

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 27.01.2021 17:29:32

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d088

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»
(ЮЗГУ)**

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

_____ **О.Г. Локтионова**

« » _____ **2018 г.**

БИОХИМИЯ

**Методические указания по выполнению лабораторных работ
для студентов направления 19.03.03 «Продукты питания животного
происхождения»**

Курск 2018

УДК: 577.1

Составители: А.Г. Калужских

Рецензент

Кандидат биологических наук, доцент *А.Г. Беляев*

Биохимия: методические указания по выполнению лабораторных работ / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: А.Г. Калужских. Курск, 2018. 50 с.: Библиогр.: с.50

Приводится перечень лабораторных работ, цель их выполнения, вопросы для подготовки, краткие теоретические сведения, задания, рекомендуемая литература.

Предназначены для студентов направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» очной, заочной и сокращенной форм обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 2,90 Уч.-изд. л. 2,63 Тираж экз. Заказ. Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Лабораторная работа №1 Правила техники безопасности при работе в лаборатории биохимии. Качественные реакции на белки.	6
Лабораторная работа №2 Биохимия белка.	11
Лабораторная работа №3 Ферменты: общая характеристика, свойства, классификация, механизм действия.	16
Лабораторная работа №4 Биохимия углеводов.	21
Лабораторная работа №5 Биохимия липидов.	24
Лабораторная работа №6 Витамины.	29
Лабораторная работа №7 Общие понятия об обмене веществ и энергии в организме	35
Лабораторная работа №8 Биологическое окисление	41
Лабораторная работа №9 Взаимосвязь обмена белков, углеводов и липидов.	45
Список рекомендуемой литературы	50

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к выполнению лабораторных работ предназначены для студентов направления для студентов направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» с целью закрепления и углубления ими знаний, полученных на лекциях и при самостоятельном изучении учебной литературы.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта. Перечень лабораторных работ, их объем соответствуют учебному плану и рабочей программе дисциплины. При подготовке к занятиям студенты должны изучить соответствующий теоретический материал по учебной литературе, приобрести теоретические и практические знания по вопросам биохимии.

Студенты должны ознакомиться с содержанием (теоретической частью) и порядком выполнения лабораторной работы.

Каждое занятие содержит цель его выполнения, контрольные вопросы, краткие теоретические сведения, задания для выполнения. При выполнении работ основным методом обучения является самостоятельная работа студентов под руководством преподавателя. Результаты выполненных каждым студентом заданий обсуждаются в конце занятий. Оценка преподавателем работы студента осуществляется комплексно: по результатам выполненного задания, устному сообщению и качеству оформления работы, что может быть учтено в рейтинговой оценке знаний студента.

Правила оформления работ

Перед выполнением работы необходимо внимательно ознакомиться с методикой её проведения и предположить ожидаемый результат, вытекающий из теоретического обоснования химизма реакции или процесса. Выполнение работ знакомит студента с методами качественных и количественных исследований органических веществ, дополняет и закрепляет теоретический материал наиболее сложных разделов изучаемой дисциплины.

В начале раздела и перед работой излагаются краткие теоретические обоснования по химии, биологической роли и метаболизму органических веществ. К каждой работе дано описание химической реакции или процесса, ожидаемый результат и практическое значение.

Выполняемую работу обязательно записать в тетрадь с указанием номера, названия, цели работы, принципа метода, происходящих реакций или процессов, схемы исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод.

1. Отчеты по каждой теме занятия оформляются в отдельной тетради.
2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, краткие ответы на вопросы для подготовки, объекты и результаты исследования, выводы по результатам работ. Если предусмотрено оформление работ в виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.
3. Каждую выполненную работу студент защищает в течение учебного семестра. Выполнение и успешная защита работ являются допуском к сдаче теоретического курса на экзамене.

Лабораторная работа №1

Тема: Правила техники безопасности при работе в лаборатории биохимии.

Качественные реакции на белки.

Цель работы: Ознакомиться с правилами техники безопасности при работе в лаборатории биохимии. Изучить качественные реакции, используемые для обнаружения белков.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть

Правила техники безопасности при работе в лаборатории биохимии

- Работу в лаборатории необходимо выполнять в халатах.
- Всю посуду перед выполнением работы необходимо вымыть.
- Концентрированные кислоты, щелочи и другие сильнодействующие реактивы набирать пипеткой с грушей или отмерять цилиндром.
- Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и легкоиспаряющимися веществами производить только в вытяжном шкафу.
- Если пролили концентрированную кислоту или щелочь, то их надо нейтрализовать толченым мелом или раствором кислоты, соответственно, а затем смыть водой.
- При попадании концентрированной кислоты или щелочи на кожу, необходимо быстро смыть водой, а затем соответственно 2 % раствором бикарбоната натрия или 2 % раствором борной кислоты.
- Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.
- Категорически запрещается принимать в лаборатории пищу, пользоваться лабораторной посудой для питья.
- При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.

Белки – это высокомолекулярные органические соединения, состоящие из остатков аминокислот, которые связаны друг с другом при помощи пептидных связей. В состав белков входят 18–20 различных аминокислот. Одни из них организм может синтезировать самостоятельно – это заменимые аминокислоты. Другие, незаменимые, в организме синтезироваться не могут и должны поступать с пищей. Все аминокислоты, входящие в состав белков, являются α -аминокислотами, так, как только аминогруппа, стоящая в α -положении, способна образовывать пептидную связь. Все α -аминокислоты, за исключением глицина, имеют ассиметричный углеродный атом и поэтому

являются оптически активными соединениями. Они способны вращать плоскость поляризованного луча или вправо, или влево. Первые называются правовращающими и обозначаются знаком +, вторые – левовращающими (-). Кроме этого, аминокислоты образуют два ряда стереоизомеров – L и D. В состав живых организмов входят L(-)-аминокислоты.

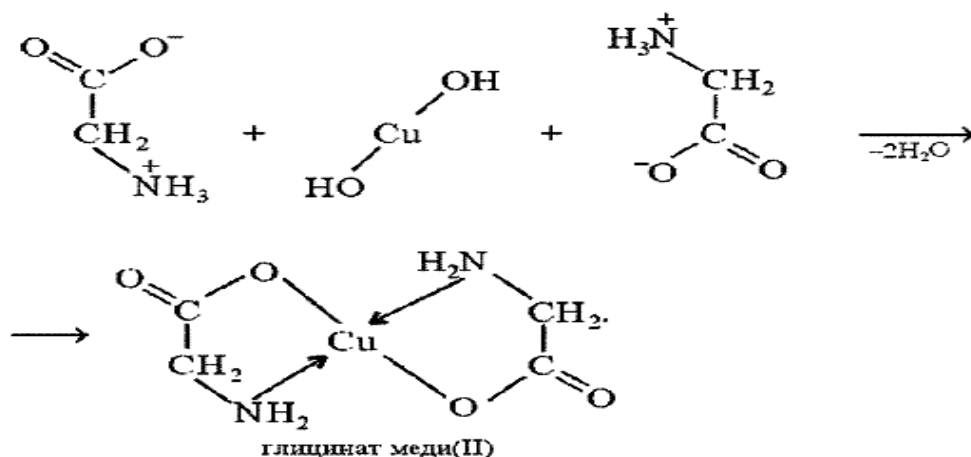
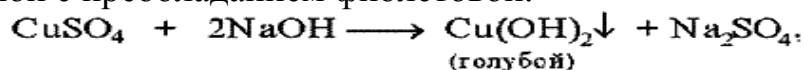
Для обнаружения белка применяют цветные реакции. Они делятся на два типа: общие, или универсальные, и специфические. К универсальным реакциям относятся биуретовая (на пептидную связь) и нингидриновая (на α-аминокислоты). При их помощи можно открыть любой белок.

К специфическим относятся реакции на отдельные аминокислоты. Это реакции на функциональные группы радикалов аминокислот, входящих в состав белков. При их помощи можно открыть только тот белок, в состав которого они входят.

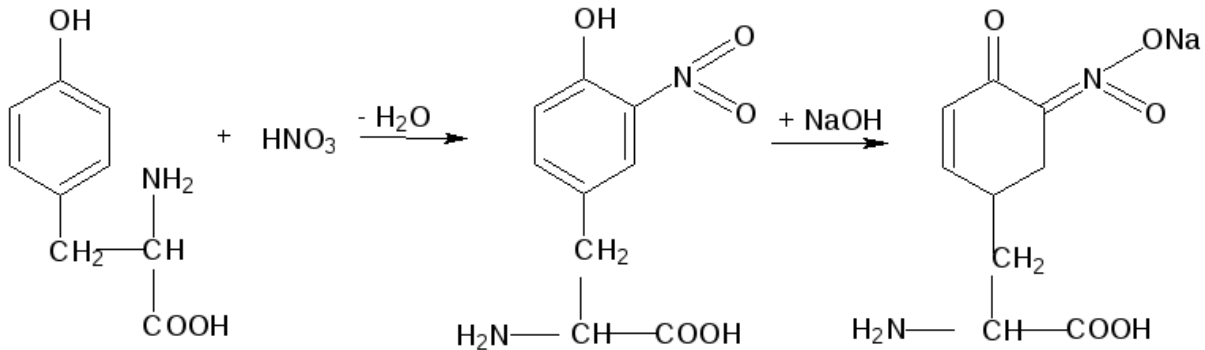
Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях, растворах и установить аминокислотный состав различных природных белков. Эти реакции применяются как для качественного, так и для количественного определения белка и содержащихся в нем аминокислот.

