

Подільський державний аграрно-технічний університет
Факультет агротехнологій та природокористування
Кафедра агрохімії, хімічних та загальнобіологічних дисциплін

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ТЕМИ “ФЕРМЕНТИ”**

з дисципліни

*“Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної
хімії”*

*для здобувачів вищої освіти за спеціальністю
211 «Ветеринарна медицина»*

Кам'янець-Подільський

2018 р.

Автор:

Коваль Т.В. кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри агрохімії, хімічних і загальнобіологічних дисциплін

Рецензенти:

Супрович Т.М. доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, фармакології і гігієни тварин Подільського державного аграрно-технічного університету;

Плахтій П.Д. кандидат біологічних наук, професор кафедри біології та методики її викладання Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка

Рекомендовано до друку науково-методичною радою Подільського державного аграрно-технічного університету (протокол №8 від 24.10.2018 р.).

Коваль Т.В.

Методичні рекомендації для вивчення теми «Ферменти» з дисципліни «Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної хімії» для здобувачів вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» / Т.В.Коваль. – Кам'янець-Подільський, 2018. – 50 с.

Методичні рекомендації скеровані на поглиблене засвоєння теми «Ферменти». Містять теоретичний матеріал, практичну частину, контрольні питання, завдання для самостійної роботи. Для самоконтролю знань подаються тестові завдання.

Методичні рекомендації можуть бути використані здобувачами вищої освіти спеціальності «Ветеринарна медицина» при вивченні дисципліни «Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної хімії».

© Коваль Т.В. 2018

ЗМІСТ

1.	ВСТУП	4
2.	Правила техніки безпеки в лабораторії біохімії	5
3.	Перша допомога при нещасних випадках	6
4.	<i>Заняття 1.</i> Вивчення загальних властивостей ферментів	7
5.	<i>Заняття 2.</i> Вивчення дії амілолітичних ферментів	14
6.	<i>Заняття 3.</i> Вивчення дії ліполітичних ферментів	19
7.	<i>Заняття 4.</i> Вивчення дії протеолітичних ферментів	24
8.	<i>Заняття 5.</i> Кінетика ферментативних реакцій	30
9.	Тестові питання для контролю знань з теми «Ферменти»	38
10.	СЛОВНИК СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ	44
11.	ДОДАТКИ	48
12.	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	49

ВСТУП

Ферменти як біокаталізатори, які містяться в усіх тканинах, клітинах і біологічних рідинах, забезпечують перебіг хімічних реакцій у живих організмах.

При вивченні ферментів необхідно знати структуру, властивості ферментів і умови, що необхідні для їх дії, механізм ферментативного каталізу. Тому в даних методичних рекомендаціях пропонується вивчати ферменти з позиції їх будови, властивостей та біологічного значення, одночасно розглядаючи їх участь у метаболічних перетвореннях в тваринному організмі.

До кожної теми подається коротка стисла теоретична частина, в якій висвітлюються і узагальнюються теоретичні дані по певним питанням. Це дозволяє студентам краще засвоїти програмний матеріал, виділити в ньому найголовніше. Після кожної теми подаються контрольні питання та завдання для самостійної роботи, на основі яких викладач перевіряє засвоєння студентами даної теми. Для контролю знань пропонуються тестові питання.

Дані методичні матеріали побудовані з врахуванням взаємозв'язку із суміжними дисциплінами і мають практичне значення для підготовки майбутніх лікарів ветеринарної медицини, формують відповідні загальнопредметні та фахові компетенції.

Автор сподівається, що методичні рекомендації допоможуть студентам краще готуватись до лабораторних занять, орієнтуватись у досить великому обсязі наукової інформації під час вивчення даної теми, а також оволодіти практичними навичками дослідження ферментів у біологічному матеріалі, умінням узагальнювати, аналізувати й оцінювати результати лабораторних досліджень.

ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ В ЛАБОРАТОРІЇ БІОХІМІЇ

1. Працювати в лабораторії дозволяється тільки в халатах.
2. Приступати до роботи студент може тільки з дозволу викладача. Під час роботи слід дотримувати чистоту, тишу, порядок, точність.
3. В лабораторії не можна пити воду, приймати їжу.
4. Забороняється працювати в лабораторії одному.
5. Забороняється вмикати прилади без попередньої перевірки.
6. Не можна залишати діючий прилад без нагляду.
7. Необхідно економити воду, електроенергію та реактиви.
8. Забороняється будь-які речовини пробувати на смак.
9. Забороняється виконувати досліди у брудному посуді.
10. Всі процедури по виконанню лабораторних робіт (відмірювання реактивів, їх переливання, нагрівання та ін.) виконувати тільки на своєму робочому місці.
11. Роботи з газоподібними, отруйними речовинами, і з тими, які легко парують, проводити у витяжній шафі.
12. Особливо обережно працювати з концентрованими кислотами, лугами, їх міцними розчинами. Забороняється відміряти такі реактиви шляхом всмоктування їх ротом в піпетку. Не допускати попадання цих реактивів на шкіру і одяг.
13. При розчиненні кислот, лугів потрібно їх додавати до води, а не навпаки.
14. Після роботи з реактивами обов'язково помити руки.
15. При нагріванні пробірок слідкувати, щоб отвір пробірки не був направлений на кого-небудь з присутніх в лабораторії. Нагрівання

пробірок треба проводити біля меніска (а не біля дна), часто обертати їх і періодично виймати з полум'я.

16. Працювати із спиртом, ацетоном, ефіром та іншими легкозаймистими речовинами можна тільки при відсутності вогню в лабораторії. Потрібно пам'ятати, що горючі, нерозчинні речовини, особливо рідини (бензол, бензин та ін.) гасити водою не можна.

17. Після закінчення лабораторних занять черговий студент закриває водопровідні крани, виключає електроприлади, світло.

18. Всі питання з техніки безпеки, що виникають в процесі роботи, потрібно негайно в'яснити у викладача або лаборанта.

ПЕРША ДОПОМОГА ПРИ НЕЩАСНИХ ВИПАДКАХ

1. У лабораторії є аптечка для надання першої допомоги при нещасних випадках.

2. При легких термічних опіках шкіру слід обмити спиртом, а потім змазати розчином гліцерину чи вазеліном. При більш сильних опіках обмити розчином калій перманганату або спиртом, потім змазати маззю від опіків.

3. При опіках кислотою промити великою кількістю води, а потім розбавленим розчином питної соди, при опіках лугом промити великою кількістю води, а потім розбавленим розчином лимонної кислоти.

4. При попаданні лугу чи кислоти в очі потрібно добре промити їх водою і негайно звернутись до лікаря.

Заняття 1. Вивчення загальних властивостей ферментів

Ферменти (ензими) – біологічні каталізатори білкової природи, що утворюються в живих клітинах і мають здатність прискорювати хімічні процеси в організмі.

Усі ферменти є простими білками (уреаза, трипсин) або складними білками (каталаза). Усі ферменти добре розчиняються у воді, в розбавлених розчинах кислот, лугів, солей та деяких органічних розчинниках. Для ферментів характерна висока молекулярна маса (від десятків тисяч до кількох мільйонів). Ферменти – амфотерні сполуки і мають високу хімічну активність.

Найважливіші властивості ферментів – термолабільність, висока каталітична активність, специфічність, залежність дії від реакції середовища, зворотність дії.

Специфічність ферментів – строго спрямована дія ферментів на окремий субстрат або групу субстратів певної хімічної будови. Розрізняють такі види специфічності ферментів:

- *абсолютна* – коли фермент діє тільки на один субстрат (сахараза, уреаза);
- *відносна* – коли фермент діє на групу подібних субстратів, в яких є подібні хімічні зв'язки (пепсин, ліпаза);
- *стереохімічна* – коли фермент каталізує перетворення субстрату з певною просторовою будовою (фумаратгідратаза).

Багато ферментів виділяються тканинами в неактивному стані у вигляді проферментів (*зимогенів*). Дія ферментів в значній мірі залежить від наявності активаторів або паралізаторів.

Активатори – речовини, які підвищують активність ферментів, **паралізатори (інгібітори)** – пригнічують її. Розрізняють специфічні і неспецифічні активатори та інгібітори.

Специфічні активатори або паралізатори виробляються в організмі тварин і діють на певний фермент. До специфічних активаторів відносяться

ентеропептидаза (активує трипсиноген і переводить його в трипсин), соляна кислота (активує пепсиноген і переводить його в пепсин), жовчні кислоти (активують ліпазу), тромбопластин (активує протромбін і переводить його в тромбін). Типові специфічні інгібітори – антиферменти антитрипсин, антипепсин, антихімотрипсин тощо.

Неспецифічні активатори або паралізатори поступають в організм тварин ззовні і діють на різні ферменти. До неспецифічних активаторів належать різні неорганічні катіони та аніони – Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- та ін.

До неспецифічних інгібіторів належать ферментні отрути, йони важких металів, алкалоїдні речовини, неорганічні кислоти, луги, алкоголі, альдегіди тощо.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФЕРМЕНТІВ

Мета: ознайомити студентів із загальними властивостями ферментів на прикладі амілази слини; на основі розуміння фізико-хімічних властивостей білків-ферментів пояснювати залежність активності ферментів від рН середовища, температури та інших факторів.

Реактиви та обладнання: 1%-ний р-н крохмалю; 0,1 %-ний розчин крохмалю; 1%-ний розчин сахарози; 1%-ний р-н NaOH; 1 н NaOH; 1%-ний р-н CuSO_4 ; %-ний розчин NaCl; 1 н розчин HCl; 10%-ний розчин HCl; розчин йоду; слина (розведена в п'ять разів); 5%-ний розчин сечовини; 1%-ний розчин фенолфталеїну; дистильована вода; штатив з пробірками; піпетки; стаканчики для слини; скляні палички для перемішування; водяна баня; спиртівки.

Дослід 1. Термолабільність ферментів

Ферменти дуже чутливі до температури. Температурний оптимум дії більшості ферментів тваринного походження дорівнює $37-42^\circ\text{C}$, рослинного – $25 - 35^\circ\text{C}$. При нагріванні вище оптимальної температури активність ферментів знижується. При температурі $80-100^\circ\text{C}$ ферменти втрачають каталітичну здатність, оскільки настає денатурація білкової молекули. З пониженням

температури швидкість ферментативних реакцій поступово зменшується, досягаючи мінімуму при 0°C. При поступовому підвищенні температури до 37°C їхня активність відновлюється.

Хід роботи. В три пробірки наливають по 10 крапель 1% розчину крохмалю. В першу пробірку додають 10 крапель слини, в другу - 10 крапель прокип'яченої слини, в третю - 10 крапель води (контроль). Всі пробірки ставлять на водяну баню при температурі 38°C на 10 хвилин. Після цього проводять якісні реакції на крохмаль і відновлюючі речовини.

