

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА
ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

НАМАНГАН ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

А. Шералиев, С. Иргашева

ЭНЗИМОЛОГИЯ

махсус курсидан

Лаборатория ишлари



Наманган - 2010

Ушбу лаборатория ишлари Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги томонидан тасдиқланган янги «Намунвий дастур» асосида ишчи дастурга мос равишда ёзилган.

Лаборатория ишлари университет Табиий фанлар факультетининг биология бўлими ва педагогика институтларининг биология факультети талабалари фойдаланиши учун мўлжалланган.

Тузувчилар: **б.ф.н. доц. А.Шералиев**
ўқитувчи С.У.Иргашева

Такризчилар: **НамДУ Физиология кафедраси**
муdiri б.ф. н. доц. А.Н.Арипов

НамМПИ Озиқ-овқат технологияси
кафедраси б.ф.н. доц. Л.Мамажонов

“Энзимология” махсус курсидан лаборатория ишлари учун Наманган давлат университети Физиология кафедраси илмий кенгашининг 27.04.2010 йилдаги 8-сонли йиғилишида муҳокама этилди ва маъқулланди.

Наманган Давлат университети Табиий фанлар факультети илмий кенгашининг 26.05.2010 йилдаги 9-сонли йиғилишида муҳокама қилинди ва маъқулланди.

Наманган Давлат университети ўқув-услубий кенгашининг 29.05.2010йил 9-сонли йиғилишида кўриб чиқилди ва нашрга тавсия этилди.

Сўз боши

Мазкур лаборатория ишлари 5420100 биология таълим йўналиши бўйича бакалаврлар тайёрлаш таълим дастури асосида тузилган. Ушбу лаборатория ишлари энзимология **махсус курсидан** талабаларни олган назарий билимларини чуқурлаштириш мақсадида ишчи дастур асосида ажратилган 12 соатлик лаборатория ишини ўз ичига олади.

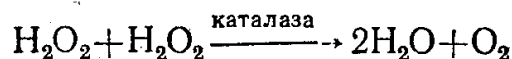
Лаборатория ишлари фойдаланган ҳолда талабалар лаборатория ишларига олдиндан тайёргарлик кўриш ва мустақил равишда лаборатория ишларини ўтказишлари мумкин.

Мазкур лаборатория ишлари тайёрлашда ҳозирги кунда қўлланилиб келинаётган биокимёдан амалий машғулотлар учун лаборатория ишлари ва бошқа илмий методик қўлланмаларга асосланади.

1-лаборатория иши.
Каталазанинг фаоллигини аниқлаш
(А. Н. Бах ва А. И. Опарин усули бўйича)

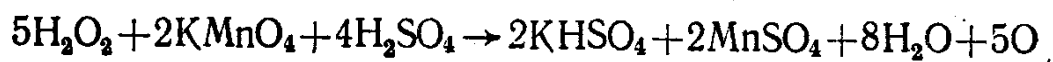
Керакли асбоб ва реактивлар: ҳовонча, кум, пипетка, шпател, 100 млли ўлчов колбаси, филтр қоғоз, воронка, 200 мл ли 2 та конуссимон колба, мензурка, штатив, пробиркалар, сув ҳаммоми, газ горелкаси, микробюретка, 50 мл ли стакан ёки колба, картошка ёки сабзи, дистилланган сув, кальций карбонат кукуни, водород пероксиднинг 0,1 н эритмаси, сульфат кислотанинг 10% ли эритмаси, калий перманганатнинг 0,1 н эритмаси.

Каталаза ферменти (H_2O_2 : H_2O_2) оксидоредуктаза КФ — 1.11.1.6 таркибида гем бор ферментлар группасига кириб, молекуласида 4 та Fe, яъни 4та гем бўлади, молекуляр массаси 225000—250000. Бу ферментнинг энг характерли функцияси водород пероксиднинг парчаланишини нихоят даражада тезлаштиришидир:



Каталаза ферменти, хужайра нафас олишида пайдо бўладиган ва тирик хужайра учун заҳарли маҳсулот — водород пероксидни парчалашга хизмат қилади. Каталаза барча ўсимликларда, кўпчилик аэроб бактэрияларда ва ҳайвонлар организмда топилган.

Каталазанинг активлигини аниқлаш бу ферментни маълум миқдордаги H_2O_2 билан инкубация қилганда парчаланмай қолган водород пероксидини KMnO_4 билан титрлаб аниқлашга асосланган:



Ишнинг бажарилиши. 2 г картошка (ёки сабзи) ҳовончада кум билан эзилади ва аста-секин 2—3 мл сув қуйилади. Кислотали муҳитни пасайтириш учун газ пуфакчалари ажралиши тўхтагунча шпателнинг учида озгина CaCO_2 сепилади. Майдаланган массанинг ҳаммаси 100 мл ли ўлчов колбасига солинади ва колбанинг белги чизигигача сув қуйилади. Аралашма 30—60 минут тинч қолдирилади ва шундан кейин филтрланади. 2 та 200 мл ли конуссимон колбага 0,1 н H_2O_2 эритмасидан 25 мл қуйилади ва улардан бирига 20 мл фермент экстрактидан қўшилади, иккинчисига шунча миқдор, яъни 20 мл экстрактни қайнаб турган сув ҳаммомида 5 минут қиздириб, сўнгра колбага қуйилади. 30 минутдан кейин фермент таъсирини тўхтатиш учун ҳар иккала колбага 10% ли сульфат эритмасидан 5 мл дан қуйилади ва аралашма 1 минут давомида пушти рангга киргунча 0,1 н KMnO_4 эритмаси билан титрланади. Контрол ва тажриба учун сарфланган калий перманганат эритмасининг мл миқдори аниқланади.

Ҳисоблаш. 1,5 г сабзидан 100 мл каталаза экстракти тайёрланган бўлса, олинган экстрактни титрлашга 15,5 мл, контрол учун 30,2 мл 0,1 н KMnO_4 эритмаси сарфланади. Парчаланган H_2O_2 нинг миқдори: $30,2 - 15,5 = 14,7$ мл. 1 мл 0,1 н KMnO_4 1,7 мг H_2O_2 га тўғри келса, $14,7 \cdot 1,7 = 24,99$ мг H_2O_2 га тўғри келади. 1 г сабзидаги каталазанинг 30 минутда парчалаши мумкин бўлган H_2O_2

микдорини ҳисоблаймиз:

$$\frac{24,99 \cdot 100}{20 \cdot 1,5} = 83,3 \text{ мг } \text{H}_2\text{O}_2 \cdot$$

1 минутда эса: $83,3:30 = 2,77 \text{ мг } \text{H}_2\text{O}_2$ ни парчаланар экан. 1 мкМ H_2O_2 0,034 мг бўлса, 1 г сабзида $(2,77 \cdot 0,034) = 84$ каталаза бўлади.

