

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	2
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1.1. Функции слюны	4
1.2. Состав и свойства слюны.....	6
1.3. Ферменты	8
1.4. Фермент амилаза	9
2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ	12
2.1. Исследование влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы.	12
2.1.1. Методика исследования влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы.....	12
2.1.2. Исследование разных концентраций слюны на активность фермента амилазы....	12
2.2. Влияние никотина на активность фермента амилазы.....	14
2.2.1. Методика исследования влияния никотина на активность фермента амилазы.	14
2.2.2 Исследование влияния никотина на активность фермента амилазы.	14
2.3. Влияние спирта на активность фермента амилазы.	15
2.3.1. Методика исследования влияния спирта на активность фермента амилазы.....	15
2.3.2. Исследования влияния спирта на активность фермента амилазы.....	15
2.4. Влияние антибиотиков на активность амилазы.	16
2.4.1. Методика исследования влияния антибиотиков на активность амилазы.....	16
2.4.2. Исследование влияния антибиотиков на активность амилазы.	17
2.5 Влияние солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.	18
2.5.1 Методика исследования влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.	18
2.5.2. Исследования влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.	18
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	20
ЛИТЕРАТУРА	21
<i>Приложение 1. Классификация ферментов</i>	<i>22</i>
<i>Приложение 2. Свойства ферментов</i>	<i>23</i>
<i>Приложение 3. Типы амилаз.....</i>	<i>25</i>

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что самое дорогое у человека – это его здоровье, которое невозможно купить и которое во многом зависит не только от правильного питания, но и от правильного приёма пищи.

Окружающая среда прямо и косвенно влияет на здоровье человека. Нормально функционировать организм может лишь в определённом диапазоне значений различных параметров внешней и внутренней среды. Чем ближе значение параметров к оптимумам, тем меньше энергии затрачивает организм для поддержания жизненных процессов.

Частичное расщепление сложных углеводов начинается уже в ротовой полости, т.к. слюна содержит амилазу и мальтазу – ферменты, расщепляющие полисахариды до мальтозы и моносахаридов. Хорошо измельченная, обильно пропитанная слюной пища легко переваривается и хорошо усваивается; от активности ферментов слюны зависит здоровье всего пищеварительного тракта, и качество дальнейшей переработки пищи.

Ферменты – это обширная группа биокатализаторов, играющая колоссальную роль в жизнедеятельности животных, растений и микроорганизмов. Благодаря своей каталитической функции разнообразные ферменты обеспечивают быстрое протекание в организме (или вне организма) огромного числа химических реакций. Складываясь в единый ансамбль саморегулируемых биохимических процессов, эти реакции преобразования веществ составляют материальную и энергетическую основу непрерывного самообновления белковых тел, т.е. самой сущности жизненных явлений.

Амилазы широко используются в пищевой промышленности. Так амилазы используются в хлебопечении и технологиях брожения. Также амилаза играет значительную роль в расщеплении крахмала в организме человека. Поэтому понимание действия амилазы важно для оптимизации промышленного производства и изучения обмена веществ в организме человека.

А может слюна служить показателем здоровья человека? Можно ли использовать данную жидкость организма в качестве анализа состояния здоровья человека (например, утомления, или показателя физиологического функционирования органов пищеварения)?

В связи с этим нам было интересно выяснить, какое влияние на свойства слюны будут оказывать концентрация и действие различных факторов.

Мы выдвинули **гипотезу**: активность амилазы слюны зависит от концентрации слюны и действия таких веществ как соли, никотин, спирт и антибиотики.

Цель нашего исследования - выяснить как повлияют на активность амилазы слюны соли, никотин, спирт и антибиотики, а также установить влияние концентрации слюны на активность фермента амилазы.

Задачи:

- ✓ Установить влияние концентрации слюны на активность фермента амилазы.
- ✓ Установить влияние на активность амилазы никотина и спирта.
- ✓ Установить влияние на активность амилазы антибиотиков.
- ✓ Установить влияние на активность амилазы солей хлорида натрия и сульфата меди.

Объект исследования: ферменты слюны

Предмет исследования: активность амилазы слюны в различных условиях.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. *Функции слюны*

Слюна играет огромную роль в поддержании нормального состояния органов и тканей полости рта. Известно, что при гипосаливации, и особенно ксеростомии (отсутствие слюны) быстро развивается воспаление слизистой оболочки рта, а спустя 3-6 мес. наступает множественное поражение зубов кариесом. Отсутствие ротовой жидкости затрудняет пережевывание и глотание пищи. Функции слюны многообразны (см. Приложение, табл. 1), но основными из них являются пищеварительная и защитная.

Пищеварительная функция в первую очередь выражается в формировании и проглатывании пищевого комка. Кроме того, пища в полости рта подвергается первичной обработке и благодаря наличию в слюне L-амилазы углеводы частично гидролизуются до декстранов и мальтозы. Качество и количество отделяемой слюны зависят от особенностей пищевого рациона.

Например, при приеме воды слюна почти не отделяется. В слюне, выделяющейся на пищевые вещества, содержится значительное количество ферментов, она богата муцином. При попадании в ротовую полость несъедобных, отвергаемых веществ выделяется жидкая и обильная слюна, бедная органическими соединениями.

Защитная функция осуществляется благодаря многообразию свойств слюны. Увлажнение и покрытие слизистой оболочки слоем слизи (муцина) предохраняет ее от высыхания, образования трещин и воздействия механических раздражителей. Защитная функция осуществляется путем очищения (смывания) поверхности зубов и слизистой оболочки рта от микроорганизмов и продуктов их метаболизма, остатков пищи, детрита. Важное значение при этом имеет бактерицидное свойство слюны, осуществляемое благодаря действию ферментов (лизоцим, липаза, РНКаза, ДНКаза, опсонины, лейкины и др.).

В осуществлении защитной функции слюны важную роль играет ее свертывающая и фибринолитическая способность. В слюне содержатся тромбопластин, антигепариновая субстанция, протромбин, активаторы и ингибиторы фибринолизина. Эти вещества, обладающие гемокоагулирующей и фибринолитической активностью, играют важную роль в обеспечении местного гомеостаза, улучшении процесса регенерации поврежденной слизистой оболочки. Буферная емкость слюны, нейтрализующая поступающие в полость рта кислоты и щелочи, также служит

проявлением защитного механизма. И, наконец, важную защитную роль играют иммуноглобулины, содержащиеся в слюне.

