

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМА ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОЦЕССА ГЛИКОЛИЗА

Курбанов А.А. Email: Kurbanov17108@scientifictext.ru

*Курбанов Асадулла Асадуллаевич – студент,
педиатрический факультет,
Ярославский государственный медицинский университет, г. Ярославль*

Аннотация: гликолиз - процесс, в ходе которого молекула глюкозы, построенная из шести углеродных атомов, расщепляется ферментативным путем в десяти последовательных реакциях до двух молекул пирувата, содержащих по три углеродных атома. На протяжении этой последовательности реакций значительная часть энергии, высвободившейся из глюкозы, запасается в форме АТФ.

В данной статье анализируется протекание гликолиза в различных биологических материалах, которые инкубировали в разных условиях. Для определения глюкозы в качестве реактива использовали раствор анестезина. Результаты исследования представлены в виде рисунков.

Ключевые слова: гликолиз, ферменты гликолиза, влияние температуры, pH на скорость ферментативных реакций.

DEVELOPMENT OF A LABORATORY WORKSHOP ON PROCESS STUDYING GLYCOLYSIS Kurbanov A.A.

*Kurbanov Asadulla Asadullaevich – Student,
PEDIATRIC FACULTY,
YAROSLAVL STATE MEDICAL UNIVERSITY, YAROSLAVL*

Abstract: a glycolysis - process during which the glucose molecule constructed of six carbon atoms is split in the enzymatic way in ten consecutive reactions to two molecules of a pyruvate containing three carbon atoms. Throughout this reaction sequence the considerable proportion of the energy released from glucose stocks up in the form of ATP.

In this article course of a glycolysis in various biological materials which incubated in different conditions is analyzed. For definition of glucose as a reactant used benzocaine solution. Results of a research are presented in the form of drawings.

Keywords: a glycolysis, glycolysis enzymes, temperature effect, pH on the speed of enzymatic reactions.

УДК 612.396.2

Гликолиз (от греч. glykys – сладкий и lysis – распад, расщепление) - это последовательность ферментативных реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием АТФ [1].

Ферменты гликолиза содержатся во всех биологических материалах, которые мы использовали для исследования (мышечная ткань, эритроциты, дрожжи).

Эритроциты лишены митохондрий, поэтому в качестве энергетического материала они могут использовать только глюкозу. В эритроцитах катаболизм глюкозы обеспечивает сохранение структуры и функции гемоглобина, целостность мембран и образование энергии для работы ионных насосов [1].

В дрожжах в присутствии кислорода глюкоза расщепляется до углекислого газа, воды и большого количества энергии. В отсутствии кислорода глюкоза расщепляется до этанола и углекислого газа, этот процесс носит название спиртового брожения [3]. Для исследования использовали сухие быстродействующие и прессованные дрожжи. Прессованные дрожжи представляют собой скопление дрожжевых клеток, выделенных из культурной среды, промытых и спрессованных. Сухие дрожжи – это те же самые прессованные дрожжи, только из них удалена значительная часть влаги, они высушены особым способом. Сушка дрожжевой культуры осуществляется в горячем воздушном потоке, конечная влажность продукта составляет около 4 %. Сухие быстродействующие дрожжи представляют собой живые дрожжевые клетки, которые сохраняют свои свойства благодаря уникальной вакуумной упаковке [3].

В мышечной ткани в присутствии кислорода пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до углекислого газа и воды. Если содержание кислорода недостаточно, как это может иметь место в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат [2].

Итак, **гликолиз** – это уникальный путь, поскольку может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Ферменты гликолиза можно использовать для изучения влияния различных факторов на активность ферментов.

Интенсивность процесса изучали по убыли глюкозы в инкубационной среде.

Глюкозу определяли бензокаиновым методом [4].

Цель: Разработка лабораторного практикума по изучению процесса гликолиза для студентов.

Задачи:

1. Определение промежутка времени линейного изменения уровня (количества) глюкозы.
2. Определение возможности использования ферментов гликолиза для демонстрации влияния температуры на скорость ферментативных реакций.
3. Определение возможности использования ферментов гликолиза для демонстрации влияния pH на скорость ферментативных реакций.

1. Реактивы: 5% р-р анестезина (бензокаина, этилового эфира парааминобензойной кислоты), 5% р-р трихлоруксусной кислоты (ТХУ), глюкоза 100 мг % (100 мг в 100 мл воды), глюкоза 200 мг % (200 мг на 100 мл воды), 0,9 % р-р NaCl (физ.р-р), буферные р-ры с pH=5,6,6,2,6,8,7,4,8,0, 10% р-р NaOH, 10% р-р HCl.

