



Лабораторна робота №7 ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи: дослідити загальні властивості ферментів на прикладі амілази слини, сахарази гідролізату дріжджів.

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

Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пластикова склянка, термостат або водяна баня з термометром, сірники, спиртівка; слина, дистильована вода, 1%-й розчин крохмалю, реактив Люголя (або розчин йоду в калій йодиді), 0,4%-й розчин натрій гідроксиду, 0,2%-й та 0,4%-й розчини хлоридної кислоти, реактив Фелінга I та II, гідролізат дріжджів, 5%-й розчин сахарази, 0,9%-й розчин натрій хлориду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату.

Хід роботи

Дослід 1. Механізм дії ферменту амілази слини та її термолабільність.

Принцип реакції. α -Амілаза, що міститься у слині – це фермент, який каталізує реакцію гідролітичного розкладу крохмалю. Фракція крохмалю – амілоза – з йодом дає синє забарвлення, а продукти його гідролізу (декстрини) залежно від ступеня гідролітичного розщеплення крохмалю в присутності йоду зумовлюють забарвлення від червоно-бурого до жовто-бурого. Мальтоза як кінцевий продукт гідролітичного розкладу крохмалю при дії α -амілази з йодом не дає будь-якої кольорової реакції.

Ферменти є термолабільними сполуками. Температурний оптимум дії більшості з них знаходиться у межах $t = 37-38\text{ }^{\circ}\text{C}$. При підвищенні температури середовища відбувається прискорення реакції внаслідок підвищення енергії активації молекул субстрату. Денатурація ферменту різко прогресує при температурі, що перевищує $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Інактивація ферменту при підвищенні температури є необоротною.

Про залежність активності амілази слини від температури свідчить розщеплення цим ферментом крохмалю в різних температурних умовах. Ступінь розщеплення крохмалю визначають за реакцією з розчином Люголя.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю. У 1-у пробірку (дослідну) додають 1 мл розчину слини, в 2-у пробірку (дослідну) – 1 мл прокип'яченого розчину слини; в 3-ю пробірку (контрольну) – 1 мл води. Нагрівають усі 3 пробірки в термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у кожен пробірку додають по 3 краплі розчину Люголя (*йодна проба*).

Про наявність крохмалю свідчить поява *синього кольору*, про його відсутність – *жовте забарвлення* або *прозорий розчин*.

Дослід 2. Вплив рН середовища на активність амілази слини

Принцип реакції. Для амілази слини оптимальне значення дії при рН = 6,8. У дуже кислому та сильно-лужному середовищі активність амілази знижується.

Хід роботи. У 1-у пробірку вносять 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю, додають 0,5 мл розчину слини, 1,0 мл 0,4%-го розчину натрій гідроксиду, у 2-у пробірку – 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю, 0,5 мл розчину слини та 1,0 мл 0,4%-го розчину хлоридної кислоти. Нагрівають в термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у кожену пробірку додають по 3 краплі розчину Люголя (*йодна проба*).

Дослід 3. Визначення специфічності дії амілази слини та сахарози гідролізату дріжджів

Принцип реакції. Специфічність дії ферментів пояснюється збігом просторових конфігурацій активного центру ферменту й субстрату, їх хімічною спорідненістю, що забезпечує утворення фермент-субстратного комплексу і протікання каталітичного процесу. Розрізняють групову (абсолютну, відносну) та індивідуальну (абсолютну, стереохімічну) специфічність ферментів. Амілаза слини розщеплює крохмаль і не діє на сахарозу; сахароза гідролізату дріжджів розщеплює сахарозу й не діє на крохмаль.

а) дія амілази слини на крохмаль і сахарозу

Хід роботи. У 1-у пробірку вносять 0,5 мл розчину слини, додають 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю. Нагрівають в термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у пробірку додають 3 краплі розчину Люголя (*йодна проба*). Якщо відбулося глибоке розщеплення крохмалю під дією амілази слини до мальтози чи глюкози, то у пробірках з'явиться *жовтувате забарвлення*; якщо відбувся частковий гідроліз крохмалю до декстринів, то з реактивом Люголя спостерігатиметься поява *червоно-фіолетового забарвлення*; якщо фермент не подіяв на цей субстрат, то буде *синє забарвлення*.

У 2-у пробірку вносять 0,5 мл розчину слини, додають 0,5 мл 5%-го розчину сахарози. Нагрівають у термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у пробірку додають реактив Фелінга (по 0,5 мл розчинів Фелінга I та Фелінга II). Про відсутність гідролізу сахарози на глюкозу і фруктозу свідчить поява *синього забарвлення*.

