с вытяжкой растения, одновременно включила секундомер. Во время опыта каталазник  держали двумя пальцами в области пробки, чтобы не происходило его нагревание, которое может повлиять на точность эксперимента. Через три минуты определяем объем выделившегося кислорода по уровню воды в градуированной бюретке. Для каждого варианта опыта проводили измерения в 3-х кратной повторности. Для сравнительного анализа определила среднее значение выделившегося кислорода по результатам измерения трехкратной повторности.  Все опыты проводила в такой же последовательности (таблица 2).

**Таблица 2.**

**Схема опытов по определению активности ферментов, расщепляющих пероксид водорода**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Объект  3 мл | Объем вытесняемой воды при действии факторов | | | | | | | |
| Контроль  +2мл вода | +2мл  NaCl | +2мл  CuSO4 | +2мл  NaOH, | +2мл  (NH2)2CO | +2мл  Pb(СН3СОО)2 | +2мл  FeCl3 | Кипячение |

**2.2. Обработка результатов исследования.**

Рис. 1. Изменение активности каталазы сока картофеля.

Как видно из рисунка 1, каталаза сока картофеля изменяет свою активность под влиянием воздействующих факторов.

По сравнению с контрольной пробой (сок с водой), все факторы оказали ингибирующее (подавляющее) действие. В наибольшей степени - ацетат свинца. Кипячение разрушает фермент. Необходимо отметить, что практически все химические вещества, добавленные в контрольную пробу, оказали сходное ингибирующее действие, кроме хлорида натрия, подавляющее действие которого проявляется в меньшей степени. На основании полученных экспериментальных данных вычисляем изменение ферментативной активности каталазы (в процентах увеличение или уменьшение выделившегося газа) по сравнению с контрольной пробой. Результаты заносим в таблицу.

**Таблица 2.**

**Влияние различных факторов на подавление (активацию) ферментов, расщепляющих пероксид водорода сока картофеля (процент)**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | NaCl | CuSO4 | NaOH | (NH2)2CO | Pb(СН3СОО)2 | FeCl3 | Кипячение |
| Сок  картофеля | 15,68% | 86.27% | 80,39% | 84,43% | 92,16% | 9,8% | 100% |

Примечание: Процент увеличение ферментативной активности в результате активации фермента под воздействием исследуемого фактора в таблице выделен красным цветом, во всех остальных случаях указан % снижение объёма выделившегося кислорода, по сравнению с исходной контрольной пробой.

Рис. 2. Изменение активности каталазы сока моркови.

**Таблица 3.**

**Влияние различных факторов на подавление (активацию) ферментов, расщепляющих пероксид водорода сока моркови (в%).**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | NaCl | CuSO4 | NaOH | (NH2)2CO | Pb(СН3СОО)2 | FeCl3 | Кипячение |
| Сок  картофеля | 14,48% | 77,78% | 79,69% | 70,37% | 81,48% | 0% | 100% |

Анализ приведенных данных, позволяет констатировать сходное воздействие изучаемых факторов на ферментативную активность каталазы сока моркови по аналогии с образцом сока картофеля, кроме FeCl3, который не оказал никакого влияния на действие фермента.

Рис.3.Изучение активности ферментов сока капусты.

**Таблица 4.**

**Влияние различных факторов на подавление (активацию) ферментов, расщепляющих пероксид водорода сока капусты (в%).**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | NaCl | CuSO4 | NaOH | (NH2)2CO | Pb(CH3COO)2 | FeCl3 | Кипячение |
| Сок капусты | 8,3% | 50% | 62.5% | 75% | 83.33% | 0% | 100% |

Анализ полученных данных показывает, что раствор поваренной соли, добавленной к исследуемой пробе сока капусты, оказывает незначительной активирующее действие на фермент, а остальные химические реагенты замедляют ферментативную активность, FeCI3 не влияет на активность фермента.

Рис.4. Изучение активности пероксидазы сока хрена.

Таблица 5.

**Влияние различных факторов на подавление (активацию) ферментов, расщепляющих пероксид водорода сока хрена (в%).**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | NaCl | CuSO4 | NaOH | (NH2)2CO | Pb(СН3СОО)2 | FeCl3 | Кипячение |
| Сок  хрена | 15,5% | 88.23% | 80,39% | 76,47% | 92% | 4,00% | 100% |

Анализ зафиксированных результатов в ходе исследования с соком хрена показывает, что действие ионов Fe3+ на образец активирует работу фермента пероксидазы, остальные факторы оказывают, кроме хлорида натрия, существенное ингибирующее действие. Раствор поваренной соли в меньшей степени ингибирует фермент. Кипячение полностью прекращает действие фермента в результате его разрушения.

Рис. 5. Изучение активности пероксидазы сока редьки.

