

Лабораторна робота № 9

Тема: Хімічний аналіз ферментативної активності

I. Теоретична частина

Активність ферменту визначають (при кількісному аналізі):

а) за кількістю продукту, який утворився під дією ферменту;

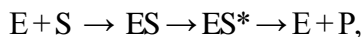
б) за кількістю витраченого за одиницю часу субстрату за оптимальних умов ферментативної реакції.

При якісному аналізі спостерігають за зміною кольору розчину, випадінням осаду та ін.

Ферментативна активність залежить від ряду факторів:

- 1) концентрації ферменту й субстрату (швидкість ферментативної реакції збільшується зі збільшенням кількості ферменту при високій концентрації субстрату);
- 2) температури (оптимальна температура для більшості ферментів - 37-40 °С);
- 3) рН середовища (для кожного ферменту існує оптимальне значення рН, при якому він проявляє максимальну активність);
- 4) присутності інгібіторів та активаторів (для ферментів характерна регуляція специфічними низькомолекулярними речовинами та іонами металів).

Механізм дії ферментів полягає в утворенні фермент-субстратного комплексу, який проходить наступні стадії:



де E - фермент, S - субстрат, ES - фермент-субстратний комплекс, ES* - активований фермент-субстратний комплекс, P - продукти реакції.

Дослід 1. Дослідження гідролізу крохмалю під дією амілази слини.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності амілази каталізувати гідроліз крохмалю через стадії утворення декстринів та мальтози. Крохмаль у разі взаємодії з йодом набуває синього забарвлення. Декстрин у разі взаємодії з йодом — фіолетового, червоно-бурого, оранжевого або жовтого забарвлення. Мальтоза з йодом забарвлення не дає і її можна виявити за допомогою проби Троммера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в калію йодиді, 10% розчин натрію гідроксиду, 5% розчин купруму сульфату, 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, у пробірку вливають 10 крапель розчину крохмалю, додають 2 краплі розчину йоду в калію йодиді. За наявності крохмалю спостерігають утворення синього забарвлення.

У штатив ставлять 10 пробірок і наливають у кожна по 2 мл дистильованої води та додають по одній краплі розчину йоду в калію йодиді.

В окрему пробірку наливають 5 мл 0,5% розчину крохмалю, додають 1 мл розведеної слини, вміст пробірки перемішують і спостерігають опалесценцію. З цієї пробірки кожні 60 с відбирають по 0,5 мл рідини і вливають по черзі в пробірки № 1,2,3 і так далі, що були заготовлені з розчином йоду в калію йодиді. Якщо розчин, перенесений у першу пробірку, змінив колір на фіолетовий або червоний, то інтервал між перенесеннями скорочують до 30 с.

Якщо чергова проба не змінить жовтого кольору розчину йоду, гідроліз крохмалю вважають закінченим і відмічають час. Спостерігають зникнення опалесценції розчину в процесі гідролізу. Через 10 хв. проводять пробу Троммера.

Для проведення проби Троммера до вмісту останньої пробірки додають однаковий

об'єм 10% розчину натрію гідроксиду і 5-7 крапель 5% розчину купруму сульфату. Вміст пробірки перемішують до зникнення помутніння. Верхню частину пробірки обережно нагрівають на відкритому вогні до кипіння. Реакція Троммера повинна бути позитивною. Спостерігають за появою жовтого або червоного осаду.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 2. Дослідження термолабільності амілази слини.

Принцип методу. Метод базується на здатності крохмалю під час взаємодії з йодом давати синє забарвлення. Продукт розщеплення крохмалю — мальтоза — з йодом забарвлення не дає і її можна виявити за допомогою проби Троммера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в калію йодиді, 10% розчин натрію гідроксиду, 5% розчин купруму сульфату, розведена слина, газовий пальник, водяна баня, холодна вода (лід), штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. У пробірку вливають 2 мл розведеної слини і кип'ятять на відкритому вогні протягом 2 хв. Вміст пробірки охолоджують.

У три інші пробірки вміщують по 5 мл 0,5% розчину крохмалю. У пробірку №1 додають кип'ячену слину, а в пробірки №2 і №3 по 2 мл розведеної некип'яченої слини. Пробірку №2 ставлять на 10 хв на водяну баню за температури 37 °С. Пробірку №3 поміщають на 10 хв у холодну воду.

Після інкубації вміст кожної пробірки розділяють порівну. До відібраних проб додають по 3-5 крапель розчину йоду в калію йодиді і спостерігають за зміною забарвлення. З пробами, що залишилися, проводять реакцію Троммера (див. дослід № 1).

