

# ФИЗИОЛОГИЯ ПИЩЕВАРЕНИЯ

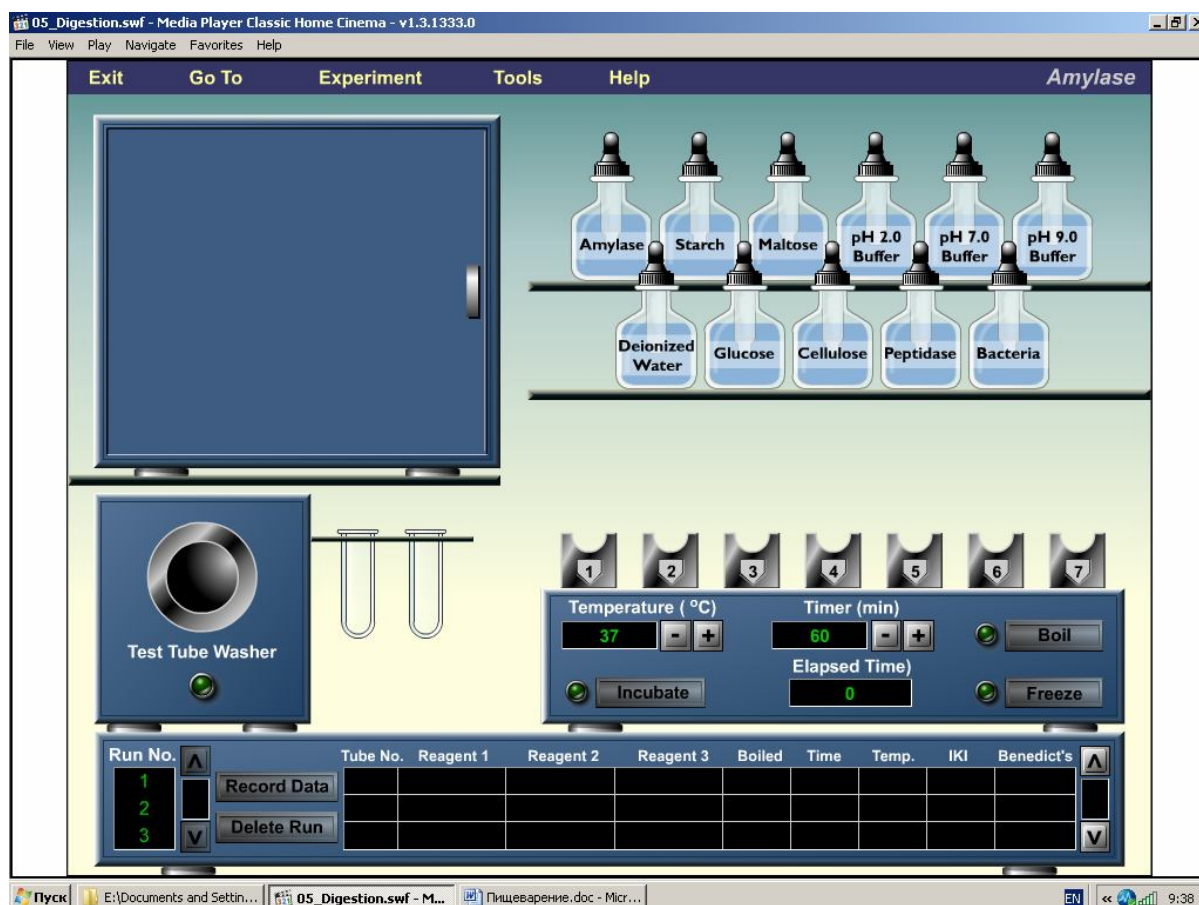
Ферменты, будучи биологическими катализаторами, обладают т.н. субстратной специфичностью, т.е. способностью выявлять определенные субстраты и взаимодействовать только с ними.

На этой модели Вы сможете убедиться в субстратной специфичности основных ферментов ЖКТ (амилолитических, липолитических и протеолитических), изучить влияние на их активность pH и температуры. Модельная установка включает термостат для инкубации растворов, набор необходимых реактивов, пробирки и блок регистрации результатов.