2. Оборудование: пробирки, пипетки, центрифуга, водяная баня, фотоэлектроколориметр- КФК-2-УХЛ 4.2, кюветы с толщиной слоя 5 мм.

3. Материал для исследования: эритроцитарная масса, дрожжи сухие, дрожжи прессованные, гомогенат мышечной ткани говядины, гомогенат мышечной ткани курицы.

Приготовление материала для исследования:

Эритроцитарная масса - 0,2 мл, дрожжи сухие - 500 мг растворили в 2 мл воды, дрожжи прессованные - 500 мг растворили в 2 мл воды, 1 г мышечной ткани говядины гомогенизировали в 2 мл физ.раствора, 1 г мышечной ткани курицы гомогенизировали в 2 мл физ.раствора.

4. Принцип метода

Концентрация глюкозы определяется по оптической плотности окрашенного раствора, образующегося при взаимодействии глюкозы, содержащейся в безбелковом фильтрате, с бензокаиновым реактивом [4].

5. Ход работы

Задача № 1. Определение промежутка времени линейного изменения уровня (количества) глюкозы.

Необходимо было подобрать концентрацию биологического материала, чтобы процесс укладывался в промежуток времени, который отводится на занятиях для выполнения лабораторных работ и чтобы мы смогли проследить динамику процесса. Для начала в качестве биологического материала использовали дрожжи сухие, брали 0,1 мл, 0,2 мл, 0,5 мл и 1 мл 25% р-ра сухих дрожжей. Результаты представлены на рисунках 1, 2, 3, 4.

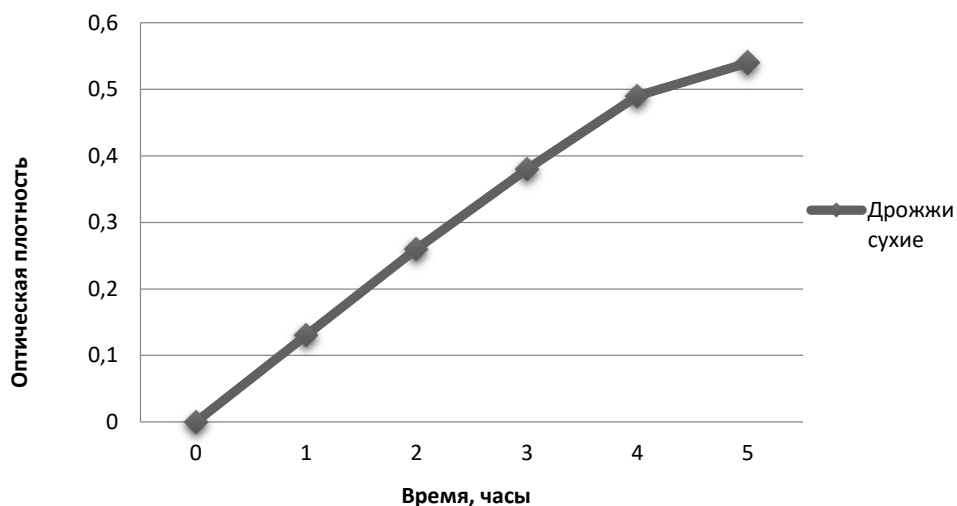


Рис. 1. Подбор концентрации биологического материала. Дрожжи сухие – 0,1 мл 25% р-ра

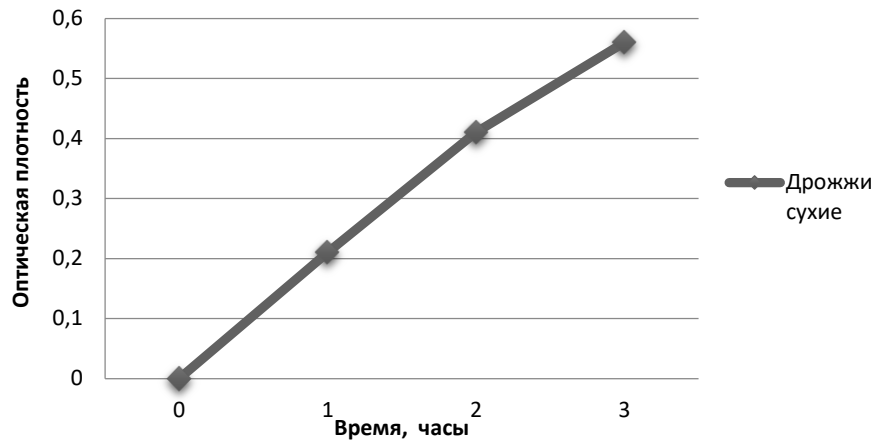


Рис. 2. Подбор концентрации биологического материала. Дрожжи сухие – 0,2 мл 25% р-ра