Реакція на крохмаль: до 5 крапель досліджуваного розчину доливають 1 краплю розчину йоду. В присутності крохмалю з'являється синє забарвлення.

Реакція Тромера (на відновлюючі речовини): до 5 крапель досліджуваної рідини додають 5 крапель 10% розчину NaOH і 5 крапель 1% розчину CuSO₄ і нагрівають. В присутності глюкози, мальтози з'являється жовте забарвлення, яке пізніше переходить в червоне. Результати роботи заносять в таблицю.

Вплив температури на активність ферментів

№	Субстрат	Фермент	Реакція на крохмаль	Реакція Тромера	Висновки
1					
2					
3					

Дослід 2. Специфічність ферментів

Характерною властивістю ферментів є їх специфічна дія, яка полягає в тому, що кожний фермент може каталізувати тільки одну реакцію, діючи на один або ряд подібних субстратів. Розрізняють абсолютну, відносну і стереохімічну специфічність ферментів.

Хід роботи. В дві пробірки наливають по 5 крапель слини. В першу пробірку доливають 10 крапель 1% розчину крохмалю, в другу - 10 крапель 1% розчину сахарози. Обидві пробірки ставлять на 10 хвилин на водяну баню

при температурі 38°C, після чого з вмістом пробірки проводять реакцію Тромера. Результати роботи записують в таблицю.

Специфічність ферментів

№	Субстрат	Фермент	Реакція Тромера	Висновки
1				
2				

Дослід 3. Вплив активаторів і паралізаторів на активність амілази

Активність деяких ферментів залежить від наявності в реакційному середовищі окремих речовин або йонів. Речовини, які підсилюють дію ферментів, називають активаторами, а ті, які знижують швидкість ферментативної реакції - паралізаторами або інгібіторами. Активатори і паралізатори, які виробляються в організмі, називають специфічними, а ті, які поступають в організм - неспецифічними.

Хід роботи. В три пробірки наливають по 3 мл розведеної слини. В першу пробірку додають 1 краплю 1% розчину NaCl, в другу - 1 краплю 1% розчину CuSO₄, в третю - 1 краплю води. Потім в кожен пробірку доливають по 5 крапель 1% розчину крохмалю. Всі три пробірки ставлять на водяну баню при температурі 37°C на 10 хвилин.

Потім з вмістом пробірок проводять реакцію на крохмаль. Результати роботи записують в таблицю.

Вплив активаторів і паралізаторів на активність амілази

№	Субстрат	Фермент	Додавана речовина	Висновки
1				
2				
3				

Дослід 4. Визначення залежності дії ферментів від рН середовища

Ферменти чутливі до рН середовища. Концентрація водневих йонів діє на активний центр ферментів, на ступінь його йонізації, а також на йонізацію субстрату, ферментсубстратного комплексу і продуктів реакції. Це впливає на структуру, стан ферментного білку і швидкість реакції. Для кожного ферменту існує оптимальне значення рН. Незначне відхилення рН від оптимального значення уповільнює або зупиняє дію ферментів.

Оптимальні значення рН для деяких ферментів: пепсин 1,5-2,2; уреаза 7,0; амілаза слини 6,8; трипсин 7,0-7,8; аргіназа 9,5-9,9; амілаза солоду 4,4-4,7, ліпаза (насіння рицини) 4,7-5,0; мальтаза (дріжджі) 6,7-7,2; цукраза (дріжджі) 4,6-5,0; каталаза - 7,0.

Хід роботи. У три пробірки з 1 мл розведеної слини наливають: в першу — 1 мл 1,0 н розчину НСІ і 5 мл 0,1 % розчину крохмалю, в другу — 5 мл 0,1 % розчину крохмалю, в третю — 1 мл 1,0 н NaOH і 5 мл 0,1 % розчину крохмалю. Після витримання пробірок при температурі 37 °С протягом 30 хвилин у них додають при помішуванні по 5 краплин розчину йоду в калій йодиді. Порівнюють забарвлення розчинів у пробірках. У пробірках з кислотою і лугом амілаза буде інактивована, і забарвлення розчину не зміниться. Результати роботи заносять в таблицю.

Вплив рН на активність ферментів

№	Субстрат	Фермент	Додавана речовина	Реакція на крохмаль	Висновки
1					
2					
3					

Дослід 5. Визначення активності уреазы

Уреаза (сечовина-аміногідролаза, КФ 3.5.1.5) каталізує розщеплення сечовини з утворенням CO_2 і NH_3 . За зміною рН середовища завдяки утворенню аміаку судять про дію уреазы.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1 мл 5% розчину сечовини і по 5 крапель 1% розчину фенолфталеїну. В одну з них додають 5 мл препарату уреазу і перемішують. У пробірці з уреазою утворюється аміак, який змінює рН середовища до лужного. При наявності фенолфталеїну розчин забарвлюється в рожевий колір. Забарвлення розчину в пробірці без уреазу не змінюється.

Дослід 6. Порівняння дії неорганічних каталізаторів і ферментів

Ферменти відрізняються від неорганічних каталізаторів за рядом властивостей. Основною відмінною рисою ферментів є їх специфічність – здатність ферментів каталізувати одну або строго визначене коло реакцій.

Значна кількість ферментів на відміну від неорганічних каталізаторів найбільш активна при температурі 37-42°C.

Порівняти дію ферментів і неорганічних каталізаторів можна на прикладі гідролізу крохмалю. Крохмаль може розщеплюватися до глюкози при кип'ятінні з концентрованими мінеральними кислотами, зокрема, соляною, яка є неорганічним каталізатором. Ця ж кислота при кип'ятінні може викликати гідроліз інших сполук, наприклад білків.

Гідроліз крохмалю проходить через стадію утворення декстринів – продуктів неповного розпаду крохмалю. Крохмаль утворює з йодом синє забарвлення, декстрини – різне забарвлення в залежності від їх складності: *амілодекстрини* – фіолетове, *еритродекстрини* – червоно-буре, *ахродекстрини* – жовто-буре. Відсутність забарвлення вказує на утворення мальтози або глюкози.

Фермент слини амілаза гідролізує крохмаль до дисахариду мальтози. В процесі ферментативного гідролізу крохмалю до мальтози теж утворюються декстрини. Слина містить також невелику кількість ферменту мальтази, яка розщеплює мальтозу до глюкози.

Хід роботи. В три пробірки наливають по 2 мл 1%-ного розчину крохмалю. В першу пробірку додають 1 мл слини, в другу – 1 мл 10%-ного

розчину HCl, в третю – 1 мл дистильованої води (третя пробірка служить контролем).

Всі три пробірки поміщають у водяну баню при температурі 38°C на 10 хвилин для порівняння дії неорганічного каталізатора – соляної кислоти і ферменту амілази в одних і тих же умовах.

Контрольні питання

1. Загальна характеристика ферментів. Хімічна природа ферментів.
2. Залежність дії ферментів від температури, рН середовища.
3. Специфічність ферментів та її види.
4. Вкажіть особливості дії ферментів в порівнянні з дією неорганічних каталізаторів.
5. Поняття про ізоферменти.
6. Номенклатура, класифікація, шифр ферментів. Типи реакцій, що каталізують окремі класи ферментів.

Завдання для самостійної роботи

1. Особливості дії ферментів як біокаталізаторів.
2. Поясніть зміну активності ферменту при зміні рН середовища.
3. Вкажіть відмінність між активним і алостеричним центрами ферменту.
4. Рівні структурної організації ферментів. Мультиферментні комплекси, ферментативні ансамблі, поліфункціональні ферменти, їх переваги.
5. Поясніть термолабільність ферментів на прикладі вивчення цієї властивості у амілази слини. Накресліть графік залежності активності ферменту від температури середовища.
6. Поясніть механізми впливу активаторів та інгібіторів на активність ферментів.
7. Тканинна (органна) специфічність ферментів. Навести приклади.
8. Внутрішньоклітинна локалізація ферментів. Навести приклади.

Заняття 2. Вивчення дії амілолітичних ферментів

Вуглеводи, які потрапляють в організм у вигляді полі- і дисахаридів, не можуть використовуватись безпосередньо. Засвоєння цих речовин стає можливим лише після їх розщеплення до моносахаридів.

Розщеплення вуглеводів – ферментативний процес і проходить при участі ферментів з класу гідролаз, підкласу глікозидаз (амілолітичних ферментів).

Процес розщеплення вуглеводів починається в ротовій порожнині, куди впадають протоки трьох пар великих слинних залоз (привушних, підщелепних, під'язикових) і великої кількості дрібних залоз, розташованих на поверхні язика і в слизовій оболонці щік та піднебіння. Ці дрібні залози, а також під'язикові залози постійно виробляють рідку слину, привушні і підщелепні залози виділяють свої секрети лише при їх рефлекторному подразненні.

Слина — безбарвна, трохи мутнувата рідина. Її основним органічним компонентом є ферменти амілаза (розщеплює крохмаль і глікоген до дисахариду мальтози) і мальтаза (α -глюкозидаза), яка розщеплює мальтозу до моносахариду глюкози.

У природі виявлено α , β , γ -амілази, кожна з яких вузько специфічна і спеціалізована. Так, ендфермент α -амілаза каталізує розщеплення 1-4 і 1-6 глікозидних зв'язків всередині молекули полісахаридів. Під її впливом крохмаль розщеплюється до декстринів.

Декстрини – продукти неповного (проміжного) гідролізу крохмалю. Вони діляться на амілодекстрини (з йодом дають синьо-фіолетове забарвлення), еритродекстрини (з йодом дають червоно-буре забарвлення), ахродекстрини (з йодом дають жовто-буре забарвлення), мальтодекстрини (з йодом забарвлення не дають). Перспективним напрямком в дієтології є використання декстринів для зв'язування та виведення з організму важких металів, нуклідів, отруйних речовин.

Наступний продукт, який утворюється при гідролізі крохмалю, - дисахарид мальтоза. Послідовне відщеплення від кінця молекули полісахариду мальтози здійснюється за допомогою β -амілази, яка інтенсифікує гідроліз 1,4 зв'язків. Гама-амілаза – відщеплює від полісахариду по одній молекулі глюкози.

Амілаза слини складається в основному з α -амілази. Її ще називають птіаліном або діастазою. Крім амілази, в слині міститься фермент мальтаза (α -глікозидаза), яка розщеплює мальтозу на дві молекули глюкози. Тому при тривалому перебуванні вуглеводної їжі у порожнині рота відчувається солодкий смак.