Биуретовая реакция (Пиотровского) открывает пептидную связь(-CO-NH-) в белке. В щелочной среде раствор белка, взаимодействуя с ионами меди, приобретает сине-фиолетовый цвет. Продукты неполного гидролиза белка – пептоны дают розовое окрашивание.

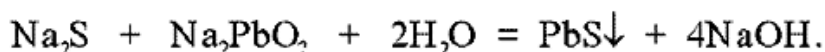
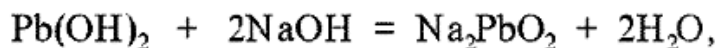
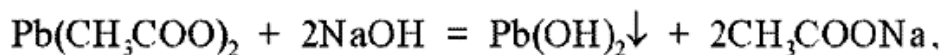
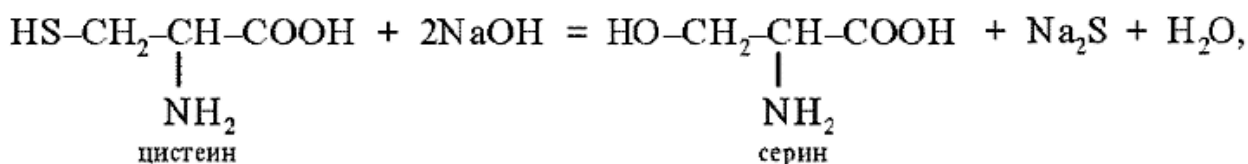
Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей. Пептидные связи могут существовать в двух формах: кето-форме и енольной. В щелочной среде они переходят в енольную форму. При прибавлении ионов меди образуется биуретовый комплекс в результате соединения меди с пептидной группировкой белка. Окраска биуретового комплекса зависит от количества пептидных связей, концентрации белка и количества ионов меди в растворе. Она изменяется от синей до красной с преобладанием фиолетовой.



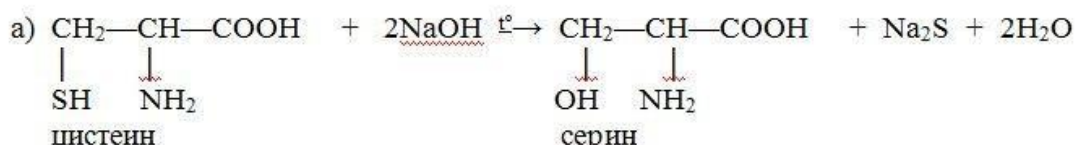
Ксантопротеиновая реакция (Мульдера) происходит только при наличии в белке ароматических аминокислот (тирозин, фенилаланин, триптофан). Реакция обусловлена образованием нитропроизводных циклических аминокислот. При добавлении к таким белкам концентрированной азотной кислоты протекает реакция нитрования с образованием окрашенных в желтый цвет нитросоединений. При добавлении щелочи желтая окраска переходит в оранжевую, так как в щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, имеющие оранжевый цвет.



Белки, содержащие сульфгидрильные группы (–SH) можно обнаружить при помощи нитропруссидной реакции и реакции Фоля. Предварительно проводят щелочной гидролиз белка, при котором отщепляется сульфидная группа, которую обнаруживают при помощи тех или иных реактивов. При проведении нитропруссидной реакции сульфидную группу открывают нитропруссидом натрия. В результате его взаимодействия с ионом серы окраска раствора изменяется на красно-фиолетовую. При проведении реакции Фоля действуют плюмбитом натрия (Na_2PbO_2), который образуется в результате взаимодействия ацетата свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и гидроксида натрия NaOH , в результате чего образуется черный нерастворимый осадок сульфида свинца. При нагревании белка, содержащегося в молекуле остатки цистеина и цистина, с концентрированным раствором щелочи и ацетатом (или другой растворимой солью) свинца (реактив Фоля) образуется бурое или черное окрашивание. Это объясняют тем, что под действием щелочи от радикалов цистеина отщепляется сера в виде иона со степенью окисления минус два, который, взаимодействуя с ионом свинца (II), дает бурый или черный нерастворимый осадок сульфида свинца. Белки, в составе которых нет цистина и цистеина, реакцию Фоля не дают.



Цистеиновая реакция – на белки, имеющие серусодержащие аминокислоты (например, цистеин):



2. Выполнение заданий по теме занятия Биуретовая реакция (Пиотровского).

Реактивы: растворы с массовыми долями: казеина 1 %, желатина 1 %, яичного белка 1 %, сульфата меди 1 %, гидроксида натрия 10 и 30 %, глицина (или другой аминокислоты).

Берут пять пробирок: в одну добавляют 5 капель разбавленного яичного белка, во вторую – 5 капель раствора желатина, в третью – 5 капель растительного альбумина (*рекомендуется приготовить заранее. 25 г пшеничной муки смешивают с 100 мл воды и оставляют смесь на 30—40 мин при частом встряхивании, после чего переносят ее в воронку на большой складчатый фильтр. Первые, мутные, порции сливают на фильтр повторно. Довольно быстро получают 60—70 мл прозрачного раствора, содержащего главным образом альбумин пшеничных зерен—лейкозин*), в четвертую – 5 капель раствора казеина и в пятую – 5 капель любой аминокислоты. В каждую пробирку прибавляют 5 капель 10%-ного раствора NaOH и 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Все пробирки тщательно перемешивают. Наблюдают за изменением окраски в пробирках и отмечают, какой цвет появился в каждой из них. Фиолетовый цвет свидетельствует о наличии пептидных связей в белковых молекулах. Внимание! В пробирки нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера).

Реактивы: 10% раствор NaOH, HNO₃ (конц.), 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствор желатина; раствор аминокислоты, раствор растительного альбумина. бензол.

Берут пять пробирок: в первую наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую – 5 капель раствора тирозина, в третью – 5 капель раствора желатина, в четвертую – 5 капель растительного альбумина и в пятую – 5 капель раствора казеина. Затем во все пробирки добавляют по 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. Наблюдают за изменением окраски и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из пробирок. Появление осадка желтого цвета свидетельствует о присутствии циклических аминокислот. После охлаждения в каждую пробирку добавляют приблизительно 10–15 капель 20%-ного раствора щелочи NaOH. Желтое окрашивание растворов переходит в оранжевое вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

Эта реакция используется для обнаружения α-аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, триптофан, фенилаланин при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, имеющие желтую окраску. В щелочной среде нитропроизводные этих аминокислот дают соли, окрашенные в оранжевый цвет. Желатин, например, не содержащий ароматических аминокислот, не дает ксантопротеиновой пробы

После окончания опыта делают вывод, какие из взятых для опыта веществ содержат циклические аминокислоты, а какие – не содержат.

Реакция на аминокислоты, содержащие серу.

Реакция Фоля

Реактивы: 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствор желатина; раствор аминокислоты; раствор растительного альбумина, реактив Фоля (к 5% раствору ацетата свинца прибавляют равный объем 30% раствора гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка).

Берут пять пробирок: в первую наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую – 5 капель 0,02%-ного раствора цистеина, в третью – 5 капель раствора желатина, в четвертую 5 капель растительного альбумина и в пятую – 5 капель раствора казеина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30%-ного раствора NaOH и по 1 капле 5%-ного раствора ацетата свинца. Интенсивно кипятят и дают постоять 1–2 мин. Наблюдают за изменением окраски в каждой из пробирок и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из них. Делают вывод, в состав каких белков входят серосодержащие аминокислоты.

3. Контрольные вопросы

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков и их строения.
2. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.
3. Какая реакция открывает пептидные связи?

4. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции? Химизм реакции.
5. Назовите аминокислоты, содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
6. Какие аминокислоты открывает ксантопротеиновая реакция?

Лабораторная работа №2

Тема: Биохимия белка.

Цель работы: Изучить физико-химические свойства белков.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Белки являются высокомолекулярными соединениями, так как в их состав входят сотни и тысячи атомов. Например, чистый β -лактоглобулин имеет следующий элементарный состав: $C_{1864}H_{3012}O_{576}N_{418}S_{21}$. Все белки в зависимости от их строения делятся на две группы: фибриллярные и глобулярные.

Фибриллярные белки имеют форму тончайших нитей. Они входят в состав мышц (миозин), сухожилий (коллаген, эластин), кожи, шерсти и т. д. Большинство из них не растворимы в воде.

Глобулярные белки имеют округлую форму. К ним относятся альбумины, глобулины, гемоглобин и др. Они растворяются в воде и солевых растворах. Белки состоят из аминокислот и поэтому обладают амфотерными свойствами. При растворении белков в воде ион водорода, появляющийся в результате диссоциации карбоксильной группы, присоединяется к аминогруппе. Поэтому белковые молекулы несут как положительные, так и отрицательные заряды.

Величина заряда определяется количеством ионогенных групп. При определенном значении рН суммарный электрический заряд молекулы белка становится равным нулю. Такое значение рН называется изоэлектрической точкой (рI). В изоэлектрической точке растворы белков имеют минимальную устойчивость, поскольку они лишены основного стабилизирующего фактора – заряда и поэтому легко выпадают в осадок. Определить изоэлектрическую точку белка можно, определив рН, при котором раствор белка имеет наибольшее помутнение. У большинства белков изоэлектрическая точка лежит в слабокислой среде.

Растворение белка объясняется его гидратацией, т. е. образованием водной оболочки из ориентированных молекул воды. При этом образуются коллоидные растворы. Такие растворы являются неустойчивыми. При добавлении к ним каких-нибудь водоотнимающих веществ (концентрированных растворов солей, спирта и т. д.) гидратация уменьшается, следовательно, уменьшается и растворимость белка. Белок выпадает в осадок. Процесс выпадения белка в осадок под действием водоотнимающих средств называется высаливанием.