Назорат саволлари

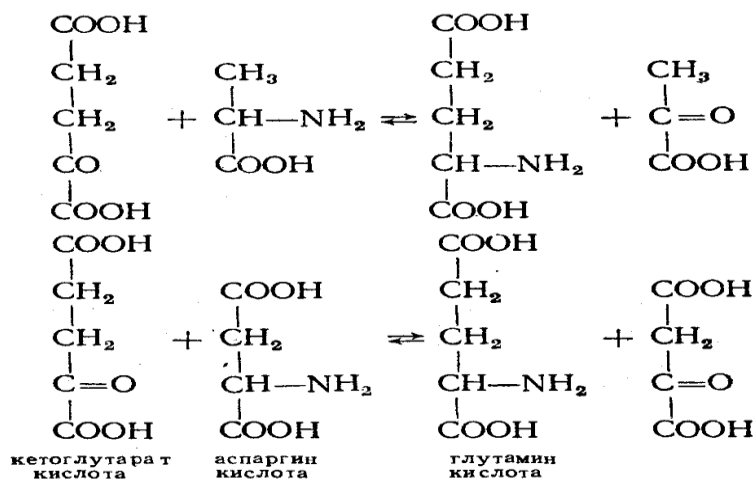
1. Каталаза ферменти қандай ферментлар гуруҳига киради ва таркибида қайси метални тутати ?
2. Каталазанинг энг характерли функцияси нима ?
3. Водород пероксидининг каталаза иштирокида парчаланиш реакциясини ёзинг.
4. Водород пероксида тирик организмда қандай жараёнда ҳосил бўлади ва организм учун қандай таъсир кўрсатади ?
5. Каталаза табиатда нималардан топилган ?
6. Каталаза активлигини аниқлаш нимага асосланган ?
7. Каталаза фаоллигини қандай аниқланади ?
(ишнинг бажарилишини гапириб беринг)

2-лаборатория иши.

Аспартатаминотрансфераза ферментининг активлигини калориметрик усулда аниқлаш

Керакли асбоб ва реактивлар: центрифуга, пипеткалар, сув ҳаммоми, термометр, шиша таёқча, фотоэлектроколориметр субстрат аралашмаси, анилин цитрат, 2,4-динитрофенилгидразининг 0,1% ли эритмаси, калий гидроксидининг спиртдаги 2,5% ли эритмаси, сувга тўйинтирилган толуол.

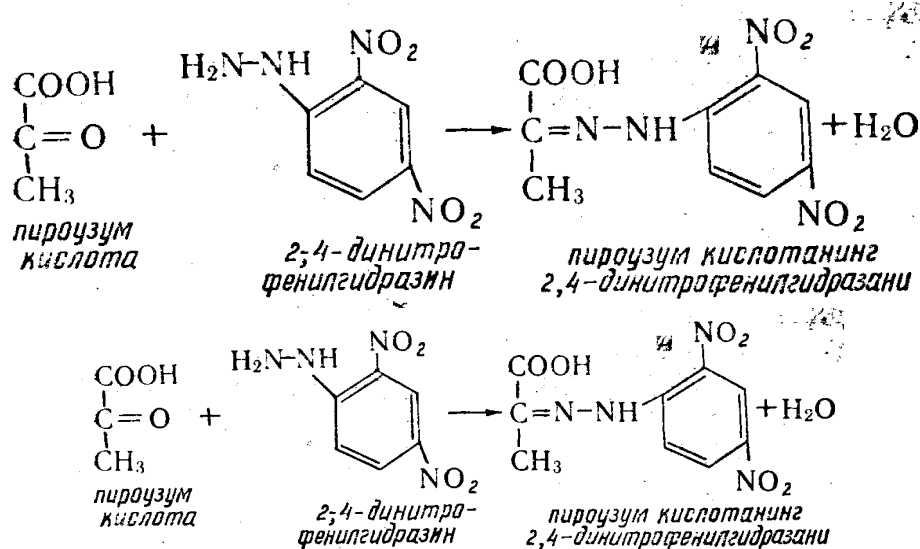
Аминотрансферазалар: аланин — аминотрансфераза (аланин: 2 оксоглутаратаминотрансферазалар КФ— 2.6.1.2) ва аспартатаминотрансфераза қайта аминланиш реакциясини катализлайди. Бу реакцияни биринчи марта 1937 йили совет биохимиклари А. Э. Браунштейн ва М. Д. Крицманлар кашф қилишган:



Бу

ферментлар активлигини аниқлаш усулининг принципи юқоридаги реакциялар натижасида пирозум ва оксалацетат кислоталар ҳосил бўлишига асосланган.

Ферментатив реакция давомида алаинин-цитрат эритмаси қўшилганда ҳосил бўлган оксалацетат кислота ҳам пирозум кислотага айланади. Реакцион аралашмага 2,4-динитрофенилгидразининг (2,4-ДНФГ) кислотали эритмасидан қуйилса, биринчисида ферментатив реакция тўхтайди, иккинчисида шу вақтнинг ўзида гидрозонлар ҳосил бўлиб, аралашма сарикдан қизғиш-бинафша рангга ўтиши мумкин. Рангнинг равшанлик даражаси ҳосил бўлган пирозум кислота микдорига тўғри пропорционал.



Пирозум кислотанинг фенилгидразинини толуол билан экстракция қилиб олиш мумкин, α-кетоглутар кислотанинг ҳосиласи эса эритмада қолади. Экстрактга ишқорнинг спиртли эритмасидан қўшилса, барқарор қизил ранг пайдо бўлади. Рангнинг равшанлик даражасини фотоэлектродколориметрда (470 нм да) аниқлаб, калибрлаш эгри чизиги ёрдамида фермент активлигини ҳисоблаб топиш мумкин.

Т а ж р и б а. Аспаратамиотрансфераза активлигини аниқлаш.

Ишнинг бажарилиши. 2 та центрифуга пробиркасини олиб, бирига 0,5 мл 1—эритмадан (субстрат аралашмаси —50 мк/ моль аспарагин кислота ва 5 мк/моль α-кетоглутар кислотадан иборат), иккинчисига 0,5 мл сув (контрол) қуйилади. Пробиркалар 4— 5 минут давомида 25°С ли сув ҳаммомига қўйилади. Сўнгра 0,5 мл дан қон зардобини қўшиб, яхшилаб аралаштирилади ва яна 25°С да 20 минут қиздирилади. Шундан кейин 2 томчи анилинцитрат томизиб аралаштирилгач, юқоридаги шароитда 20 минут давомида инкубация қилинади. Шундан сўнг пробиркаларга 0,5 мл дан 0,1 % ли 2,4-динитрофенилгидразин қуйиб, яхшилаб аралаштирилади ва 5 минут хона температурасида қолдирилади, сўнгра 2,5 мл сувга тўйинтирилган толуол қўйилади. Пробиркадаги суюқлик яхшилаб чайқатилади, ҳосил бўлган эмулсия 2000 g тезланишда 5 минут давомида центрифугаланади.