Минерализующее действие слюны. Оно также является одним из механизмов защитной функции слюны. В основе этого действия слюны лежат механизмы, препятствующие выходу из эмали ее компонентов и способствующие поступлению таких компонентов из слюны в эмаль.

Физико-химическое постоянство эмали полностью зависит от состава и химического состояния окружающей ротовой жидкости. Главным фактором стабильности апатитов эмали в слюне являются рН и концентрация кальция, фосфата и фтористых соединений в растворе.

Таким образом, ротовая жидкость является сложной средой и осуществляет ряд важных функций. Это лабильная среда, и на ее количественный и качественный состав влияет ряд факторов и условий, но в первую очередь - состояние организма. С возрастом уменьшается секреторная функция больших и малых слюнных желез. Происходит нарушение слюноотделения при острых и ряде хронических заболеваний. Так, одним из важных диагностических признаков ящура является избыточное выделение слюны (до 7-8 л в сутки). При гепатохолеститах отмечается гипосаливация, и больные жалуются на сухость в полости рта. При сахарном диабете увеличено содержание глюкозы в ротовой жидкости.

Большое влияние на состав и свойства слюны оказывает гигиеническое состояние полости рта. Ухудшение ухода за полостью рта приводит к увеличению налета на зубах, повышению активности ряда ферментов (фосфатазы, аспарагиновая трансаминаза), увеличению осадка слюны, быстрому размножению микроорганизмов, что создает условия, особенно при частом приеме углеводов, для продуцирования органических кислот и изменения концентрации рН.

Слизистая оболочка в силу анатомо-гистологических особенностей выполняет ряд функций, таких как:

Пластическая функция. Эта функция слизистой оболочки рта объясняется высокой митотической активностью эпителия, которая, по некоторым данным, в 3 - 4 раза выше митотической активности клеток кожи. Это обуславливает высокую регенерационную способность слизистой оболочки рта, часто подвергающуюся различного рода повреждениям.

Чувствительная функция. Осуществляется за счет обилия различных рецепторов". Холодовых, тепловых, болевых, вкусовых, тактильных. Они являются началом

афферентных путей, которые связывают слизистую оболочку с полушариями большого мозга.

Экскреторная функция. В составе слюны могут выделяться некоторые продукты обмена, такие как: мочевины, мочевая кислота, лекарственные вещества (хинин, стрихнин), а также вещества, поступившие в организм (соли ртути, свинца, алкоголь).

Всасывательная функция. Слизистая оболочка рта обладает способностью всасывать ряд органических и неорганических соединений: аминокислот, антибиотиков, лекарственных веществ и др. Установлено, что уровень всасывания можно изменять. Дубильные средства уменьшают поступление веществ, а воздействие физических факторов (электрофорез, ультразвук, фонофорез и др.) увеличивает. На использовании указанных свойств основано применение лечебных паст, эликсиров, ванночек и т. д.

1.2. Состав и свойства слюны

Слюна состоит из 99,0 - 99,4 % воды (H_2O) и 1,0 - 0,6 % растворенных в ней органических минеральных веществ. Список известных составных веществ слюны представлен в алфавитном порядке в трех разделах (белки, низкомолекулярные органические вещества и электролиты) таблицы 2.

Из неорганических компонентов в слюне содержатся кальциевые соли, фосфаты, калиевые и натриевые соединения, хлориды, гидрокарбонаты, фториды, роданиты и др. Ионная активность кальция и фосфора в ротовой жидкости является показателем растворимости гидроксиапатита - и фторапатитов. Установлено, что слюна в физиологических условиях пересыщена по гидроксиапатиту, что позволяет говорить о ней как о минерализующем растворе. Заслуживает внимания тот факт, что растворимость гидроксиапатита в ротовой жидкости значительно увеличивается при снижении ее pH. Значение pH, при котором ротовая жидкость насыщена эмалевым апатитом, рассматривается как критическая величина и, в соответствии с расчетами, подтвержденными клиническими данными, варьируют от 4,5 до 5,5. При pH 4,0 - 5,0, когда ротовая жидкость не насыщена как гидроксиапатитом, так и фторапатитом, происходит растворение поверхностного слоя эмали по типу эрозии (Larsen и др.). В тех случаях, когда слюна не насыщена гидроксиапатитом, но пересыщена фторапатитом, процесс идет по типу подповерхностной деминерализации, что характерно для кариеса. Таким образом, уровень pH определяет характер деминерализации эмали.

Органические компоненты ротовой жидкости многочисленны. В ней содержатся белки, синтезируемые как в слюнных железах, так и вне их. В слюнных железах вырабатываются ферменты: гликопротеиды, амилаза, муцин, а также иммуноглобулины класса А. Часть белков слюны имеет сывороточное происхождение (аминокислоты, мочевины). Видоспецифические антитела и антигены, входящие в состав слюны, соответствуют группе крови. Методом электрофореза выделено до 17 белковых фракций слюны.

Ферменты в смешанной слюне представлены 5 основными группами: карбоангидразами, эстеразами, протеолитическими, ферментами переноса и смешанной группой. В настоящее время в ротовой жидкости насчитывают более 60 ферментов. По происхождению ферменты делятся на 3 группы: секретлируемые паренхимой слюнной железы, образующиеся в процессе ферментативной деятельности бактерий, образующиеся в процессе распада лейкоцитов в полости рта.

Из ферментов слюны, в первую очередь, следует выделить L-амилазу, которая в полости рта частично гидролизует углеводы, превращая их в декстраны, мальтозу, маннозу и др.

В слюне содержатся фосфатазы, лизоцим, гиалуронидаза, кининогенин (калликреин) и калликреинподобная пептидаза, РНКазы, ДНКазы и др. Фосфатазы (кислая и щелочная) участвуют в фосфорно-кальциевом обмене, отщепляя фосфат от соединений фосфорной кислоты и, тем самым, обеспечивая минерализацию костей и зубов. Гиалуронидаза и калликреин изменяют уровень проницаемости тканей, в том числе и эмали зубов.

Наиболее важные ферментативные процессы в ротовой жидкости связаны с ферментацией углеводов и в значительной степени обусловлены количественным и качественным составом микрофлоры и клеточных элементов полости рта: лейкоцитов, лимфоцитов, эпителиальных клеток и др.

