

Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

Лабораторная № 10

- **Опыт Изучение влияния концентрации фермента на гидролиз сахарозы, катализируемый сахаразой (инвертазой)**

Материалы и оборудование

- 2%-ный раствор сахарозы
- 1, 0,75 и 0,5%-ные растворы сахарозы (инвертазы)
- Реактив Бенедикта
- 12 пробирок со штативом
- Водяные бани с температурой 38 и 100°C
- Стеклянные палочки
- Таймер
- Дистиллированная вода
- Этикетки
- Бунзеновская горелка

Методика

- 1. Добавьте 2 мл прозрачного синего реактива Бенедикта к 2 мл прозрачного бесцветного 1%-ного раствора сахаразы. Нагрейте смесь на водяной бане при 100°C в течение 5 мин (реакция Бенедикта).
- 2. Повторите процедуру 1 с 2 мл прозрачного бесцветного 2%-ного раствора сахарозы, а затем с 2 мл дистиллированной воды.
- 3. 5 мл 1%-ного раствора сахаразы доведите до кипения.
- 4. В восемь чистых сухих пробирок с этикетками 1-8 влейте по 1 мл реактива Бенедикта.

- 5. Влейте 5 мл 2%-ного раствора сахарозы в пробирку с этикеткой S и поместите на водяную баню, в которой на протяжении всего эксперимента поддерживается температура 38°C.
- 6. Влейте 5 мл 1%-ного раствора сахаразы в пробирку с этикеткой E и поместите на водяную баню с температурой 38°C.
- 7. Выдержите обе пробирки вместе с их содержимым на водяной бане в течение 5 мин для того, чтобы они приобрели нужную температуру.
- 8. Добавьте раствор фермента к раствору сахарозы и переверните пробирку, чтобы хорошо перемешать эти два раствора

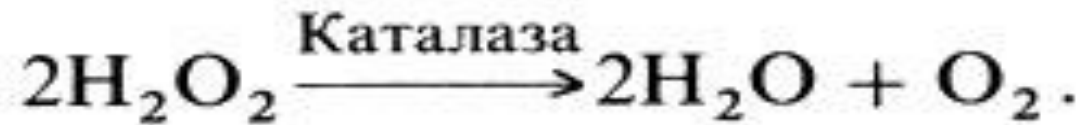
- 9. Сразу же включите отсчет времени и вновь поставьте пробирку, содержащую реакционную смесь, на водяную баню.
- 10. В течение всего опыта непрерывно перемешивайте реакционную смесь.
- 11. После 30 с инкубации перенесите 1 мл смеси в пробирку 1.
- 12. С интервалами в 30 с отберите такие же пробы и перенесите их по очереди в пробирки 2-8.

- 13. Нагрейте пробирки 1-8 на водяной бане с температурой 100°C в течение 5 мин. Отметьте время первого появления кирпично-красного осадка, свидетельствующего о положительной реакции на редуцирующий сахар.
- 14. Повторите тот же эксперимент, используя на этот раз прокипяченный раствор фермента (см. п. 3).
- 15. Повторите всю последовательность процедур дважды: с 0,75%-ным и 0,5%-ным растворами сахарозы.
- 16. Зафиксируйте наблюдения и объясните полученные результаты.

Лабораторная № 11

- **Опыт. Изучение распределения каталазы в намоченных семенах гороха и влияния температуры на активность этого фермента**

Каталаза - это фермент, катализирующий разложение пероксида водорода с образованием молекулярного кислорода, выделяющегося в виде пузырьков газа:



Пероксид водорода образуется в некоторых растительных и животных клетках в качестве побочного продукта метаболизма. Соединение это токсично для клеток, и каталаза обеспечивает эффективное его удаление. Каталаза - один из наиболее быстро работающих ферментов: при 0°C одна молекула каталазы разлагает в 1 с до 40000 молекул пероксида водорода. Локализуется каталаза в микротельцах и пероксисомах.