Толуол экстрактидан (юқори қават) куруқ пробиркага 1,5 мл қуйиб, устига ишқорнинг спиртдаги 2.5% ли эритмасидан 4,5 мл қўйилади. Пробиркадаги суюқлик аралаштирилгач, рангни тиниқлаштириш учун 10 минут хона температурасида қолдирилади. Кўрсатилган вақт ўтгандан кейин рангнинг равшанлик даражаси фотоэлектродколориметрда (470 нм) 1 см ли кюветада

аниқланиб, калибрлаш эгри чизиғи ёрдамида ҳисобланади.

Назорат саволлари.

1. Аспартатаминотрансферазалар қандай реакцияни катализлайди?
2. Қайта аминланиш реакцияси қимлар томонидан қачон кашф қилинган?
3. Қайта аминланиш реакциясини ёзиб изохлаб бэринг.
4. Аспартатаминотрансфераза активлигини аниқлаш қандай амалга оширилади ? (тажрибанин изохлаб беринг).

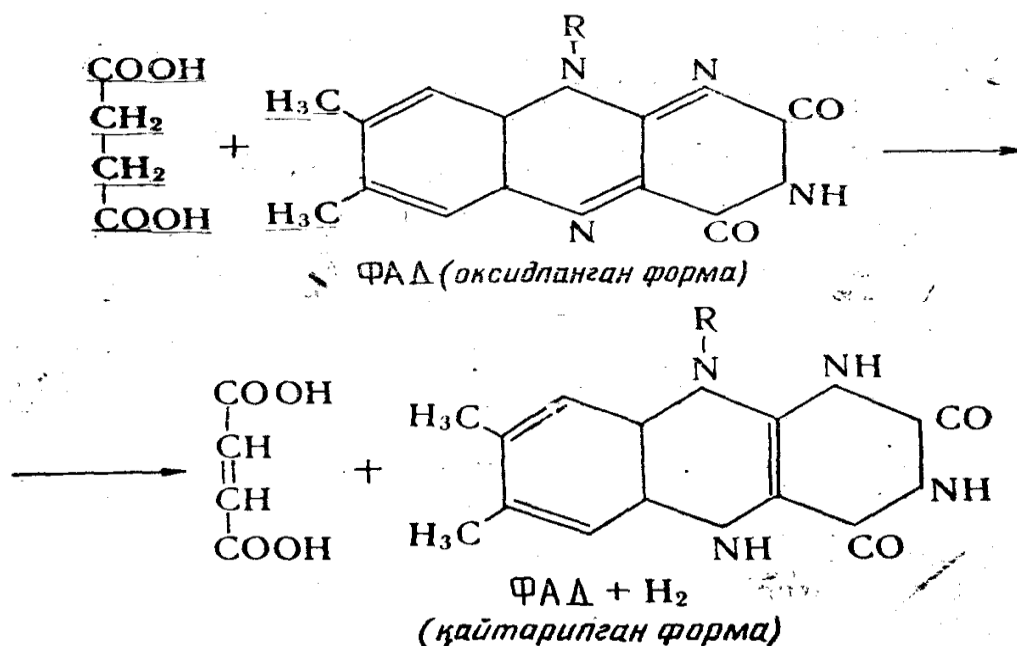
3-лаборатория иш

Мускуллардаги сукцинатдегидрогеназа ферменти активлигини аниқлаш

Керакли асбоб ва реактивлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, термостат, фосфат буфери (рН-6,8), мускул бўтқаси, қахрабо кислотанинг 0,1н эритмаси, дистилланган сув, 0,02% метилен кўки, вазелин мойи.

Сукцинатдегидрогеназа (сукцинат: ФАД — оксидоредуктаза КФ. 1.3.99.1) ферменти флавопротеид бўлиб, қахрабо кислота фумар кислотагача оксидланишини катализлайди. Бу фермент таркибида кофермент сифатида флавинадениндинуклеотид (ФАД) бўлади.

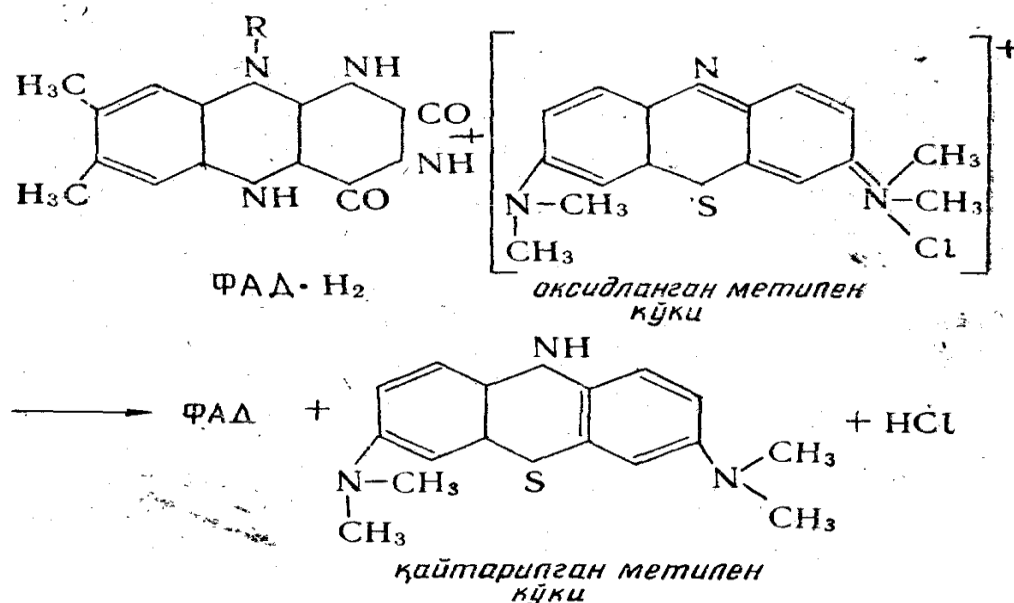
Бу ферментнинг активлигини аниқлаш таркибида фермент бор препарат — мускул бўтқасининг қахрабо кислотанинг дегидрогенланиш реакциясини катализлаб, ажралиб чиққан водородни метилен кўкига ташиб ўтказишига асосланган. Бу реакцияда метилен кўки қайтарилиб, рангсизланади, натижада энзиматик реакция боради:



Мис фермент актив марказининг асосий компоненти бўлиб, оксидланиш

—қайтарилиш процессида электрон ташувчи ролини ўтайди. Тирозиназанинг молекуляр массаси 100000 га тенг. Ундан мис атоми олиб ташланса, активлиги йўқолади. Мис одам ва ҳайвон организмида адреналин алмашинувида, меланинлар ҳосил бўлишида иштирок этади.