Ротовая жидкость как основной источник поступления кальция, фосфора и других минеральных элементов в эмаль зуба влияет на физические и химические свойства эмали зуба, в том числе на резистентность к кариесу. Изменения количества и качества ротовой жидкости имеют важное значение для возникновения и течения кариеса зубов.

1.3. Ферменты

«Ферменты есть возбудители всех химических превращений»

(И.П.Павлов)

Ферменты (или энзимы) – это катализаторы белковой природы, ускоряющие протекание химических реакций.

Чем же эти вещества отличаются от неорганических катализаторов? Во-первых ферментативные реакции протекают исключительно в физиологических условиях, т.к. требуются чёткие значения температуры, давления и кислотности среды.

Например, фермент желудочного сока пепсин способен функционировать только в кислой среде и при 37⁰С. Абсолютно все ферменты являются органическими веществами – белками и соответственно скорость их действия гораздо выше, чем у неорганических катализаторов. Большое разнообразие ферментов и многообразие реакций, катализируемых ферментами, потребовало проведения их классификации. В

настоящее время известно более 3700 ферментов, различающихся по реакциям, которые они катализируют. В 1961 Международный биохимический союз принял единую классификацию ферментов, которая является общепринятой в настоящее время. В соответствии с типом катализируемой реакции ферменты делят на (см. приложение № 1).

По строению ферменты бывают простыми и сложными. В первом случае фермент представлен простым белком, а во втором случае в составе фермента обнаруживается дополнительная группа небелковой природы – кофермент (лабильно связан с белковой частью) или простетическая группа (прочно связана с белком). Примерами простых пищеварительных ферментов являются трипсин и химотрипсин. К сложным ферментам относятся уреаса, каталаза и многие другие.

В простых ферментах биокаталитическую функцию выполняет часть белковой молекулы, получившая название активного центра. Последний представляет собой уникальное сочетание определённых аминокислотных радикалов. Чаще всего в активных центрах ферментов встречаются остатки серина, гистидина, триптофана,



График зависимости активности фермента от температуры

аргинина, цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и тирозина. Аминокислотные остатки, образующие активный центр фермента, расположены в разных точках единой полипептидной цепи. Поэтому активный центр возникает в тот момент, когда белковая молекула приобретает присущую ей третичную структуру.

Следовательно, изменение третичной структуры белка-фермента под влиянием тех или иных факторов может привести к деформации активного центра и существенным образом повлиять на его каталитическую активность.

Частью активного центра фермента является особый участок – так называемый субстратный центр, ответственный за присоединение субстрата, подвергающегося ферментативному превращению. Часто этот участок называют «якорной площадкой» фермента, где, как судно на якорь, закрепляется субстрат.

Наряду с общими свойствами, присущими ферментам как белковым телам, биокатализаторы обладают рядом специфических качеств, тоже вытекающих из их белковой природы. Эти качества отличают ферменты от катализаторов обычного типа. Общие закономерности действия катализаторов как неорганического, так и биологического происхождения, по-видимому, одни и те же. Белковая природа фермента вносит в течение каталитического процесса лишь некоторые своеобразные черты, не изменяя его сущности. Рассмотрим основные свойства ферментов (приложение № 2).

У ферментов имеется свой механизм действия. Его можно разделить на три фазы. На первой фазе ферментативного катализа между субстратом (или субстратами) и ферментом возникает соединение, в котором первые и вторые связаны друг с другом ковалентной или иного типа связью. На второй фазе субстрат под действием присоединенного к нему фермента претерпевает изменение, делающее его более доступным для соответствующей химической реакции. На третьей фазе происходит сама химическая реакция (на поверхности фермента), и, наконец, образовавшиеся продукты реакции освобождаются из фермент-продуктного комплекса. Схематически это можно изобразить следующим образом: (таблица № 1).

1.4. Фермент амилаза

Амилазы – это ферменты, катализирующие гидролиз крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов путём расщепления гликозидных связей между 1-м и 4-м атомами углерода. Неочищенный комплекс амилаз, выделенный из солодовой вытяжки французским учёным Пайеном и Ж.Персо (1833) – диастаз, был первым

ферментным препаратом. Некоторые амилазы уже получены в кристаллическом виде. Фермент этот бывает трех типов, которые представлены в таблице (приложение № 4).

Рассмотрим конкретно амилазу слюны. В ротовой полости пища измельчается при пережёвывании, смачиваясь при этом слюной. Слюна – это прозрачная бесцветная жидкость, выделяющаяся в ротовую полость тремя парами крупных слюнных желез (подчелюстные, околоушные, подъязычные) и множеством мелких слюнных желез полости рта.

Слюна смачивает полость рта, обеспечивает восприятие вкусовых ощущений, смазывает и склеивает пережёванную пищу, способствуя глотанию. Кроме того, слюна очищает полость рта, обладает бактерицидным действием, предохраняет от повреждения зубы. Под действием ферментов слюны в ротовой полости начинается переваривание углеводов.

Слюна обладает рН от 5,6 до 7,6, т.е. имеет слабощелочную реакцию среды. В состав входит вода (99%), муцин (формирует и склеивает пищевой комок), лизоцим (выполняет бактерицидную функцию), ферменты амилаза и мальтоза, которые расщепляют углеводы до олиго- и полисахаридов, а также различные микроэлементы, катионы некоторых металлов, витамины, другие ферменты.

Как уже было сказано, в слюне содержится фермент амилаза, а именно α -амилаза (или α -1,4-гликозидаза), расщепляющая в крахмале α -1,4-гликозидные связи (связи в местах разветвлений), поэтому крахмал переваривается лишь частично с образованием крупных фрагментов – декстринов и небольшого количества мальтозы. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

Действие амилазы слюны прекращается в резко кислой среде содержимого желудка (рН 1,5-2,5). Однако внутри пищевого комка активность амилазы может некоторое время сохраняться, пока рН не изменится в кислую сторону. Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих углеводы. В желудочном содержимом возможен лишь незначительный кислотный гидролиз гликозидных связей.

Так как речь идёт о расщеплении крахмала, следует дать краткую характеристику этого углевода.