При высаливании происходит дегидратация белковых молекул. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, заряд катиона и аниона соли и т. д. Поэтому различные белки высаливаются при различной концентрации одних и тех же солей. Этим пользуются для разделения белков на различные фракции. Так, глобулины, имеющие относительную массу больше, чем альбумины, осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а альбумины – его насыщенным раствором. Осаждение белков различными солями зависит от их дегидратирующей способности, в частности хлорид натрия осаждает белки слабее, чем сульфат аммония. Высаливание белков является обратимым процессом, т. е. при высаливании способность белков к растворению не теряется. При прибавлении достаточного количества воды белок снова может раствориться.

Денатурация белка, в отличие от высаливания, является необратимым процессом. При денатурации происходит разрушение третичной и частично вторичной структуры белковой молекулы в результате разрыва водородных связей. При денатурации в той или иной мере происходит изменение формы и размеров молекулы, изменение реактивности некоторых химических групп, уменьшение растворимости, уменьшение или полная потеря специфической биологической активности, изменение удельной оптической активности. При денатурации изменяется строение поверхностного слоя белковых частиц, в результате чего на поверхность выходят гидрофобные (не растворимые в воде) группы. Денатурацию вызывают различные физические (нагревание, действие ультрафиолетовых лучей и т. д.) и химические (соли тяжелых металлов, минеральные и органические кислоты и т. д.) факторы. Соли тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) вызывают денатурацию белков даже в очень малых концентрациях. Взаимодействуя с белками, ионы тяжелых металлов адсорбируются на них, образуя соединения, растворимые в избытке солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но не растворимые в воде.

Концентрированные минеральные кислоты тоже вызывают денатурацию белковых молекул. Происходит образование комплексных солей белка с кислотами (за исключением фосфорной кислоты). В избытке всех минеральных кислот (исключая азотную) выпавший осадок белка растворяется.

Денатурированные частицы белка способны к агрегации и выпадению в осадок, но коагуляция является вторичным процессом по отношению к денатурации, поэтому денатурация белка не всегда сопровождается выпадением осадка. Так, если проводить нагревание сильно подкисленных или подщелоченных растворов белка, то осадка не образуется. Это объясняется тем, что на молекулах белка появляются одноименные заряды (+ или –), которые препятствуют объединению частиц в агрегаты. Заряд на поверхности белковых молекул является одним из основных стабилизирующих факторов. Для количественного осаждения белка необходимо устранить два фактора стабилизации коллоидных частиц: разрушить их защитную водную оболочку и снять электрический заряд. Для этого белок денатурируют нагреванием в изоэлектрической точке.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания.

Яичный белок состоит из нескольких белков, отличающихся друг от друга по растворимости. При помощи метода высаливания из него можно выделить альбумины и глобулины.

Реактивы: яичный белок, хлорид натрия, сульфат аммония, раствор уксусной кислоты, (1%-й, 10%-й), 10%-й раствор гидроксида натрия.

1. К 20 каплям неразбавленного яичного белка добавляют сухую соль хлорида натрия до насыщения раствора, т. е. до того момента, когда соль перестанет растворяться. Выпадает белый аморфный осадок глобулинов. Через 10–12 мин. произойдет их полное осаждение. После этого осадок отфильтровывают через бумажный фильтр. Пробирку с фильтратом кипятят или проводят с ее содержимым биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка, положительная – на его присутствие. Делают вывод о наличии белка в фильтрате.
2. К 20 каплям неразбавленного яичного белка добавляют 20 капель насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором выпадает осадок яичного глобулина. Через 5–10 мин. осадок отфильтровывают. В фильтрате остается яичный альбумин. Для его высаливания к фильтрату прибавляют сухую соль сульфата аммония до полного насыщения раствора. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают, а фильтрат кипятят или проводят с ним биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка. Делают вывод о высаливающей способности хлорида натрия и сульфата аммония.
3. Берут пять пробирок, наливают в каждую по 0,5 мл раствора разбавленного яичного белка. Затем в первую пробирку добавляют 1–2

капли 1%-ной уксусной кислоты, во вторую 2–3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты, в третью – 1–2 капли 1%-ого раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, в четвертую – 1–2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия, а пятую оставляют без изменения. Все пять пробирок нагревают на водяной бане. Наблюдают за изменениями, которые в них происходят. Определяют, в каких пробирках и в какой последовательности происходит помутнение. Результаты опыта и выводы записывают в табл. 1.

Таблица 1

Результаты опыта

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Слабокислая (1% CH_3COOH)	Хлопьевидный осадок, образуется быстрее и полнее чем в контрольной пробирке	
2	Кислая (10% CH_3COOH)	Осадок не образуется даже при кипячении.	
3	Слабокислая (1% $\text{CH}_3\text{COOH}+\text{NaCl}$)	Образуется осадок.	
4	Щелочная (10% NaOH)	Осадок не образуется даже при кипячении	
5	Нейтральная	Осадок образуется даже до того, как жидкость закипит.	

Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке (когда заряд молекулы равен нулю), поскольку при этом частицы белка наименее устойчивы. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки с основными свойствами - в слабощелочной. В сильнокислых или сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, так как его частицы перезаряжаются и несут в первом случае положительный, а во втором-отрицательный заряд, что повышает их устойчивость в растворе.

Осаждение белков солями тяжёлых металлов

Реактивы: яичный белок, 5%-е растворы сульфата меди, ацетата свинца, нитрата серебра.

Берут три пробирки, наливают в каждую по 5 капель раствора яичного белка и добавляют в первую – 2 капли 5%-ного раствора сульфата меди, во

вторую – 2 капли 5%-ного раствора нитрата серебра, в третью – 2 капли 5%-ного раствора ацетата свинца.

Наблюдают образование осадка во всех пробирках. Затем в каждую из пробирок добавляют избыток реактива: в первую – 8-10 капель сульфата меди, во вторую – 8-10 капель нитрата серебра, в третью 8-10 капель ацетата свинца. В пробирке с нитратом серебра растворения осадка не происходит. В двух пробирках наблюдается растворение осадка. Однако при избытке некоторых солей наблюдается растворение первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле. Делают вывод о том, в избытке каких солей осадок растворяется. Если осадок не растворяется, то реакция практически не обратима.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Реактивы: яичный белок, концентрированная серная кислота, концентрированная азотная кислота.

Берут две пробирки, наливают по 10 капель: в одну – концентрированной азотной кислоты, в другую – серной. Наклоняют пробирки под углом 45° и осторожно по стенке наливают по 10 капель белка. Пробирки ставят вертикально, не допуская перемешивания жидкостей. На границе двух слоёв наблюдают помутнение в виде кольца белого цвета. В каждую пробирку добавляют избыток соответствующей кислоты. Наблюдается растворение осадка в избытке серной кислоты. Денатурация белка протекает за счет удаления факторов устойчивости: заряд и гидратная оболочка.

3. Контрольные вопросы

1. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белки в растворе?
2. Каковы общие принципы осаждения белка из раствора?
3. Каким способом можно осадить белки из раствора, не вызывая их денатурации?
4. Как отделить глобулины от альбуминов в растворе яичного белка?
5. Что такое изоэлектрическая точка белка и изоэлектрическое состояние белка?
6. Какие вещества вызывают денатурацию?
7. Почему белки при нагревании в изоэлектрической точке быстро выпадают в осадок и не выпадают при нагревании в сильно кислой и сильно щелочной среде?

Лабораторная работа №3

Тема: Ферменты: общая характеристика, свойства, классификация, механизм действия.

Цель работы: Изучить свойства ферментов как биологических катализаторов.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Ферменты (энзимы) – это специфические белки, выполняющие в организмах роль биологических катализаторов. Они увеличивают скорость протекания реакций, но, как и небиологические катализаторы, не могут вызывать реакции, невозможные по термодинамическим условиям. Ферменты могут быть как простыми, так и сложными белками. Простыми белками является большинство гидролитических ферментов (пепсин, трипсин, уреазы и др.).

Большинство ферментов остальных классов – это сложные белки. Фермент, который является сложным белком, состоит из белка и небелковой части – простетической группы. Белковая часть термолабильна и называется апоферментом. Простетическая группа в отличие от белковой части термостабильна. Иногда связь белка с простетической группой очень непрочная, и фермент легко диссоциирует на белковую и небелковую части. Небелковая часть фермента, которая легко отделяется и может существовать самостоятельно, называется коферментом, или коэнзимом.

Механизм действия ферментов объясняется теорией гомогенного катализа. Фермент вступает во взаимодействие с субстратом с образованием фермент-субстратного комплекса, который, в свою очередь, взаимодействует дальше. При этом фермент отделяется и затем вступает во взаимодействие с новым субстратом. Таким образом, фермент катализирует реакцию между двумя субстратами, а сам при этом не расходуется. Если же в состав фермента входит кофермент, то фермент катализирует реакцию не между двумя субстратами, а между субстратом и коферментом. Кофермент является связующим звеном между двумя ферментами. Особенностью многих ферментов является обратимость их действия, т. е. один и тот же фермент может катализировать как прямую, так и обратную реакцию.

Особое значение при катализе играет активный центр фермента. Активный центр – это часть молекулы ферментативного белка, к которому присоединяется субстрат. Он образован остатками аминокислот, в него могут также входить ионы металлов, витамины и др. Активный центр состоит из ряда

функциональных групп, определенным образом ориентированных в пространстве. Поэтому активный центр фермента может взаимодействовать только с определенным субстратом, который может к нему присоединиться.

