

【实验创新】

“探究 pH 对 H_2O_2 酶活性的影响” 实验创新及优化

董路遥 张志祥 戚尚宁 芦文婧 邱宇

【摘要】利用滤纸片上浮法分别测定平菇、杏鲍菇、金针菇、土豆和猪肝中的 H_2O_2 酶在不同 pH 条件下的酶活性,缩短实验时间、放大实验现象,提高了实验成功率。实验显示, H_2O_2 酶的最适 pH 在 7.0 左右;真菌尤其是平菇中的 H_2O_2 酶活性远高于教材推荐的土豆和猪肝,是本实验的理想材料。

【关键词】酶活性;最适 pH;滤纸片上浮法

“探究 pH 对 H_2O_2 酶活性的影响”是浙教版生物学必修 1《分子与细胞》第 3 章第 2 节“酶是生物催化剂”中的重要实验。该实验能够帮助学生掌握变量控制和对照实验的设计能力,以便进一步理解酶的作用与本质。《普通高中生物学课程标准(2017 年版 2020 年修订)》指出,教学中教师要高度重视学生的实践环节,鼓励学生参与设计低成本、低消耗、低(无)污染的教学实验;提供机会让学生学习生物学研究中的测量方法,实事求是地记录、整理和分析实验数据,定量表述实验结果等。基于此,本实验在教材的基础上,引导学生大胆创新,针对实际操作中遇到的问题,提出改进优化的方法,以期提高该实验的开出率和成功率。

一、实验创新及优化

(一)实验材料优化

教材以土豆和猪肝作为实验材料,但实际操作中发现土豆和猪肝中 H_2O_2 酶浓度较低,产生 O_2 较少、实验耗时较长,猪肝味道较重,易引起学生抗拒心理,且室温下不易保存,增加了实验难度。文献资料显示,菌菇类的酶活性是土豆的 18.5 倍且没有异味^[1]。因此本实验增设了平菇、金针菇和杏鲍菇 3 种菌类作为实验材料,与土豆、猪肝进行对比,以筛选出酶活性更高、实验效果更好的实验材料。

(二)实验方法优化

教材将富含土豆匀浆的滤纸片粘贴在反应瓶上壁,向反应瓶中加入 H_2O_2 和 pH 缓冲液,翻转反应瓶使二者发生反应,后利用排水集气法收集 O_2 。此方

法对学生的实验技能要求较高,操作不当常出现漏气、气体收集困难等问题^[2]。 H_2O_2 酶会使 H_2O_2 分解产生 O_2 , O_2 可附着在滤纸片上,达到一定数量后托着滤纸片上浮。因此,采用滤纸片上浮法可有效避免教材实验缺陷,且滤纸片的材质相同,密度相近,吸附的酶量相对恒定,更有利于不同实验材料之间的比较。

(三)实验装置优化

为保证各组滤纸片同时参与反应,兴趣小组以泡沫板为材料自制了试管架。泡沫板具有较好的弹性,能够刚好卡住试管,且泡沫板承重性更强,不易形变,能使试管保持在同一水平线上。将 7 个 50mL 的烧杯排成一排,在泡沫板上标记各烧杯中心点位置,按照标记打孔并插入试管(见下页图 1)。试管安装完成后,将等量固定好的含酶滤纸片迅速粘贴在各试管底部外壁。3 位学生为 1 组,2 位学生手持试管架两端,保持试管架与桌面水平,1 位学生布置相机位置并拍摄实验视频,一切就绪后,发出开始指令。手持试管的学生听到指令后将滤纸片同时浸入 H_2O_2 溶液,观察纸片上浮情况。实验结束后,回放视频查看各组滤纸片上浮所需时间,测量烧杯内液面高度并计算上浮速度。

(四)实验过程优化

教材在正式实验前将不同 pH 的缓冲液与 H_2O_2 溶液混合,此操作在 pH5.0~8.0 的范围内并未造成较大误差。但 H_2O_2 会在强碱环境下分解,当 pH 提高至 10.0 后,直接混合可能会导致误差^[3]。因此,

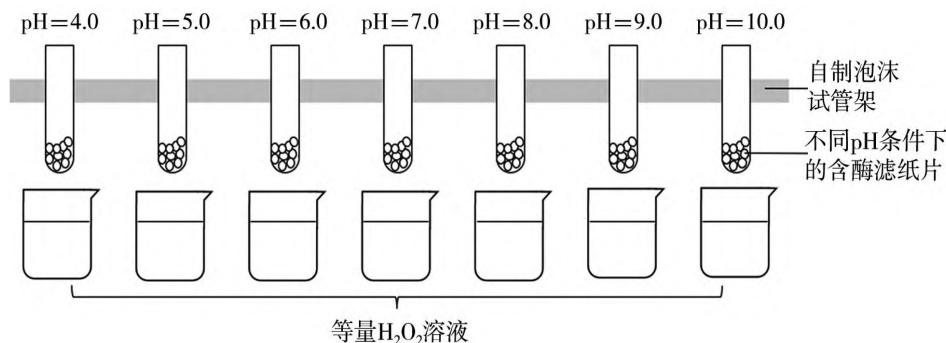


图1 实验装置设计

本实验事先将 H_2O_2 酶和相应的 pH 缓冲液混合 5min, 改变了酶的活性, 由于酶活性恢复时间较长且滤纸片上浮时间较短, 酶与底物反应过程中活性基本保持不变, 能够较为准确地反映出 pH 对酶活性的影响。实验结果也能正确地体现酶活性变化规律, 具有一定的科学性。