Материалы и оборудование

- Горсть намоченного гороха
- Раствор пероксида водорода
- Пробирки со штативом
- Водяные бани с температурой 40, 60, 70, 80 и 100°C
- Часы
- Термометр
- Скальпели, ножницы и пинцеты
- Держатель для пробирок
- Стеклянная палочка
- Белая кафельная плитка

Методика

- 1. Убедитесь в наличии каталазы. Для этого разомните одну горошину и нанесите на нее несколько капель пероксида водорода.
- 2. Снимите с гороха кожуру и проверьте на каталазу по отдельности кожуру и семядоли.
- 3. Поставьте две пробирки с дистиллированной водой на водяную баню с температурой 40°C.
- 4. Прокипятите в отдельной пробирке три целые горошины, а затем поместите их в одну из пробирок на водяной бане.

- 5. В другую пробирку на водяной бане положите три горошины, не подвергавшиеся кипячению.
- 6. Выдержите пробирки на водяной бане в течение времени, достаточного для того, чтобы они приняли ее температуру (около 10 мин).
- 7. Проверьте каждую из горошин на каталазную активность.
- 8. Повторите тот же эксперимент при 50, 60, 70, 80 и 100°C.
- 9. Зафиксируйте наблюдения и объясните полученные результаты

Ознакомьтесь с рис. 1 Что вы можете сказать по поводу формы трех кривых, описывающих ход ферментативной реакции при разных температурах?