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 3. Дослідження впливу рН середовища на активність амілази слини.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності крохмалю під час взаємодії з йодом давати синє забарвлення. Продукт розщеплення крохмалю — мальтоза — з йодом забарвлення не дає і її можна виявити за допомогою проби Троммера.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в калію йодиді, 10% розчин натрію гідроксиду, 5% розчин купруму сульфату, розведена слина, буферної суміші з рН 5.0, 7.0, 9.0, газовий пальник, водяна баня, штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. У три пробірки вливають по 2 мл 0,5% розчину крохмалю. У першу додають 2 мл фосфатної буферної суміші з рН 5.0, у другу — з рН 7.0, а в третю — з рН 9.0. У кожен з пробірок додають по 1 мл розведеної слини і поміщають їх на водяну баню за температури 37 °С.

Після інкубації вміст кожної пробірки ділять порівну. До перших фракцій додають по 3-5 крапель розчину йоду в калію йодиді і спостерігають за зміною забарвлення. З фракціями, що залишилися, проводять пробу Троммера (див. дослід 1).

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 4. Визначення залежності дії ферменту амілази від її кількості.

Принцип методу. Активність ферментів залежить від кількості їх у середовищі. Це можна визначити за розщепленням субстрату розчинами ферментів різної концентрації.

Матеріальне забезпечення: фосфатно-цитратний буфер з рН 6.8, розчин KI, дистильована вода, пробірки, піпетки, штатив, термостат.

Хід роботи. У 4 пробірки наливають по 3 мл фосфатно-цитратного буфера з рН 6.8 та по 4 мл 0,25% розчину крохмалю, потім додають (швидко!): у першу пробірку - 1 мл слини, розведеної у 20 разів, у другу - 1 мл слини, розведеної у 40 разів, у третю - 1 мл слини, розведеної у 80 разів і в 4 - 1 мл слини, розведеної у 160 разів. Усі пробірки ставлять в

термостат при температурі 37 °С. Відразу ж, а потім через кожні півхвилини, відбирають проби по кілька краплин і змішують їх в окремих пробірках з сильно розведеним розчином КІ. Відмічають час від початку досліду до зникнення синього забарвлення. На основі отриманих результатів будують графік, відкладаючи по осі абсцис розведення амілази (відносну концентрацію), а по осі ординат - відповідний час у хвиликах.

Зробити висновок про залежність швидкості гідролізу крохмалю від концентрації ферменту.

Дослід 5. Специфічність дії ферментів.

Принцип методу. Специфічність дії ферментів зумовлена відповідністю конфігурації активного центра ферменту до конформації субстрату, на який він діє (рис. 7.1). Специфічність буває абсолютна субстратна (коли фермент діє лише на один субстрат, наприклад уреаза), відносна субстратна (фермент каталізує перетворення субстратів, що належать до різних класів органічних сполук, наприклад глутатіонтрансфераза), групова (коли фермент діє на групу субстратів, подібних за будовою або типом хімічного зв'язку, наприклад, пепсин, трипсин, ліпаза, алкогольдегідрогеназа), стереохімічна специфічність (коли фермент діє на один стереоізомер, наприклад, фумаратгідратаза діє тільки на транс-ізомер-фумарат).

Фермент сахараза (КФ 3.2.1.48) гідролізує сахарозу. Амілаза - фермент, який прискорює гідроліз крохмалю та глікогену. Розрізняють: α -амілазу (КФ 3.2.1.1), яка каталізує ендогідроліз 1,4- α -глікозидних зв'язків у полісахаридах, β -амілазу (КФ 3.2.1.2) - каталізує гідроліз 1,4- α -глікозидних зв'язків у полісахаридах і відщеплює залишки мальтози від нередукуючих кінців молекули, γ -амілазу (КФ 3.2.1.3) - каталізує послідовне відщеплення залишків глюкози від нередукуючих кінців полісахаридів.