二、实验材料及方法

(一) 实验材料和试剂

杏鲍菇、金针菇、平菇、马铃薯块茎、猪肝、pH 在 4.0 ~ 10.0 之间的缓冲液、0.2mol/L 的磷酸二氢钾溶液、1.5% 的 H_2O_2 溶液。

(二) 实验仪器和用具

试管、培养皿、滤纸片若干, 直径 10mm 的打孔机 1 台, 破壁机 1 台, 纯水机 1 台, 泡沫板 1 块, 规格为 50mL 的烧杯 7 个。

(三) 实验方法

1. 材料处理

经预实验的反复测试, 最终确定质量浓度为 12.5g/L 的样品提取液实验效果相对较好。即取 2.5g 杏鲍菇和 0.2L 0.2mol/L 的磷酸二氢钾溶液置于破壁机中, 榨汁、过滤所得上层清液即为 H_2O_2 酶提取液。

2. 酶的固定化

按图 1 所示实验装置搭建试管架, 取 7 支试管插进对应的孔位。在 7 个 50mL 的烧杯中加入 50mL 的 H_2O_2 溶液, 调整与试管孔位的间距。另取 7 支试管, 分别加入 5mL pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的磷酸缓冲液和 5mL H_2O_2 酶提取液, 摇匀混合后静置 5min。在 7 个培养皿中分别不重叠地放置 8 个滤纸小圆片, 将不同 pH 的混合液倒入对应的培养皿中, 固定 2min。待 H_2O_2 酶固定完成后, 将含酶滤纸片夹起, 迅速粘贴在试管底部, 使多余的匀浆流尽。

3. 滤纸片上浮速度测定

利用自制试管架, 将含酶滤纸片同时浸入准备好的 H_2O_2 溶液中, 录制视频, 实验后回放视频, 查看和记录各个烧杯中滤纸片的上浮时间。将材料更换为等量的金针菇、平菇、土豆和猪肝, 重复上述实验。

4. 实验数据处理

用 Excel 计算每组滤纸片上浮的平均速度, 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 比较不同实验材料间的差异, 并绘制曲线图和柱形图。

三、结果与分析

(一) 不同 pH 对 H_2O_2 酶活性的影响

在 4.0 ~ 10.0 的范围内, 随着 pH 的增大, 3 种含真菌提取液的滤纸片上浮速度均先增大后减缓, 在 pH = 7.0 时达到最大, 表明 H_2O_2 酶的最适 pH 为 7.0 左右, 过低或过高的 pH 会使酶的空间结构发生不可逆的改变, 从而导致酶活性降低, 此结果与孙逊^[2]和泮琦斌^[4]的研究一致。菇类中平菇对强酸、强碱的耐性较好; 而杏鲍菇在 pH = 5.0 环境下仍具一定的酶活性, 能使滤纸片上浮, 但当 pH = 10.0 时活性极大降低, 滤纸片无法上浮, 表明其耐酸性较强但耐碱性较弱; 而金针菇在 pH 为 4.0 ~ 5.0 时酶活性极低, 无法使滤纸片上浮, 但在 pH = 10.0 时依旧能够上浮, 表明其耐碱性较强但耐酸性较弱 (见下页图 2)。

(二) 不同材料的 H_2O_2 酶活性比较

如下页图 3 所示, 当 H_2O_2 酶提取液质量浓度为 12.5g/L, pH = 7.0 时, 真菌的酶活性显著高于土豆和猪肝, 其中平菇中 H_2O_2 酶活性最强, 滤纸片上浮速度为 3.59mm/s, 显著高于其他 2 种真菌 ($P = 0.009 < 0.01$)。金针菇和杏鲍菇酶活性相当, 滤纸片上浮速度分别为 1.82mm/s 和 1.36mm/s, 土豆和猪肝组截至实验开始后 5min, 滤纸片均无上浮迹象, 表明此质量浓度下土豆和猪肝的酶活性较弱, 产生

