Verslag Hydrolasen

1. Kinetische studie van het speekselamylase
   1. **Samenvatting/doel**  
      De concentratie speeksel-amylase (S-amylase) is zodanig groot dat we eerst een seriële verdunningsreeks moeten maken. Hierbij wordt het speeksel (student 2) vijftig keer verdund, daarna volgen nog vijf verdunningen. Nadien worden twee testen uitgevoerd namelijk: enerzijds de oriëntatietest en anderzijds de kinetische studie.   
      **Oriëntatietest**: de proefbuizen worden geïncubeerd gedurende 5min. bij 37 graden celcius. Hierna wordt er een Lugol-oplossing toegevoegd (buis met sterkste kleuring wordt later gebruikt als buis X in de kinetische studie).  
      **Kinetische studie**: deze houdt in dat we een lugol- en fehlingreactie uitvoeren op vier proefbuizen; bij de lugol-reactie worden vier proefbuizen gebruikt die elk een verschillende incubatietijd hadden (5’, 15’, 30’ en 45’) en bij de fehlingreactie worden vier profbuizen gedurende vijf minuten in een kokend bad gestoken.
   2. **Oriëntatietest**  
      kleurcontrole na vijf minuten na toevoeging lugolreagens

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Waarneming** |
| **Buis 1’** | Licht blauw |
| **Buis 2’ (buis X)** | Donker blauw (sterkste blauwe kleur) |
| **Buis 3’** | Donker blauw |
| **Buis 4’** | Donker blauw |
| **Buis 5’** | Donker blauw |
| **Buis 6’** | Donker blauw |

Verklaring: We voeren de lugol-reactie uit om aan te tonen of er nog zetmeel in de oplossing aanwezig is. Amylose (de onvertakte koolhydraat van zetmeel) adsorbeert namelijk jodium in zijn ruimtelijke spiraalstructuur. Die adsorptie geeft een diep blauw-paarse kleur aan het jodium zetmeel complex. Hieruit volgt dat als het mengsel bij het uitvoeren van de lugolreactie blauw is en blijft er nog polysachariden aanwezig zijn en dat het S-amylase genoeg verdund is om de rest van de proef uit te voeren dit was dan het geval bij proefbuis 2’, dus gaan we verder met proefbuis 2.

* 1. **Kinetische studie op buis X**

**Waarneming proefbuis na toevoegen Fehling- of Lugolreagens**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Waarneming Fehling** | **Waarneming Lugol** |
| **BUIS a (5’)** | Donker blauw met baksteenrode neerslag | Donkerblauw |
| **BUIS b (15’)** | Ook donker blauw met meer rode neerslag | Donker blauw/paars |
| **BUIS c (30’)** | Donker blauw, nog meer rode neerslag | Lichtblauw/lichtpaars |
| **BUIS d (45’)** | Baksteenrode kleur | Lichtblauw/lichtpaars |

Verklaring: - Speekselamylase zorgt voor de omzetting van polysachariden in maltose, maltotriose en α-limit-dextrines deze sachariden bezitten een reducerende groep die zorgt voor de reductie van Cu (II+) naar Cu (I+) (= fehlingreactie). Het Cu+-tartraat complex is onoplosbaar wat de baksteenrode neerslag veroorzaakt. Hoe langer de incubatie, hoe meer neerslagvorming, omdat het amylase meer tijd had om in te werken.   
- Zoals eerder uitgelegd betekent de donkerblauwe kleur van lugol dat er nog steeds zetmeel aanwezig is. Wederom deed het amylase beter zijn werking na een langere incubatietijd en zorgde het dus voor een lichtere blauwe kleur. Dit stemt overeen met de fehlingreactie.

1. Invloed van de pH op de trypsineactiviteit
   1. Samenvatting/doel

In deze proef onderzoeken we de trypsineactiviteit bij verschillende pH-waarden. Trypsine is een serine protease peptidase , het breekt eiewitten optimaal af in een licht alkalisch midden nl. bij pH 8. We zullen in 2 reactiemengsels 5% HCl of 10% NaOH toevoegen om de pH te wijzigen. Door de pH te wijzigen wijzigen we ook de enzymatische activiteit. De hoeveelheid overgebleven eiwitten wordt geschat door het vergelijken van de relatieve hoeveelheden eiwitneerslag na het toevoegen van trichloorazijnzuur( TCA). TCA denatureert de eiwitten irreversibel en slaat ze neer. Hoe minder eiwit er is neergeslagen des effectiever het trypsine heeft gefunctioneerd.

* 1. Waarnemingen

**Relatieve hoeveelheden eiwitneerslag na toeveogen TCA**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Waarneming** |
| **BUIS 1** | Klein beetje neerslag |
| **BUIS 2** | Beetje meer neerslag |
| **BUIS 3** | Ongeveer evenveel als in buis 2 |
| **BUIS 4** | Heel veel witte neerslag aanwezig ( meeste ) |

* 1. Verklaring

- Buis 1: De trypsine-activiteit was optimaal aangezien de pH 8 was ( =optimum pH) Dus hier hebben we de minste neerslag.

- Buis 2: Bij zure pH ( agv. HCl) zien we een verminderde enzymatische activiteit, waardoor we meer eiwit neerslag hebben. Dus trypsine breekt minder eiwitten af tot aminozuren, waardoor de eiwitten wel neerslaan door TCA. De pH-waarde ligt immers te ver van het optimum.

- Buis 3: Bij basische pH ( agv. NaOH) ) zien we een verminderde enzymatische activiteit, waardoor we meer eiwit neerslag hebben. Dus trypsine breekt minder eiwitten af tot aminozuren, waardoor de eiwitten wel neerslaan door TCA. De pH-waarde ligt immers te ver van het optimum.

- Buis 4: Hier werd geen trypsine toegevoegd, waardoor alle eiwitten konden neerslaan agv. TCA. Hierdoor hebben we de meeste neerslag.

1. Galzouten
   1. Samenvatting/doel  
      Galzuren ontstaan in de lever bij omzetting van cholesterol. De detergenswerking tonen we aan door het toevoegen van zwavelpoeder en een natriumtaurocholaat-oplossing aan water.
   2. Waarnemingen  
      Wanneer we zwavelpoeder toevoegen aan water zien we dat het het poeder op het water blijft drijven. Als we dan de natriumtaurocholaat-oplossing aan het mengsel toevoegen, zien we dat het zwavelpoeder gaat zinken.
   3. Verklaring  
      Zwavelpoeder is een apolaire stof, water is polair. Dit zorgt voor een slechte oplosbaarheid. Natriumtaurocholaat is amfifatisch en brengt het water en zwavel beter met elkaar in contact. Hierdoor wordt het contact oppervlak vergroot. Dit zorgt er voor dat er in plaats van grote zwavel’druppels’ , kleine zwavel’druppeltjes’ gevormd worden.
2. Algemene conclusie

We kunnen bij de eerste proef concluderen dat hoe langer een enzym kan inwerken hoe beter het haar functie kan uitoefenen. In dit geval dus de omzetting van polysachariden naar maltose, maltotriose en α-limit dextrines door amylase.

Bij de tweede proef besluiten we dat de omstandigheden waarin het enzym zich bevindt een grote invloed hebben op zijn werking. Zo kan een te hoge of te lage pH een enzym volledig stoppen. In dit geval werkte het enzyme trypsine het best bij een pH van 8.

Bij de laatste proef ondervonden we de functie van galzouten. Galzouten werken als detergens. Ze bevatten zowel een polair als een apolair deel waarmee ze micellen kunnen vormen. Het zal zo het contactoppervlak met water proberen verhogen.