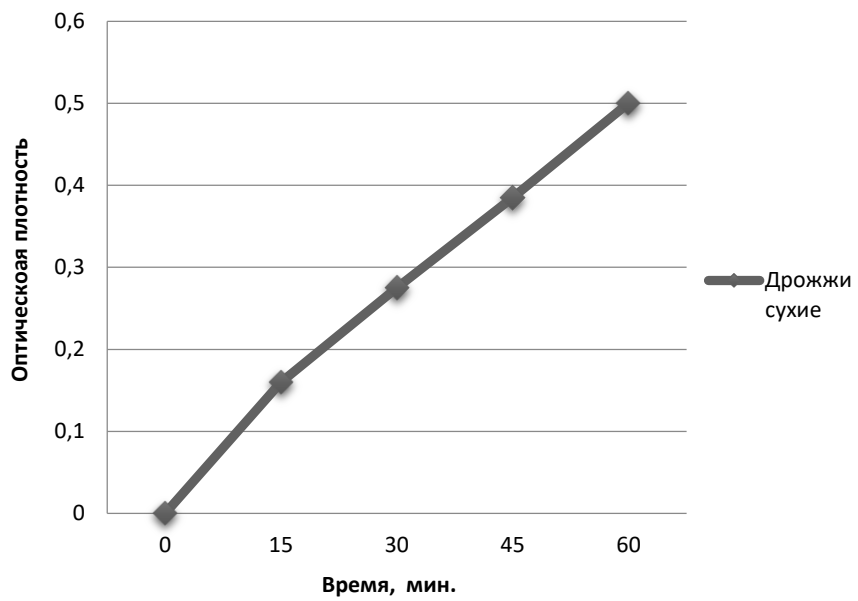


Рис. 3. Подбор концентрации биологического материала. Дрожжи сухие – 0,5 мл 25% р-ра

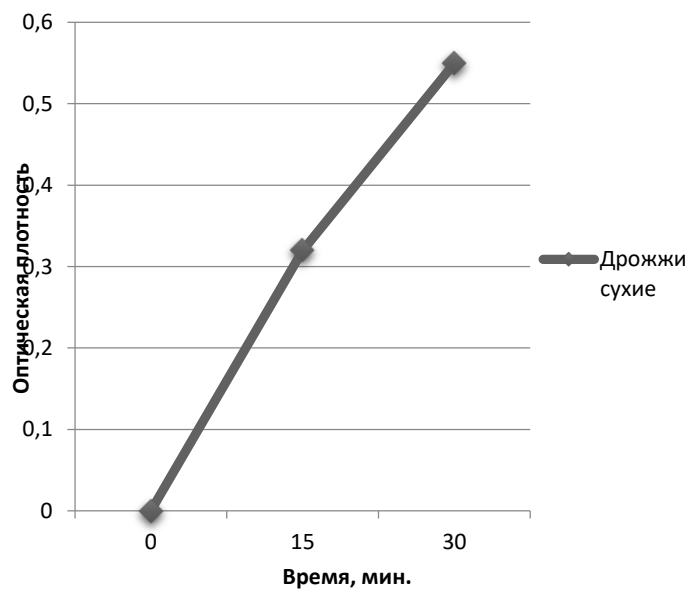


Рис. 4. Подбор концентрации биологического материала. Дрожжи сухие – 1 мл 25% р-ра

По результатам мы видим, что концентрация дрожжей – 500 мг является наиболее оптимальной для выполнения работы. Точно так же определяли концентрацию и других биологических материалов. Количество остальных биологических материалов: мышечная ткань говядины и курицы – 1 мл гомогената, эритроцитарная масса – 0,2 мл. В последующем выполняли работу с данными количествами биологических материалов.

1. Дрожжи сухие 0,5 мл(25% р-р), дрожжи прессованные 0,5 мл(25% р-р), эритроцитарную массу 0,2 мл, гомогенат мышечной ткани говядины 1 мл, гомогенат мышечной ткани курицы 1 мл - добавили в отдельные пробирки с 5 мл 100 % р-ра глюкозы. Биологический материал инкубировали при $t=40^{\circ}\text{C}$.

2. Из инкубируемой смеси отбирали каждые 15 минут по 0,1 мл в пробирки с 0,9 мл 5% р-ра ТХУ.

3. После осаждения белка центрифугировали 5 мин при 1000-1500 об/мин.