б) дія сахарози гідролізату дріжджів на крохмаль і сахарозу

Хід роботи. У 1-у пробірку вносять 0,5 мл гідролізату дріжджів, додають 0,5 мл 1%-го розчину крохмалю. Перемішують, нагрівають у термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у пробірку додають 3 краплі розчину Люголя (*йодна проба*). Про відсутність гідролізу крохмалю свідчить поява *синього забарвлення*.

У 2-у пробірку вносять 0,5 мл гідролізату дріжджів, додають 0,5 мл 1%-го розчину сахарози. Перемішують, нагрівають у термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через 10-15 хв у пробірку додають реактив Фелінга (по 0,5 мл розчинів Фелінга I та Фелінга II). Переконаються в

наявності гідролізу сахарози на глюкозу та фруктозу. Якщо фермент гідролізує сахарозу, то в розчині можна виявити глюкозу за допомогою реактиву Фелінга. При нагріванні відбувається відновлення глюкозою Cu^{2+} до CuOH (жовтий осад) чи Cu_2O (червоний осад).

Дослід 4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини

Принцип реакції. Речовини, які підвищують активність ферментів, називаються активаторами (NaCl), а ті, які пригнічують – інгібіторами (CuSO_4). Активатори, приєднуючись до молекули неактивного ферменту, здатні змінювати її конформацію з утворенням комплексу, що має каталітичну активність. Пригнічувальна дія інгібіторів реалізується шляхом зміни нативної конформації ферменту.

Хід роботи. До 1,0 мл розчину слини додати 5,0 мл дистильованої води.

У 1-у пробірку вносять 1,0 мл розведеної слини, додають 1,0 мл дистильованої води, 5 крапель 1%-го розчину крохмалю.

У 2-у пробірку вносять 1,0 мл розведеної слини, додають 1,0 мл 0,9%-го розчину натрій хлориду, 5 крапель 1%-го розчину крохмалю.

У 3-ю пробірку вносять 1,0 мл розведеної слини, додають 1,0 мл 1%-го розчину купрум (II) сульфату, 5 крапель 1%-го розчину крохмалю.

Вміст трьох пробірок перемішують. Пробірки нагрівають у термостаті або на водяній бані з термометром при $t = 38^\circ\text{C}$. Через 10-15 хв у кожен з трьох пробірок додають по 3 краплі розчину Люголя (йодна проба).

Результати дослідів 1-4 запишіть у таблицю 10 за аналогією:

Таблиця 10

Загальні властивості ферментів

Дослід 1. Механізм дії ферменту амілази слини та її термолабільність				
№ пробірки	Фермент або вода	Субстрат	Температура та час	Йодна проба з реактивом Люголя
1	2	3	4	5
1	Амілаза	Крохмаль	38°C , 10-15 хв	Прозорий розчин
2	Амілаза прокип'ячена	Крохмаль	38°C , 10-15 хв	
3	Вода	Крохмаль	38°C , 10-15 хв	
Дослід 2. Вплив рН середовища на активність амілази слини				
№ пробірки	Фермент	Субстрат	Реактиви, температура та час	Йодна проба з реактивом Люголя
1	2	3	4	5
1	Амілаза	Крохмаль	NaOH , 38°C , 10-15 хв	
2	Амілаза	Крохмаль	HCl , 38°C , 10-15 хв	

Дослід 3. Визначення специфічності дії амілази слини та сахарози гідролізату дріжджів					
№ пробірки	Фермент	Субстрат	Температура та час	Реактив Люголя	Реактив Фелінга
1	2	3	4	5	6
1	Амілаза	Крохмаль	38 °С, 10-15 хв		–
2	Амілаза	Сахароза	38 °С, 10-15 хв	–	
3	Сахараза	Крохмаль	38 °С, 10-15 хв		–
4	Сахараза	Сахароза	38 °С, 10-15 хв	–	
Дослід 4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини					
№ пробірки	Фермент	Субстрат	Реактиви, температура та час	Йодна проба з реактивом Люголя	
1	2	3	4	5	
1	Амілаза	Крохмаль	НОН, 38 °С, 10-15 хв		
2	Амілаза	Крохмаль	NaCl, 38 °С, 10-15 хв		
3	Амілаза	Крохмаль	CuSO ₄ , 38 °С, 10-15 хв		

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.