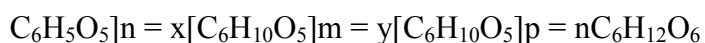
Итак, крахмал – один из наиболее распространённых запасных полисахаридов растений. Он интенсивно накапливается в результате фотосинтеза и откладывается в семенах, клубнях и других частях растений. При кислотном гидролизе крахмал распадается с образованием D-глюкозы. На основании этого логично считать остатки D-глюкозы структурными элементами молекулы крахмала. Вместе с тем гидролиз в присутствии специфического фермента, ускоряющего гидролитический распад

крахмала, приводит к образованию дисахарида мальтозы. Однако её не считают наряду с глюкозой структурной единицей, из остатков которой складывается молекула крахмала. (Изображение фрагмента молекулы крахмала смотреть в приложении № 5)

Природный крахмал состоит из двух различных фракций, отличающихся по своему строению и свойствам. Примерно 20% крахмала составляет амилоза (от греч. “amilon” – крахмал). Остальное приходится на вторую фракцию, получившую название амилопектина (от греч. “pectos” – студнеобразный). Указанная терминология отражает некоторые свойства этих двух видов крахмала. Амилопектин с трудом растворяется в горячей воде, причём раствор получается вязкий (крахмальный клейстер) и при охлаждении застывает в студнеобразную массу. Амилоза же хорошо растворима в тёплой воде и не образует клейстера. Обе фракции крахмала дают окрашивание с раствором йода в йодистом калии, однако амилоза окрашивается в чисто синий цвет, а амилопектин – в фиолетовый.

Декстринизация крахмала при нагревании сопровождается повышением его растворимости в воде. Поэтому обработанный так крахмал называют растворимым. Распад молекул крахмала до декстринов особенно интенсивно идёт при нагревании крахмального клейстера с 10% раствором серной кислоты. При дальнейшей обработке молекулярный вес декстринов прогрессивно падает и конечным продуктом распада становится D-глюкоза. Крупномолекулярные декстрины окрашиваются с йодом в красный цвет, низкомолекулярные окраски с йодом не дают.

Гидролиз крахмала можно выразить следующей схемой:



крахмал эритродекстрины ахродекстрины D-глюкоза.

Эритродекстрины – красный цвет.

Ахродекстрины – оранжевый цвет.

2. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

2.1. Исследование влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы.

2.1.1. Методика исследования влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы.

Исследование влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы мы проводили по методу Вольгемута.

Для проведения эксперимента необходимо оборудование: водяная баня, пробирки (6 шт.), пипетка, раствор крахмала, раствор йода, раствор слюны, вода.

Для исследования влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы наливают в пробирки 1 мл воды, в первую пробирку добавляют 1 мл раствора слюны. Перемешивают и 1 мл данной смеси переводят во 2-ую пробирку и так до последней, а из 6-ой выливают 1 мл смеси. Затем добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала помещают в водяную баню (t° 37) на 30 минут. После охлаждения холодной водой, добавляют по 1 капле 0,125% раствора йода и перемешивают. В пробирках фиксируют окраску растворов.

Фермент амилаза осуществляет гидролиз крахмала до мальтозы, которая затем расщепляется на две молекулы глюкозы. Нерасщеплённый крахмал даёт синее окрашивание с йодом, а продукты его распада – декстрины – дают разное окрашивание в зависимости от размера своей цепи: фиолетовое, красно-бурое, оранжевое или вообще не окрашивают. Мальтоза и глюкоза окрашивания с йодом не дают.

2.1.2. Исследование влияния концентрации слюны на активность фермента амилазы.

Первым этапом было приготовление растворов йода, крахмала и слюны. Для приготовления 0,125% раствора йода мы взяли аптечный йод (5%), разбавили его в 40 раз. Что бы получить 1% раствора крахмала мы взвесили 2 грамма крахмала и добавили его в 200 мл горячей воды. Перемешали и прокипятили. А раствор слюны мы готовили так: прополоскали рот, затем набрали 20 мл чистой воды и продержали во рту 2 минуты.

Далее взяли 6 пробирок. В каждую добавили по 1 мл воды. В первую пробирку добавили 1 мл раствора слюны. Перемешали и 1 мл данной смеси перевели во 2-ую пробирку и так до последней, а из 6-ой вылили 1 мл смеси.

Для определения концентрации слюны мы произвели расчеты поэтапно:

- 1/10 мл слюны расщепляет 2 мл 1% раствора крахмала

1 мл слюны расщепляет X мл 1% раствора крахмала

$$X = 1 \cdot 2 : 1/10 = 2 : 1/10 = 20$$

- 1/20 мл слюны расщепляет 2 мл 1% раствора крахмала

1 мл слюны расщепляет X мл 1% раствора крахмала

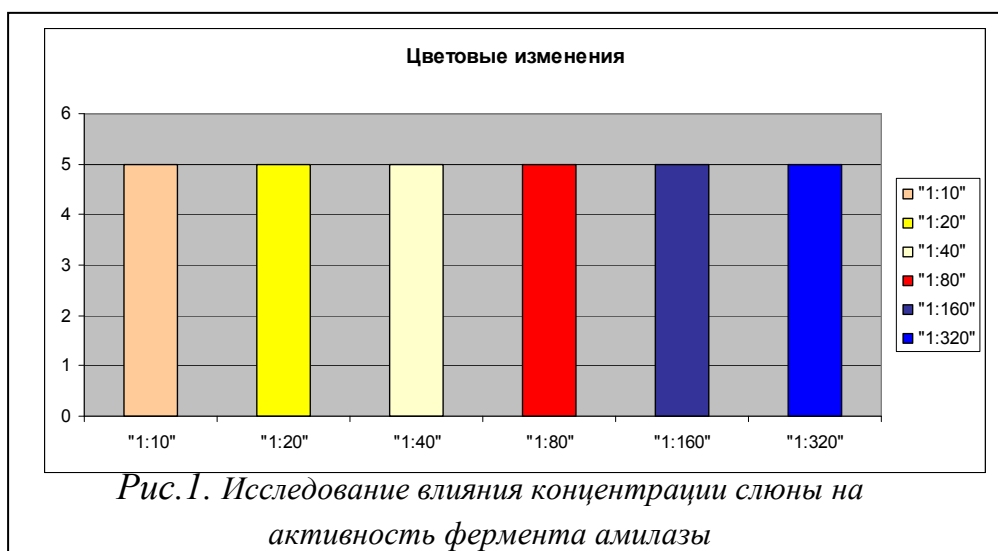
$$X = 1 \cdot 2 : 1/20 = 2 : 1/20 = 40 \text{ и так далее.}$$