Ферменты обладают специфичностью действия, так как каждый из них катализирует лишь определенные химические реакции. Различают абсолютную и относительную специфичность действия. Ферменты, обладающие относительной специфичностью действия, катализируют реакции у близких по строению веществ, действуя на определенный тип связи. К ним относятся ферменты желудочно-кишечного тракта: пепсин, трипсин и др. Ферменты, обладающие абсолютной специфичностью, действуют на один определенный субстрат. Так, мальтоза расщепляет мальтозу, но не оказывает никакого действия на сахарозу.

Поскольку ферменты являются белками, на их активность влияют температура (они термолабильны), рН среды, наличие различных химических веществ и т. д.. Следовательно, скорость ферментативного катализа зависит от многих факторов: температуры, рН среды, концентрации субстрата и фермента и т. д. Одним из важнейших факторов, от которого зависит активность фермента, является температура.

С изменением температуры активность фермента изменяется. Каждый фермент имеет свой температурный оптимум. У большинства ферментов теплокровных животных он лежит в интервале 37–40°C. Повышение температуры выше 70°C приводит к потере активности фермента. Фермент необратимо инактивируется вследствие денатурации белка. Понижение температуры, как и повышение, приводит сначала к уменьшению, а потом и к полной потере активности фермента. Но при низких температурах ферменты не разрушаются, поэтому при последующем повышении температуры их активность восстанавливается (обратимая инактивация). Подавляющее большинство ферментов теплокровных животных при 0°C прекращают свою деятельность, т. е. теряют свою активность. В отличие от них ферменты хладнокровных животных, в частности рыб, при такой температуре имеют достаточно высокую активность. Потеря их активности происходит при гораздо более низкой температуре. Наибольшую устойчивость к действию низких температур проявляет фермент липаза, который вызывает гидролиз простых липидов (триглицеридов). Он теряет свою активность при температуре – 25°C.

Активность ферментов меняется в зависимости от реакции среды. Для каждого фермента существуют оптимальные значения рН, при котором он проявляет максимальную активность. Так, для пепсина оптимальное значение рН = 1,5–2,5, в то время как трипсин при таких условиях полностью теряет способность гидролизовать белки. Оптимум его действия наступает при рН = 8–9. Влияние рН на скорость ферментативного катализа, так же, как и влияние температуры, связано с их белковой природой. На скорость фермен-

тативного катализа влияет также присутствие определенных веществ, которые могут и увеличивать активность фермента (активаторы), и уменьшать ее (ингибиторы или парализаторы). Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуя его образованию (активаторы) или блокированию (ингибиторы). Одно и то же вещество для одного фермента может быть активатором, а для другого – ингибитором. Ферменты могут находиться как в активной форме, так и в неактивной. Неактивная форма называется проферментом (зимогеном). В нем присутствует парализатор, блокирующий активный центр.

Изучение влияния различных факторов на скорость ферментативного катализа проводят, используя ферменты слюны: амилазу и мальтозу. Действие ферментов выявляют либо по исчезновению субстрата, либо по появлению продуктов его расщепления. Амилаза катализирует гидролиз гликозидной связи крахмала и гликогена, расщепляя их сначала до декстринов, а затем до мальтозы. Крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины в зависимости от размера дают разное окрашивание – от фиолетового до красно-бурого. Мальтоза с йодом окрашивания не дает. Мальтоза расщепляет мальтозу до глюкозы, имеющей альдегидную группировку, по реакции на которую она может быть обнаружена.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Влияние активаторов и ингибиторов (парализаторов) на активность амилазы.

Реактивы: Раствор слюны (слюна, разведенная в 5 раз); H_2O дистиллированная; 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди; 1% раствор хлорида натрия, 0,5%-й раствор крахмала, 0,1%-й раствор йода.

Берут три пробирки и наливают в первую – 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 8 капель дистиллированной воды и 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, в третью – 8 капель дистиллированной воды и 2 капли 1%-ного раствора медного купороса. В каждую пробирку добавляют по 10 капель слюны, разведенной 5 раз (2 капли слюны и 8 капель воды) и по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре.

В три другие пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1 капле 0,1%-ного раствора йода. Через 5 мин из каждой пробирки, в которой проводят опыт, отбирают по 2–3 капли содержимого и переносят с пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрасится в синий цвет, реакцию повторяют еще через 5 мин со вновь приготовленными пробирками с раствором йода, а затем повторяют еще через 5 мин. Различная окраска при реакции с йодом, а, следовательно, разная степень гидролиза крахмала обусловлена разной скоростью ферментативного катализа при добавлении различных веществ. Результаты работы оформляются в виде табл. 1 и делаются выводы.

Ионы Cl активирует амилазу, ионы Cu – ингибиторы для всех ферментов, т.к. типичный металл вызывает денатурацию белка. Значит NaCl является активатором, а CuSO₄ – ингибитором.

Таблица 1

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ пробирки	Фермент	Субстрат	Время действия ферментов	Окраска жидкости после добавления йода в присутствии:		
				CuSO ₄	NaCl	вода
1	Амилаза слюны	Крахмал	5			
2	Амилаза слюны	Крахмал	10			
3	Амилаза слюны	Крахмал	15			

Влияние pH среды на активность амилазы

Реактивы: слюна - раствор, разведенный в 10 раз; 1% раствор крахмала; 1% раствор йода; 0,1М раствор лимонной кислоты, 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия, H₂O дистиллированная.

В семь пробирок наливают растворы 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М лимонной кислоты в количествах, указанных в табл. 2. Получают буферные растворы с pH от 5,5 до 8.

В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала и по 2 капли слюны, разведенной 10 раз. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат при температуре 37°C. Через 5 мин из четвертой пробирки (pH в ней должно быть наиболее оптимально для действия амилазы) берут контрольную пробу для реакции с йодом. Если получают сильнее окрашивание, пробу повторяют через 5 мин. Когда в пробе будет получено красное или желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по 1 капле 0,1%-ного раствора йода, их содержимое перемешивают и фиксируют окраску. Оптимум pH для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (при реакции с раствором йода получается красная или желтая окраска). Результаты работы оформляются в виде табл. 2, делаются выводы.

Таблица 2

Влияние pH среды на активность амилазы

№ про-	Кол-во 0,2 М Na ₂ HPO ₄ , мл	Кол-во 0,1М ли-	pH среды	Кол-во капель	Кол-во капель	Окрашивание в реакции с

бирки		монной кислоты, мл		0,5% крахмала	слюны	йодом
1	0,58	0,42	5,6	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Реактивы: раствор слюны; 1% раствор крахмала; 1% раствор йода; 5% раствор сульфата меди; 10% раствор гидроксида натрия; термостат.

Наливают в 4 пробирки по 0,5 мл крахмала. Еще в 4 пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:5) слюны. Берут первую пару пробирок (одна с ферментом, другая – с крахмалом) и помещают в баню со льдом. Вторую пару оставляют при комнатной температуре. Третью пару пробирок помещают в термостат (37° С), а четвертую – в кипящую водяную баню. Через 5 минут содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин при тех же условиях. Из третьей пробирки отливают 3 капли жидкости и прodelывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле. После этого добавляют по 2 капли реактива Люголя (раствор йода в водном растворе иодида калия. Типичная 5 % концентрация готовится из 5 частей йода, 10 частей иодида калия и 85 частей воды) во все пробирки и наблюдают за развитием окраски.

Результаты записывают в таблицу. Делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы.

Таблица 3

Влияние температуры на активность амилазы слюны

№ пробирки	Температура инкубации °С	Окрашивание с йодом
1		
2		

3		
4		

3. Контрольные вопросы

1. Каков механизм действия ферментов?
2. Что такое активный центр фермента?
3. Как влияет изменение температуры на скорость ферментативного катализа?
4. В чем заключается механизм действия высоких и низких температур на ферменты?
5. Чем обусловлена термолабильность ферментов?
6. На чем основано влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативного катализа?
7. От каких факторов зависит скорость ферментативного катализа?
8. Из каких составных частей состоит сложный фермент?
9. Какое значение pH оптимально для действия амилазы?

Лабораторная работа №4

Тема: Биохимия углеводов.

Цель работы: Изучить основные свойства углеводов.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(C_nH_{2n}O)_n$, а также производные этих соединений. В организме человека и животных углеводы выполняют разнообразные функции. Они служат источником энергии, являются пластическим материалом для построения клеток, а также используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводы классифицируются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды, или простые сахара, состоят из одной полиоксиальдегидной или полиоксикетонной единицы.

Олигосахариды содержат в своем составе 2–10 остатков моносахаридов, связанных между собой гликозидными связями.

Полисахариды содержат более 10 остатков моносахаридов и подразделяются на гомополисахариды и гетерополисахариды.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Спиртовое брожение

Реактивы: дрожжи, раствор глюкозы, термостат, 10%-й раствор гидроксида натрия, 10%-й раствор йода.

Спиртовое брожение – ферментативный процесс распада глюкозы с образованием этилового спирта и углекислого газа: $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2$. Процесс гликолиза и брожение протекают одинаково до образования пировиноградной кислоты с выделением тепла и образованием двух молекул АТФ. В анаэробных условиях под действием дрожжевой декарбоксилазы (ТПФ) пировиноградная кислота декарбоксилируется и превращается в уксусный альдегид, который восстанавливается в этиловый спирт под действием алкогольдегидрогеназы.