4. 0,2 мл центрифугата вносили в пробирки с 2 мл 5% р-ра бензокаина.

5. Нагревали в кипящей водяной бане 15 минут.

6. Измеряли оптическую плотность при длине волны 440 нм.

Результаты представлены на рисунке 5.

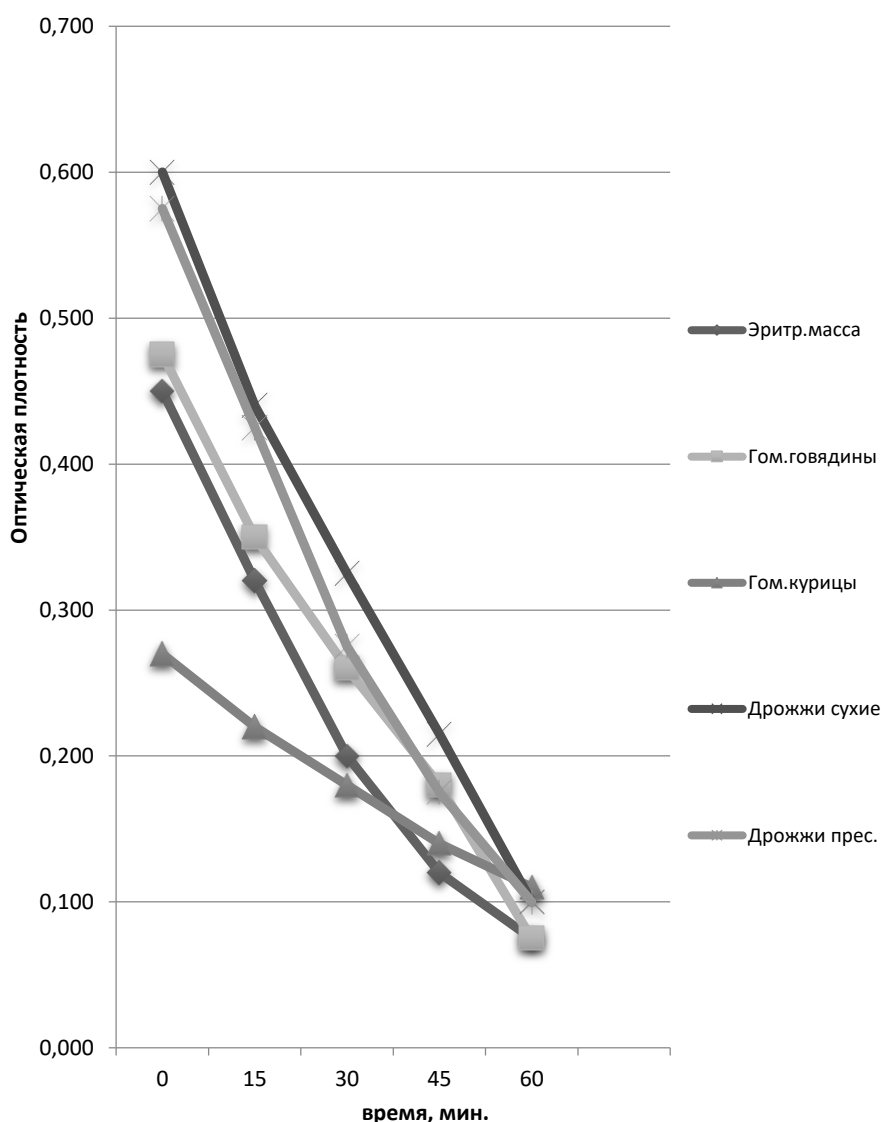


Рис. 5. Зависимость скорости уменьшения количества глюкозы в инкубационной среде от времени инкубирования

Скорость процесса гликолиза наиболее интенсивна, а значит, наиболее наглядна при использовании в качестве биологического материала эритроцитарной массы. Другие более доступные биологические материалы также можно использовать, но нужно учитывать, что для демонстрации процесса потребуется или больше времени, или выше концентрации биологического материала.

Задача № 2. Определение возможности использования ферментов гликолиза для демонстрации влияния температуры на скорость ферментативных реакций.

Биологический материал инкубировали при $t = 0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 100^\circ\text{C}$.

Результаты представлены на рисунках 6, 7, 8, 9.

