

Лабораторна робота №7 ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи: вивчити загальні властивості ферментів.

Практичне значення роботи: вивчення властивостей ферментів необхідне для підбору оптимальних умов дії ферментів або визначенні їх активності в наукових або клінічних дослідженнях, для проведення фармакологічного аналізу ферментативних препаратів.

Матеріали і реактиви: штатив для пробірок, пробірки, піпетки, крапельниці, фарфорова ступка з товчком, термостат, водяна баня з термометром, сірники, спиртівка, скляні палички, годинникове скло, чашка Петрі; лід, слина (розчин амілази), дистильована вода, 1%-ий розчин крохмалю, реактив Люголя (1%-ий розчин йоду в калій йодиді), варена та сира картопля, 3%-ий розчин H_2O_2 , 5%-ий розчин сахарози або 2%-ий розчин сахарози, препарат сахарози, 0,4%-ий розчин натрій гідроксиду, 0,4%-ий розчину хлоридної кислоти, 1%-ий розчин натрій хлориду, 1%-ий розчин купрум (II) сульфату, реактив Фелінга I та Фелінга II.

Хід роботи

Дослід 1. Дія амілази

Принцип методу. Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз α -глюкозидного зв'язку α -1-4-крохмалю до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуку *синього забарвлення*, амілодекстрин – *фіолетового*, еритродекстрин – *червоно-бурого*, ахродекстрин – *жовтого*.

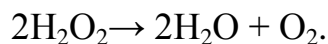
Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл 1%-ого розчину крохмалю, в одну із пробірок додають 2 мл слини, добре перемішують. Обидві пробірки зі скляними паличками, зануреними в них, одночасно поміщають у водяну баню при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Через 4 хв. з кожної пробірки відбирають за допомогою скляної палички по краплині рідини і змішують їх окремо з краплею реактиву Люголя, заздалегідь нанесеною на годинникове скло. Повторюють взяття проб через 6 та 10 хв.

Забарвлення з йодом проб з пробірки, що містить **слину**, змінюється від *синього* до *синьо-фіолетового*, *буро-червоного*, *червоного* і, нарешті, *жовтого*.

До вмісту пробірки з амілазою додають реактив Фелінга (Фелінг I та Фелінг II по 0,5 мл відповідно) і нагрівають до кипіння. Утворюється червоний осад купрум (I) оксиду.

Дослід 2. Дія каталази

Принцип методу. Каталаза прискорює реакцію розщеплення гідроген пероксиду на H_2O та O_2 :



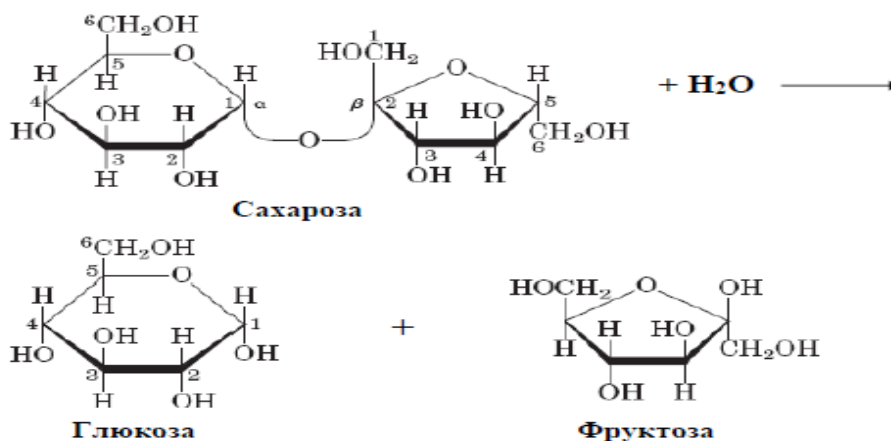
У цій реакції одна молекула гідроген пероксиду окиснюється і є донором електронів, а друга молекула відновлюється і є акцептором електронів.

Хід роботи. Розрізати картоплю, додати на зріз сирі та вареної картоплі 2 краплі розчину H_2O_2 .

На зрізі сирі картоплі внаслідок утворення молекулярного кисню з'являється велика кількість бульбашок. На вареній картоплі бульбашки газу не утворюються.

Дослід 3. Дія сахарози

Принцип методу. Сахароза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози.