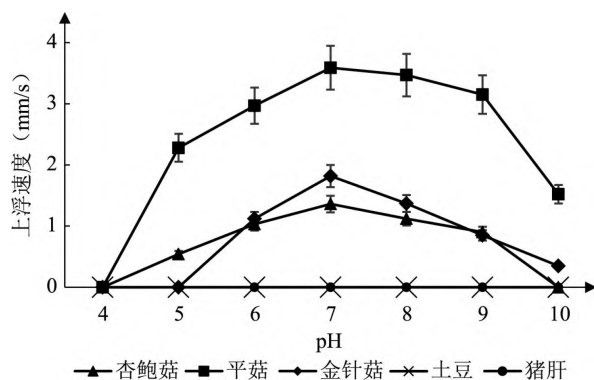


图2 不同pH条件下不同实验材料得到的滤纸片上浮速度对比

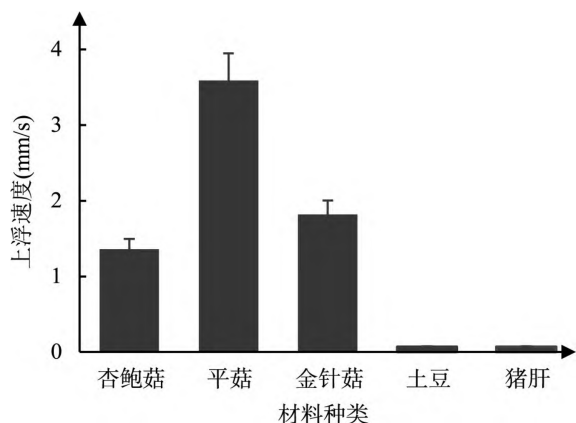


图3 pH7.0条件下不同材料得到的滤纸片上浮速度对比

O₂ 的速度较慢。因此在选择 H₂O₂ 酶的实验材料时可以使用菇类替代土豆和猪肝,相同质量浓度下,平菇的酶活性远高于其他材料,既清洁卫生又节省实验用量,是本实验发现的最佳实验材料。但若实验室只准备了土豆或猪肝,则应适当增加提取液浓度或底物浓度,加快反应速度。

四、思考与讨论

(一)合适的提取液质量浓度能提升实验的精度

滤纸片上浮法操作简单,现象直观,更适用于课堂探究 H₂O₂ 酶最适 pH 的教学。真菌中尤其是平菇的 H₂O₂ 酶活性较强,相同质量浓度下反应速率明显高于土豆与猪肝,材料用量更省,保存更简单。但是实验时应选择合适的材料质量浓度,资料显示和本实验预实验所得,真菌的最适质量浓度为 12.5g/L 左右,过高会导致滤纸片上浮速度过快,不同 pH 下的组间差异过小,难以确定最适 pH;过低则导致滤纸片上浮速度较慢,甚至不上浮,影响实验结果。

(二)合理的固定化时间能提高实验的效率

将 H₂O₂ 酶固定在滤纸片上时,固定时间过长,会导致 H₂O₂ 酶因长期暴露在空气中逐渐失活,但若固定时间过短,则会使酶无法充分吸附于滤纸片上。因此,固定化时间的控制对于实验成功与否有着重大的影响。在实际操作中,建议将固定化时间控制在 2min~3min,这样既可以节约课堂时间,又可以使固定化效果达到最佳状态。且由于 H₂O₂ 在空气中也会缓慢分解,建议此时开展分工合作,4 人为 1 组,2 人负责固定 H₂O₂ 酶,另外 2 人配制 H₂O₂ 溶液,相互协助,一旦固定完成就以最快速度将滤纸片投入 H₂O₂ 溶液中开展实验。

五、结语

教师教学过程中应着力培养学生的科学探究和科学实践能力,为学生提供动手体验和操作的机会。本实验基于学生在实验过程中遇到的实际问题,引导学生从实验材料、实验装置、实验方法和实验过程 4 个方面进行改进和探索。经历多次的失败后,最终提出了有效方案,极大提高了实验的成功率。但受时间限制,只比较了 5 种材料在不同 pH 下的 H₂O₂ 酶活性,其他效果更好的实验材料尚待进一步研究。

参考文献:

- [1]黎兴,李晓晴,朱明启,等.“比较过氧化氢在不同条件下的分解”实验材料优化[J].生物学通报,2022,57(7):53.
- [2]孙逊.“探究 pH 对过氧化氢酶活性的影响”实验的优化设计[J].生物学教学,2021,46(10):51.
- [3]刘中兴,谢传欣,石宁,等.过氧化氢溶液分解特性研究[J].齐鲁石油化工,2009,37(2):99.
- [4]洋琦斌.“探究 pH 对过氧化氢酶的影响”实验创新[J].中学生物教学,2021(6上):49.

【作者简介】董路遥、张志祥(通讯作者)、戚尚宁、芦文婧、邱宇,宁波市惠贞书院(浙江 宁波 315016)。

【原文出处】《生物学通报》(京),2023.11.51~53

【基金项目】浙江省教育科学规划 2021 年度一般规划课题“现象教学模式下高中生科学探究能力培育策略研究”(2021SC062);浙江省教师教育规划 2022 年度课题“基于课程综合化的高中生物学情境教学与实践”(ZX2022041)。