Тирозиназанинг каталитик таъсирини тирозиннинг ҳаво кислороди таъсирида оксидланиб, меланин пигменти ҳосил бўлишида кўриш мумкин:



Ишнинг бажарилиши. 2 та пробиркага 1 мл дан рН 6,8 бўлган фосфат буфэри қуйилиб, ҳар иккала пробиркага 100 мгдан ювилган мускул бўтқаси солинади. Биринчи пробиркага қахрабо кислотанинг 0,1 н эритмасидан 2 мл, иккинчи пробиркага 2 мл дистилланган сув қуйилади, устига 2 томчидан, 0,02% ли метилен кўки қўшиб аралаштиргач, 3—5 томчи вазелин мойи томзилади. Сўнгра 30 минут термостатга (37—40°C) қўйилади, шундан кейин аралашманинг ранги кузатилади. Биринчи пробиркадаги суюқлик рангсизланади, иккинчисига субстрат қўшилмаганлиги учун ранги ўзгармайди.

Назорат саволлари.

1. Сукцинатдегидрогенеза қандай ферментлар гуруҳига киради ?
2. Сукцинатдегидрогенеза нимани оксидланишини катализлайди ?
3. Сукцинатдегидрогенезанинг кофермент сифатидаги ролини тушунтириб беринг?
4. Сукцинатдегидрогенеза ферменти активлигини аниқлаш нимага асосланган ?
5. Энзиматик реакцияни ёзиб беринг.
6. Тирозиназанинг молекуляр массаси қанча ?
7. Одам организмида мис қандай моддаларнинг ҳосил қилишда иштирок этади ?

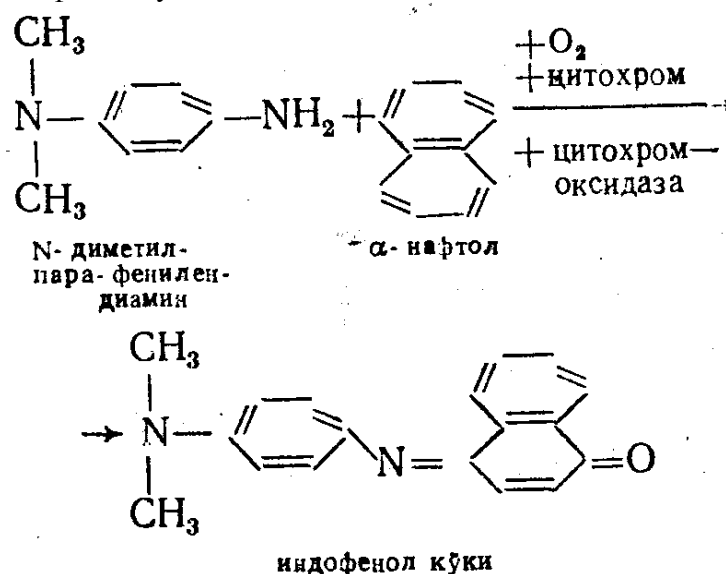
4-лаборатория иши.

Цитохромоксидазанинг фаоллигини аниқлаш

Керакли асбоб ва реактивлар: чинни ҳовонча, дока ёки фильтр қоғоз, воронка, пипетка, кум, штатив, пробиркалар, сув ҳаммоми, янги мускул тўқимаси, дистилланган сув, «Нади» реактиви.

Цитохромоксидаза барча ўсимлик ва ҳайвон ҳужайраларида кенг тарқалган фермент бўлиб, химиявий таркиби жиҳатидан гемин табиатли ферментлар группасига киради. Цитохромоксидаза ёки цитохром аз юқори даражада специфик фермент бўлиб, кайтарилган цитохромни ҳаво кислороди ёрдамида, яъни цитохромдан электронни ҳаво кислородига ташиб ўтказиб беради. Цитохромоксидаза ва бошқа цитохромлар гемин табиатли нафас ферментлари группасини ташкил қилиб, нафас олиш занжирининг электрон ташувчи кисмида: $b \rightarrow c_1 \rightarrow c \rightarrow a$ цитохромоксидаза ёки аз тартибда жойлашиб, митохондрийнинг ички мембранасида, кристалларида боғланган ҳолда жойлашган.

Цитохромлар, хусусан, цитохромоксидаза турли феноллар ва ароматик аминларни ҳаво кислороди ёрдамида оксидлаши мумкин. α -нафтол билан М-диметил-пара-фенилендиаминнинг ишқорий эритмаси («Нади» реактиви), цитохром ва цитохромоксидаза ёрдамида, ҳаво кислороди иштирокида оксидланиб индофенол кўкини ҳосил қилади:



1- т а ж р и б а. Цитохромоксидаза препаратини тайёрлаш.

Ишнинг бажарилиши: яхшилаб майдаланган 300 мг янги мускул тўқимасини чинни ҳовончага солинади, унинг устига 6 мл дистилланган сув қуйиб, кайтарувчи моддалар ва сувда эрувчи ферментлар экстракция қилиб олинади. Майдаланган тўқимани дока ёки фильтр қоғоз ёрдамида филтрлаб, яна 2 марта экстракция қилинади, бунда таркибида цитохромлар ва цитохромоксидаза бор деярли рангсиз бўтқа қолади, бу қолдиқдан Цитохромоксидаза препарати сифатида фойдаланилади.

2- т а ж р и б а. Цитохромоксидазанинг цитохромлар ва шаво кислороди иштирокида «Нади» реактивини оксидлаш.

Олинган цитохромоксидаза препаратининг бир қисмини фил тр қоғозга қуйиб 1 — 2 томчи «Нади» реактивидан томизилади. 3 — 5 минутдан кейин кўк ёки

яшил-кўк ранг пайдо бўлади. Препаратнинг бир қисми пробиркага солинади ва қайнаб турган сув ҳаммомида 5 минут давомида қиздириб, совитилгач яна филтр қоғозга қўйилади ва юқоридаги реакция такрорланади. Фермент активлиги йўқолганлиги учун кўк ранг ҳосил бўлмайди.

Назорат саволлари.