Моносахариди, які утворюються, визначають реакцією Фелінга. Сахароза не містить вільної альдегідної групи і тому не має відновних властивостей.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1 мл препарату сахарози. Вміст однієї з них (контроль) кип'ятять впродовж 3 хв., після чого в обидві пробірки додають (охлаждені) по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат за температури $38^{\circ}C$. Через 15 хв. у пробірки вносять реактив Фелінга (Фелінг I та Фелінг II по 0,5 мл відповідно), перемішують і нагрівають до кипіння.

У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом (дослід), утворюється червоний осад купрум (I) оксиду.

Дослід 4. Термолабільність ферментів. Вплив температури на активність амілази слини

Принцип методу. Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури й визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 5 мл 1%-ого розчину крохмалю. Пробірку 1 залишають за кімнатної температури, пробірку 2 – у термостат за температури $40^{\circ}C$, пробірку 3 вміщують у киплячу водяну баню, а пробірку 4 ставлять у лід.

Через 15 хв. у всі пробірки, залишаючи їх за тих же умов, додають по 1 мл розчину амілази слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю стежать за реакцією з 1%-им розчином йоду через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 хв.

У пробірці **1** при кімнатній температурі, *червоне* чи *фіолетово-червоне забарвлення*, в пробірці **2** за оптимальної температури (40 °С) – *жовте забарвлення*, в пробірці **3** (100 °С) та пробірці **4** (лід) – *синє забарвлення*.

Дослід 5. Вплив рН середовища на активність амілази слини

Принцип методу. Для амілази слини оптимальне значення при рН = 6,8. В дуже кислому і сильно-лужному середовищі активність амілази знижується.

Хід роботи. У 1-у, 2-у, 3-у пробірки додати 0,5 мл 1,0%-ого розчину крохмалю, 0,5 мл розчину амілази слини, у 1-у пробірку додати 1,0 мл 0,4%-ого розчину натрій гідроксиду, у 2-у пробірку – 1,0 мл 0,4%-ого розчину хлоридної кислоти, у 3-ю – 1,0 мл води. Нагрівають в термостаті при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 15 хв. у кожену пробірку додати по 3 краплі розчину Люголя.

В пробірці **1** – *жовте забарвлення*, в пробірках **2** та **3** – *фіолетове забарвлення*.

Дослід 6. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини

Принцип методу. Активатором амілази є натрій хлорид, а інгібітором – купрум сульфат. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності натрій хлориду та купрум сульфату.

Хід роботи. В 1-у пробірку наливають 1,5 мл води, в 2-у пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у 3-ю пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину купрум сульфату. У всі пробірки додають по 1,5 мл слини, перемішують, вносять по 1,5 мл 1%-ого розчину крохмалю, потім знову перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °С. Через 5 хв. додають по 5 краплин 1%-ого розчину йоду.

В 1-й пробірці утворюється фіолетове або червоне забарвлення, у 2-й пробірці – *прозора рідина* або *жовте забарвлення*, у 3-й пробірці – *синє забарвлення*.

Дослід 7. Специфічність дії амілази та сахарози

Принцип методу. Амілаза розщеплює полісахарид крохмаль і не діє на дисахариди (мальтозу або сахарозу). Сахароза розщеплює тільки сахарозу й не розщеплює крохмаль та інші дисахариди.

Хід роботи. У 1-у пробірку та 2-у пробірку наливають по 1 мл 1%-ого розчину крохмалю. У 1-у пробірку додають 1 мл розчину амілази слини, в 2-у пробірку – 1 мл препарату сахарози, потім перемішують і ставлять у термостат за температури 38 °С.

У 3-ю пробірку та 4-у пробірки наливають по 1 мл 2-ого розчину сахарози. У 3-ю пробірку додають 1 мл препарату сахарози, а 4-у пробірки – 1 мл розчину амілази слини й залишають за тих самих умов.

Через 5 хв. у 1-у пробірку та 2-у пробірку додають по 5 краплі розчину йоду й спостерігають за забарвленням.

У 3-ю пробірку, 4-у пробірку додають реактив Фелінга (Фелінг I та Фелінг II по 0,5 мл відповідно) та нагрівають до кипіння.

У 1-й пробірці з амілазою синє забарвлення розчину зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою – прозора рідина або жовте забарвлення. У 2-й пробірці розчин має синє забарвлення.

Сахароза відновних властивостей немає, тому в пробірці, де під впливом сахарози сахароза розщепилася на глюкозу та фруктозу, спостерігається червоне забарвлення, утворюється червоний осад купрум (І) оксиду.