Таким образом, получили различную концентрацию слюны от 1:10 до 1:320 (см. табл.2)

Таблица 2. Исследование разных концентраций слюны на активность фермента амилазы

№ пробирки	№1	№2	№3	№4	№5	№6
Концентрация слюны	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
Окраска с йодом	Темно-жёлтый цвет	Жёлтый цвет	Светло- жёлтый цвет	Красный цвет	Фиолетовый цвет	Синий цвет

Во все 6 пробирки налили по 1 мл воды и по 2 мл 1% раствора крахмала, перемешали и встряхнули. Поместили на водяную баню ($t^{\circ} 37$) на 30 минут. После охладили холодной водой, добавили по 1 капле 0,125% йода. Получили растворы различной окраски от темно-желтой до синей (см. рис. 1), т.е. в пробирке №1 с концентрацией слюны 1:10 гидролиз крахмала протекает быстро, чем ниже концентрация слюны, тем расщепление крахмала под действием амилазы идёт медленнее, в пробирке №6 с концентрацией слюны 1:320 крахмал не расщепляется.



Таким образом, мы установили, что активность фермента амилазы зависит от концентрации слюны: чем выше концентрация слюны, тем быстрее происходит расщепление крахмала (см. рис.1).

2.2. Влияние никотина на активность фермента амилазы.

2.2.1. Методика исследования влияния никотина на активность фермента амилазы.

Оборудование: пробирки (2шт), пипетка, 1% раствор крахмала, 0,125 % раствор йода, растворы слюны курящего и не курящего человека.

В пробирки добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 2 капли 0,125% раствора йода, встряхивают. В первую пробирку добавляют 2 мл раствора слюны некурящего человека. Во вторую столько же мл раствора слюны курящего человека.

2.2.2 Исследование влияния никотина на активность фермента амилазы.

В обе пробирки добавляем по 2 мл 1% раствора крахмала и по 2 капли 0,125% раствора йода, встряхиваем. В первую пробирку добавляем 2 мл раствора слюны некурящего человека. Во вторую столько же мл раствора слюны курящего человека.

В результате проделанного опыта мы наблюдали, что в первой пробирке синее окрашивание исчезает и в дальнейшем раствор обесцвечивается. Во второй пробирке где находилась слюна некурящего человека раствор остаётся синим (см.рис.2). Результаты влияния никотина на активность фермента амилазы приведены в таблице 3.

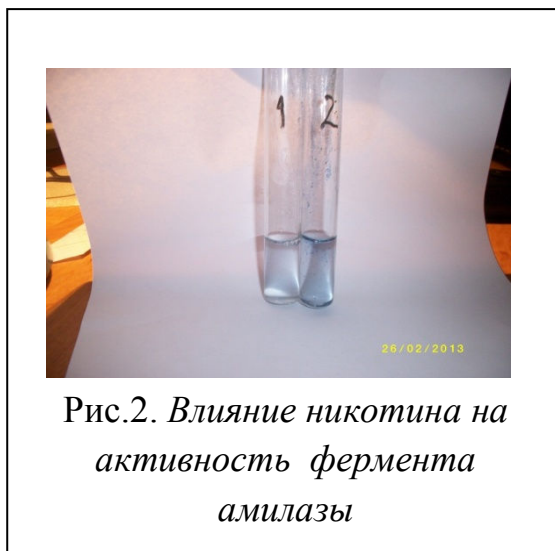


Рис.2. Влияние никотина на активность фермента амилазы

Таблица 3. Влияние никотина на активность фермента амилазы.

№ пробирки	Содержимое пробирок	Окраска с йодом
1	Крахмал, слюна некурящего человека	синее окрашивание исчезает со временем
2	Крахмал, слюна курящего человека	синее окрашивание не исчезает

Таким образом, синий цвет во второй пробирке, говорит нам о том, что расщепление крахмала не произошло, а это значит, что никотин угнетающе воздействует на активность амилазы (см. рис.3)

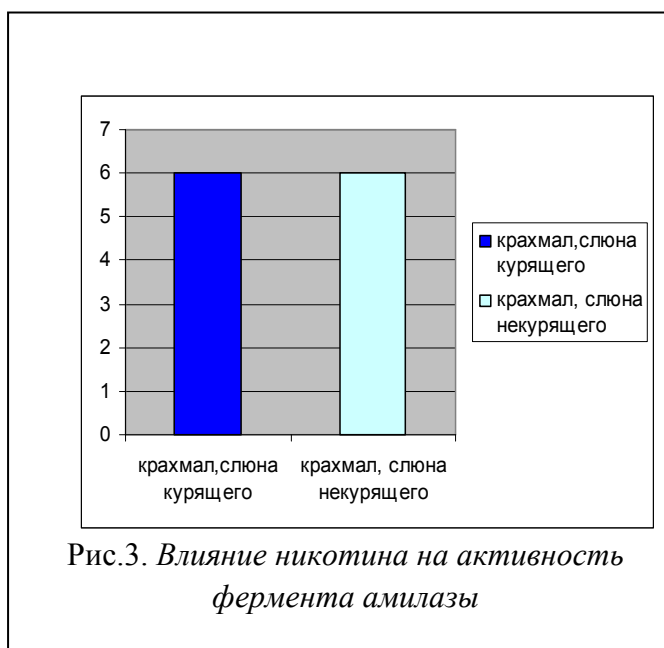


Рис.3. Влияние никотина на активность фермента амилазы

2.3. Влияние спирта на активность фермента амилазы.

2.3.1. Методика исследования влияния спирта на активность фермента амилазы.

Оборудование: пробирки (2шт), пипетка, 1%раствор крахмала, 0,125% раствор йода, раствор слюны.

Берут 2 мл 1% раствора крахмала, по 2 капле 0,125 % раствора йода и по 2 мл раствора слюны. Встряхивают. В первую пробирку добавляют 1 каплю этилового спирта, а во вторую 1 каплю воды.

2.3.2. Исследования влияния спирта на активность фермента амилазы.

В обе пробирки добавляем по 2 мл 1% раствора крахмала, по 2 капле 0,125 % раствора йода и по 2 мл раствора слюны. Встряхиваем. В первую пробирку добавили 1 каплю воды, а во вторую 1 каплю этилового спирта (см. рис.4).