Пробирку на 1/3 заполняют раствором дрожжей, доливают доверху 5% раствор глюкозы и закрывают корковой пробкой со стеклянной трубкой. Такой бродильный аппарат помещают в термостат при 37°C на 30–50 минут (в зависимости от активности ферментов дрожжей). Когда в процессе брожения произойдет накопление газа в верхней части пробирки, продельывают качественные реакции на CO_2 и спирт.

Обнаружение CO_2 . В бродильный аппарат наливают 10% раствор едкого натра почти до краев пробирки и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешивают ее содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию пробирки.

Обнаружение этилового спирта. Спирт можно открыть с помощью реакции получения йодоформа: $C_2H_5OH + 4I_2 + 6NaOH = CHI_3 + 5NaI + HCOONa + 5H_2O$. Для этого около 2–3 мл жидкости из бродильного аппарата отфильтровывают в пробирку, добавляют несколько капель 10% раствора йода до получения желтого окрашивания и нагревают, не доводя до кипения, в пламени спиртовки. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

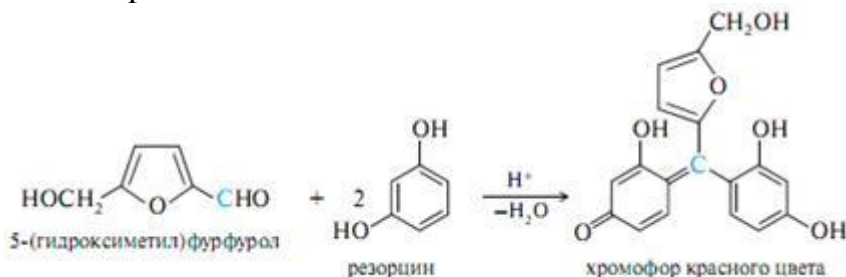
Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Реактивы: раствор глюкозы, раствор фруктозы, реактив Селиванова.

В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую пробирку – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. (Реактив Селиванова - 0,5 % - ный раствор резорцина в 20 % - ной соляной кислоте. Для приготовления 20 % - ной соляной кислоты берут 213 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем кислоты водой до 500 мл. Реактив Селиванова следует применять свежеприготовленным.)

Приготовление реактива Селиванова: в 100 мл 20 % - ного раствора HCl растворяют 0,050 г резорцина.)

Осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно появляется красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

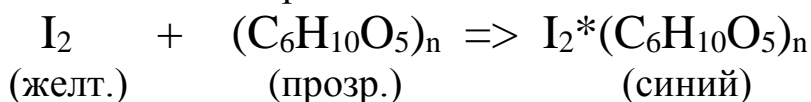


Реакция крахмала с йодом

Реактивы: раствор крахмала, раствор Люголя, раствор гидроксида натрия, этиловый спирт.

К 2 мл раствора крахмала прибавляют 1–2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части: к первой части прибавляют 1 мл раствора NaOH, ко второй – 2 мл этилового спирта, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, но в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой.

йод + крахмал ⇒ соединение темно-синего цвета

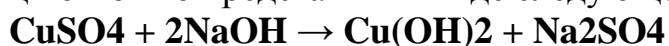


Реакция Троммера

Реактивы: 1% раствор глюкозы; 1% раствор сахарозы; 1% раствор крахмала; 10% раствор гидроксид натрия; 5% раствор сульфата меди.

Углеводы, в составе которых имеются свободные карбонильные группы, дают ряд реакций, основывающихся на окисляемости этой группы.

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удается выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:



Гидрат окиси окисления Гидрат закиси
 меди (голубой осадок) глюкозы меди (желтый осадок)



В пробирку наливают раствора глюкозы и 6-8 капель NaOH. Затем по каплям добавляют раствор CuSO_4 до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II), постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера. Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов.

Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Кислотный гидролиз крахмала

Реактивы: раствор Люголя, серная кислота, крахмал.

В колбочку помещают 5 мл раствора крахмала 3 мл раствора серной кислоты. Нагреть на спиртовке в течение 5 мин, отбирая пипеткой каждую мин по 0,5 мл гидролизата и добавляя в них по 1 капле раствора Люголя. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. С оставшимся гидролизатом проделать реакцию Троммера. По результатам реакции сделать вывод о строении крахмала.

3. Контрольные вопросы

1. Что называют углеводами?
2. На какие группы делятся углеводов.
3. Напишите структурные формулы глюкозы и фруктозы (линейные и циклические) и отметьте асимметричные атомы.
4. Какие углеводы относятся к восстанавливающим?
5. Принципы методов обнаружения: а) глюкозы? б) фруктозы? в) сахарозы?
6. В чем сходство и различие в строении крахмала и гликогена?

Лабораторная работа №5

Тема: Биохимия липидов

Цель работы: Изучить основные свойства липидов.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Липидами называются все органические вещества независимо от их строения, растворяющиеся в органических растворителях (эфире, хлороформе и др.). Чаще всего это производные высших жирных кислот и спиртов.

В зависимости от строения липиды подразделяются на простые и сложные. Молекулы простых липидов состоят только из остатков жирных кислот и спиртов. К ним относятся триглицериды (нейтральные жиры) и воск. Молекулы сложных липидов содержат остатки фосфорной кислоты (фосфолипиды или фосфотиды), моно- или олигосахаридов (гликолипиды). К липидам относят также некоторые вещества, которые не являются производными жирных кислот – стерины, убихиноны и др.

Липиды входят в состав клеточных мембран (фосфотиды), являются запасными питательными веществами, выполняют энергетическую функцию (триглицериды), являются растворителями многих биологически активных веществ, выполняют механическую функцию и т. д.

Нейтральные жиры (триглицериды) состоят из глицерина и остатков трех высших жирных одноосновных кислот: $\text{CH}_2\text{OCOR}'$ – CHOCOR'' – $\text{CH}_2\text{OCOR}'''$, где R' , R'' и R''' – радикалы высших жирных одноосновных кислот.

В состав триглицеридов входят остатки насыщенных и ненасыщенных кислот преимущественно с четным количеством углеродных атомов, количество которых колеблется от 8 до 24.

Жиры наземных млекопитающих, в которых преобладают триглицериды насыщенных высших жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой) мононенасыщенной олеиновой, являются при комнатной температуре твердыми веществами. Жиры рыбы морских млекопитающих, в состав которых входит значительное количество ненасыщенных жирных кислот – жидкие при комнатной температуре вещества. Так, в состав жиров рыб входят: 20–25% насыщенных жирных кислот, содержащих от 14 до 20 атомов углерода (преимущественно 16 и 18); 30–35% ненасыщенных жирных кислот с 16 и 18 атомами углерода и 40–45% ненасыщенных жирных кислот с 20 и 22 атомами углерода.

Для характеристики жиров, их состояния и качества введены химические константы: кислотное число, эфирное число, число омыления и йодное число.

Кислотное число характеризует количество свободных кислот, содержащихся в 1 г жира. Эфирное число характеризует количество связанных кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует общее количество кислот, содержащихся в 1 г жира. Йодное число характеризует количество непредельных кислот в 100 г жира.

Наличие в составе жиров непредельных (ненасыщенных) жирных кислот определяет ненасыщенность жира. Степень ненасыщенности жира характеризуют йодным числом. Метод определения йодного числа основан на том,

что для непредельных кислот характерны реакции присоединения по месту двойных связей. По месту разрыва каждой двойной связи присоединяются по два атома йода.

По двойным связям кроме йода могут реагировать и другие галогены (хлор и бром). Однако для них характерны как реакции присоединения, так и реакции замещения. Поэтому они не только присоединяются по месту разрыва двойной связи, но и замещают атомы водорода в радикале. Йод же при определенных условиях реагирует с двойными связями, поэтому именно он используется для определения ненасыщенности жиров и масел.

Йодное число измеряется количеством граммов йода, которое присоединяется к 100 г жира. У жиров рыб оно колеблется от 104 до 193. Йодное число является одним из наиболее важных химических показателей для жиров и в первую очередь – для рыбного жира и масел. Оно позволяет судить о степени ненасыщенности масла (жира), о его прогоркании, склонности к «высыханию» и другим изменениям, происходящим при хранении переработке пищевых и технических жиров и масел. Понижение йодного числа указывает на снижение качества жира или масла.

Механизм реакции взаимодействия ненасыщенных жирных кислот с йодом следующий:

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира (масла).

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество жира (масла). При хранении жира происходит частичный гидролиз триглицеридов, что приводит к накоплению свободных жирных кислот, т. е. к возрастанию кислотности. Повышение кислотного числа указывает на снижение качества жира (масла).

Метод определения кислотного числа основан на том, что кислоты легко вступают в реакцию со щелочами (реакция нейтрализации). Свободные жирные кислоты, содержащиеся в жире или масле, оттитровывают 0,1 н раствором гидроксида калия (KOH). Титрование ведут именно гидроксидом калия, а не натрия (NaOH), потому что образующиеся в результате реакции калиевые соли растворимы лучше, чем натриевые.

Число омыления характеризует общее количество кислот, содержащееся в жире. Числом омыления называется количество миллиграммов KOH, необходимое для нейтрализации всех – как свободных, так и связанных в форме триглицеридов – жирных кислот, содержащихся в 1 г жира (масла). У жиров рыб число омыления колеблется от 180 до 204.

Эфирное число характеризует содержание связанных (в виде эфиров) жирных кислот. Оно равно количеству миллиграммов KOH, необходимому для нейтрализации жирных кислот, образующихся при гидролизе в 1 г жира

(масла). Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Сравнение ненасыщенности различных жиров.