1. Цитохромоксидаза кимёвий жиҳатдан қандай табиатли ферментлар гуруҳига кирази ?
2. Цитохромоксидазанинг вазифаси нима ?
3. Цитохромоксидаза нафас олиш занжирида қандай тартибда жойлашади вақандай ҳолда учрайди ?
4. Цитохромоксидаза фенол ва ароматик аминларга қандай таъсир кўрсатади ?
5. α -нафтол билан М-диметил-пара-фенилендиаминнинг ишқорий эритмаси цитохром ва цитохромоксидаза ёрдамида, ҳаво кислороди иштирокида оксидланиб индофенол кўкини ҳосил қилиш реакциясини ёзинг ?
6. Цитохромоксидаза препарати қандай тайёрланади ?
7. Цитохромоксидазанинг цитохромлар ва ҳаво кислороди иштирокида «Нади» реактивини оксидлаш қандай амалга оширилади ?

5-лаборатория иши.

Сўлак таркибидаги диастаза (амилаза) фаоллигини аниқлаш

Керакли реактив ва асбоблар: 1. 10 марта суюлтирилган сўлак эритмаси; 2. 0,1% ли крахмал эритмаси; 3. Йод эритмаси; 4. 1% мис сульфат эритмаси; 5. 1 % ли ош тузи эритмаси; 6. Пробиркалар; 7. Бюретка; 8. Пипеткалар; 9. Штатив; 10. Сув ҳаммоми; 11. Термометр.

Сўлак таркибидаги амилаза активлиги деганда 1 мл ҳажмдаги сўлакнинг маълум бир вақт (30 дақиқа) давомида қанча миқдордаги крахмални парчалаш тезлиги тушунилади. Крахмал фермент таъсирида тўла парчаланганда йод эритмаси билан одатдаги зангори ранг ўрнига қизғиш ранг ҳосилқилади.

Сўлак таркибидаги амилаза активлигини аниқлаш пайтида ферментлар тезлигига таъсир қилувчи активаторларнинг ва реакция тезлигини секинлаштирувчи ингибиторларнинг фаолиятини ҳам кузатиш мумкин. Масалан, субстратга озгина ош тузининг суюлтирилган эритмасини қўшиш билан реакция тезлиги ошса, мис сульфат тузи таъсирида эса крахмалнинг парчаланиш тезлиги анча пасаяди.

Ишнинг бажарилиши. 10 та пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дистилланган сув қўйилади ва штативга тартиб номери билан жойлаштирилади. Сўнгра биринчи пробиркага 10 марта суюлтирилган сўлакнинг филтрланган эритмасидан 1 мл солинади ва яхшилаб аралаштирилади. Биринчи пробиркадаги аралашмадан пипетка ёрдамида 1 мл олиб иккинчи пробиркага солинади ва яхшилаб аралаштирилади. Иккинчи пробиркадаги аралашмадан учинчи пробиркага ва ҳоказо тўққизинчи пробиркага, ундан эса ўнинчи пробиркага олиб солинади. Ўнинчи пробирка ҳам яхшилаб аралаштирилади ва ундан 1 мл аралашма олиб ташланади. Шу тартибда тайёрланган эритмаларнинг

хажми бир хилда бўлиб, аралашма таркибидаги фермент концентрацияси биринчи пробиркадан бошлаб ўнинчи пробиркагача камая боради. Сўнгра ҳар бир пробиркага 1 мл дан дистилланган сув ва 0,1% ли крахмал эритмасидан 2 мл дан солиб, яхшилаб аралаштирилади. Пробиркаларга крахмални охириги ўнинчи пробиркадан бошлаб солиш керак.

Крахмал солингач, пробиркалар ҳарорати 37°C бўлган сув ҳаммомида 30 дақиқа тутилади. Мўлжалдаги вақт ўтиши билан пробиркалар сув ҳаммомидан олиниб, водопровод тагида совитилади ва тартиб номери бўйича штативга жойлаштирилади. Сўнгра пробиркаларнинг ҳар бирига 1—2 томчи йод эритмасидан томизиб секин-аста чайқатилади. Пробиркалардаги аралашмалар йод таъсирида сўлак концентрациясига қараб сариқ, қизил-қўнғир ва кўк рангларгача бўялади.

Сариқ рангнинг ҳосил бўлиши крахмалнинг амилаза иштирокида тўла парчаланганлигини кўрсатади. қизил-қўнғир рангнинг ҳосил бўлиши, крахмал парчаланганида оралик бирикмалардан декстринлар борлигини кўрсатади. Аралашмаларнинг кўк рангга бўялиши еса амилазанинг крахмални бутунлай парчаламаганлигидан далолат беради.

Сўлак таркибидаги амилаза активлигини ҳисоблаш.

Қайси бир пробиркада кўк ранг ҳосил бўлган бўлса, крахмал хали парчаланмаган дейилади. Агар пробиркадаги эритмада ҳеч қандай кўк ранг ҳосил бўлмаса, у пробиркадаги крахмал тўла парчаланган бўлади. Фараз қилайлик, тўртинчи пробиркагача кўк ранг рўй бермаган бўлсин. Бешинчи пробиркадан бошлаб эса аралашмада салгина кўкимтир ранг пайдо бўлиб, қолган пробиркаларда кўк рангнинг ҳосил бўлиши кучая борсин. кучсиз кўк рангнинг ҳосил бўлиши бешинчи пробиркада кузатилганлиги учун ҳам, у ердаги сўлак концентрацияси 1/160 тенг бўлади. Бу эса бешинчи пробиркадаги сўлакнинг 160 марта суялганлигини кўрсатади.

Агар 1/160 миллилитр сўлак — 2 мл, 0,1% ли крахмални

1 — X парчалаган бўлса,

$$X = \frac{2 \times 1}{\frac{1}{160}} = 320 \text{ мл.}$$

Демак, 1 мл суялтирилмаган сўлак, ярим соат давомида 37°C да 0,1% ли крахмалнинг 320 миллилитрини парчалаши мумкин.

Назорат саволлари.

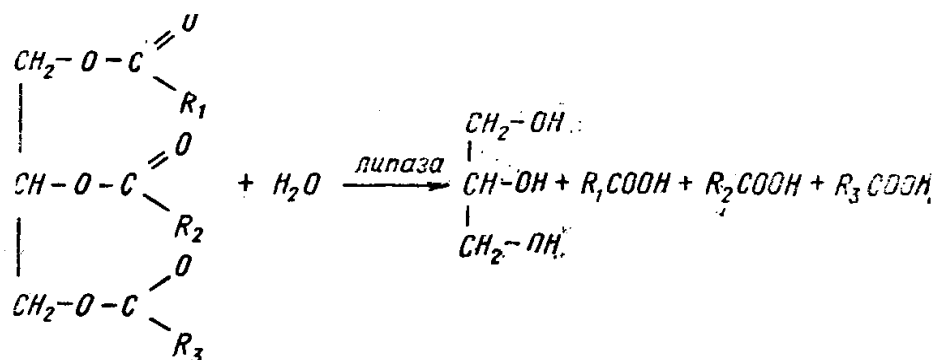
1. Сўлак таркибидаги амилаза активлиги деб нимага айтилади ?
2. Крахмал фермент таъсирида тўла парчаланганда йод билан қандай ранг ҳосил қилади ?
3. Сўлак таркибидаги амилазанинг активлигига қандай омиллар таъсир қилади ?
4. Активатор ва ингибитор сўзининг моҳиятини изоҳлаб беринг.
5. Сўлак таркибидаги амилаза активлигини қандай ҳисоблаб топилади ?
6. Амилаза ферменти табиатда нималарда учрайди ?
7. Унаётган буғдой донининг ширин бўлиб қолишини изоҳланг .