Важливим є той факт, що на вміст ферментів у слині впливає склад їжі. Так, у слині хижаків, які харчуються м'ясом, амілаза практично відсутня. У людей, які споживають їжу, багату на вуглеводи, вміст амілази у слині вищий, ніж у тих, які споживають бідну на вуглеводи їжу.

В слині містяться також мукополісахариди і глікопротеїни (муцин, специфічні білки крові тощо), імуноглобуліни, незначна кількість білків плазми крові, йони Натрію, Калію, Кальцію, Хлору та інші. Високу бактерицидну властивість слини забезпечує фермент ліцозим. Своєрідний слизистий вигляд слини зумовлений присутністю в ній муцину. До щільного залишку слини (0,5–1,5 %) окрім муцину входять ферменти, глобулін, амінокислоти, креатинін, сечова кислота, сечовина та неорганічні солі.

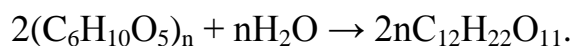
Реакція слини (рН 5,8–7,8) залежить від інтенсивності її секреції: при великих об'ємах секреції вона слаболужна, при незначних — слабокисла. Слина завжди гіпотонічна. Це зумовлено процесами активної секреції і реабсорбції в протоках слинних залоз. В залежності від характеру їжі упродовж доби слинні залози виробляють 0,5–2,0 л слини. На суху їжу завжди виділяється більше слини, ніж на вологу.

Їжа в ротовій порожнині знаходиться 1-5 хвилин. Ферменти частково розщеплюють вуглеводи їжі. Основна маса полісахаридів не змінюється і

надходить у шлунок. Встановлено, що найбільша активність амілази в слині людини, найменша – в слині собак і котів.

З порожнини рота їжа потрапляє в шлунок, де дія амілази слини може тривати лише 20-30 хвилин, поки харчова маса не набуде кислого характеру. Зміна рН середовища (рН шлункового соку дорівнює 1,5-2) повністю ін активує фермент, оптимальна каталітична дія якого проявляється лише при рН=6,8-7,2.

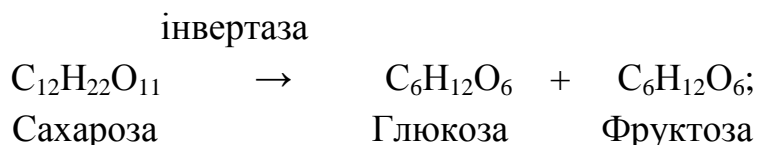
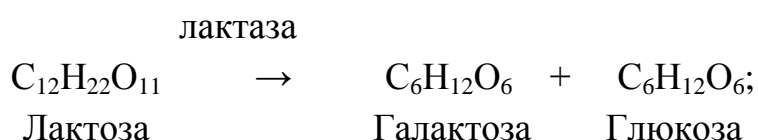
Повністю вуглеводи перетравлюються в тонкому під дією соку підшлункової залози і кишкового соку. В тонкому кишечнику полісахариди (крохмаль, глікоген, інουλін) та їх похідні (декстрини) під впливом α -амілази розщеплюються до дисахаридів:



Подальше розщеплення дисахаридів здійснюється різними ферментами. Наприклад, солодовий цукор (мальтоза) розщеплюється під впливом ферменту мальтази:



Лактоза і сахароза розщеплюються лактазою (β -галактозидазою) і сахаразою, або інвертазою (β -фруктофуранозидазою):



Під впливом цих ферментів вуглеводи розщеплюються до моносахаридів. Доведено, що розщеплення дисахаридів відбувається не лише в тонкому кишечнику, а й на мембранах епітеліальних клітин слизової оболонки, де локалізовані відповідні ферменти. Цей вид травлення досліджував А.М.Уголев. За його пропозицією, воно дістало назву пристінкового травлення.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА. ДОСЛІДЖЕННЯ ГІДРОЛІЗУ КРОХМАЛЮ ПІД ДІЄЮ АМІЛАЗИ СЛИНИ

Амілаза відноситься до класу гідролаз – ферментів, що каталізують розрив хімічних зв'язків з приєднанням молекули води. Амілаза слини каталізує гідроліз крохмалю (розрив глікозидних зв'язків) через стадію утворення декстринів до дисахариду мальтози. Це можна підтвердити реакцією з йодом (позитивна для полісахаридів та декстринів) та реакцією Тромера (позитивна для цукрів, що мають вільний півацетальний гідроксил, зокрема для мальтози). Крохмаль реагує з йодом з появою синього забарвлення і не дає забарвлення в реакції Тромера, оскільки не містить вільних альдегідних груп, декстрини реагують з йодом з появою сполук червоного кольору. Мальтоза містить вільну альдегідну групу, а тому її можна виявити за допомогою проби Тромера.

Мета: виявити амілазу в слині за реакцією з йодом.

Реактиви та обладнання: 0,5 %-ний розчин крохмалю, 0,1%-ний розчин J_2 в КJ, 10%-ний розчин NaOH, 5%-ний розчин $CuSO_4$, дистильована вода, газовий пальник, пробірки, піпетки, штатив.

Хід роботи. Для одержання розведеної слини ротову порожнину злегка прополіскують водою, набирають нову порцію дистильованої води і прополіскують нею рот протягом 1-2 хв. Зібрану в пробірку рідину використовують для аналізу. Щоб переконатись у тому, що крохмаль з йодом дає синє забарвлення, в пробірку вносять 10 крапель розчину крохмалю та додають 2 краплі розчину J_2 в КJ. Спостерігають позитивну реакцію.

У штатив ставлять 10 пробірок і наливають у кожну по 2 мл дистильованої води та додають по одній краплі розчину J_2 в КJ.

В окрему пробірку наливають 5 мл 0,5 % розчину крохмалю, додають 1 мл розведеної слини, вміст пробірки перемішують і спостерігають опалесценцію. З цієї пробірки кожних 60 секунд відбирають по 0,5 мл рідини і вносять по черзі в пробірки № 1, 2, 3 і т.д., що були заготовлені з розчином J_2 в КJ. Якщо після першого перенесення в пробірці спостерігають фіолетове

або червоне забарвлення, то інтервал між перенесенням скорочують до 30 секунд.

Якщо чергова проба не змінює жовтого кольору розчину йоду, гідроліз крохмалю вважається закінченим. Відзначають час. Спостерігають зникнення опалесценції розчину в процесі гідролізу. Через 10 хв проводять пробу Тромера.

Для проведення проби Тромера до вмісту пробірки з реактивною сумішшю додають рівний об'єм 10% розчину NaOH і 5-7 крапель 5% розчину CuSO₄. Вміст пробірки перемішують до зникнення помутніння. Верхню частину пробірки обережно нагрівають на відкритому вогні до кипіння, реакція Тромера повинна бути позитивною, що відзначають за появою жовто-червоного осаду.

Пояснюють отриманий результат та роблять висновок.

Контрольні питання

1. Ферменти перетравлення вуглеводів: локалізація, оптимум рН і специфічність дії.
2. Дайте характеристику фракцій амілази слини.
3. Які продукти утворюються в результаті дії амілази слини на крохмаль?
4. Особливості перетравлювання вуглеводів в жуйних тварин.
5. Кінцеві продукти перетравлення вуглеводів і механізм їхнього всмоктування в тонкому кишечнику.

Завдання для самостійної роботи

1. Анаеробне окиснення глюкози – гліколіз: послідовність ферментативних реакцій, біологічна роль, локалізація в організмі і клітині.
2. Регуляція гліколізу. Ключові ферменти процесу.
3. Цикл трикарбонових кислот. Локалізація, послідовність ферментативних реакцій, значення в обміні речовин.
4. При яких патологічних станах змінюється активність амілази?

Заняття 3. Вивчення дії ліполітичних ферментів

У процесі перетравлення ліпідів є як спільні закономірності, так і специфічні особливості для кожної з груп.

В ротовій порожнині ліпіди їжі механічно подрібнюються, змочуються слиною. Перетравлення ліпідів, які потрапляють в організм з їжею, починається в шлунку, але тут розщеплюється незначна кількість ліпідів із-за відсутності необхідних умов. Незначна кількість ліпази, що міститься в шлунку дорослих людей, малоактивна, оскільки оптимальна активність цього ферменту проявляється при кислотності, близькій до нейтральної (рН=5,5...7,5), а в шлунку реакція середовища кисла. Окрім цього, ліпаза здатна розщеплювати лише емульговані жири, а чинники, що сприяють їх емульгації, у шлунку відсутні. Частковому гідролізу в шлунку піддаються лише емульговані жири молока. Більш інтенсивно розщеплення емульгованих жирів молока шлунковою ліпазою проходить у немовлят у яких рН шлункового соку близько 5.

В тонкому кишечнику перетравлюється основна маса жирів (95-97%). Перетравлення складається з двох процесів: емульгування і гідролітичне розщеплення жиру. Емульгування відбувається під впливом солей жовчних кислот, вищих жирних кислот, моногліцеридів, NaHCO_3 , CO_2 , білків та ін. Жирові краплі подрібнюються, утворюючи найдрібнішу жирову емульсію внаслідок різкого зниження поверхневого натягу, розпаду їх на дрібні часточки та утворення адсорбату жир + ліпаза. Настає гідроліз. Ліпаза спочатку здійснює гідролітичне розщеплення зовнішніх естерних зв'язків.

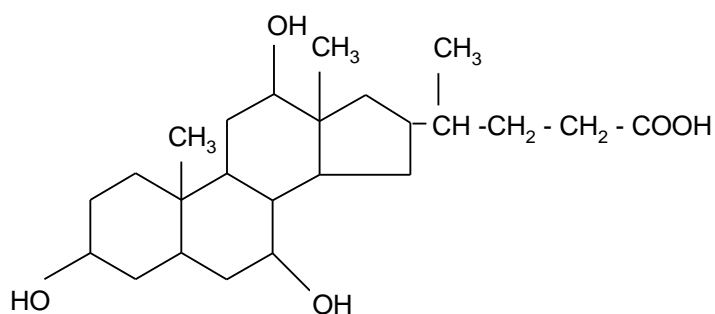
Важливу роль в перетравленні і всмоктуванні ліпідів відіграє жовч. Жовч виробляється гепатоцитами печінки безперервно. Ця ізотонічна золотистого кольору рідина має слаболужну реакцію. Її добова секреція становить 0,5–1,0 л. При відсутності травлення жовч нагромаджується в жовчному міхурі. Внаслідок зневоднення міхурова жовч стає більш густою і темнішою.

До складу жовчі входять органічні компоненти — солі жовчних кислот, білірубін, холестерин, жирні кислоти і лецитин. Ферментів у жовчі немає. Білірубін утворюється з гемоглобіну при руйнуванні еритроцитів (з 1 г гемоглобіну утворюється 40 мг білірубіну). Білірубін надає жовчі жовтого кольору, а білівердін (продукт окиснення білірубіну) — зеленого. Жовч стимулює діяльність кишкової мікрофлори, пригнічує життєдіяльність патогенних мікроорганізмів. Основу щільного залишку жовчі складають жовчні кислоти.