В ходе опыта мы наблюдали, что во второй пробирке, где присутствовал этиловый спирт, раствор остаётся синим, а в первой



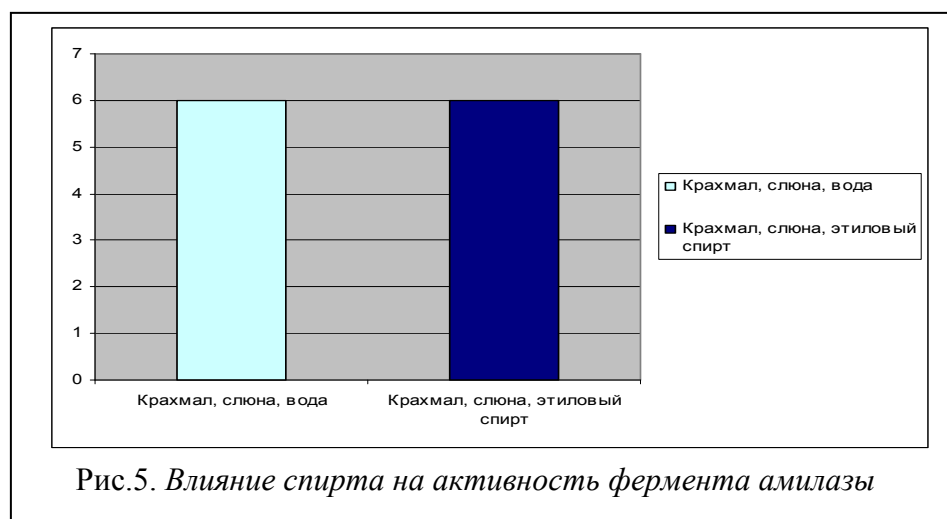
Рис.4. Влияние спирта на активность фермента амилазы

появившееся синее окрашивание исчезает(см. таблицу 4).

Таблица 4. Влияние спирта на активность фермента амилазы.

№ пробирки	Содержимое пробирок	Окраска с йодом
1	Крахмал, слюна, вода	синее окрашивание исчезает со временем
2	Крахмал, слюна, этиловый спирт	синее окрашивание не исчезает

Таким образом, синий цвет в первой пробирке говорит нам о том, что расщепления крахмала не произошло, следовательно, спирт негативно влияет на активность амилазы (см.рис.5)



2.4. Влияние антибиотиков на активность амилазы.

2.4.1. Методика исследования влияния антибиотиков на активность амилазы.

Оборудование: пробирки (2шт), пипетка, 1% раствор крахмала, 0,125% раствор йода, раствор слюны, антибиотик «Амоксицилин».

Для исследования влияние антибиотиков на активность амилазы в пробирки добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала, по 2 капли 0,125% раствора йода и по 2 мл раствора слюны. В первую пробирку добавляют 1 каплю антибиотика. Во вторую пробирку добавляют 1 каплю воды. Встряхивают.

2.4.2. Исследование влияния антибиотиков на активность амилазы.

В обе пробирки добавляем по 2 мл 1% раствора крахмала, по 2 капли 0,125% раствора йода и по 2 мл раствора слюны. В первую пробирку добавляем 1 каплю антибиотика. Во вторую пробирку добавляем 1 каплю воды. Встряхиваем.

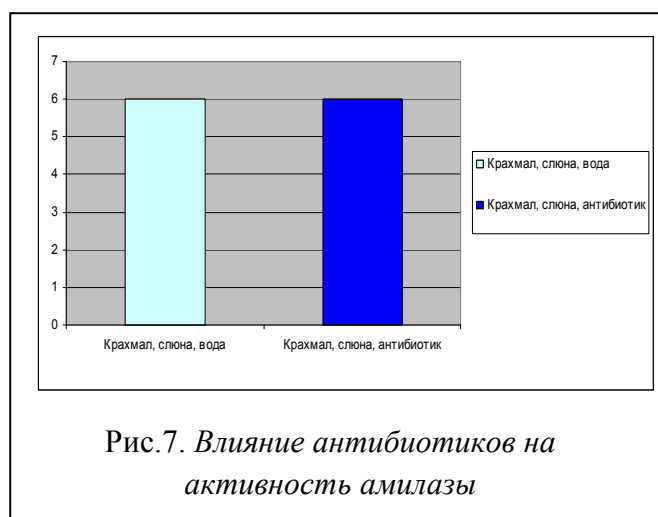
В пробирке, где находился антибиотик, содержимое окрасилось в синий цвет, в пробирке, где вместо антибиотика была вода, в растворе появившееся синее окрашивание исчезает. В таблице 5 представлены результаты проведенного опыта.



Таблица 5. Влияние антибиотиков на активность амилазы.

№ пробирки	Содержимое пробирок	Окраска с иодом
1	Крахмал, слюна, вода	синее окрашивание исчезает со временем
2	Крахмал, слюна, антибиотик «Амоксициклин»	синее окрашивание не исчезает

Таким образом, синий цвет говорит нам о том, что антибиотик угнетающе повлиял на активность амилазы и помешал ей расщепить крахмал (см. рис.7).



2.5 Влияние солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.

2.5.1 Методика исследования влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.

Оборудование: пробирки (3шт), пипетка, 1%раствор крахмала, 0,125%раствор йода, раствор слюны, раствор поваренной соли, раствор сульфата меди.

В пробирки добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала, по 1 капле 0,125% раствора йода. В первую пробирку добавляют 1 каплю хлорида натрия (поваренной соли), во вторую пробирку 1 каплю сульфата меди, а в третью пробирку 1 каплю воды. Все пробирки встряхивают и добавляют в каждую пробирку по 1 мл раствора слюны.

2.5.2. Исследования влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.

В три пробирки добавляем по 2 мл 1% раствора крахмала, по 1 капле 0,125% раствора йода. В первую пробирку добавим 1 каплю хлорида натрия (поваренной соли), во вторую пробирку 1 каплю сульфата меди, а в третью пробирку 1 каплю воды. Все пробирки встряхнули и добавили в каждую пробирку по 1 мл раствора слюны.

В пробирке с хлоридом натрия раствор окрасился сначала в синий цвет, но окрашивание быстро исчезло. В пробирке с сульфатом меди раствор остаётся синим. В пробирке с водой проявившееся синее окрашивание со временем исчезает, но исчезает медленнее, чем в пробирке с хлоридом натрия (см. рис.8). Результаты исследования влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы приведены в таблице 6.