6-лаборатория иши.

Липаза ферментининг фаоллигини аниқлаш

Керакли реактив ва асбоблар. 1. 2—3 кунлик унаётган пахта чигити; 2. Пахта мойи; 3. Ацетат буфэри $\text{pH} = 4,7$; 4. 96% ли этил спирт; 5. Эфир; 6. 0,1% ли фенолфталеин ёки тимолфталеин; 7. Тоулол; 8. 0,1 н натрий гидроксид; 9. Чинни ҳовонча; 10. Ҳар хил ҳажмдаги колбалар; 11. Пипеткалар; 12. Бюретка.

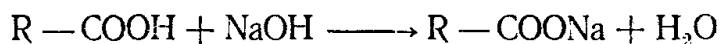
Липаза ферменти эстеразалар гуруҳига мансуб бўлиб, мойли ўсимликлар уруғида кўп учрайди. Липаза мойларни глицерин ва ёғ кислоталаригача парчалайди. Мойларнинг липаза ферменти билан парчаланишини тубандаги тенглама билан кўрсатиш мумкин.



Бу ерда R_1 , R_2 ва R_3 ва юқори молекуляр ёғ кислоталарининг радикаллари — пал митат, стеаринат, олеинат ва бошқалар бўлиши мумкин.

Липаза ферменти таъсирида ёғ кислоталарининг миқдори ошади. Ёғ кислоталари миқдорининг кескин ошишини унаётган уруғларда аниқ кўриш мумкин. Озиқ-овқат маҳсулотларининг (ун, ёрма, айникса ёғ тутувчи уруғлар — кунжут, кунгабоқар, чигит кабилар) сифатини бир меъёрда сақлаб туришда бу ферментнинг роли каттадир. Озиқ-овқат маҳсулотлари сақланаётган шароитда намлик ва ҳароратнинг кўтарилиши заҳирадаги мойларнинг парчаланишига сабаб бўладн. Натижада, улар таркибидаги эркин ёғ кислоталарининг миқдори кескин ортади. Бу эса озиқ-овқат маҳсулотларининг бузилишига ва тахирланишига олиб келади.

Липаза ферментининг активлигини, мойларнинг парчаланишидан ҳосил бўлган ёғ кислоталарини нейтраллаш учун кетган натрий гидроксиднинг миқдорига қараб аниқлаш мумкин.



Ишнинг бажарилиши. Липаза ферментининг активлигини аниқлаш учун 2 — 3 кунлик унаётган чигит мағзидан 3 г олиб, чинни ҳовончада $\text{pH} = 4,7$ га тенг бўлган ацетат буфэрида яхшилаб янчилади ва 100 мл щажмдаги ўлчов колбагақуйилади. Чинни идишни 2 — 2,5 мл дистилланган сув билан 2 — 3 марта ювиб, уни ҳам колбага солинади. Кўпчилик ўсимликлар таркибидаги липазанинг оптимал $\text{pH} = 4,5$ — 5,0 бўлганлиги учун унга яна 5 мл ацетат буфури қўшилади. Сўнгра фермент шираси устига 1 мл тоза пахта ёки кунгабоқар мойидан солинади, унинг устига еса 1—2 томчи толуол томчилатиб, колбадаги аралашма яхшилаб чайқатилади ва 20—24 соатга оддий хона

хароратида ёки термостатда 30°C да колдирилади. Мана шу давр ичида мой липаза ферменти таъсирида парчаланади. Контрол колбаларда ҳам худди юкоридаги тажрибадаги ишлар олиб борилади, аммо колбаларни инкубацияга кўйишдан олдин аралашма 3—5 дақиқа қайнатилади.

Инкубация вақти тугаши билан колбаларнинг ҳар бирига 20 мл 96% ли спирт, 20 мл эфир солиниб, улар устига 2—3 томчи фенолфталеин томизиб, 0,1 н натрий гидроксид эритмаси билан титрланади. Агар колбалардаги аралашма рангли бўлса, тимофталеиндан фойдаланилади.

Олинган натижани ҳисоблаш. Липаза активлиги 10 г уруғга нисбатан қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади:

$$X = \frac{(a \cdot T) - (b \cdot T) \cdot 10}{H}$$

X — изланаётган липаза активлиги;

a — титрлаш учун кетган 0,1 н натрий гидроксид эритмасининг ҳажми (мл ҳисобида);

T — 0,1 н натрий гидроксиднинг титри;

b — контрол титрлаш учун сарф бўлган 0,1 н натрий гидроксиднинг ҳажми (мл ҳисобида); x — тажриба учун олинган уруғнинг массаси (г ҳисобида).

Назорат саволлари.

1. Липаза ферменти қайси ферментлар гуруҳига киради ?
2. Липаза нималарнинг таркибида кўп учрайди ?
3. Липаза сандай вазифа бажаради ?
4. Липаза таъсирида мойларнинг парчаланиш реакциясини ёзинг ?
5. Ёғ кислоталарининг миқдори қайси фермент таъсирида ошади ?
6. Ёғ кислоталари қандай уруғда кўп бўлади ?
7. Озиқ-овқат маҳсулотларини сақланаётган шароитда намлик ва ҳароратнинг ошиши нимага олиб келади ?
8. Липаза ферментининг активлигини қайси модданинг миқдorigа қараб аниқланади ?

ИЛОВА

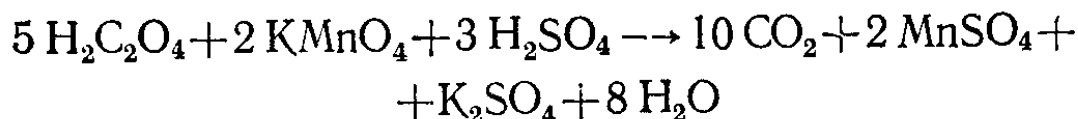
Перманганат эритмасини тайёрлаш ва унинг титрини мис орқали аниқлаш

5 г KMnO_4 олиб, 1 л ҳажмдаги ўлчов колбасида, олдиндан қайнатилган дистилланган сувда эритилади. Агар эритма тагида чўкма ҳосил бўлса, у филтрланади ва эритма ўзидан ёруғликни кам ўтказадиган рангли шиша идишларда ёки қора қоғоз билан ўралган идишларда сақланади.