Жовчні кислоти (речовини стероїдної природи) синтезуються в печінці з холестерину. Вони є похідними холанової кислоти.

Саме жовчні кислоти або їх натрієві та калієві солі і емульгують жири.

Жовчні кислоти в основному представлені холевою кислотою:



Окрім того, до жовчних кислот належать дезоксихолева, кенODEЗОКСИХОЛЕВА і літохолева кислоти (її багато у жовчних каменях).

Жовчні кислоти, як правило, містяться у жовчі не у вільному стані, а у вигляді так званих комплексних (парних) жовчних кислот – кон'югатів з гліцином або таурином – глікохолева, глікодезоксихолева, таурохолева, таурODEЗОКСИХОЛЕВА кислоти.

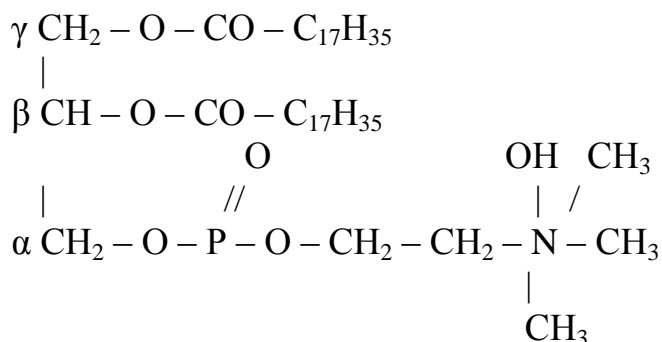
Роль жовчних кислот в обміні ліпідів багатогранна. Вони емульгують жири, сприяють всмоктуванню вищих жирних кислот, активують фермент ліпазу (відноситься до класу гідролаз, підклас естераз).

Вищі жирні кислоти не розчиняються у воді, а при наявності жовчних кислот утворюють розчинні *холейнові комплекси*, які всмоктуються у тонкому кишечнику.

Стериди їжі емульгуються під впливом тих же чинників, що й жири, після чого розщеплюються ферментом холестеролестеразою до холестерину та вищих жирних кислот.

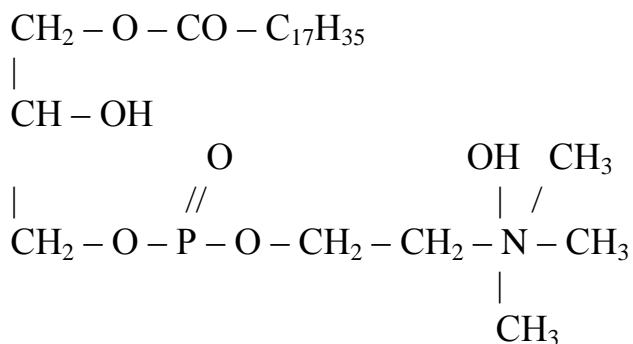
Подібним чином емульгуються і фосфатиди. Їх гідролітичний розпад відбувається під впливом фосфоліпази А, В, С, Д. Кожний фермент діє на певний естерний зв'язок ліпиду. При послідовній дії цих фосфоліпаз фосфоліпіди розщеплюються до гліцерину, двох залишків вищих жирних кислот, фосфатної кислоти та азотистих основ.

Розглянемо процес перетравлювання фосфоліпідів на прикладі лецитину.



1 етап. Фосфоліпаза А в присутності води відщеплює залишок вищої жирної кислоти в β-положенні. Утворюється лізолецетин.

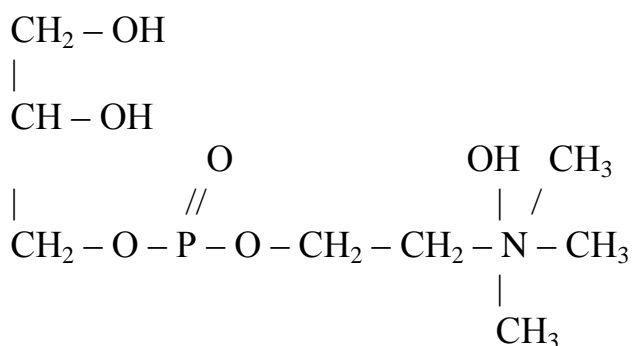
Лізолецетин – досить токсична сполука і може викликати руйнування клітинних мембран (лізис еритроцитів). У вільному стані в значній кількості міститься в отруті змій та скорпіонів, де фосфоліпаза А проявляє високу активність.



Лізолецетин

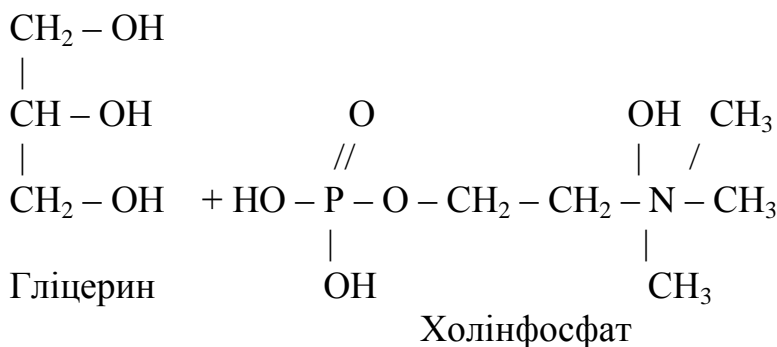
2 етап. Фосфоліпаза В відщеплює вищу жирну кислоту в γ -положенні.

Утворюється гліцеринфосфохолін (гліцерофосфохолін, гліцерофосфорилхолін).

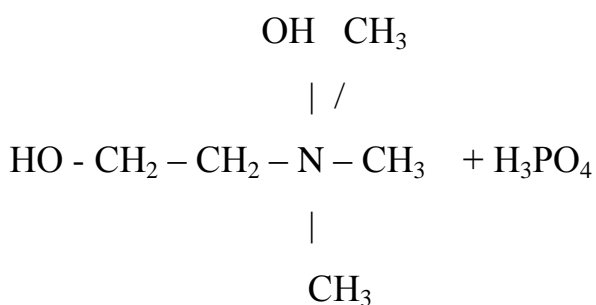


Гліцерофосфохолін

3 етап. Фосфоліпаза С розщеплює гліцерофосфохолін до гліцерину і холінфосфату (в присутності води).



4 етап. Фосфоліпаза Д гідролізує холінфосфат до холіну і фосфорної кислоти.



Таким чином, при перетравлюванні лецитину утворюються гліцерин, дві вищі жирні кислоти, холін і фосфорна кислота.

Кінцеві продукти травлення ліпідів складаються з дрібних часточок жиру, ди- і моногліцеридів, вищих жирних кислот, гліцерину, гліцерофосфатів, азотистих основ, холестерину, вищих спиртів, фосфатної

кислоти тощо. Вони розподіляються у двох фазах: ліпідній і міцелярній. У ліпідній фазі основними компонентами є найдрібніші часточки три- і дигліцеридів, у міцелярній – вищі жирні кислоти, моногліцериди та інші продукти травлення ліпідів.

Всмоктування ліпідів відбувається в нижній частині 12-палої кишки і у верхній частині порожньої кишок, решти – в інших ділянках тонкої кишки. Всмоктування відбувається за рахунок мікроворсинок епітелію.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА. ВІДКРИТТЯ ДІЇ ФЕРМЕНТУ ЛІПАЗИ

Ліпаза прискорює гідроліз нейтрального жиру до гліцерину і вищих жирних кислот. Фермент відноситься до класу гідролаз, підкласу естераз. Входить до складу соку підшлункової залози. Ліпазу можна відкрити, додавши її розчин до молока, що містить емульгований жир. Одержану суміш залужнюють розчином натрій карбонату до блідо-рожевого забарвлення на фенолфталеїн. В присутності ліпази проходить гідролітичне розщеплення жиру на гліцерин і жирні кислоти, реакція середовища зсувається в кислу сторону, рожеве забарвлення зникає.

Мета: ознайомити студентів з умовами та методами визначення активності ліпази – ліполітичного ферменту підшлункової залози.

Реактиви та обладнання: 5%-ний розчин панкреатину; молоко; 10%-ний розчин фенолфталеїну; 1%-ний розчин Na_2CO_3 ; пробірки; піпетки; водяна баня.

Хід роботи. В дві пробірки наливають по 10 крапель молока. В першу пробірку додають 5 крапель 5%-ного розчину панкреатину, який містить ліпазу. В другу пробірку додають таку ж кількість води. В дві пробірки додають по 1 краплі 10%-ного розчину фенолфталеїну і по краплям 1%-ний розчин натрій карбонату до появи блідо-рожевого забарвлення (не можна додавати надлишок розчину Na_2CO_3). Пробірки ставлять в водяну баню при температурі 38° на 30 хвилин. Спостерігають зміну забарвлення, одержані дані заносять в таблицю.

Гідроліз емульгованого жиру під дією ліпази

N	Фермент	Субстрат	Забарвлення на фенолфталеїн	Висновки
1				
2				

Контрольні питання

1. Ферменти перетравлення ліпідів: локалізація синтезу, активація проферментів, оптимум рН і специфічність дії активних форм ферментів.
2. Роль жовчних кислот у перетравленні та всмоктуванні ліпідів.
3. Ферментативний розпад лецитину.

Завдання для самостійної роботи

1. Охарактеризуйте розщеплення триацилгліцеролів і всмоктування продуктів їх розпаду в травному тракті.
2. Дайте характеристику процесам розщеплення і всмоктування фосфоліпідів і холестеролу.

Заняття 4. Вивчення дії протеолітичних ферментів

Перетравлювання білків проходить під впливом протеолітичних ферментів (відносяться до класу гідролаз, підкласу протеїназ). При розщепленні білків розриваються пептидні зв'язки.

Всі протеолітичні ферменти діляться на:

- *ендопептидази* – розщеплюють пептидні зв'язки всередині поліпептидного ланцюга;
- *екзопептидази* – розщеплюють пептидні зв'язки на кінцях поліпептидного ланцюга.

Розщеплення білків, що надходять в організм, починається в шлунку і закінчується в тонкій кишці. У ротовій порожнині білки не піддаються змінам, оскільки в слині відсутні протеолітичні ферменти (в ротовій порожнині корми механічно подрібнюється, змочується слиною і утворює харчову грудку, яка по стравоходу потрапляє в шлунок). Тут харчова грудка просочується шлунковим соком.