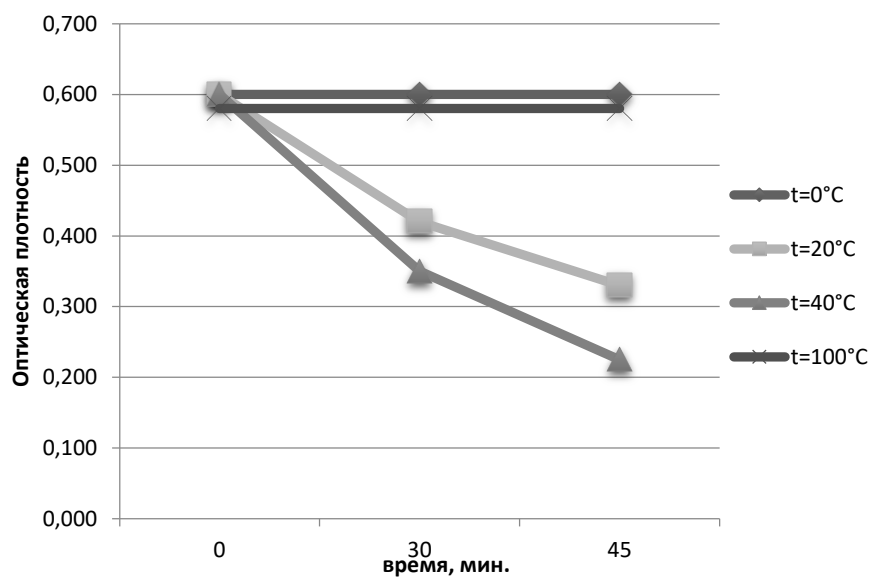


Рис. 6. Дрожжи сухие

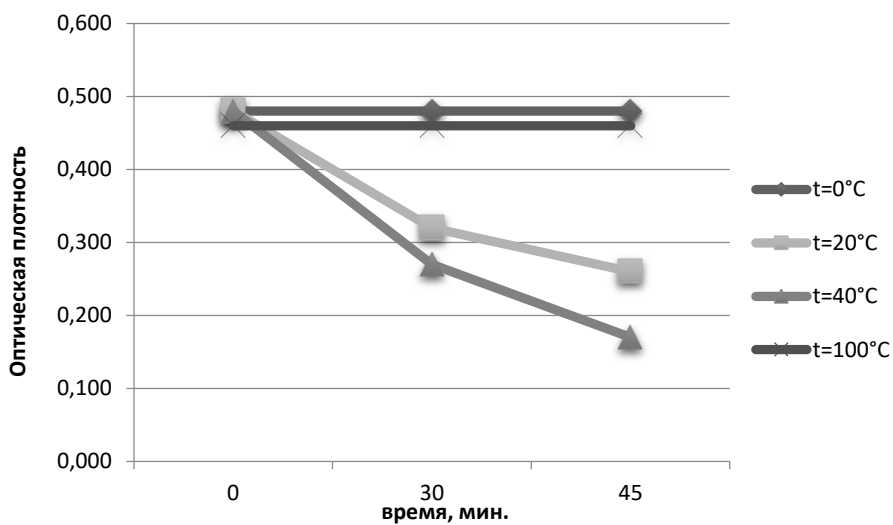


Рис. 7. Гомогенат мышечной ткани говядины

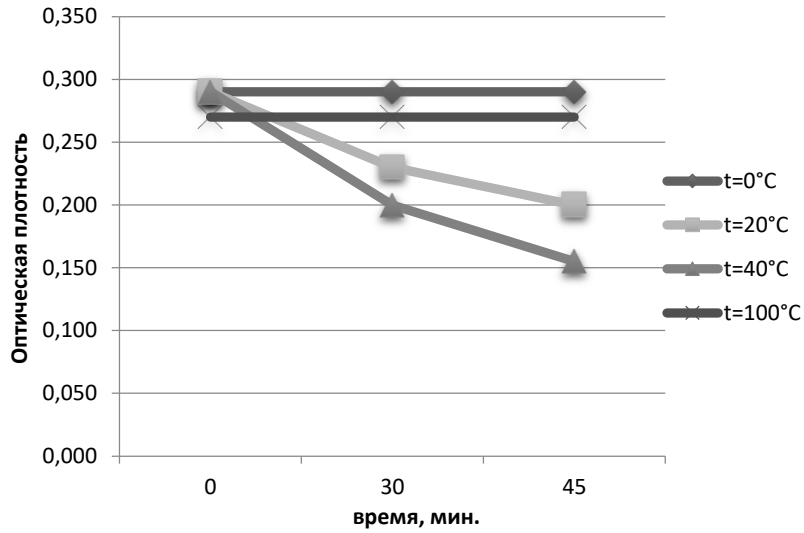


Рис. 8. Гомогенат мышечной ткани курицы

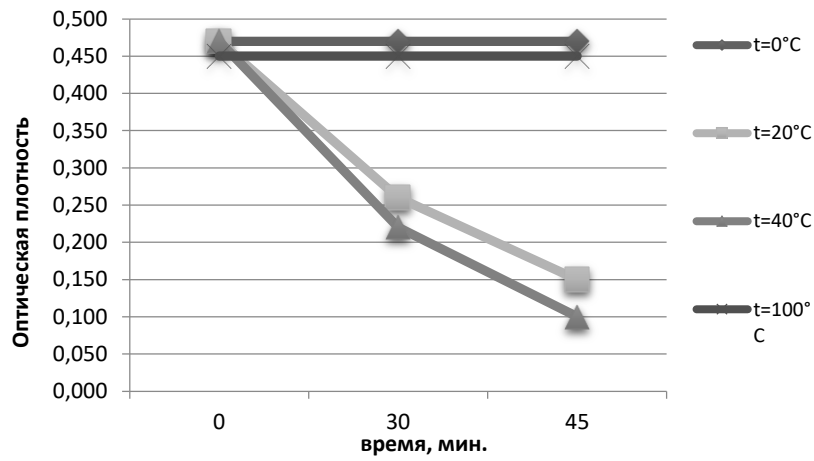


Рис. 9. Эритроцитарная масса

Для более наглядной демонстрации влияния температуры на скорость протекания процесса построен рисунок 10, на котором показана разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы в инкубируемой смеси при $t=0^{\circ}$, 20° , 40° , 100° С.

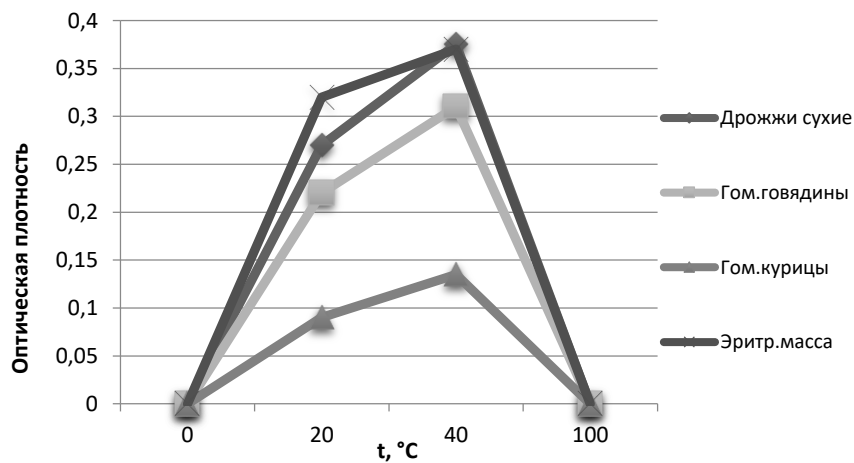


Рис. 10. Разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы в инкубируемой смеси при $t=0^{\circ}$, 20° , 40° , 100° С

На всех рисунках мы видим, что при температурах 0° и 100°С процесс не протекает, график остается на одном уровне на протяжении всего времени. 20° и 40°С являются оптимальными температурами для действия ферментов, но все-таки интенсивнее процесс протекает при 40°С.

Задача № 3. *Определение возможности использования ферментов гликолиза для демонстрации влияния рН на скорость ферментативных реакций.*

Исследовали влияние небольших изменений рН и влияние резких изменений рН на активность ферментов гликолиза.

В качестве биологического материала использовали дрожжи сухие.

А) В пробирки вносили 0,5 мл биологического материала, 2,5 мл 200% р-ра глюкозы, 2,5 мл буферного раствора с рН=5.6, 6.2, 6.8, 7.4, 8.0.

Б) Параллельно проводили исследование с использованием фосфатных буферных растворов с созданием рН=2, рН=7, рН=13 в инкубируемой смеси.

В пробирки вносили 0,5 мл биологического материала, 2,5 мл 200% р-ра глюкозы, 0,1 мл НСl, NaOH, физ. р-ра (0,9% NaCl).

Биологический материал инкубировали при t=20°

Результаты представлены на рисунках 11, 12, 13, 14.