Исходя, из приведённых диаграмм, констатируем отсутствие влияния на действие фермента добавление к исследуемой пробе раствора хлорида натрия и незначительную активацию его при добавлении FeCl3. Остальные химические соединения в значительной степени снижают активность пероксидазы. Соотношение выделившегося объёма кислорода в результате добавление к исследуемому образцу сока редьки растворов химических веществ ( в %) отразим в виде таблицы 6:

**Таблица 6.**

**Влияние различных факторов на подавление (активацию) ферментов, расщепляющих пероксид водорода сока редьки (в %).**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | NaCl | CuSO4 | NaOH | (NH2)2CO | Pb(CH3COO)2 | FeCl3 | Кипячение |
| Сок редьки | 0% | 50% | 80% | 90% | 90% | 10% | 100% |

# 

# Глава 3. Анкетирование учащихся гимназии №2 г Волковыска.

Цель анкетирования сводилась к выявлению содержанию в пищевом рационе учащихся овощей и фруктов, и продуктов их переработки, а также пониманию их значимости для здорового питания.

Учащимся 9 - 11 классов предложено ответить на три вопроса анкеты.

1. Как регулярно вы употребляете в пищу свежие овощи?

а) ежедневно; б) несколько раз в неделю; в) несколько раз в месяц.

2. Как часто употребляете в пищу свежие фрукты?

а) ежедневно; б) несколько раз в неделю; в) несколько раз в месяц.

3. Какие продукты из перечисленных чаще других должны содержатся, по вашему мнению, в пищевом рационе человека:

а) овощи в сыром виде; б) свежие фрукты; в) свежевыжатые соки; г) минеральная вода;

д) чай; е) ягодные морсы ж) затрудняюсь ответить.

Анкетированию подверглись 50 учащихся 10-11классов гимназии. Результаты анкетирования представлены на диаграммах 1 и 2:

**Диаграмма 1. Употребление овощей и фруктов участниками анкетирования.**

Как видно из диаграммы 1, большинство участников опроса овощи и фрукты в свежем виде употребляют не ежедневно. В основном эти продукты применяют в питании несколько раз в месяц.

**Диаграмма 2. Рейтинг продуктов в пищевом рационе участников опроса.**

Диаграмма 2 показывает, что среди анкетированных учащихся нет явных приоритетов по данному вопросу. Некоторые участники опроса не смогли указать причины, по которым данные продукты должны присутствовать в рационе.

**Заключение.**

**Выводы:**

1. Все исследуемые образцы овощных соков содержат ферменты группы оксиредуктаз – каталазу и пероксидазу.

2. Содержание данных ферментов в исследуемых образцах соков различно, что доказывает разный объём выделившегося кислорода при действии перекиси водорода к исследуемым контрольным образцам.

2. На скорость ферментативной реакции оказывает влияние воздействие внешних факторов.

3. Химические вещества различным образом влияют на активность исследуемых ферментов: растворы солей ацетата свинца(II), сульфата меди(II), мочевины и гидроксида натрия являются ингибиторами по отношению к данным ферментам. Влияние хлорида железа(III) усиливает активность ферментов, а раствор хлорида натрия оказывает незначительное воздействие на скорость ферментативных процессов в условиях эксперимента.

4. Кипячение практически во всех случаях прекращает ферментативную реакцию, что связано с разрушением самих ферментов.

5. Исследование проводилось с использование ограниченного количества образцов овощей и ограниченного количества факторов внешнего воздействия на исследуемые ферменты, однако, полученные данные подтверждают гипотезу, что ферментативная система живых организмов подвергается изменениям под действием факторов внешней среды.

6. Хозяйственная деятельность человека является одной из причин загрязнения окружающей среды, поэтому изучение кинетики ферментативных процессов можно использовать как метод экологического мониторинга, а также для понимания специфики биохимических реакций в живых системах.

7. Овощи и фрукты являются природным источником самых разнообразных химических соединений, в том числе и белков-ферментов, поэтому они должны присутствовать в пищевом рационе человека.

**Список использованных источников.**

**1.** Березов, Т.Т., Коровкин, Б.Ф. Биологическая химия./ Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин // - М.: Медицина - 1990 - 528

2. Резяпкин В. И., Бурдь В. Н. Основы биохимии. / В. И. Резяпкин, В. Н. Бурдь // – Гродно ГрГУ им Я. Купалы - 2009 - 191с.

3.Страйер, Л. Биохимия. / Л. Страйер // - М.: Мир, 1984. - т.1.- 232 с

4. Уэбб, Э. Ферменты. в 3-х томах. //Э. Уэбб // - М.: Мир - 1982.- 515 с.

5.Опыты с ферментами. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://allforchildren.ru/sci/sci056.php>. – Дата доступа: 23. 09. 2015 г.

6. Химический состав и питательная ценность корнеплодов. Часть 3. [Электронный ресурс] – Режим доступа:http://www.activestudy.info/ - Дата доступа: 25. 09. 2015 г.