Основним ферментом, який розщеплює білки в шлунку, є пепсин, відкритий в 1836 році Т.Шванном, а в 1930 році виділений в кристалічному вигляді Ф.Нортропом.

Пепсин – це складний білок-фосфопротеїд, він утворюється в головних клітинах залоз слизової оболонки шлунку в неактивній формі, тобто у вигляді проферменту – пепсиногену. Останній (пепсиноген) перетворюється в активний пепсин під дією HCl. Пепсин розщеплює білки до поліпептидів.

Молекулярна маса пепсиногену – 42000. Соляна кислота відщеплює від пепсиногену поліпептид масою 7000. Поліпептид молекулярною масою 35000 і є активний фермент пепсин. Пепсин має досить високу каталітичну активність – 1г кристалічного ферменту за 2 години може розщепити 50 кг денатурованого яєчного альбуміну. В 1 мл шлункового соку міститься близько 1 мг пепсину. Пепсин діє як на нативні, так і на денатуровані білки. Під його дією проходить розщеплення здебільшого внутрішніх пептидних зв'язків білку.

Пепсин гідролізує переважно пептидні зв'язки, утворені аміногрупами ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин). Він розщеплює практично всі природні білки, за винятком кератинів вовни, фіброїнів шовку, муцинів слизу, овомукоїдів, деяких білків кісток і хрящів.

Фермент *катепсин* свою активність проявляє в молодому віці. Його оптимум рН =4,0-5,0.

У шлунковому соці грудних дітей, а також у телят та інших молодих жуйних тварин у сичузі міститься активний фермент *ренін* (*хімозин*, *сичужний фермент*). Ренін каталізує звертання молока, тобто перетворення розчиненого казеїногену в нерозчинний казеїн. Цей процес має досить важливе значення для молодих організмів, для яких молоко є основним продуктам харчування. Звертання молока в шлунках дорослих організмів може проходити і під дією пепсину.

Ренін виробляється в неактивному вигляді – прореніну, який при значенні рН < 5 перетворюється на ренін. Його каталітична дія проходить

при участі солей кальцію. Ренін складається з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою 34 тисячі. Має ІЕТ при рН = 4,5. Ренін використовують для виготовлення сиру, бринзи. В грибах сиріжках є подібний до реніну білок - русулін (звертає білок молока). У дорослих людей хімосин не синтезується.

В шлунку виразно кисле середовище і високоактивний фермент пепсин. Проте в звичайних умовах він не роз'їдає стінки шлунку. Це досягається активізацією таких трьох захисних механізмів:

- пепсин спочатку виробляється в неактивній формі – у вигляді пепсиногену;

- в захисті стінки шлунку від пошкоджуючої дії пепсину і соляної кислоти важлива роль належить слизовому бар'єру з великим вмістом муцину, який виробляється додатковими клітинами шлункових залоз;

- стінки шлунку дуже васкуляризовані (багато кровоносних судин), які мають слаболужну реакцію.

У тонкому кишечнику на білки їжі діють ферменти підшлункового соку і кишкового соку.

Сік підшлункової залози — це прозора рідина лужної реакції (рН 7,8–8,4) з вмістом ферментів, які діють на білки, ліпіди, вуглеводи. Першочергова роль у розщепленні білків належить *трипсину*. Він розщеплює близько 30% пептидних зв'язків білків. Трипсин виділяється у неактивній формі, тобто у вигляді трипсиногену. Процес перетворення його в активну форму – трипсин відбувається за участю ферменту слизової оболонки кишків – ентерокінази (ентеропептидази). Для процесу активації важливе значення мають йони кальцію. Під впливом ентеропептидази від трипсиногену з N-кінця відщеплюється гексапептид, і залишається активний трипсин. Трипсин побудований з одного поліпептидного ланцюга, який містить 229 залишків амінокислот і шести дисульфідних зв'язків. Оптимальну активність трипсин проявляє при рН = 7...8.

Трипсин діє гідролітично як на білки, що не розщепились у шлунку, так і на відносно високомолекулярні пептиди. При цьому він гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами аргініну і лізину.

Майже 50% пептидних зв'язків розщеплюється *хімотрипсином*. Він виділяється у формі хімотрипсиногену, який під впливом трипсину перетворюється на хімотрипсин.

Фермент розщеплює пептидні зв'язки, утворені –COOH-групами фенілаланіну, тирозину і триптофану і –NH₂-групами інших амінокислот. Оптимальна активність хімотрипсину, як і трипсину, при рН=7...8. Решта пептидних зв'язків розщеплюється пептидазами кишкового соку і соку підшлункової залози – *карбоксипептидазами й амінопептидазами*.

До складу соку підшлункової залози входять *колагеназа* (розщеплює колаген) і *еластиназа* (гідролізує еластин). Діяльність ферментів активується мікроелементами: Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ тощо.

Амінокислоти, низькомолекулярні пептиди і простетичні групи, які утворились при перетравлюванні білків, всмоктуються мікроросинками епітелію слизової оболонки тонкої кишки. Швидкість всмоктування різних амінокислот неоднакова: аргінін, метіонін, лейцин всмоктуються швидше; тирозин, цистеїн, фенілаланін – повільніше; серин, аланін, глутамінова кислота – ще повільніше.

Отже, білки в травному каналі внаслідок послідовної дії протеолітичних ферментів розщеплюються до структурних одиниць – амінокислот в невеликої кількості простих пептидів.

Перетравлювання білків проходить в порожнині кишок і на поверхні слизової оболонки (пристінкове травлення). У порожнині кишок розщеплюються білки, а на поверхні слизової оболонки – їх „уламки”-пептиди.

Особливості перетравлювання білків у жуйних зв'язані з тим, що у цих тварин багатокамерний шлунок, в якому є велика кількість мікроорганізмів, які населяють передшлунки (бактерії, інфузорії, гриби). Харчова грудка, яка

потрапила в передшлунки, при реміганні повертається в ротову порожнину, додатково подрібнюється, і потім знову надходить в рубець, сітку, книжку і сичуг.

Особливістю травлення в передшлунках жуйних є те, що мікроорганізми можуть синтезувати білок з небілкових азотистих речовин, тому їм можна згодовувати небілкові азотисті речовини (зокрема, сечовину).

Основна маса рослинних кормів представлена клітковиною, яка під впливом ферментів мікроорганізмів розщеплюється до глюкози та інших моносахаридів. Ці моносахариди бродять, і в результаті бродіння утворюються леткі жирні кислоти (в основному – оцтова, пропіонова, масляна). Частина цих кислот йде на синтез амінокислот і власного білку за рахунок мікрофлори.

З амінокислот мікроорганізми синтезують білки, необхідні для свого існування. Залежно від раціону в рубці корів може синтезуватися 300-700 г бактеріального білку за добу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА. ВИВЧЕННЯ ФЕРМЕНТАТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШЛУНКОВОГО СОКУ

У шлунковому соку містяться протеолітичні ферменти — пепсин і катепсин, що розщеплюють білки до альбумоз і пеп-тонів; хімозин (сичужний фермент) переводить казеїноген мо-лока в казеїн, який випадає в осад; ліполітичний фермент роз-щеплює жири на гліцерин і жирні кислоти. В організмі пепсин виробляється в неактивному стані (пепсиноген). В активну фор-му його переводить соляна кислота.

Мета: дослідити умови дії протеолітичних ферментів і переконатися в тому, що перетравлювання білків шлунковим соком – ферментативний процес.

Реактиви та обладнання: натуральний шлунковий сік або пепсин, карбонат кальцію або 0,5%-ний розчин бікарбонату натрію, 0,5%-ний розчин HCl, водяна баня, лакмусовий папір, фібрин, дистильована вода. При роботі з натуральним шлунковим соком частину соку нейтралізуйте

додаванням карбонату кальцію або 0,5%-ного розчину соди. Створіть слаболужну реакцію, її показником буде синювате фарбування червоного лакмусового паперу. При роботі з пепсином приготуйте нейтральний і кислий розчини, для чого частину пепсину розчиніть у воді (з розрахунку 3-4 г на 1 л води), частину – в 0,5%-ному розчині соляної кислоти.

Хід роботи. Приготуйте чотири пронумеровані пробірки і налейте в них: у пробірку №1 – 2-3 мл кислого шлункового соку (або пепсину), в пробірку № 2 – 2-3 мл ретельно прокип'яченого шлункового соку, в пробірку № 3 – 2-3 мл нейтрального шлункового соку (або розчину пепсину у воді), в пробірку №4 – 2-3 мл 0,5%-ного розчину соляної кислоти. Перевірте за допомогою лакмусового паперу реакцію середовища в кожній пробірці. Покладіть в кожен пробірку по невеликому однаковому шматочку фібрину (0,2-0,3 г). Поставте пробірки на 20 хв у водяну баню при температурі 38-40 °С.

Спостерігайте за ходом досліду, відзначаючи, що відбувається з фібрином в кожній пробірці. Відмітьте, що фібрин повністю зник у пробірці №1, так як відбулося його розщеплення на розчинні з'єднання – альбумози і пептони.

У пробірках №2 і №4 фібрин лише набухає під впливом соляної кислоти.

У пробірці №2 фермент зруйнований кип'ятінням, а в пробірці №4 його немає зовсім.

У пробірці №3 фібрин зовсім не змінився, тому що кислота нейтралізована, а в нейтральному середовищі пепсин не діє.

Результати досліду внесіть в таблицю та проаналізуйте їх. Відзначте, в якій пробірці фібрин повністю розчинився, де він тільки збільшився в розмірах, а де залишився без змін.

Визначте, який момент досліду переконує, що переварювання білка шлунковим соком – ферментативний процес.

Результати дослідження по вивченню ферментативних властивостей шлункового соку

№ пробірки	Вміст пробірки	Зміни фібрину	Причини змін
1	Фібрин + натуральний шлунковий сік		
2	Фібрин + прокип'ячений шлунковий сік		
3	Фібрин + нейтральний шлунковий сік		
4	0,5%-ний розчин HCl		

Контрольні питання

1. Як проходить процес перетравлювання білків у шлунку?
2. Які ферменти приймають участь у перетравлюванні білків в тонкому кишечнику?
3. Яке значення хімозину в шлунковому соку та де він використовується?
4. Яка роль соляної кислоти в шлунку?

Завдання для самостійної роботи

1. Як проходить процес розпаду нуклеопротейдів у кишечнику?
2. Якими шляхами проходить активація проферментів пепсину і трипсину?
3. В клітинах організму досить активно протікає дезамінування глутамінової кислоти. Напишіть рівняння даної реакції і вкажіть фермент, який її каталізує.