## Работа №1

### ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ АМИЛАЗЫ.

Рис. 1. Оборудование для изучения субстратной специфичности амилазы



Амилаза слюны является гликолитическим ферментом, основные субстраты которого – полисахариды крахмал и гликоген. Наиболее эффективен он при температуре 37-38<sup>0</sup>С и слабощелочной среде (pH 8).

**Цель эксперимента:** продемонстрировать субстратную специфичность амилазы слюны и выявить оптимальные условия для ее работы.

**Принцип действий:** амилазу смешивают с тремя углеводами, которые обладают разной структурой. Для выявления моносахаридов используется реакция Бенедикта, реактив IKI, содержащий йод, используется для выявления в растворах полисахаров (крахмала).

В набор реактивов на полке входят:

1) *ферменты*: амилаза (Amylase), крахмал (Starch), пептидаза (Peptidase), бактерии (Bacteria);

2) *субстраты*: мальтоза (Maltose), дистиллированная вода (Deionized water), глюкоза (Glucose), целлюлоза (Cellulose),

3) три буферных раствора с pH 2, pH 7 и pH 9.

Вы имеет возможность поместить три раствора (по одному из каждой группы) в пробирку, которая извлекается из держателя и помещается в инкубатор. Число проб может быть от 1 до 7. Основное правило: в каждой пробирке должно быть смешано три раствора.

Составьте план эксперимента: какие субстраты и какие ферменты Вы будете смешивать, и при какой величине pH. Например:

Пробирка 1. Крахмал + амилаза + pH 9;

Пробирка 2. Глюкоза + амилаза + pH 9;

Пробирка 3. Целлюлоза + амилаза + pH 9;

Пробирка 4. Целлюлоза + бактерии + pH 7;

Пробирка 5. Крахмал + пептидаза + pH 2;

Пробирка 6. Мальтоза + амилаза + pH 9

Пробирка 7. Крахмал + вода + pH 7;

Алгоритм действий:

1. Установите время инкубации (по умолчанию оно составляет 60 мин). Если Вы хотите исследовать влияние времени инкубации на гидролиз субстратов – измените его так, как Вам нужно.

2. С помощью мышки захватите 1-ю пробирку из контейнера и поместите на штатив инкубатора. С помощью пипетки наполните ее субстратом (крахмалом), добавьте фермент (амилазу) и буфер с pH = 9 (вспомните, что наибольшую активность амилаза проявляет в щелочной среде).

3. Захватите 2-ю пробирку из контейнера и поместите ее в штатив. Наполните ее растворами в соответствии с Вашим планом эксперимента.

4. Повторяйте эти шаги, пока не заполните все места в штативе.

5. Нажмите кнопку **Incubate** для начала инкубации растворов в термостате. После окончания выставленного времени пробирки появятся из термостата, и откроется штатив с контрольными реактивами.

6. С помощью мышки захватите первую пробирку и отлейте из нее часть раствора в первую пробирку в контрольном штативе. Повторите это для каждой следующей пробирки.

7. В каждую контрольную пробирку добавьте с помощью мышки по капле реактива IKI, который содержит йод. Почернение раствора в пробирке укажет на присутствие в нем полисахарида (крахмала).

8. Добавьте по капле реактива Бенедикта (**Benedict**) в каждую из пробирок, находящихся в штативе инкубатора. Затем включите кипячение (кнопка «**Boil**» справа от указателя времени).

Возможные всплывающие подсказки при нарушении технологии эксперимента:

Before boiling, a test tube must be filled with the correct number of reagents and lowered into the incubation unit (Перед кипением, испытательная труба должна быть заполнена правильным числом реактивов и подвергнута инкубации)

*The following test tubes do not contain the proper number of reagents* (Следующие испытательные трубы не содержат надлежащее количество реактивов)

Benedict's solution has already been dispensed to this tube (Реактив Бенедикта был уже добавлен в эту трубу)

Изменение окраски раствора укажет на наличие в нем моносахарида (глюкозы). Нажмите «**Record date**» для регистрации результатов эксперимента. Перепишите эти данные в тетрадь и сделайте вывод о субстратной специфичности амилазы и влиянии на ее активность pH и времени инкубации.