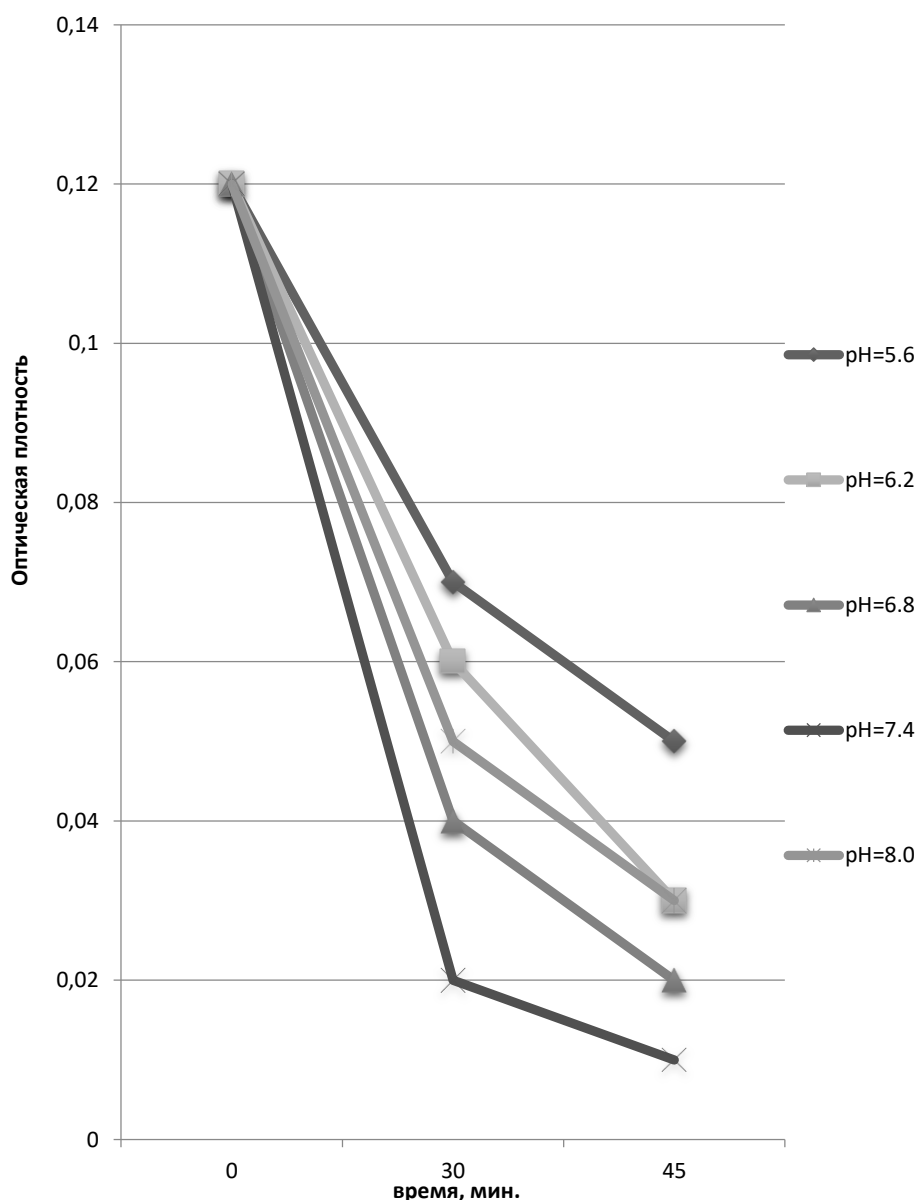


Рис. 11. Влияние рН буферных растворов на скорость ферментативных реакций. Дрожжи сухие

Для более наглядной демонстрации влияния рН на скорость протекания процесса построен рисунок 12, на котором показана разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы в инкубируемой смеси при значениях рН=5.6, 6.2, 6.8, 7.4, 8.0.

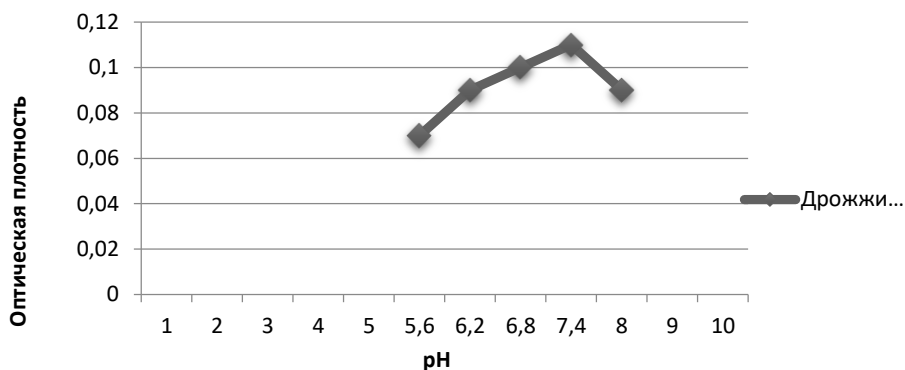


Рис. 12. Разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы при значениях рН=5.6, 6.2, 6.8, 7.4, 8.0. Дрожжи сухие