Заняття 5. Кінетика ферментативних реакцій

Запропоновано цілий ряд теорій, які пояснюють механізм дії відповідних ферментів. За основу взято той факт, що ферменти значно знижують енергію активації тих чи інших реакцій, тобто енергію, яка необхідна для активації молекул реагуючих речовин, щоб відбулася відповідна реакція. Наприклад, для розщеплення пероксиду водню на воду і кисень без каталізатора необхідна енергія активація 75,2кДж/моль. При

використанні каталізатора колоїдної платини енергія активації зменшується до 50,2 кДж/моль, а в присутності ферменту каталази – до 8,3 кДж/моль. Отже, каталізатори значно знижують енергію активації, причому ферменти краще, ніж неорганічні каталізатори, що свідчить про їх високу каталітичну дію.

Більшість дослідників вважають, що механізм дії ферментів у процесах каталізу тих чи інших реакцій пов'язаний з утворенням фермент-субстратних комплексів.

Зв'язування ферменту із субстратом здійснюється в основному через активний центр. Активний центр ферменту – одна або кілька функціональних груп, через які фермент з'єднується із субстратом. У простих ферментів в утворенні активного центру беруть участь білкові функціональні групи, у складних – також відповідні кофактори.

При зв'язуванні ферменту і субстрату має місце висока відповідність між субстратом і ферментом по типу „замок-ключ”. Цю гіпотезу запропонував німецький вчений Е. Фішер, який порівнював фермент і субстрат як ключ із замком. Він передбачав, що фермент підходить до свого субстрату як ключ до замка.

Е.Фішер вважав, що фермент має жорстку структуру і якщо „ключ” трохи видозмінено, то він уже не підійде до свого „замка”.

Процес каталітичної дії ферментів найповніше пояснює теорія Михаеліса-Ментен (теорія ферментативного каталізу).

Згідно неї процес відбувається в чотири етапи:

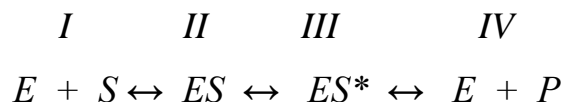
I етап – між субстратом і ферментом виникає зв'язок – утворюється фермент-субстратний комплекс.

II етап – субстрат під впливом ферменту активується і стає доступним для відповідних реакцій каталізу.

III етап – здійснюється каталіз фермент-субстратного комплексу (*).

IV етап – вивільнюються молекула ферменту і продукти реакції.

Схематично процес можна зобразити так:



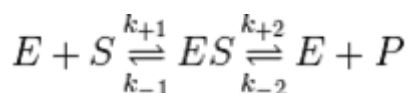
Теорія ферментативного каталізу підтверджена експериментально.

Під час ферментативного каталізу виявляються білкова природа ферментів, їх термолабільність, вплив рН середовища, специфічність дії і т.д. Ферментативна реакція відбувається згідно із законом діючих мас.

Загальні принципи кінетики хімічних реакцій можуть бути застосовані і до ферментативних реакцій.

Розрізняють кілька типів ферментативних реакцій: необоротні реакції з одним субстратом, оборотні реакції з одним субстратом, необоротні реакції з двома субстратами і т.д. Найпоширенішими є необоротні реакції з одним субстратом.

Л.Михаеліс і М. Ментен розробили загальну теорію ферментативної кінетики. Вони виходили з припущення, що ферментативний процес відбувається за такою схемою реакції:



Тобто фермент E вступає у взаємодію зі субстратом S з утворенням проміжного комплексу ES, який далі розпадається на вільний фермент і продукт реакції P.

Ферментсубстратний комплекс характеризується константою швидкості реакції його утворення k_{+1} і константою швидкості реакції розпаду k_{-1} .

Математична обробка на основі закону діючих мас дала можливість вивести рівняння:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_S + [S]}, \quad \text{де:}$$

v – швидкість реакції при даній концентрації субстрату $[S]$;

K_S – константа дисоціації ферментсубстратного комплексу, моль/л;

V_{\max} – максимальна швидкість реакції при повному насиченні ферменту субстратом.

Це рівняння назване на честь авторів рівнянням Михаеліса-Ментен і виражає кількісне співвідношення між концентрацією субстрату і швидкістю ферментативної реакції.

З рівняння Михаеліса-Ментен випливає, що при високій концентрації субстрату і низькому значенні K_S швидкість реакції є максимальною, тобто $v = V_{\max}$. При низькій концентрації субстрату, навпаки, швидкість реакції є пропорційною концентрації субстрату в кожен даний момент.

Ферментсубстратному комплексу властива субстратна константа, або константа дисоціації K_S :

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}.$$

Значення субстратної константи залежить від природи субстрату і ферменту. Вона визначає ступінь спорідненості ферменту і субстрату. Наприклад, для інвертази $K_S = 0,0167$. Тут концентрація ферментсубстратного комплексу перевищує концентрацію вільних ферменту і субстрату приблизно в 60 разів.

Для повної характеристики ферментативного процесу використовують константу Михаеліса K_m . Вона виражає відношення констант трьох реакцій, показаних у системі

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}.$$

Числовий вираз K_m завжди дещо більший, ніж K_S . Так, значення K_S для ферментсубстратного комплексу сахароза-сахароза дорівнює 0,0167, а K_m – 0,0280 моль/л. Величина K_m для різних ферментів неоднакова.

Швидкість ферментативних реакцій виражають у каталах (кат). **Катал** – каталітична активність ферменту, здатна здійснювати реакцію із швидкістю, що становить 1 моль/с в заданій системі вимірювання активності. Часто застосовують похідні каталу – мікрокатали (мккат), нанокатали (нкат)

або пікокатоли (пкат), чому відповідають швидкості реакцій, виражені в мікромолях, наномолях і пікомолях за секунду. Одна ферментна одиниця або міжнародна одиниця активності ферменту Е (U) відповідає 16,67 нкат.

Про чистоту ферменту судять за значенням питомої активності, яку виражають кількістю одиниць активності ферменту, що міститься в 1 мг білка (або кількістю каталів на 1 кг активного білка).

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА. РЕГУЛЯЦІЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета: засвоїти основні принципи регуляції метаболічних шляхів.

Реактиви та обладнання: 1%-ний розчин крохмалю; 0,5 М розчин NaCl; суміш 1% -ного розчину крохмалю з 0,5 М розчином NaCl (4:1); фосфатний буфер, рН 7,2; сироватка крові свіжа без ознак гемолізу; 1 н розчин HCl; 0,3%-ний розчин йоду в 3%-ному розчині KI (3 г калій йодиду розчиняють в 70 мл води в мірній колбі ємністю 100 мл, додають 0,3 г розтертого в ступці йоду і після розчинення йоду доводять водою до мітки (розчин зберігають в темній склянці); печінка свіжа; 0,2 н розчин CH₃COOH (11,3 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють у воді в мірній колбі ємністю 1 л); 0,2 н розчин CH₃COONa (27,22 г оцтовокислого натрію розчиняють у воді в мірній колбі ємністю 1 л); ацетатний буфер з рН 4,6 (520 мл розчину оцтової кислоти змішують з 480 мл розчину оцтовокислого натрію); 20%-ний розчин трихлороцтової кислоти; концентрована H₂SO₄; пергідроль; реактив Неслера; 0,05 мгN/мл розчин (NH₄)₂SO₄ для побудови стандартної кривої; гомогенізатор; штатив з центрифужними пробірками; піпетки, мікропіпетки на 0,1 мл; термостат; центрифуга електрична; мірні колби на 50 мл; фотоелектроколориметр; колби Кьельдаля на 25 мл.

Для побудови стандартної кривої в п'ять мірних колбочок ємністю 50 мл наливають по 30-40 мл води, переносять по 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мл розчину крохмалю, додають по 0,5 мл розчину соляної кислоти, по 0,1 мл розчину йоду, доводять водою до мітки і перемішують. Колориметрують через 5 хв на

ФЕКу з червоним світлофільтром відносно води в кюветах з відстанню 1 см між робочими гранями.

Дослід 1. Визначення активності амілази

Хід роботи. В дві центрифужні пробірки наливають по 0,5 мл суміші розчинів крохмалю і хлориду натрію і по 0,3 мл фосфатної буферної суміші. В пробірку 1 (дослід) додають 0,1 мл сироватки крові; в пробірку 2 (контроль) - 0,1 мл дистильованої води. Обидві пробірки інкубують в термостаті (37°C) упродовж 30 хвилин. Потім в обидві пробірки додають по 0,1 мл 1 н розчину соляної кислоти. І центрифугують на протязі 10 хвилин при 1500 об/хв. В мірні колби на 50 мл наливають по 30-40 мл води, переносять по 0,2 мл центрифугату і проводять кольорову реакцію, як це описано для побудови стандартної кривої.

Активність амілази (Е) виражають кількістю крохмалю (мг), яку може розщепити за 30 хвилин фермент, що міститься в 100 мл сироватки. Розрахунок проводять за формулою:

$$E = \frac{(b - a) \cdot 100}{0,2 \cdot 0,1}, \text{ де:}$$

a – кількість мг крохмалю в дослідній пробірці, знайдена за стандартною кривою;

b – кількість мг крохмалю в контрольній пробірці, знайдена за стандартною кривою;

100 – перерахунок на 100 мл сироватки;

0,1 – кількість мл сироватки, взятої для дослідження;

0,2 – кількість центрифугату (мл), взятого для кольорової реакції.

Дослід 2. Визначення активності протеїназ

Хід роботи. 100 мг тканини печінки гомогенізують в 5 мл ацетатного буферу. В дві центрифужні пробірки переносять по 2 мл гомогенату і в пробірку 1 (контроль) зразу ж додають 2 мл розчину трихлороцтової кислоти. Пробірку 2 (дослід) інкубують в термостаті (37°C) на протязі однієї години. Потім в пробірку 2 додають 2 мл трихлороцтової кислоти та обидві

пробірки центрифугують. Із дослідної та контрольної пробірок відбирають по 2 мл центрифугату, переносять в колби Кьельдаля та проводять мінералізацію і кольорову реакцію з реактивом Неслера.

Активність тканинних протеїназ виражають кількістю небілкового азоту (мг), яка наростає упродовж 1 хв за рахунок діяльності ферментів, що містяться в 1 г тканини. Розрахунок проводять за формулою:

$$E = \frac{(a-b) \cdot 4 \cdot 5}{2 \cdot 2 \cdot c \cdot 60}, \text{ де:}$$

E – активність протеїназ;

a – кількість мг азоту у дослідній пробірці, знайдене за стандартною кривою;

b – кількість азоту (мг) в контрольній пробірці, знайдене за стандартною кривою;

2 – кількість центрифугату, взята для мінералізації та кольорової реакції;

4 – загальна кількість центрифугату, мл;

2 – кількість гомогенату (мл), що використовується у досліді та контролі;

5 – загальна кількість гомогенату, мл;

c – наважка тканини, г;

60 – час інкубації, хв.