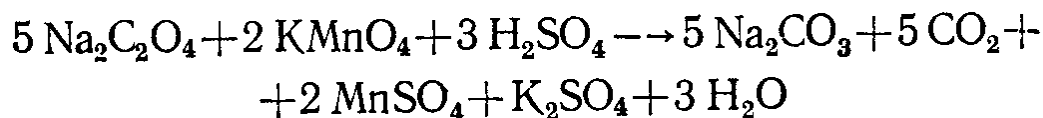
Перманганат титрини аниқлашда оксалат кислотадан ёки шу кислотанинг натрийли, аммонийли тузларидан фойдаланилади. қайта кристалланган оксалат кислотанинг натрийли тузидан 0,20 - 0,25 г олиб, 200—250 мл ҳажмдаги чинни косага солинади ва 50 - 100 мл дистилланган сувда

эритилади. Сўнгра унинг устига 1—2 мл концентранган сульфат кислотада солиб, эритма сув ҳаммомида 60—80°C гача қиздирилади. Чинни косадаги эритма ҳарорати 70°C га этганда микробюретка ёрдамида KMnO_4 эритмаси билан оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Титрлаш даврида чинни косадаги эритманинг ҳарорати 60—80°C атрофида бўлиши керак. Титрланаётган эритманинг ҳароратини назорат қилиб туришда ва бюреткадан тушаётган KMnO_4 эритмасини ҳар доим аралаштириб туришда термометр ишлатилади.

Реаксия қуйидаги тенгламага мувофиқ содир бўлади:



Агар титрлаш учун натрий оксалат олинган бўлса, реакция тенгламасини қуйидагича ифодалаш мумкин:



Юқоридаги реакция тенгламасидан 5 моль оксалат кислотага 2 моль перманганат тўғри келганлиги кўриниб турибди. Биз юқорида кўриб ўтган иккинчи реакцияда 2 моль перманганатга 10 моль темирнинг, биринчи реакцияда 2 моль темирга 2 моль миснинг тўғри келганлигини кўрган эдик. Демак, бундан 1 моль оксалат кислотага, 2 мол темир тўғри келади деган хулоса чиқариш мумкин.

Агар перманганат титрини аниқлаш учун олинган натрий оксалатнинг молекуляр массаси 134 га тенг бўлса, унга 2 моль мис тўғри келади десак, қуйидаги натижани оламиз:

$$63,6 \times 2 : 134 = 0,964$$

Олинган натрий оксалатнинг миқдорини топилган ана шу коэффициентга кўпайтирилса, 1 мл перманганатга тўғри келадиган мис миқдорини топган бўламиз. Агар олинган натрий оксалатнинг миқдори 0,2345 г бўлса, у ҳолда мис миқдори $0,2345 \times 0,964 \times 0,2261$ г бўлади.

Топилган бу сонни, титрлашда кетган перманганат миқдорига бўлсак, 1 мл перманганатга тўғри келадиган мис миқдорини топган бўламиз, $0,2261 : 22 \times 0,01028$ г ёки 10,28 мг.

Амалий машғулотлар учун зарур бўлган баъзи реактивларни тайёрлаш усуллари

1. **Агар-агар парчасини тайёрлаш.** 10% ли агар-агар парчасини тайёрлаш учун 20 г агар-агарни химиявий стаканга солиб, унинг устига 80 мл дистилланган сув қуйиб электр плиткада ёки газ горелкасида қиздирилади. қиздириш давомида стакандаги агар-агар аралашмаси шиша таёкча билан аралаштириб турилади. Ҳосил бўлган қуюқ атала устига 2% ли крахмал эритмасидан солиб аралаштирилади, сўнгра уни Петри косачасига кўчирилади. Агар-агар Петри косачасида бир текисда қотгандан кейин, унинг устига

узунасига кесилган унаётган уруғ бўлаклари ёпиштириб қўйилади.

2. Азобензол эритмасин тайёрлаш. 14,5 мг азобензолни 100 мл спиртда эритилади. Бу эритма 2,35 мкг ўмл каротинга тўғри келади.

3. Амилаза ширасини олиш. Унаётган буғдой, арпа, сули уруғидан (майсасидан) 8—10 г олиб, чинни ҳовончада янчилади. Сўнгра ҳовончани иссик дистилланган сув билан ювиб, 50 мл ли ўлчов колбасига ўтказилади ва ярим соат тинч қолдирилади. Бундан кейин филтрланади. Филтрат амилаза фермент сифатида

ишлатилади. Фермент ширасини тажриба бошланишидан олдин тайёрлаш керак.

4. Анилиннинг спиртли эритмаси. Анилин спиртда 1:6 нисбатда эритилади. Тайёрланган эритма махсусқора рангдаги идишларда ёки усти қорақоғоз билан ўралган шиша идишларда сақланади.

5. Асетат буферини тайёрлаш. 1 н сирка кислота (H_3COOH) билан 1 н натрий асетат (CH_3COONa) эритмалари 1:1 нисбатда аралаштирилади. Шу нисбатда тайёрланган аралашмадаги pH-4,7 га тенг бўлади.

6. Ганус эритмаси. 13 г ёд кристалли 100 мл сирка кислотада эритилади. Сўнгра унинг устига 8,2 г бром қўшиб, шажми сирка кислота билан 1 л га келтирилади. Тайёрланган эритма махсус рангли идишда сақланади.

7. Гюбл эритмаси. Бу эритма икки қисмдан иборат бўлади: 1) 30 г симоб (ИИ)-хлорид (сулема эҳтиёт бўлинг!), 500 мл 96% ли этил спиртда эритилади, 2) 25 г йод кристалли 500 мл 96% ли спиртда эритилади. Тайёрланган эритмалар айрим-айрим ҳолда шиша идишларда сақланади. Тажриба бошлашдан икки кун олдин, эритмалар 1:1 нисбатда олиниб, уларнинг устига солиштирма массаси 1, 19 бўлган хлорид кислотада 25 мл қўшилади.

8. Диазо реактив. 0,9 г сулфанил кислотани 9 мл концентранган хлорид кислотада эритилади. Агар сулфанил кислота яхши эримаса, унга 2—3 томчи дистилланган сув қўшиб қиздирилади. Сўнгра аралашманинг 100 мл шажми ўлчов колбасига солинади ва дистилланган сув билан ўлчов чизигига етказилади. Тайёрланган эритма қора рангли шиша идишларда ёки қорақоғоз билан ўралган шиша идишда, совутгичда сақланади.