Реактивы: рыбий жир, коровье масло, свиное сало, подсолнечное масло, хлороформ, 0,001н раствор йода в хлороформе.

Берут навески по 0,5 г различных жиров (рыбьего жира, свиного сала, коровьего масла, маргарина, подсолнечного масла). Помещают их в пробирки, добавляют в каждую по 3 мл хлороформа и хорошо перемешивают до полного растворения жира. После этого полученный в каждой пробирке раствор титруют из микробюретки 0,001 н раствором йода в хлороформе до появления отчетливой розовой окраски и записывают объем раствора йода, пошедшего на насыщение каждого жира. Располагают жиры по убывающей степени насыщенности.

Определение йодного числа.

Реактивы: жир или масло, этиловый спирт, 0,2н раствор йода, дистиллированная вода, 0,1н раствор тиосульфата натрия

Берут точную навеску небольшого количества жира или (и) масла. Для этого, если жир жидкий, его помещают в склянку, в пробку которой вставлена пипетка, и все это взвешивают на аналитических весах. Затем при помощи пипетки 3–4 капли жира помещают в сухую коническую колбу емкостью 250 мл, с пришлифованной стеклянной пробкой, и снова взвешивают склянку с жиром, пробкой и пипеткой.

По разности масс определяют величину навески, взятой на исследование. Отмеривают 25 мл этилового спирта и переносят его в колбу с навеской. Содержимое колбы хорошо перемешивают для растворения жира (масла). Если навеска растворяется плохо, колбу ставят на водяную баню и немного нагревают. Параллельно ставят «слепой» (контрольный) опыт. Для этого берут вторую колбу и вносят в нее 25 мл этилового спирта.

В бюретку наливают 0,2 н спиртового раствора йода и из нее переносят по 12,5 мл раствора в каждую из колб. Затем добавляют в каждую из них по 100 мл дистиллированной воды.

Колбы закрывают пробкой и хорошо встряхивают в течение не менее 5 мин. Затем содержимое колб оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия до появления слабозеленого окрашивания. После чего прибавляют 1 мл раствора крахмала и титруют до исчезновения синего окрашивания. Записывают объемы тиосульфата натрия, которые пошли на титрование растворов каждой из колб.

Разность между объемом 0,1 н раствора тиосульфата натрия, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества йода, связанного навеской жира (масла). Йодное число вычисляют по формуле:

Йодное число = $(V_1 - V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100/a$

где V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование контроля, мл;

V_2 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование опыта, мл;

0,0127 – титр тиосульфата натрия по йоду;

a – навеска жира (масла), г.

Для достоверного определения проводят несколько параллельных опытов и по каждому из них рассчитывают величину йодного числа. Допускается расхождение лишь в десятых долях получаемых значений йодных чисел.

Определение кислотного числа.

Реактивы: жир или масло, смесь спирта и эфира в пропорции 1:1, раствор фенолфталеина, 0,1н спиртовой раствор гидроксида калия.

Для определения кислотного числа 2–3 г жира или (и) масла взвешивают на аналитических весах, помещают в коническую колбу объемом 100 мл и добавляют в нее 10–15 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1) Для нейтрализации смеси спирта и эфира прибавляют 3–4 капли раствора фенолфталеина и по каплям добавляют 0,1 н спиртовой раствор КОН до появления слабо розового окрашивания.

После полного растворения навески жира (масла) в нейтрализованной спирто-эфирной смеси к ней прибавляют 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска не должна исчезать при взбалтывании в течение 0,5–1 мин. Определяют объем гидроксида калия, который пошел на титрование.

Кислотное число вычисляют по формуле: кислотное число = $VТ/a$

где V – объем 0,1 н раствора КОН, израсходованный на титрование взятой навески, мл;

T – титр 0,1 н раствора КОН, мг/мл;

a – навеска жира (масла), г.

Определение числа омыления.

Реактивы: жир или масло, 0,5н спиртовой раствор КОН, фенолфталеин, соляная кислота.

Берут две колбы объемом 50 мл и в одну вносят навеску жира (масла), взвешенную на аналитических весах массой 0,5 г, а в другую – 0,5 мл воды. В обе колбы при помощи мерной пипетки добавляют по 15 мл 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия.

Колбы закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками, длина которых должна быть не менее 70 см, ставят на кипящую водяную баню и нагревают при периодическом встряхивании в течение 30–40 мин. Жидкость в колбе должна кипеть слабо, так чтобы верхняя часть обратного холодильника не нагревалась.

По окончании омыления определяют количество не связавшейся щелочи. Для этого в каждую колбу добавляют по 15–20 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Исходя из того, что в 1 мл 0,5 н раствора гидроксида калия содержится 28 мг КОН, число омыления определяют по формуле: число омыления = $(V_1 - V_2) \times 28/a$.

где V_1 – объем 0,5 н раствора HCl, затраченный на титрование контроля (колба с водой), мл;

V_2 – объем 0,5 н раствора HCl, затраченный на титрование опыта (колба с жиром), мл;

a – навеска жира (масла), г.

Определение эфирного числа

Для определения эфирного числа нужно сначала определить число омыления (п. 4.4) и кислотное число (п. 4.3), после чего находят разность между ними – это и будет эфирное число.

эфирное число = число омыления – кислотное число.

3. Контрольные вопросы

1. Какие константы характеризуют химический состав жиров?
2. Что характеризует йодное число и как его определяют?
3. Что характеризует эфирное число и как его определяют?
4. Что характеризует кислотное число и как его определяют?
5. Что характеризует число омыления и как его определяют?

Лабораторная работа №6

Тема: Витамины

Цель работы: Изучить качественные реакции витаминов.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Витамины – это разнообразные по химическому строению низкомолекулярные органические вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности организма. Они являются необходимой составной частью пищи. Содержание витаминов в пище по сравнению с ее основными компонентами очень мало. При отсутствии в пище витаминов развиваются заболевания, ко-

торые носят общее название – авитаминозы, а при их недостаточном содержании – гиповитаминозы. Если содержание витаминов в пище велико, это тоже приводит к заболеваниям – гипервитаминозам. Суточная потребность в витаминах измеряется в милли- или микрограммах.

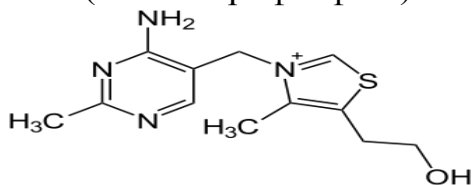
Витамины – это вещества, обеспечивающие нормальное протекание биохимических и физиологических процессов в организме. Поэтому они относятся к группе биологически активных веществ (БАВ), которые влияют на обмен веществ. Это связано с тем, что водорастворимые витамины входят в состав сложных ферментов всех классов, кроме гидролаза, в качестве их простетических групп или коферментов. Следовательно, изменения в обмене веществ, происходящие при авитаминозах, являются результатом нарушения деятельности ферментативных систем.

Роль жирорастворимых витаминов в процессе обмена веществ изучена в меньшей степени.

Все витамины в зависимости от их отношения к воде делятся на две группы: водорастворимые и жирорастворимые. Все водорастворимые витамины, за исключением витамина С и Р, содержат в своем составе азот, поэтому их объединяют в комплекс витаминов группы В. Они обычно сопровождают друг друга в продуктах и обладают общим свойством – устойчивостью к нагреванию. В отличие от них витамин С к нагреванию неустойчив. При нагревании он быстро разрушается, особенно в присутствии кислорода и солей тяжелых металлов.

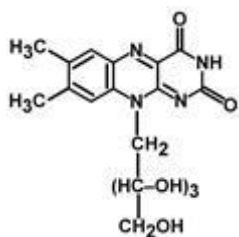
К водорастворимым витаминам относятся В1 – тиамин, В2 – рибофлавин, РР (В5) – никотиновая кислота и ее амид, В6 – пиридоксин, В3 – пантотеновая кислота, Н – биотин, Вс – фолиевая кислота, В12 – цианкобаламин, В15 – пангамовая кислота, С – аскорбиновая кислота, Р – рутин и некоторые другие.

Витамин В1 (тиамин) состоит из пиримидинового и тиазолового колец. В организме он входит в состав коферментов ТПФ (тиаминпирофосфата) и ТТФ (тиаминтрифосфата).



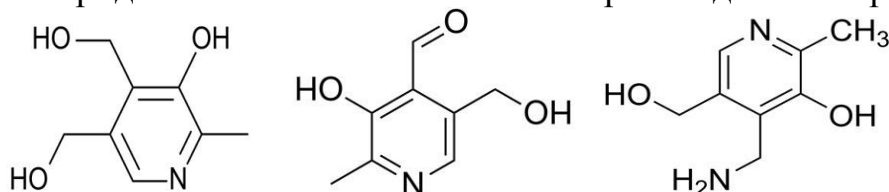
ТПФ является коферментом ферментов декарбоксилирования (декарбоксилаз) α -кетокислот, поэтому при его недостатке процессы декарбоксилирования будут нарушены. Это в первую очередь относится к декарбоксилированию пировиноградной кислоты (ПВК) – важнейшего промежуточного продукта обмена углеводов:

Витамин В2 (рибофлавин) относится к группе природных пигментов, известных под названием флавинов.