Таблица 1. Субстратная специфичность амилазы

№ пробирки	Субстрат	Фермент	pH	время	T°C	Наличие крахмала	Наличие глюкозы

- 1) На какие субстраты воздействует амилаза лучше всего?
- 2) Где расщепляется целлюлоза и под влиянием каких ферментов?
- 3) Каков оптимум pH для работы амилолитических ферментов?

## Работа №2

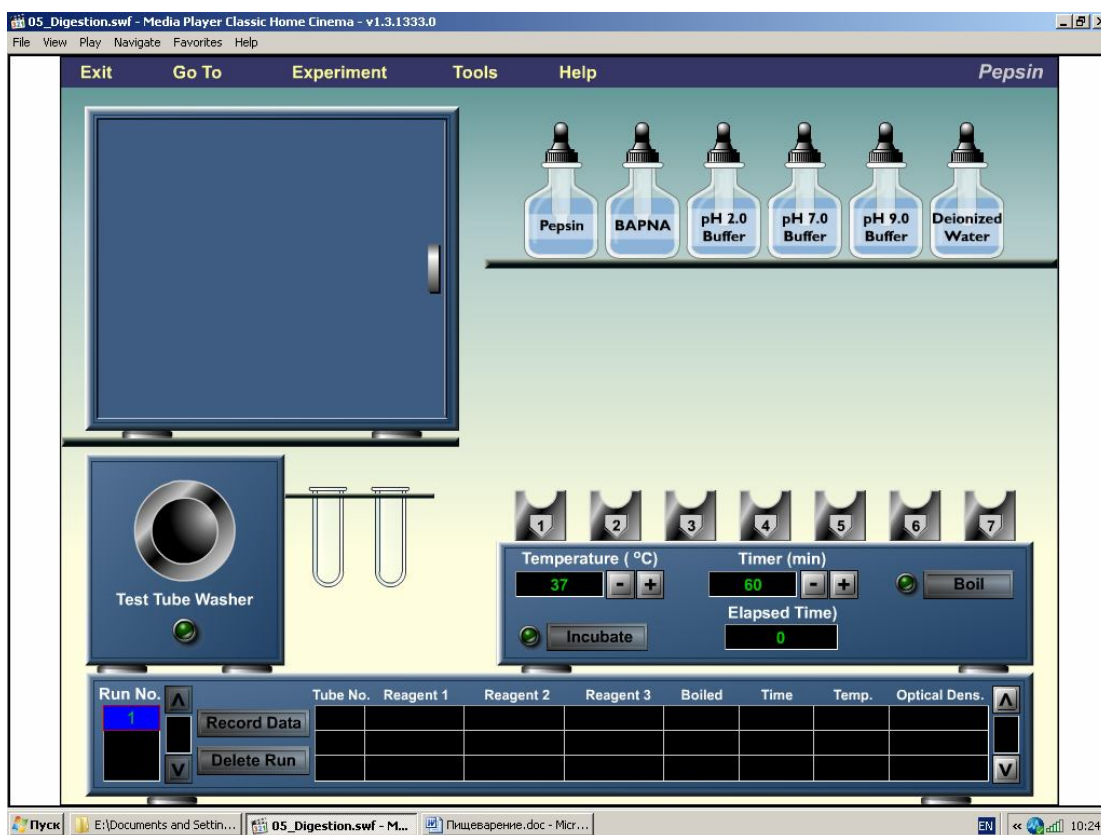
### ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЕПСИНА.

Пепсин является протеолитическим ферментом, который синтезируется основными клетками желудочных желез в виде неактивного пепсиногена. Когда pH содержимого желудка становится ниже 5, пепсиноген превращается в пепсин. Происходит это благодаря присутствию с желудочном сока соляной кислоты. Наибольшую активность пепсин проявляет при pH 2.

Цель: продемонстрировать влияние уровня pH на активность пепсина.

Принцип действий: инкубирование в течение 3 часов пепсина и яичного белка при 38°C вместе с соляной кислотой и без нее. Определение степени переваривания белка (по уменьшению его размеров).

Рис. 2. Оборудование для изучения субстратной специфичности пепсина



В набор реактивов для этого опыта входят пепсин, куриный белок (ВАРНА), вода и буферные растворы с рН 2, 7, 9.

Прежде, чем начинать эксперимент, составьте план опыта. Вы можете максимально использовать 7 пробирок, в которых должны быть смешаны 3 реактива. Вы можете также менять время инкубации (максимально до 90 мин) и температуру в термостате.