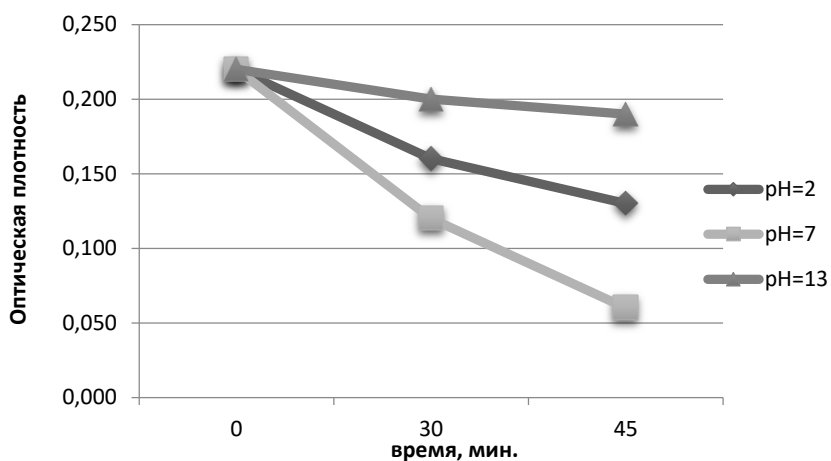


Рис. 13. Влияние рН(НСl, физ.р-р, NaOH) на скорость ферментативных реакций. Дрожжи сухие

Для более наглядной демонстрации влияния рН на скорость протекания процесса построен рисунок 14, на котором показана разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы в инкубируемой смеси при значениях рН=2;7;13.

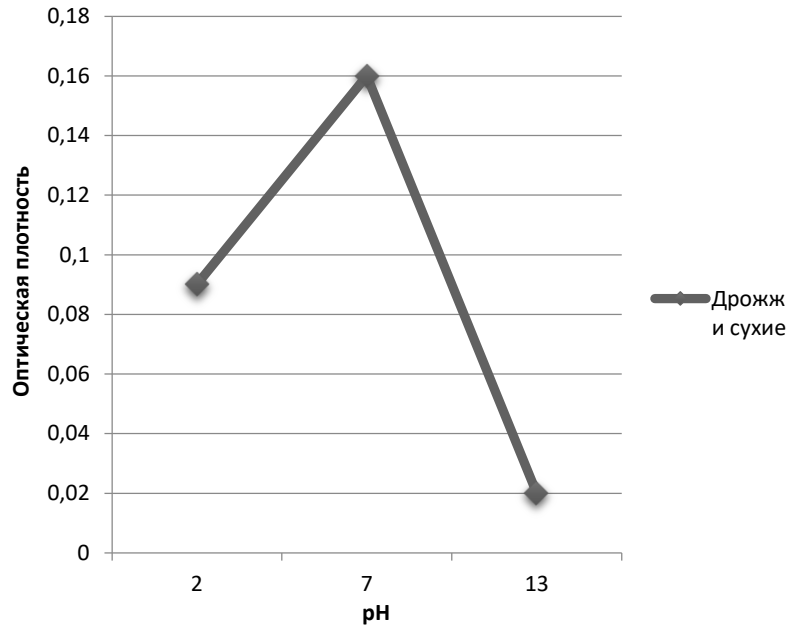


Рис. 14. Разница между начальной и конечной концентрациями глюкозы в инкубируемой смеси при значениях рН=2;7;13. Дрожжи сухие

На рисунках мы видим, что интенсивнее всего процесс протекает в нейтральной среде при рН=7.0-7.4

Выводы:

1. Для изучения процесса гликолиза можно использовать различные биологические материалы. Если использовать более доступные (мясо, дрожжи), то с увеличением времени инкубации или количества биологического материала. Сроки укладываются в промежуток времени, который отводится на занятиях для выполнения лабораторных работ.
2. Ферменты гликолиза можно использовать также для демонстрации влияния t° и рН на скорость ферментативных реакций.

Список литературы / References

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. 3 изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1998. 704 с.
2. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. М.: «Медицинское информационное агентство», 2008. 364 с.
3. Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи. Морфология, химический состав, метаболизм. Учебное пособие. СПб: Университет ИТМО, 2015. 88 с.
4. Когут П.П. К определению крови бензокаиновым методом / П.П. Когут // Лаб. Дело, 1985. № 9. С. 566-567.