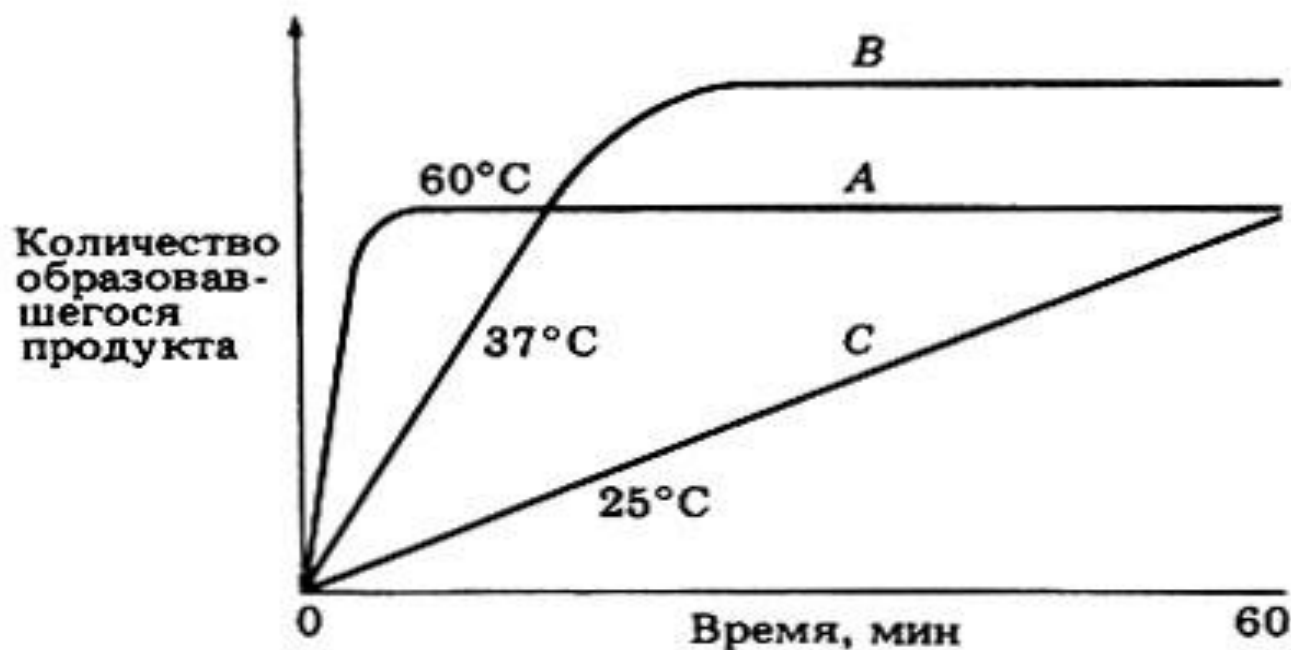


Рис. 6. Ход ферментативной реакции при разных температурах

Лабораторная № 12

- **Опыт Изучение влияния различных значений рН на активность фермента**

Материалы и оборудование

- Реактив Бенедикта
- Буферные растворы с рН 3, 5, 7, 9 и 11
- 1%-ный раствор крахмала
- Водяная баня с температурой 38°C
- Бунзеновская горелка
- Асбест
- Держатель для пробирок, штатив с пробирками
- Градуированные пипетки на 5 мл
- Термометр
- Таймер
- Дистиллированная вода
- Исходный раствор слюны
- Амилаза (такая же, как та, которая содержится в слюне)

Методика.

- 1. Сполосните рот 5 мл дистиллированной воды и выплюньте эту воду.
- 2. Наберите в рот 10 мл дистиллированной воды, полощите в течение 1 мин и эту жидкость соберите.
- 3. Доведите объем этого раствора амилазы слюны до 40 мл дистиллированной водой.
- 4. Проверьте растворы амилазы, крахмала и буферные растворы на присутствие в них редуцирующих сахаров с помощью реактива Бенедикта.
- 5. Пометьте этикеткой "рН 3" одну из пробирок и внесите в нее 2 мл раствора крахмала

- 6. Добавьте в ту же пробирку 2 мл буферного раствора с рН 3 и тщательно перемешайте оба раствора.
- 7. Прокипятите не менее 4 мл раствора фермента и влейте 4 мл этого раствора в пробирку с соответствующей этикеткой.
- 8. В другую пробирку, также снабженную этикеткой, влейте 4 мл раствора фермента, не подвергавшегося кипячению; поставьте все три пробирки на водяную баню и выждите некоторое время (около 1 мин) для того, чтобы они успели нагреться до 38°C.
- 9. Влейте небольшое количество реактива Бенедикта в каждую из 11 пробирок и пометьте их цифрами 1-11.

Три следующие операции (10-12) провести очень быстро:

- 10. Когда растворы на водяной бане примут ее температуру, влейте забуференный раствор крахмала в некипяченый раствор фермента.
- 11. Хорошо перемешайте оба раствора, перевернув пробирку, а затем снова поставьте пробирку на водяную баню.
- 12. Включите отсчет времени и сразу же перенесите небольшое количество реакционной смеси (примерно равное по объему взятому реактиву Бенедикта) в пробирку 1.

- 13. На протяжении всего опыта энергично встряхивайте смесь.
- 14. По истечении 1 мин перенесите в пробирку 2 вторую порцию реакционной смеси (приблизительно того же объема, что и первая).
- 15. Повторяйте ту же процедуру с интервалами 1 мин в течение еще 9 мин (т. е. заполните отобранными пробами пробирки 3-11).
- 16. Отметьте для пробирок 1-11 продолжительность инкубации, требуемой для появления первых признаков положительной реакции Бенедикта (выпадения кирпично-красного осадка).
- 17. Повторите тот же опыт с прокипяченным раствором фермента, начиная от п. 7.
- 18. Повторите весь опыт целиком с каждым из остальных буферных растворов.
- 19. Постройте график зависимости времени гидролиза от pH и объясните полученные результаты