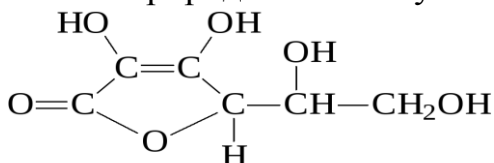
Рибофлавин входит в состав коферментов аэробных (вторичных) дигидрогеназ – в состав флавинадениндинуклеотида (ФАД). Поэтому при недостатке рибофлавина происходит нарушение процесса биологического окисления органических веществ, в частности окисления β -оксикислот (восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД · Н₂) и др.

Витамин В6 (пиридоксин). Пиридоксин – это общее название группы веществ, обладающих активностью витамина В6: пиридоксола, пиридоксаля и пиридоксамина. Все они являются производными пиридина.



В организме витамин В6 играет большую роль в обмене белков и аминокислот. Он входит в состав коферментов ферментов трансаминирования (перееминирования) и поэтому участвует в процессах трансаминирования аминокислот (переносе аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту). Он также входит в состав декарбоксилаз некоторых аминокислот. Поэтому при недостатке витамина В6 нарушается белковый обмен.

Витамин С (аскорбиновая кислота) – вещество, которое по своей химической природе близко к углеводам. Оно очень неустойчиво.

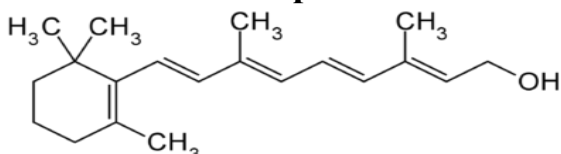


В живых организмах витамин С присутствует как в свободном, так и в связанном виде. Связанная с белком аскорбиновая кислота – аскорбиноген – обладает большей устойчивостью к окислителям, чем свободная кислота. Важнейшей особенностью аскорбиновой кислоты является ее способность к обратимому окислению (дегидрированию) с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. В живых организмах витамин С принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, в синтезе стероидных гормонов, в образовании тетрагидрофолиевой кислоты, в превращениях аминокислот (тирозина и фенилаланина) и др. Это говорит о том, что биологическая роль аскорбиновой кислоты многообразна.

К жирорастворимым витаминам относятся витамины А (ретинол), Д (эргокальциферол, холикальциферол), Е (токоферол), К (филлохинон), Q (убихинон).

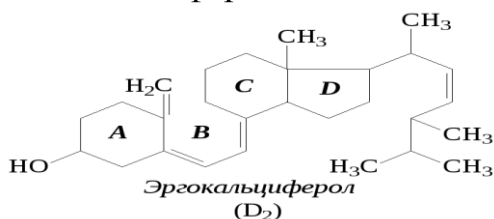
нон), F (комплекс ненасыщенных жирных кислот – линолевой, линоленовой и арахидоновой).

Витамин А – ретинол.



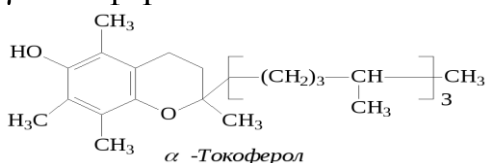
Биологически активный витамин А содержится только в животных продуктах. В настоящее время выделены два вещества, обладающих активностью витамина А: витамин А1 – из печени морских рыб и витамин А2 – из печени пресноводных рыб. Витамин А2 отличается от витамина А1 наличием дополнительной двойной связи в кольце (между 3 и 4 углеродными атомами). В растениях содержатся пигменты, которые являются провитаминами витамина А. В животных организмах под влиянием фермента каротинокиназы они превращаются в витамин А. К ним относится каротин – желтый пигмент растений. Витамин А в организме принимает участие в образовании зрительного пурпура – родопсина. Кроме этого, он поддерживает стабильность клеточных мембран:

Витамин Д является производным циклопентанпергидрофенантрена. Выделено несколько веществ, обладающих активностью витамина Д. Наиболее распространены витамин Д2 – эргокальциферол и витамин Д3 – холекальциферол:



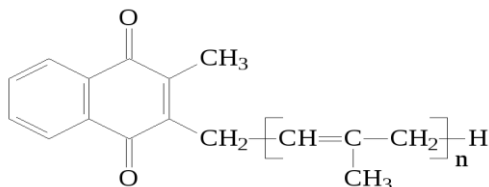
Биологически активный витамин Д содержится только в животных продуктах. Провитамином витамина Д2 является эргостерол. Он содержится в грибах и дрожжах. Провитамином витамина Д3 является холестерол – он содержится в коже. Провитамины превращаются в витамины при облучении их ультрафиолетовыми лучами. Витамин Д в живых организмах участвует в процессе костеобразования, так как влияет на обмен кальция и фосфора, а так же на группу ферментов, осуществляющих всасывание кальция. При его недостатке кости становятся мягкими и искривляются:

Витамин Е (токоферол) существует в виде нескольких изомеров α -, β - и γ -токоферолов.



При недостатке витамина Е нарушаются процессы размножения, наступает бесплодие. Витамин Е оказывает влияние на окислительные процессы в организме, принимая участие в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с окислительным фосфорилированием. Кроме этого, он является прекрасным природным антиокислителем и стабилизирует витамин А.

Витамин К (филохинон) является производным нафтохинона.



Менахинон (K₂), n = 6-9

Существует два природных вещества, обладающих активностью витамина К – К1 и К2. В живых организмах витамин К входит в состав протетической группы ферментов, участвующих в биосинтезе протромбина. Он участвует также в регуляции процессов фосфорилирования. Искусственно синтезирован викасол, являющийся производным витамина К3 (метилбензохинона), обладающий свойствами витамина К:

Для обнаружения витаминов в различных веществах применяют качественные реакции. Они основаны на цветных реакциях, характерных для группировок, входящих в витамины.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Качественные реакции на витамин А (ретинол).

Реактивы: рыбий жир, концентрированная серная кислота.

Реакция с серной кислотой.

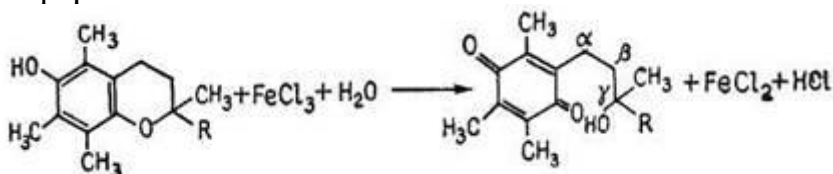
В сухую пробирку вносят 3 капли рыбьего жира в хлороформе (1 каплю рыбьего жира растворяют в 4–5 каплях хлороформа) и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется красно-фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в красно-бурое.

Качественные реакции на витамин Е (токоферол).

Реактивы: хлорид железа (III), раствор токоферола, концентрированная азотная кислота.

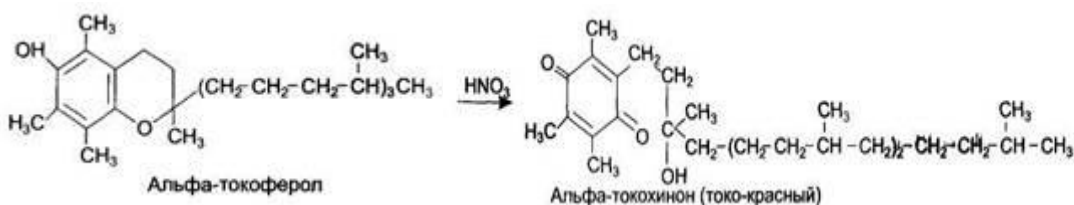
Реакция с хлоридом железа (III).

В сухую пробирку вносят 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α-токоферола, прибавляют 0,5 мл 1%-ного раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают. Раствор в пробирке приобретает красный цвет в результате окисления α-токоферола хлоридом железа (III) в α-токоферилхинон.



Реакция с концентрированной азотной кислотой.

В сухую пробирку вносят 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и тщательно перемешивают. Образуется эмульсия, которая при стоянии расслаивается. При этом ее верхний слой приобретает желтовато-красную или красную окраску в результате окисления α -токоферола в α -токоферилхинон.



Качественные реакции на витамин В1 (тиамин).

Реактивы: раствор нитрита натрия, раствор сульфаниловой кислоты, раствор бикарбоната натрия, раствор тиамин.

Диазореакция.

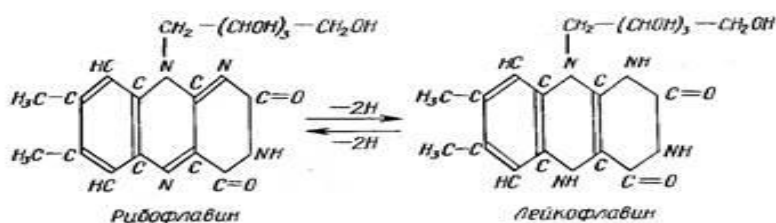
В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

В пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия – получают диазореактив. Добавляют к нему 1–2 капли 5%-ного раствора тиамин или тиаминхлорида и 5–7 капель 10%-ного раствора бикарбоната натрия. Раствор в пробирке окрашивается в оранжево-красный цвет. Если раствор бикарбоната прибавлять осторожно по стенке пробирки (наклонив ее), образуется оранжево-красное кольцо на границе раздела двух жидкостей.

Качественная реакция на витамин В2 (рибофлавин).

Реактивы: 0,005%-й раствора витамина В2, концентрированная соляная кислота, металлический цинк.

В пробирку вносят 10 капель 0,005%-ного раствора витамина В2, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. В результате взаимодействия цинка с кислотой происходит интенсивное выделение водорода. Жидкость в пробирке постепенно розовеет, а затем обесцвечивается. Происходящая реакция обусловлена восстановлением рибофлавина выделяющимся водородом сначала в красный родофлавин, а затем в бесцветный лейкофлавин.