Тажриба бошлашдан олдин бу тайёрланган эритмадан 1,5 мл олиб, илгаридан музга (совутгичга) қўйилган 50 мл ли ўлчов колбасига солинади. Сўнгра унинг устига 1,5 мл янги тайёрланган 5% ли натрий нитрат эритмасидан қўшиб, 5 дақиқа музга қўйиб совутилади. Колбадаги аралашма яхшилаб чай катилади ва унинг устига 5% ли натрий нитрат эритмасидан яна 6 мл қўшиб, шажми дистилланган сув билан 50 мл га етказилади. Тайёрланган эритмадан бир сутка давомида фойдаланиш мумкин. Реактив совутгичда сақланади.

9. Ишқор эритмаси. 5,76% ли натрий карбонат ва 4% ли натрий гидроксид эритмалари алоҳида-алоҳида тайёрланади. Иш бошлашдан олдин бу эритмалар 1:1 нисбатда аралаштирилади.

10. Йод эритмаси. 20 г калий йодид 100 мл дистилланган сувда эритилади. Сўнгра 1 г йод кристалли тарозида тортиб олинади ва тайёрланган КЖ эритмасида эритилади. Шу усулда тайёрланган ёднинг концентранган эритмасидан маълум миқдорда олиб, дистилланган сув билан 1:5 нисбатда суюлтирилгач, тажрибаларда ишлатилади.

Йод эритмаси (крахмални аниқлаш учун). 7,5 г йод кристалли 7,5 г калий йодид билан чинни ҳовончада 5—10 мл дистилланган сув иштирокида

янчилади. Сўнгра аралашма 250 мл хажмдаги ўлчов колбасига ўтказилади. Чинни ҳовонча 3—4 марта дистилланган сув билан ювилиб, колбага солинади, аралашма шажми эса дистилланган сув билан 250 мл га келтирилади ва эритма филтрланади.

11. Кумуш нитратнинг аммиакдаги эритмаси. 5 г кумуш нитрат тузидан олиб, уни 50 мл дистилланган сувда эритилади. Агар эритма устига концентрланган аммиакдан бир неча томчи томизилса, чўкма тушади. Чўкма устига аммиак томизишни давом эттирсак, укайта эрийди. Сўнгра, эритма хажми дистилланган сув билан 100 мл га келтирилади.

12. Миллон реактиви. 40 г симоб 57 мл концентрланган нитрат кислотада, аввал хона ҳароратида, кейин эса сув ҳаммомида қиздириш билан эритилади. Эритма икки баробар шажмдаги дистилланган сув билан суюлтирилиб, маълум вақт тинчқолдирилади. Ҳосил бўлган чўкмали суюқликнинг усткиқисми чўкмадан ажратиб олинади.

13. Натрий гидроксиднинг спиртдаги 0,25 н эритмаси. 5 н натрий гидроксид эритмасидан 25 мл олиб, 350 мл 96% ли этил спиртга аралаштирилади ва унинг хажми дистилланган сув билан 500 мл га келтирилиб, сўнгра эритма филтрланади.

14. Натрий хлориднинг спиртдаги эритмаси. 20% ли натрий хлорид эритмасидан 50 мл олиб, 350 мл 96% ли этил спирт билан аралаштирилади. Сўнгра, унинг хажми дистилланган сув билан 1 л га етказилади.

15. α-нафтолнинг 0,2 ли эритмаси. 0,4 г α-нафтол олиб, уни 50 мл этил спиртда эритилади. Тажрибақилиш олдидан ундан 5 мл олиб, 20 мл дистилланган сув билан суюлтирилади.

16. Оксил эритмаси. 1—2 та тухум оксили олиб, 1 л дистилланган сувда эритилади

17. Оксилнинг тузли эритмаси. Оксилларни диализ қилишда ва уларни чўктиришда оксилнинг ош тузидаги эритмаси ишлатилади. Бунинг учун 3 та тухум оксили 700 мл дистилланган сувда эритилиб, унинг устига 300 мл натрий хлориднинг тўйинган эритмаси солинади. Эритма филтрланади.

18. Селиванов реактиви. 0,05 г резорсин олиб, 20% ли хлорид кислотанинг 10 мл да эритилади.

19. Сўлак эритмаси. Суюлтирилган сўлак эритмаси тайёрлаш учун енг аввал, оғиз бўшлиғи дистилланган сув билан яхшилаб чайиб ташланади. Оғиз бўшлиғи овқатқолдиқларидан тозалангач, оғизга дистилланган сув олиб, 1—2 дақиқа тутиб турилади. Кейин эса стаканга солинади. Сўнгра унинг шажми дистилланган сув билан 10 мл га келтирилади. Сўлак аралашмаси филтрланади. Филтрат, амилаза ферменти манбаи сифатида ишлатилади.

20. Тирозин эритмаси. Тирозиндан 0,05 г олиб, 0,1% ли сода эритмасининг 50 мл да эритилади. Эритма сув ҳаммомидақиздирилса, эриш тезлашади.

21. Фелинг суюқлиги. Бу иккиқисм эритмадан иборат бўлади: а) 200 г сегнет тузи 500 мл дистилланган сувда эритилиб, сўнгра унинг устига 150 г натрий гидроксид кўшиб, эритма хажми дистилланган сув билан 1 л га етказилади; б) 40 г мис сульфат тузи 1 л дистилланган сувда эритилади. Тажрибани бошлашдан олдин «а» ва «б» эритмалардан тенг хажмда олиб, аралаштирилади. Шу тартибда тайёрланган эритма Фелинг суюқлиги вазифасини бажаради.

Фойдаланилган адабиётлар

1. Р. Абдуллаев, К. Сафаров, Э. Аҳмедов, В. Асомов Ўсимликлар биохимиясидан амалий машғулотлар. Тошкент «Ўқитувчи» 1994 йил.
2. А.Қосимов, Қ.Қўчқоров, Д. Х. Муборакова Биохимиясидан амалий машғулотлар. Тошкент, «Ўқитувчи», 1989 йил.
3. А.Қосимов, Қ.Қўчқоров, С. Тешабоев Биохимия. Тошкент, «Ўқитувчи»,

Мундарижа

1. Сўз боши.....	3
2. Каталазанинг фаоллигини аниқлаш	4
3. Аспартат-аминотрансфераза ферментининг активлигини колориметрик усулда аниқлаш	5
4. Мускуллардаги сукцинатдегидрогенеза ферменти активлигини	7
5. Цитохромоксидазанинг фаоллигини аниқлаш.....	8
6. Сўлак таркибидаги диастаза (амилаза) фаоллигини аниқлаш.....	10
7. Липаза ферментининг фаоллигини аниқлаш.....	11
8. Илова.....	16
9. Фойдаланилган адабиётлар.....	21