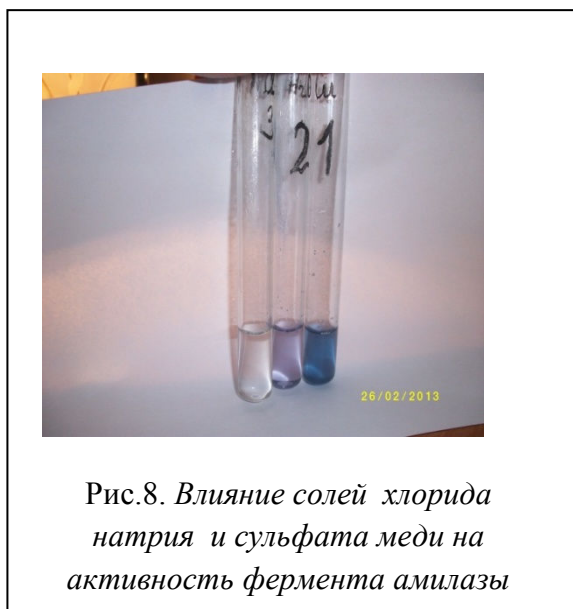


Рис.8. Влияние солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы

Таблица 6. Влияние солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы.

№ пробирки	Содержание пробирок	Окраска с йодом
1	Крахмал, амилаза, CuSO ₄	синее окрашивание не исчезает
2	Крахмал, амилаза, вода	синее окрашивание исчезает со временем
3	Крахмал, амилаза, NaCl	синее окрашивание исчезает быстрее, чем с водой

Таким образом, синий цвет в пробирке с сульфатом меди говорит нам о том, что амилаза не расщепила крахмал, следовательно, данное вещество угнетающе воздействует на активность этого фермента, так как с хлоридом натрия синее окрашивание исчезло. Это значит, что эти вещества не понижают активность амилазы. Значит ионы Cl активирует амилазу, ионы Cu – ингибиторы для всех ферментов, т.к. типичный металл вызывает денатурацию белка (см.рис.9)

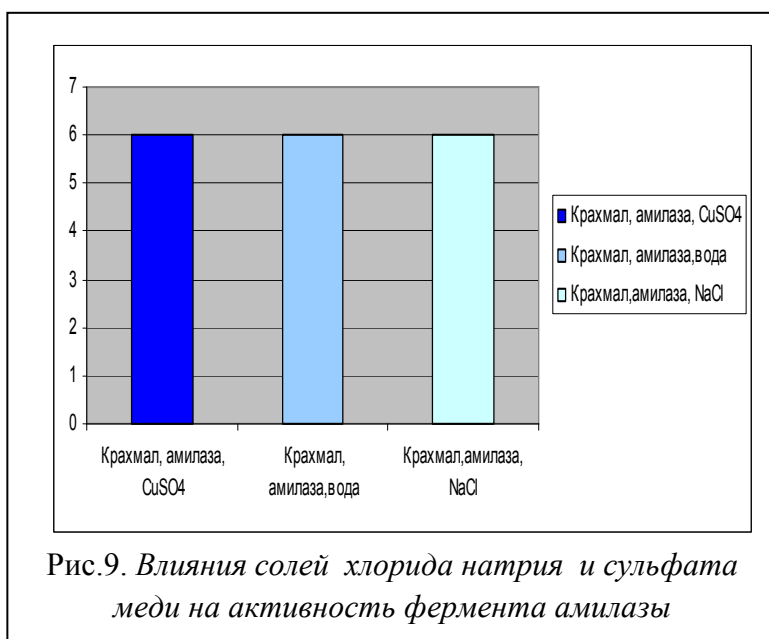


Рис.9. Влияния солей хлорида натрия и сульфата меди на активность фермента амилазы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования гипотеза о том, что различные вещества влияют на активность фермента амилазы, подтвердилась. Нами были сделаны следующие выводы:

1. Чем ниже концентрация слюны, тем расщепление крахмала под действием амилазы идёт медленнее.

2. Никотин, этиловый спирт и антибиотики снижают активность фермента амилазы.

3. Поваренная соль (хлорид натрия) повышает активность амилазы - является активатором (способствует образованию активного центра).

4. Все соли тяжёлых металлов, например медный купорос (сульфат меди), снижает активность амилазы - является ингибитором, блокирующим активный центр.

На основе полученных результатов, хотели бы мы, предложить несколько советов правильного приёма пищи:

1. Температура, потребляемой пищи должна быть в пределах 37 – 40 0С.
2. Тщательно пережёвывать пищу, т.к. чем дольше пища задерживается в ротовой полости, тем больше поступление слюны в пищевой комок и мельче его составные компоненты. Тем самым больше концентрация ферментов и поверхность соприкосновения реагирующих веществ, и выше скорость реакции гидролиза.
3. Если есть необходимость в приеме антибиотиков, то применять их нужно в виде инъекций.
4. Вести здоровый образ жизни, т.е. отказаться от алкоголя и сигарет.
5. Разумно сочетать потребляемые продукты:
 - нельзя в один приём употреблять крахмалосодержащие продукты с кислыми.
 - нужно сочетать крахмалосодержащие продукты с солёными.

Выполняя эти несложные предписания, можно уберечь себя от нежелательных последствий в нарушении пищеварительной системы.

«Наше здоровье – в наших руках»

ЛИТЕРАТУРА

1. Амилаза // Википедия [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Амилаза>. – Дата доступа: 15.12.2012.
2. Биохимия: Учеб. Для вузов. / Комов В.П., Шведова В.Н.- М.: Дрофа, 2004. С. 239-240.
3. Классификация ферментов // Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: <http://www.medical-enc.ru/20/ferment-classification.shtml>. – Дата доступа: 29.01.2013.
4. Полтырев С.С. Состав и свойства слюны / С.С.Полтырев // Физиология пищеварения [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: http://www.medchitalka.ru/fiziologiya_pischevareniya/pischevarenie_v_rotovoy_polosti_i_glotanie/19815.html. – Дата доступа: 15.01.2013.
5. Ферменты // Википедия [Электронный ресурс]. – 2013. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Ферменты>. – Дата доступа: 12.01.2013.
6. Функции слюны // Пищеварительная система [Электронный ресурс]. – 2011. – Режим доступа: http://www.novostioede.ru/article/funkcii_sluny/. – Дата доступа: 15.01.2013.