Результати досліду 1-7 запишіть у таблицю 9 за аналогією:

Таблиця 9

Загальні властивості ферментів

Дослід 1. Дія амілази					
№ пробірки	Субстрат	Фермент	Умови	Час	Реакція з йодом
1	Крохмаль	Вода	Водяна баня, 40 °С	4 хв.	
				6 хв.	
				10 хв.	
2		Амілази слини		4 хв.	
				6 хв.	
				10 хв.	
№ пробірки	Реактив	Умови		Спостереження	
2	Фелінга	До кипіння			

Дослід 2. Дія каталази		
Картопля	Реактив	Спостереження
Сира	H ₂ O ₂	
Варена		

Дослід 3. Дія сахарози					
	Фермент	Субстрат	Умови	Реактив	Спостереження
К	Сахароза кип'ячена	Сахароза	Термостат 38 °С, 15 хв.	Фелінга	
Д	Сахароза				

Дослід 4. Термолабільність ферментів											
№	Субстрат	Фермент	Умови	Час	Спостереження						
1	1-%-ий розчин крохмалю	Розчин амілази слини	Кімнатна температура	1 хв.							
				2 хв.							
				4 хв.							
				6 хв.							
				8 хв.							
				10 хв.							
				12 хв.							
2			1-%-ий розчин крохмалю	Розчин амілази слини	Термостат 40 °С	1 хв.					
						2 хв.					
						4 хв.					
						6 хв.					
						8 хв.					
						10 хв.					
						12 хв.					
3					1-%-ий розчин крохмалю	Розчин амілази слини	Кипляча водяна баня 100 °С	1 хв.			
								2 хв.			
								4 хв.			
								6 хв.			
								8 хв.			
								10 хв.			
								12 хв.			
4							1-%-ий розчин крохмалю	Розчин амілази слини	Лід	1 хв.	
										2 хв.	
										4 хв.	
										6 хв.	
										8 хв.	
										10 хв.	
										12 хв.	

Дослід 5. Вплив рН середовища на активність амілази слини				
№	Субстрат / Фермент	Реактив	Умови	Спостереження з Люголем
1	Крохмаль / Амілаза слини	NaOH	Термостат 38 °С, 15 хв.	
2		HCl		
3		Вода		

Дослід 6. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини				
№	Субстрат / Фермент	Реактив	Умови	Спостереження з йодом
1	Крохмаль / Амілаза слини	Вода	Термостат 38 °С, 5 хв.	
2		NaCl		
3		CuSO ₄		

Дослід 7. Специфічність дії амілази та сахарози					
№	Субстрат	Фермент	Умови	Спостереження	
				З йодом	З Фелінгом
1	Крохмаль	Амілаза слини	Термостат 38 °С, 5 хв.		
2		Сахароза			
3	Сахароза	Сахароза			
4		Амілаза слини			

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.

✍ Завдання для домашнього виконання

1. Охарактеризуйте будову ферменту. Наведіть схематичне зображення розташування активного (каталітичного, адсорбційного) та алостеричного центрів ферменту. Вкажіть роль цих центрів.

2. Напишіть приклади основних класів ферментів: оксидоредуктаз, трансфераз, гідролаз, ліаз, ізомерази, лігази (синтезази).

3. У чому полягає специфічність дії ферментів? Застосування ферментів.

? Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення таких понять, як фермент, субстрат, каталіз. Наведіть приклади ферментів.

2. Наведіть класифікацію ферментів. Охарактеризуйте особливості будови простих і складних ферментів.

3. Охарактеризуйте активний (субстратний, каталітичний) та алостеричний центри ферменту.

4. Дайте визначення таких понять, як кофермент, апофермент, ізофермент. Охарактеризуйте їх роль.

5. Розкрийте механізм дії ферментів та перелічіть основні етапи ферментативної реакції.

6. Розкрийте сутність кінетики ферментативної реакції.

7. Дайте визначення поняття «активність ферменту». Що таке юніт, катал, питома активність ферменту?

8. Назвіть види специфічності ферментів.

9. Поясніть вплив чинників (температура, рН середовище) на кінетику та швидкість ферментативної реакції. Розкрийте механізм дії активаторів та інгібіторів ферментів, наведіть приклади. Охарактеризуйте види інгібування.

10. Наведіть номенклатуру ферментів.

11. Охарактеризуйте класи ферментів (оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази, лігази).