Контрольні питання

1. Кінетика ферментативних реакцій: вплив концентрації субстрату і ферменту на швидкість ферментативної реакції (графічні залежності).

2. Рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса, її визначення і значення.

3. Загальне поняття про інгібітори. Типи інгібірування ферментів: зворотне (конкурентне, неконкурентне) і незворотне (приклад).

4. Чинники регуляції активності ферментів: концентрація субстрату, концентрація ферменту, концентрація продуктів реакції; температура і рН середовища.

Завдання для самостійної роботи

1. Охарактеризуйте методи регуляції активності ферментів.
2. Поясніть, яке клінічне значення має визначення активності ферментів у біологічних рідинах.
3. Сучасні положення про механізм дії ферментів: поняття про енергію активації ферментативної реакції; утворення фермент-субстратного комплексу і механізми отримання продуктів ферментативної реакції (ковалентний і кислотно-лужний каталіз). Значення робіт Е. Фішера і Д.Кошленда.
4. Поняття про хімічну природу і функцію активаторів. Механізми активації ферментів.
5. Поняття про алостеричний центр і його функцію у ферментативному каталізі. Алостеричний тип регуляції активності ферментів.

ТЕСТОВІ ПИТАННЯ
ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ З ТЕМИ «ФЕРМЕНТИ»

1. Ферментами називаються: а) неорганічні кислоти; б) складні ефіри спиртів і вищих жирних кислот; в) гормоноподібні речовини; г) біологічні каталізатори білкової природи.

2. Наука, яка вивчає ферменти, називається: а) вітамінологія; б) ендокринологія; в) ензимологія; г) вірусологія.

3. Термін „ферменти” ввів в науку: а) Т.Шванн; б) О.Я.Данилевський; в) Ван Гельмонт; г) Е.Фішер.

4. Назвіть загальні властивості, характерні для ферментів: а) амфотерність; б) висока молекулярна маса; в) термостабільність; г) термолабільність; д) розчинність у воді; е) низька хімічна активність; є) білкова природа.

5. Оптимальною температурою для більшості ферментів є: а) 80-100°C; б) 0-10°C; в) 37-42°C; г) 60-70°C.

6. При високих температурах ферменти: а) підвищують свою активність; б) денатуруються; в) не змінюють свою активність.

7. Вкажіть рН, оптимальне для більшості ферментів організму тварин: а) 5-6; б) 7; в) 2-3; г) 10-12; д) 3-4.

8. Вкажіть, чи впливає зміна рН на активність ферментів: а) ні; б) так.

9. Поясніть термін „специфічність ферментів”: а) залежність дії ферментів від температури; б) залежність дії ферментів від рН середовища; в) зворотність дії; г) строго спрямована дія ферментів на певний субстрат або групу субстратів подібної хімічної будови.

10. Розрізняють такі види специфічності ферментів: а) стереохімічну; б) відносну; в) протоплазматичну; г) конституційну; д) абсолютну.

11. Запишіть пари чисел (фермент – специфічність, якою володіє):

1. трипсин	1. стереохімічна
2. малеїнат-транс-ізомераза	2. абсолютна
3. амілаза	3. відносна

12. Специфічні активатори: а) синтезуються в організмі тварин і пригнічують дію ферментів; б) синтезуються в організмі тварин і прискорюють дію ферментів; в) не синтезуються в організмі тварин і прискорюють дію ферментів; г) не синтезуються в організмі і пригнічують дію ферментів.

13. До неспецифічних паралізаторів відносяться: а) солі важких металів; б) жовчні кислоти; в) алкоголі; г) соляна кислота; д) тромбокіназа; е) альдегіди; є) неорганічні кислоти; ж) антиферменти.

14. Запишіть пари чисел (речовина – до якої групи належить):

1. соляна кислота	1. неспецифічний активатор
2. антипепсин	2. специфічний активатор
3. іони натрію	3. неспецифічний паралізатор
4. сірчаноокисла мідь	4. специфічний паралізатор

15. Прості ферменти під час гідролізу розщеплюються до: а) амінокислот; б) спиртів; в) білкового і небілкового компонентів; г) вуглеводів.

16. Складні ферменти під час гідролізу розщеплюються до: а) амінокислот; б) спиртів; в) білкового і небілкового компонентів; г) вуглеводів.

17. Ферменти, які завжди присутні в організмі, називаються: а) адаптивними; б) простими; в) конституційними; г) складними.

18. Ферменти, які утворюються в результаті пристосування організму до певних умов існування, називаються: а) складними; б) простими; в) конституційними; г) адаптивними.

19. Поясніть термін „зимогени”: а) білкова частина ферментів; б) попередники ферментів; в) паралізатори ферментів; г) активатори ферментів.

20. Поясніть термін „кофермент”: а) попередники ферментів; б) паралізатори ферментів; в) білкова частина ферментів; г) небілкова частина ферментів.

21. Коферментами складних ферментів є: а) антиферменти; б) похідні вітамінів; в) зимогени; г) речовини нуклеотидної природи; д) цитохроми.

22. Запишіть схему будови складного ферменту:

Складний фермент = ? + ?.

23. До складу НАДФ входить: а) вітамін В₁; б) вітамін В₂; в) вітамін В₃; г) вітамін В₅; д) Вітамін В₆.

24. Назвіть ферменти, до складу яких входить тіамініпрофосфат.

25. Простетичною групою флавінових ферментів є: а) піридоксальфосфат; б) тіамініпрофосфат; в) рибофлавінфосфат; г) НАД; д) НАДФ.

26. Назвіть фермент, до складу якого входить вітамін В₃ (пантотенова кислота).

27. Піридоксальфосфат входить до складу ферментів: а) амінотрансфераз; б) дегідрогеназ; в) декарбоксилаз амінокислот; г) карбоксилаз; д) декарбоксилаз кетокислот.

28. Запишіть пари чисел (простетична група – назва складного ферменту):

1. біотин	1. декарбоксилази кетокислот
2. тіамініпрофосфат	2. карбоксилази
3. рибофлавінфосфат	3. амінотрансферази
4. піридоксальфосфат	4. флавінові

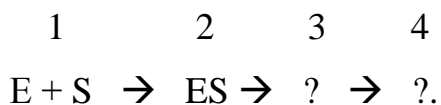
29. Різновиди ферментів, які відрізняються між собою білковим компонентом, але каталізують одну і ту ж реакцію, називаються:

а) проферментами; б) антиферментами; в) ізоферментами.

30. Речовина, на яку діє фермент, називається...

31. Теорію ферментативного каталізу запропонували: а) Фішер; б) Мішер; в) О.Я.Данилевський; г) Михаеліс і Ментен.

32. Закінчіть послідовність перетворень реакцій ферментативного каталізу:



33. Назвіть кількість цифр, яку включає шифр ферменту: а) дві; б) чотири; в) три; г) одну.

34. Вкажіть, на скільки класів поділяються ферменти.

35. Запишіть в правильній послідовності цифри, які відповідають порядку розміщення класів ферментів у їх класифікації: 1 – ізомерази; 2 – ліази; 3 – оксидоредуктази; 4 – трансферази; 5 – лігази; 6 – гідролази.

36. Запишіть пари чисел (назва класу – тип реакцій, які каталізують):

1. гідролази	1. окисно-відновні реакції
2. ізомерази	2. реакції синтезу
3. оксидоредуктази	3. реакції перенесення атомів і груп атомів з одного субстрату на інший
4. трансферази	4. реакції розщеплення субстрату в присутності води
5. ліази	5. реакції ізомеризації
6. лігази	6. реакції розщеплення субстрату не гідролітичним способом

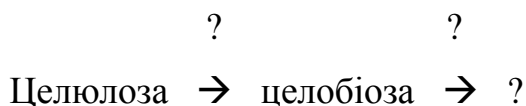
37. Вкажіть, до якого підкласу належить трипсин: а) глікозидаз; б) естераз; в) протеїназ.

38. Запишіть повністю схему ферментативного гідролізу крохмалю:



39. Назвіть ферменти, які розщеплюють клітковину в рубці жуйних: а) целюлаза; б) амілаза; в) мальтаза; г) целобіаза; д) сахараза.

40. Запишіть повністю схему ферментативного розщеплення клітковини (целюлози):



41. Назвіть речовину, яка є субстратом для амілази.

42. Вкажіть, до якого класу належать ферменти, що переносять амінну групу: а) трансферази; б) гідролази; в) оксидоредуктази; г) ліази; д) ізомерази; е) лігази.

43. З наведених ферментів виберіть ті, які мають абсолютну специфічність: а) амілаза; б) пепсин; в) сахараза; г) трипсин; д) мальтаза.

44. З наведених ферментів виберіть ті, які мають відносну специфічність: а) амілаза; б) пепсин; в) сахараза; г) трипсин; д) мальтаза.

45. Складіть пари чисел (фермент – до якого підкласу належить):

1. лактаза	1. глікозидази
2. трипсин	2. естерази
3. ліпаза	3. протеїнази
4. пепсин	
5. амілаза	
6. фосфоліпаза	

46. Назвіть клас і підклас, до якого належать ферменти, які розщеплюють вуглеводи: Клас..... Підклас.....

47. Запишіть пари чисел (фракції амілази слини – що розщеплюють):

1. альфа-амілаза	1. відщеплює мальтозу
2. бета-амілаза	2. відщеплює по одній молекулі глюкози
3. гама-амілаза	3. розщеплює 1,4 і 1,6-глікозидні зв'язки всередині молекули полісахаридів

48. Назвіть клас і підклас, до якого належать ферменти, які розщеплюють ліпіди: Клас..... Підклас.....

49. Запишіть пари чисел (фермент – який субстрат розщеплює):

1. фосфоліпаза	1. стериди
2. холестеринестераза	2. нейтральні жири
3. ліпаза	3. фосфоліпіди

50. Запишіть пари чисел (назва фосфоліпаз – який субстрат розщеплює):

1. фосфоліпаза В	1. лецитин до лізолецитину і вищої жирної кислоти
2. фосфоліпаза Д	2. гліцерофосфохолін до гліцерину і холінфосфату
3. фосфоліпаза А	3. холінфосфат до холіну і фосфорної кислоти
4. фосфоліпаза С	4. лізолецитин до гліцерофосфохоліну і вищої жирної кислоти

51. Вкажіть, під впливом чого активуються вищі жирні кислоти:

а) гідратази; б) дегідрогенази; в) коензиму А.

52. Ферменти, які розщеплюють білки, належать до класу..., підкласу...