6.3.a) Укажите оптимальное значение активности фермента В на рис. 2

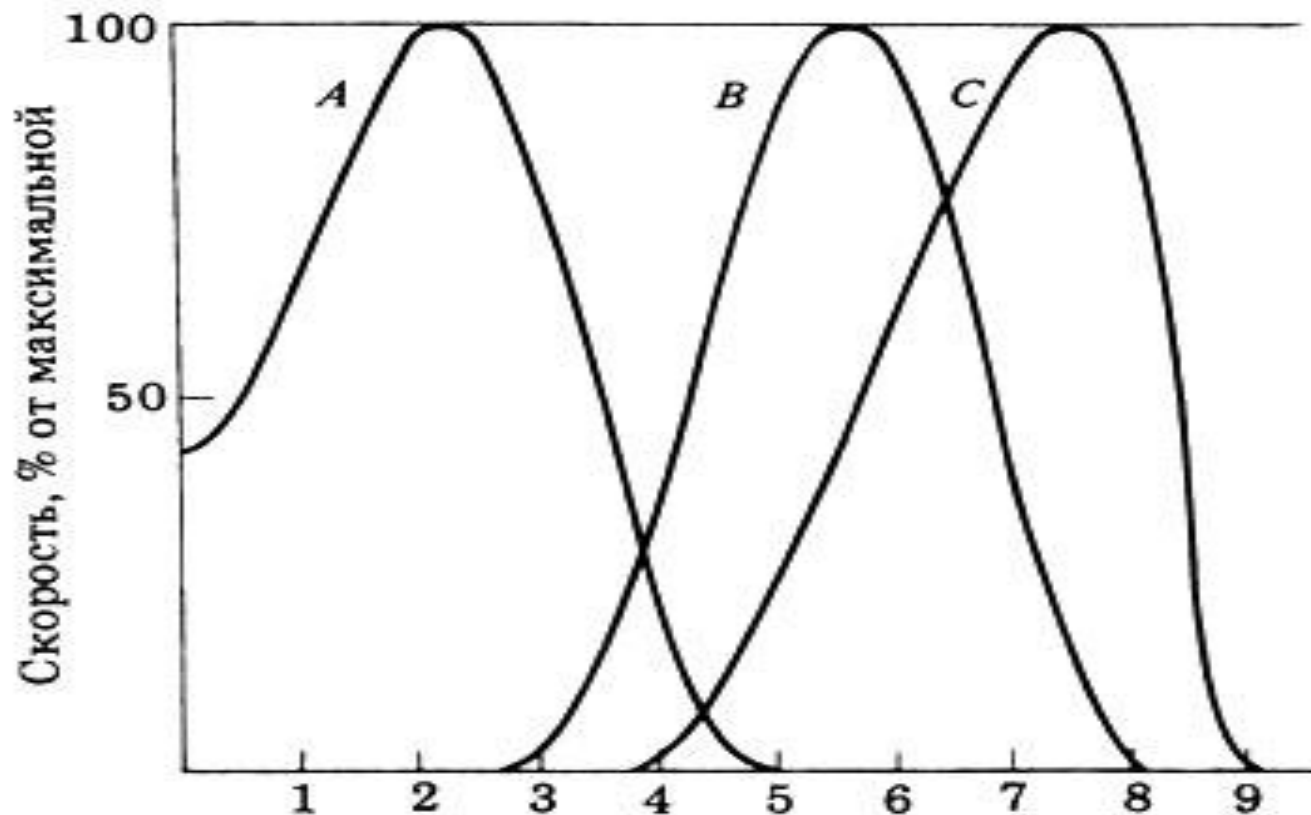


Рис. 2. Влияние pH на активность трех ферментов - А, В, и С

б) Назовите в качестве примера какие-либо известные вам ферменты, активность которых могла бы характеризоваться: 1) кривой А и 2) кривой В.

в) Почему активность фермента С снижается между рН 8 и 9?

г) Почему регуляция активности ферментов путем изменения рН важна *in vivo*?

д) К раствору пероксида водорода добавляли при разных значениях рН по 1 мл раствора каталазы и отмечали время, за которое удавалось собрать 10 мл O_2 . При этом были получены следующие результаты:

рН раствора	Время, мин
4,00	20,00
5,00	12,50
6,00	10,00
7,00	13,60
8,00	17,40

Представьте эти результаты в виде графика и объясните их.