Приложение 1. Классификация ферментов

Оксидоредуктазы.	Ускоряют окислительно-восстановительные реакции. Дегидрогеназа, редуктаза, оксидаза.
Гидролазы.	Разрыв внутримолекулярных связей в субстрате (кроме С-связей) путём присоединения молекул воды. Пепсин, трипсин.
Трансферазы	Ускоряют процессы переноса групп и молекулярных остатков. Участвуют в реакциях взаимопревращения различных веществ, обезвреживания природных и чужеродных соединений. Гексокиназа, фосфофруктокиназа.
Лиазы.	Катализируют разрыв С-С, С-О, С-N и других связей, а также обратимые реакции Отщепления различных групп негидролитическим путём. Декарбоксилазы карбоновых кислот.
Изомеразы.	Ускоряют процессы внутримолекулярных превращений (перенос атомов водорода, фосфатных групп и ацильных групп, изменение пространственного расположения атомных группировок, перемещение двойных связей и т.п.)
Лигаза.	Катализируют присоединение друг к другу двух молекул с использованием молекул АТФ. Лигазам, катализирующим синтез связей С-О, принадлежит важнейшая роль в биосинтезе белков.

Приложение 2. Свойства ферментов

<p>Термолабильность</p>	<p>Температура воздействует, с одной стороны, на белковую часть фермента, приводя при слишком высоких значениях к денатурации белка, т.е. снижению каталитической функции, а с другой стороны, оказывает влияние на скорость реакции образования фермент/субстратного комплекса и на все последующие этапы преобразования субстрата, что ведёт к усилению активности катализа. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом. Для ферментов животного происхождения он лежит между 35 и 40 С⁰. У растений между 50 и 60 С⁰. Однако есть ферменты с более высоким температурным оптимумом. Например, у папаина (фермент растений, ускоряющий гидролиз белка) он находится при 80 С⁰. В то же время у каталазы (ускоряет распад перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода) оптимальная температура действия находится между 0 и 10 С⁰.</p>
<p>Зависимость активности фермента от значения рН среды</p>	<p>Для каждого фермента существует оптимальное значение рН среды, при котором он проявляет максимальную активность. Влияние концентрации водородных ионов на каталитическую активность ферментов состоит в воздействии на её активный центр. При разных значениях рН в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизирован, больше или меньше экранирован соседними с ним фрагментами полипептидной цепи белковой части фермента и т.д. Кроме того, рН среды влияет на степень ионизации субстрата, ф/с комплекса и продуктов реакции, оказывает большое влияние на состояние ферментного белка, определяя соотношение в нём катионных и анионных центров, а это сказывается на третичной структуре белковой молекулы</p>

<p>Специфичность</p>	<p>Это свойство было открыто ещё в прошлом столетии, когда было ещё сделано наблюдение, что очень близкие по структуре вещества – пространственные изомеры альфа и бета метилглюкозиды – расщепляются по эфирной связи двумя совершенно разными ферментами. Бета – метилглюкозид гидролизуется по эфирной связи ферментом из семян горького миндаля. По образному выражению, нередко употребляемому в биохимической литературе, фермент подходит к субстрату, как ключ к замку. Несомненно, что специфичность ферментов объясняется в первую очередь совпадением пространственной конфигурации субстрата и участка молекулы ферментного белка. По-видимому, только тогда, когда совпадение это достаточно точно, может образовываться ф/с комплекс, а, следовательно, начинается процесс ферментативного катализа.</p>
<p>Влияние ингибиторов и активаторов</p>	<p>К числу активаторов, повышающих активность ферментов, относятся ионы многих металлов и немногочисленная группа анионов. Особенно часто в качестве активаторов выступают ионы цинка, магния, марганца, калия, кобальта, а из анионов – хлора. Причём в одних случаях ионы металлов входят в состав простетической группы фермента, в других облегчают образование ф/с комплекса или же действуют иными путями. Ингибиторы тормозят действие ферментов. Механизм ингибирующего действия разнообразен, но в большинстве случаев сводится к двум типам торможения: конкурентному и неконкурентному. При конкурентном торможении ингибитор, обладающий структурным сходством с субстратом, соединяется с ферментом, подменяя собой субстрат, конкурируя с ним. Так как часть фермента расходуется на образование комплекса фермент – ингибитор, количество образующегося ф/с.</p>

Таблица 1. Механизм действия ферментов

<p>Требуется какая-то реакция: $A+B = AB$, где А и В – это исходные вещества, а АВ – это продукт реакции.</p> <p>Чтобы ускорить эту реакцию требуется вмешательство фермента: $A+F(\text{фермент}) = AF$ – фермент-субстратный комплекс.</p> <p>Далее ф/с комплекс соединяется со вторым реагентом: $AF + B = AB + F$ (и в конце фермент освобождается от фермент-продуктного комплекса).</p>

Приложение 3. Типы амилаз

α-амилаза	В-амилаза	γ-амилаза
<p>Является кальций-зависимым ферментом. К этому типу амилаз относится амилаза слюнных желез и амилаза поджелудочной железы. Она способна гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов в любом месте. Таким образом, процесс гидролиза ускоряется и приводит к образованию олигосахаридов различной длины. У животных α-амилаза оптимальная при нейтральной рН 6,7-7,0. Фермент обнаружен так же у растений (например, в овсе), в грибах (в аскомицетах и базидиомицетах) и бактериях.</p>	<p>Присутствует у бактерий, грибов и растений. У животных отсутствует. Она отщепляет вторую концевую α-1,4-гликозидную связь, образуя, таким образом, дисахарид мальтозу. При созревании фруктов β-амилаза расщепляет плодовой крахмал на сахара, что приводит к сладкому вкусу зрелых плодов. В семенах β-амилаза активна на стадии предшествующей прорастанию, тогда как α-амилаза важна при непосредственном прорастании семян.</p>	<p>Отщепляет последнюю α-1,4-гликозидную связь, приводя к образованию глюкозы. Кроме того, γ-амилаза способна гидролизоваться α-1,6 – гликозидную связь. В отличие от других амилаз, эта наиболее активна в кислых условиях при рН 3.</p>