53. Запишіть, які ферменти розщеплюють білки в шлунку, а які – в тонкому кишечнику: а) пепсин; б) трипсин; в) хімотрипсин; г) ренін; д) амінопептидаза; е) катепсин; є) карбоксипептидаза.

Шлунок: Тонкий кишечник:

54. Запишіть, під впливом яких ферментів перетворюються амінокислоти (складіть відповідні пари чисел):

1. переамінування амінокислот	1. декарбоксилази амінокислот
2. дезамінування амінокислот	2. амінотрансфери
3. декарбоксилювання амінокислот	3. оксидази

55. Запишіть ферменти, які приймають участь у розщепленні нуклеопротейдів:

?

Нуклеопротейди → монопнуклеотиди → нуклеозиди + H_3PO_4 .

56. Запишіть ферменти, які приймають участь в біологічному окисненні:

а) дегідрогенази; б) протеїнази; в) флавінові ферменти; г) ліпази; д) убихінони; е) цитохроми; є) глікозидази.

57. Вкажіть, до якого класу належать ферменти, що приймають участь в біологічному окисненні: а) ліаз; б) лігаз; в) гідролаз; г) трансфераз; д) оксидоредуктаз; е) ізомераз.

СЛОВНИК СПЕЦІАЛЬНИХ ТЕРМІНІВ

Адаптивні ферменти – ферменти, які утворюються в організмі при появі певного субстрату, для перетворення якого необхідний даний фермент. Синтезуються на генах, що «включаються» індукторами, яким є певні субстрати.

Активний центр ферменту – ділянка в просторовій тривимірній структурі молекули ферменту, яка забезпечує приєднання та перетворення субстрату. До складу активного центру складних ферментів входять кофактори і залишки амінокислот, орієнтовані в просторі. До складу активних центрів простих ферментів входять лише залишки амінокислот.

Алостеричний (регуляторний) центр – це функціонально активна ділянка ферменту, з якою зв'язуються модифікатори – молекули, що впливають на роботу активного центру.

Амілази – ферменти класу гідролаз, які забезпечують гідроліз 1,4-глікозидних зв'язків у молекулах полісахаридів – глікогену, крохмалю. Залежно від специфіки дії ферменту розрізняють α -, β -, γ -амілази.

Апофермент – білковий компонент ферменту, який залишається після відділення коферменту. Він позбавлений активності і здатний знову її набувати після приєднання простетичної групи.

Біокаталіз – механізм прискорення хімічних перетворень біополімерів організму, що забезпечується участю ферментів.

Гетерогенний каталіз – коли реагенти і каталізатор знаходяться в різних фазах і відділені границею розділу. Його часто називають контактний, так як каталізатор звичайно знаходиться в твердому стані, а реагуючі речовини - в рідкому або газоподібному.

Гідролази – клас ферментів, що каталізують реакції гідролітичного (за участю води) розщеплення внутрішньомолекулярних зв'язків (гідролізу).

Гомогенний каталіз – коли реагуюча речовина і каталізатор знаходяться в одній фазі – рідкій або газоподібній.

Ензимодіагностика – полягає у постановці діагнозу захворювання (або синдрому) на базі визначення активності ферментів у біологічних рідинах організму.

Ензимологія (ензим[s] + грец. logos вчення) – розділ біохімії, який вивчає будову, механізм каталітичної дії і молекулярну структуру ферментів.

Зимогени (проферменти) – неактивні форми протеолітичних ферментів (протеаз) травного каналу та підшлункової залози (пепсиноген, трипсиноген, хімотрипсиноген), які перетворюються на активні форми під дією певних агентів.

Ізомерази – ферменти, що каталізують структурні або геометричні зміни в молекулі субстрату.

Ізоферменти – молекулярні форми ферментів, які характеризуються генетично зумовленими відмінностями первинної структури, набором і співвідношенням субодиниць та різною каталітичною активністю. Ізоферментні форми характерні для більшості ферментів рідин і тканин організму.

Імобілізовані ферменти – штучно добуті комплекси ферментів із нерозчинним у воді носієм.

Інгібітори – речовини, що гальмують каталітичні та ланцюгові процеси, які відбуваються за участю активних центрів або активних часточок.

Індуковані ферменти – біокаталізатори, швидкість синтезу яких змінюється залежно від умов існування організму.

Каталіз (від грец. katalysis – руйнування) – зміна швидкості хімічної реакції під впливом каталізаторів.

Кофермент А (коензим А, КоА-SH) – коферментна форма пантотенової кислоти, що входить до складу активного центру деяких ферментів. Сполучаючись з апоферментом, він утворює каталітично активний фермент – протеїд. Під час ферментативного каталізу кофермент А може легко відокремлюватись від білкової молекули, тобто є типовим коферментом.

Кофермент Q (КоQ) – жиророзчинне похідне бензохінону, яке функціонує як переносник електронів між флавопротеїдами і цитохромами дихального ланцюга.

Ліази – клас ферментів, що каталізують реакції негідролітичного і неокисного розриву різних хімічних зв'язків (С-С, С-О, С-Н, С-S і інших) субстрату, оборотні реакції утворення і розриву подвійних зв'язків, що супроводжуються відщепленням або приєднанням груп атомів за їх місцем, а також утворенням циклічних структур.

Лігази – клас ферментів, здатних каталізувати з'єднання двох молекул з утворенням нового хімічного зв'язку (лігування). При цьому зазвичай відбувається відщеплення (гідроліз) невеликої хімічної групи від однієї з молекул.

Мікрогетерогенний (ферментативний) каталіз – коли каталізатор і реагенти знаходяться в колоїдально-дисперсному стані.

Нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) – кофермент окисно-відновних реакцій, функціональною групою якого є вітамін нікотинамід.

Нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ) – цей кофермент відрізняється від НАД наявністю додаткової фосфатної групи. Відрізняється від НАД здатністю взаємодіяти з дегідрогеназами.

Оксидоредуктази – ферменти, що каталізують окисно-відновні процеси в організмі.

Простетична група – компонент ферментів-протеїдів та інших складних білків, який зв'язаний з білковою частиною міцними ковалентними зв'язками. Простетичними групами ферментів, як правило, є похідні вітамінів, нуклеотидів, залізопорфіринів та інших складних органічних сполук.

Субстрат – сполука, на яку спрямована дія ферменту. Субстратами, як правило, є органічні сполуки різної хімічної природи – високомолекулярні полімери та низькомолекулярні сполуки.

Трансферáзи – клас ферментів, що каталізують перенесення функціональних груп і молекулярних залишків від однієї молекули до іншої.

Ферменти – біологічні каталізатори білкової природи, які утворюються та функціонують в усіх живих організмах і забезпечують чітку запрограмованість, координацію та узгодженість численних метаболічних процесів.

Фермент-субстратний комплекс – проміжна активована сполука, яка утворюється при зв'язуванні субстрату з активним центром ферменту в процесах ферментативного каталізу.

Цитохроми – складні залізовмісні білки, які у вигляді простетичної групи містять залізо порфіринові комплекси. Локалізовані на внутрішніх мембранах мітохондрій, хлоропластів, ендоплазматичного ретикулуму та інших мембранних структурах клітини, беруть участь у різних окисно-відновних процесах – тканинному диханні, фотосинтезі тощо.

ДОДАТКИ

Додаток А

Схема будови складного ферменту



Додаток Б

Механізм дії ферментів



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гомонай В.І. Фізична та колоїдна хімія / В.І.Гомонай. – Вінниця: Нова Книга, 2014. – 496 с.
2. Гонський Я.І. Біохімія людини / Я.І.Гонський, Т.П.Максимчук, М.І.Калинський. – Т.: Укрмедкнига, 2002. – 744 с. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2004. – 469 с.
3. Губський Ю.І. Біохімія / Губський Ю.І. – К.–Т.: Укрмедкнига, 2002. – 508 с.
4. Губський Ю. І. Біоорганічна хімія / Ю.І.Губський. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 464 с.
5. Коваль Т.В. Біохімія тварин / Т.В.Коваль, О.В.Овчарук. – Кам'янець-Подільський: Видавець ПП Зволейко Д.Г., 2016. – 440 с.
6. Коваль Т.В. Загальна біологія / Т.В.Коваль, О.В.Овчарук – м. Кам'янець-Подільський, ПП Мошак М.І., 2017. – 192 с.
7. Коваль Т.В. Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної хімії. Лабораторний практикум / Т.В.Коваль, О.В.Овчарук. – Кам'янець-Подільський: ПП «Медобори-2006», 2018. – 174 с.
8. Кононський О. І. Фізична і колоїдна хімія / О. І. Кононський. – 2-е вид., доп. і випр. – Київ : Центр учб. л-ри, 2009. – 312 с.
9. Кононський О.І. Біохімія тварин / О.І.Кононський. – К.: Вища шк., 2006. – 454 с.
10. Копильчук Г.П. Біохімія: Навчальний посібник / Г.П.Копильчук, О.М.Волощук, М.М.Марченко. – Чернівці: Рута, 2004. – 224 с.
11. Кучеренко М.Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: Учебний посібник / М.Є.Кучеренко, Ю.Д.Бабенюк, В.М.Войціцький. – К: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.

12. Ластухін Ю.О. Хімія природних органічних сполук. Навчальний посібник / Ю.О.Ластухін – Львів: Національний університет „Львівська політехніка”, 2005. – 560 с.

13. Механізми біохімічних реакцій: навч. посіб.: [для студ. вищ. навч. закл.] / [Н.О.Сибірня, Я.П.Чайка, Н.І Климишин та ін.]; за ред. проф. Н.О.Сибірної: - Львів: Видавничий центр ЛНУ ім.Івана Франка, 2009. – 316 с.

14. Плахтій П.Д. Обмін речовин та енергії. Теорія, завдання для самостійної підготовки, тести: Навчальний посібник для студентів природничих спеціальностей / П.Д.Плахтій, Т.В.Коваль, М.С.Гончаренко. – Кам'янець-Подільський, Рута, 2009. – 336 с.

15. Плахтій П.Д. Фізіологія людини і тварин. Фізіологія м'язів і м'язової діяльності / П.Д.Плахтій, Т.В.Коваль, Л.С.Соколенко. – Кам'янець – Подільський: ППБуйницький О.А., 2011. – 164 с.

16. Роговик Л.Й. Аналітичне оцінювання компонентів біосфери. Лабораторний практикум / Л.Й.Роговик, Т.В.Коваль, Р.С.Ямборак, О.В.Овчарук, Г.І.Прохацька – Кам'янець-Подільський, 2017. – 102 с.

17. Тимошенко О.П. Клінічна біохімія / О.П.Тимошенко. – Харків: Видавництво НФаУ; Золоті сторінки, 2003. – 239с.