Один из вариантов опыта:

Пробирка 1. Белок + пепсин + рН 2.

Пробирка 2. Белок + пепсин + + рН 7.

Пробирка 3. Белок + пепсин + рН 9

Пробирка 4. Белок + вода + рН 2.

Пробирка 5. Белок + вода + рН 7.

Пробирка 6. Белок + вода + рН 9.

Пробирка 7. Пепсин + вода + рН 9.

Алгоритм действий:

1. Перенести 1-ю пробирку из контейнера в штатив справа.
2. С помощью мышки поместить в пробирку белок (ВАРНА) и добавить пепсин. Добавить буферный раствор рН 2.
3. Перенести 2-ю пробирку из контейнера в штатив. Налить в нее белок и пепсин. Добавить буфер рН 7.
4. Повторяйте эти шаги, пока не заполните все пробирки согласно плану эксперимента.

*Примечание:* вы можете работать и с меньшим числом пробирок!

5. Установите необходимое время и нажмите «**Incubate**» . После окончания инкубации откроется окно спектрофотометра.

6. С помощью мышки переместите первую пробирку в держатель спектрофотометра слева и нажмите «Анализ». Показатель экстинции прибора прямо пропорционален концентрации аминокислот в растворе.

7. Повторите эту процедуру с другими пробирками.

8. Нажмите **Record data** для регистрации результатов эксперимента в таблице.

9. Уберите пробирки в контейнер. Запишите полученные результаты в тетрадь и сделайте выводы.

Таблица 2. Свойства пепсина и влияние pH на его активность

№ пробирки	Субстрат	Фермент	pH	время	T°C	Показатель экстинции

- 1) При каком pH раствора и при какой температуре произошел наиболее активный гидролиз?

### Работа №3

## ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ЛИПАЗЫ.

Липаза является липолитическим ферментом, который расщепляет липиды на глицерол и жирные кислоты. Оптимальная температура для действия липазы – 37-38<sup>0</sup>C и слабощелочная среда. Активность липазы усиливается желчью, которая обладает способностью эмульгировать жиры, благодаря чему расширяется область действия этого фермента.

*Цель:* продемонстрировать роль желчи в обеспечении оптимального режима активности липазы поджелудочной железы.

*Принцип действий:* В пробирки вводят липазу и растительное масло и добавляют желчь. После инкубации исследуют pH. Снижение pH по сравнению с исходной доказывает появление жирных кислот в пробирке с желчью.

Прежде, чем начинать эксперимент, составьте план опыта. Вы можете максимально использовать 7 пробирок, в которых должны быть смешаны 4 реактива. Вы можете также менять время инкубации (максимально до 90 мин) и температуру в термостате.

*Один из вариантов опыта:*

Пробирка 1. Масло + липаза + желчь + pH 9.

Пробирка 2. Масло + липаза + вода + pH 9.