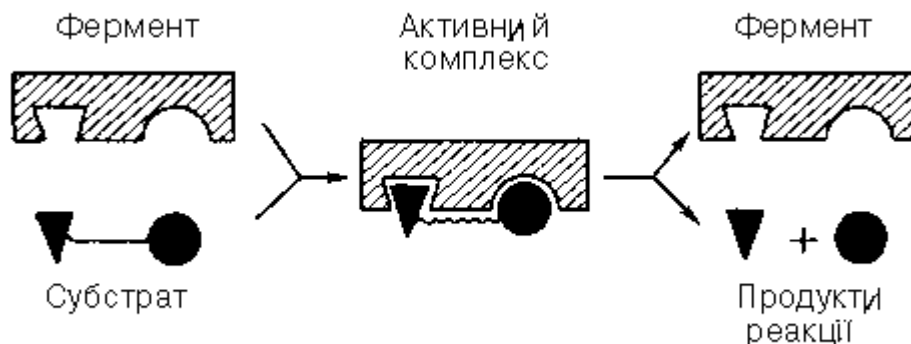


Рисунок 7.1 – Схематичне зображення утворення нестійкого фермент-субстратного комплексу згідно теорії «ключ-замок».

Матеріальне забезпечення: розчин амілази, розчин сахарази, 0,5% розчин крохмалю, 1% розчин сахарози, розчин Фелінга (готують два розчини: А – 34,6 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 500 мл розчину і В – 173 г сегнетової солі $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ з 70 г натрію гідроксиду в 500 мл розчину; розчини зберігають окремо, перед використанням змішують рівні об'єми розчинів А і В), розчин йоду, дистильована вода, пробірки, піпетки, штатив, водяна баня.

Хід роботи. Готують 4 пробірки: № 1, № 2, № 3, № 4. У перші дві пробірки наливають по 10 крапель розчину крохмалю, а дві інші - по 10 крапель розчину сахарози. У пробірку № 1 додають 5 крапель препарату амілази (розчин слини), а в № 2 - 5 крапель препарату сахарази (витяжки з дріжджів). Обидві пробірки ставлять у водяну баню при 38 °С на 10 хв. У пробірку № 3 додають 5 крапель препарату сахарази (витяжка з дріжджів), а № 4 - 5 крапель препарату амілази (розведена слина). Обидві пробірки також ставлять у водяну баню при 38 °С на 10 хв.

Через зазначений час у пробірки № 1 і № 2 додають по 2 краплі розчину йоду й відмічають забарвлення, а з вмістом пробірок № 3 і № 4 проводять реакцію Фелінга.

Для цього до вмісту пробірок № 3, № 4 додають по 5 крапель розчину Фелінга й підігрівають на киплячій водяній бані 5 - 7 хв.

Результати дослідження заносять до таблиці.

№	Фермент	Субстрат	Реакція з йодом	Реакція Фелінга
1	Амілаза	Крохмаль		
2	Сахараза	Крохмаль		
3	Амілаза	Сахароза		
4	Сахараза	Сахароза		

Дослід 6. Вплив активаторів і інгібіторів на активність амілази слини.

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності деяких речовин гальмувати (інгібітори) або прискорювати (активатори) роботу ферментів.

Матеріальне забезпечення: 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в калію йодиді, 1% розчин натрію хлориду, 5% розчин купрум(II) сульфату, розведена слина (1:10), водяна баня, штатив із пробірками, піпетки.

Хід роботи. В одну пробірку вносять 10 крапель дистильованої води, у другу – 8 крапель води і 2 краплі 1%-го розчину хлориду натрія, у третю – 8 крапель води і 2 краплі розчину сульфату купрум(II).

У кожен пробірку додають по 20 крапель розведеної (1:10) слини, вміст кожної пробірки перемішують, додають по 5 крапель розчину крохмалю і залишають стояти при кімнатній температурі 5 хвилин. В цей час готують три пробірки з водою (по 1 мл у кожній), підфарбованою краплею розчину йоду, і додають у них по 2-3 краплі вмісту досліджуваних зразків. Спостерігають забарвлення в залежності від ступеня розщеплення крохмалю амілазою. У першій пробірці з'являється фіолетове чи червоно-буре забарвлення, у другій пробірці, де іони хлору грають роль активатора, з'являється жовте забарвлення, а в третій пробірці, де іони міді (купрум(II)) гальмують дію амілази, забарвлення залишається синім. Якщо описаної картини не спостерігається, то дослід повторюють через 10 хв.

Результати вносять у таблицю і записують у зошит. Роблять висновок про характер впливу хлориду натрію і сульфату купрум(II) на активність амілази.

Питання для контролю за виконанням лабораторної роботи

1. Які Ви знаєте методи визначення активності ферментів?
2. Від чого залежить активність ферментів?
3. Функції ферментів в організмі.
4. Яку реакцію каталізує амілаза слини?
5. Які продукти утворюються в результаті дії амілази слини на крохмаль?
6. Які ви знаєте види амілаз, який механізм їх дії?
7. У чому полягає специфічність дії амілази й сахарози?