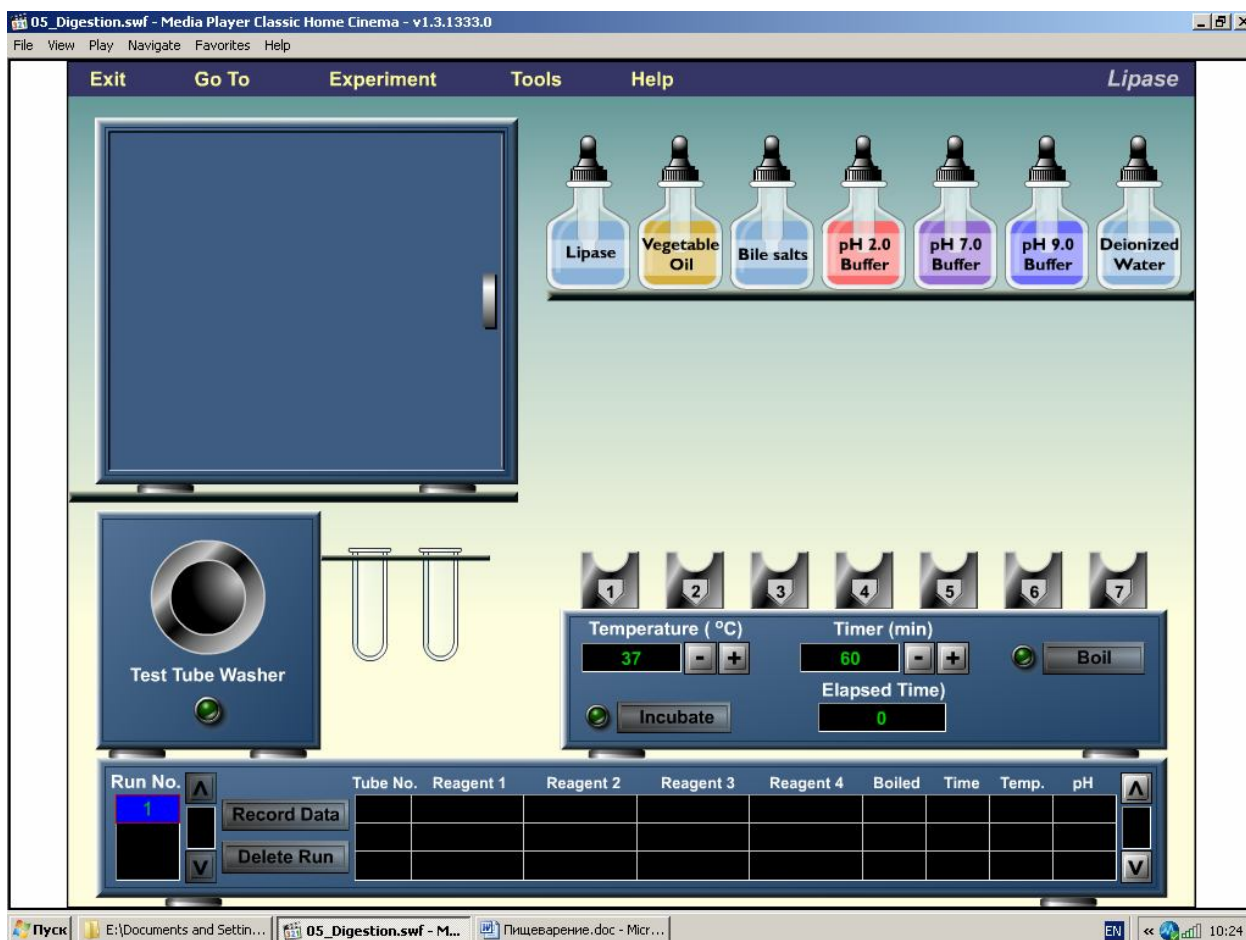
Пробирка 3. Масло + липаза + желчь + pH 7.

Пробирка 4. Масло + липаза + вода + pH 7.

Пробирка 5. Масло + липаза + желчь + pH 2.

Пробирка 6. Масло + липаза + вода + pH 2.

*Рис. 2. Оборудование для изучения субстратной специфичности липазы*



### Алгоритм действий:

1. Перенести 1-ю пробирку из контейнера в штатив справа.
2. С помощью мышки налить в пробирку растительного масла и добавить липазы и желчи. Добавить буферный раствор pH 9.
3. Перенести 2-ю пробирку из контейнера в штатив. Налить в нее растительное масло, липазу и воду. Добавить буфер pH 9.

4. Повторяйте эти шаги, пока не заполните все пробирки согласно плану эксперимента.

*Примечание:* вы можете работать и с меньшим числом пробирок!

5. Установите необходимое время и нажмите «**Incubate**» . После окончания инкубации откроется окно pH-метра.

6. С помощью мышки переместите первую пробирку в держатель pH-метра слева и нажмите «Измерить pH» (**Measure pH**).

7. Повторите эту процедуру с другими пробирками.

8. Нажмите Record data для регистрации результатов эксперимента в таблице.

9. Уберите пробирки в контейнер. Запишите полученные результаты в тетрадь и сделайте выводы.

*Таблица 3. Субстратная специфичность липазы и роль желчи в расщеплении жиров.*

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Наличие желчи	pH исходная	T°C	Время	pH конечная

Попробуйте ответить на следующие вопросы:

- 1) *Какова роль желчи в гидролизе жиров? Чем вы можете доказать свое утверждение?*
- 2) *Докажите, что интенсивность гидролиза зависит от времени инкубации и pH среды.*