Качественная реакция на витамин В6 (пиридоксин).

Реактивы: 1%-й раствор В6, 1%-й раствор хлорного железа

Витамин В6 при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

В пробирку вносят 10 капель 1%-ного раствора В6, добавляют 10 капель 1%-ного раствора хлорного железа и хорошо перемешивают. Раствор в пробирке окрашивается в красный цвет.

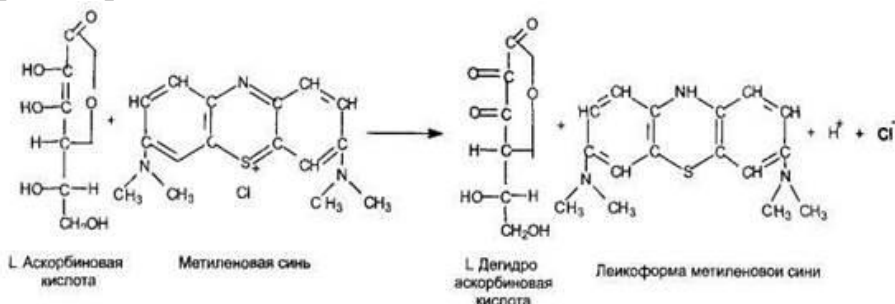
Качественные реакции на витамин С (аскорбиновую кислоту).

Реактивы: 0,002%-й раствор аскорбиновой кислоты, 0,01%-й раствор метиленовой сини.

Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции и восстанавливать различные вещества.

Реакция с метиленовой синью.

В пробирку вносят 10 капель 0,002%-ного раствора аскорбиновой кислоты, добавляют 10 капель 0,01%-ного раствора метиленовой сини, хорошо перемешивают, закрывают пробкой для предохранения от попадания в пробирку кислорода воздуха и помещают в термостат при температуре 37–40°C. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини в бесцветную лейкоформу и образования дегидроаскорбиновой кислоты.



3. Контрольные вопросы

1. На какие группы делятся витамины по отношению к воде.
2. Какими реакциями можно открыть витамины В1, РР, В6, А, Д, С, Е, К, рибофлавин?
3. Какую биологическую роль выполняют витамины Д, А, Е, К, В1, В2, РР, В6, С?

Лабораторная работа №7

Тема: Общие понятия об обмене веществ и энергии в организме

Цель работы: углубить и закрепить понятие обмена веществ, научить рассчитывать суточные энергетические затраты, энергетическую ценность продуктов.

План занятия

1. Теоретическая часть

2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть.

Организм человека, как и все живые организмы, существует как открытая энергетическая система. Это значит, что организм постоянно теряет вещество в виде достаточно простых химических соединений. Одновременно с этим происходит выведение энергии из организма. Но организм - это устойчивая энергетическая система, поэтому потеря вещества и энергии восполняется постоянным их поглощением из окружающей среды. Таким образом, через организм человека постоянно идет поток вещества и заключенной в нем энергии. Этот непрерывный поток является одним из важнейших свойств живых организмов и называется обмен веществ и энергии, или метаболизм. Вещество, поступающее в организм, включает в себе химическую энергию (энергия внутримолекулярных химических связей). Эта энергия преобразуется в организме в химическую энергию других соединений, а также в тепловую, механическую и электрическую. Электрической энергии в организме вырабатывается немного, но она важна для деятельности нервной и мышечной систем.

Обмен веществ – это единый процесс, осуществляющийся на уровне целостного организма, он складывается из метаболических процессов, происходящих в каждой отдельной клетке. Сутью метаболизма является все многообразие превращений веществ в организме, которые происходят либо с затратой, либо с освобождением энергии. Поэтому общий процесс метаболизма имеет две стороны, неразрывно связанные между собой:

Анаболизм (ассимиляция, пластический обмен) - это совокупность реакций синтеза, протекающих в клетках. При этом из более простых веществ синтезируются более сложные вещества. Реакции анаболизма идут с затратой энергии. Основным источником энергии для реакций анаболизма является АТФ. Примером таких реакций является биосинтез белка, протекающий во всех клетках. Исходными веществами для анаболизма являются питательные вещества, поступающие в организм с пищей и образующиеся в результате процесса пищеварения. В результате анаболических реакций происходит постоянное самообновление, рост и развитие организма. Кроме этого, реакции анаболизма являются поставщиками органических соединений для процессов катаболизма.

Катаболизм (диссимиляция, энергетический обмен) - это совокупность реакций расщепления и распада более сложных органических веществ

до более простых, вплоть до углекислого газа и воды. Эти реакции идут с освобождением энергии, примерно половина которой превращается в тепловую и тратится на поддержание температуры тела, а вторая половина энергии запасается в виде макроэргических связей в молекулах АТФ, которая используется в реакциях синтеза.

Основными органическими веществами, из которых состоит организм человека, являются белки, углеводы, жиры, нуклеиновые кислоты, при этом одни вещества могут превращаться в другие, например, углеводы – в жиры и наоборот, белки могут превращаться в жиры и углеводы. Неорганические вещества организма - это вода и минеральные соли. **Полноценная, сбалансированная пища** должна содержать органические вещества в достаточном количестве и качестве, а также в ее составе должны быть необходимые минеральные соли и вода и витамины. Насчитывается около 60 пищевых веществ, которые требуют сбалансированности. Однообразное питание, приводящее к исключению отдельных компонентов, вызывает нарушение обмена веществ. Принято выделять белковый, углеводный, жировой и водно-солевой обмен. Энергетическую ценность пищи измеряют в **килокалориях(ккал)**. Суточная потребность человека в энергии составляет в среднем около 3 100 кДж. Эта величина зависит от пола, возраста, физической и эмоциональной активности. Особенно высоки затраты энергии в пересчете на массу тела у детей 1 – 5 лет в связи с высокой активностью обменных процессов.

2. Выполнение заданий по теме занятия

1. Организм находится в состоянии покоя. Продолжаются ли в нём процессы диссимиляции?

Решить логическую задачу. Перед закладкой на инкубацию определили массу яйца. После того как из него вылупился цыплёнок, провели повторное взвешивание. У кого больше масса: у яйца до инкубации или у цыплёнка с остатками скорлупы, вылупившегося из этого яйца.

2. Внимательно прочитайте приведенную ниже таблицу, в которой даны усредненные значения энергетических затрат различных видов деятельности человека.

Таблица 1.

Энергетические затраты различных видов деятельности человека.

Вид деятельности	Энергетические затраты, в ккал/ч	Время, в часах	Общая сумма, в

			ккал/ч
Сон и отдых лежа	65-70		
Уборка постели, умывание	102		
Употребление пищи	130		
Мытье посуды, глажение белья	120-130		
Вытирание пыли, подметание полов	170		
Стирка белья, мытье полов	200-250		
Чтение учебной литературы	110-120		
Чтение, просмотр телевизора	90-100		
Работа в университете, выполнение контрольных и самостоятельных работ	120-130		
Выполнение лабораторной работы	150		
Занятие спортом	200-600		
Ходьба пешком	110		
Езда в транспорте	100-110		

Составьте подобную таблицу в тетради, озаглавив ее «Мои суточные энергозатраты» и оставляя только те виды деятельности, которые Вы выполняете. При этом для удобства берите лишь одно значение ккал/ч, наиболее соответствующее выполняемому Вами действию.

Оценка состояния обмена веществ и энергии человека по индексу массы тела

Избыточная масса тела наряду с гиподинамией и несбалансированным питанием представляют собой серьезные факторы риска для здоровья.

Ожирение в значительном количестве случаев способствует появлению тяжелых заболеваний в молодом возрасте и косвенно приводит к ранней смертности. Наиболее используемым критерием ожирения является избыток массы тела по отношению к норме. Идеальная масса (индекс Кетле) определяется с учетом конституции человека (нормостеническая, астеническая и гиперстеническая).

Определить массу тела испытуемого в килограммах и рост в метрах. Рассчитать индекс массы тела (ИМТ), $\text{кг}/\text{м}^2$, по формуле:

$$\text{ИМТ} = M/P^2,$$

где M – масса тела, кг; P – рост, м.

Результаты вычислений занести в тетрадь в виде таблицы 2. Сделать вывод о состоянии ИМТ испытуемого, оценить состояние его обмена веществ и энергии.

Таблица 2

Оценка степени ожирения по индексу массы тела

Индекс Кетле	Оценка массы тела	Показатель индекса исследуемого
20-23	Идеальная	
24-29	Избыточная	
30 и более	Ожирение	

Оценка энергозатрат физической деятельности человека

Оценка энергозатрат физической деятельности человека непосредственно связана с вопросами обмена веществ и питания. В организме человека постоянно происходит обмен веществ, для поддержания которого используется энергия, получаемая из пищи. Различают следующие виды обмена:

1) основной обмен – обмен веществ в состоянии «покоя». Взрослый расходует при этом примерно 300 кДж / ч, ребенок – 150...250 кДж / ч;

1) мышечная деятельность, при которой энергозатраты организма составляют от 450 кДж / ч при лёгкой работе до 1600-2000 кДж / ч – при тяжёлой.

Энергия, получаемая из пищи, необходима человеку для поддержания постоянной температуры тела.

Для сохранения баланса в организм человека с пищей должно поступать столько энергии, сколько её было израсходовано.

Оценка энергозатрат мышечной деятельности человека осуществляется на примере пешей прогулки со скоростью 3 км / ч. Энергетическую стоимость прогулки можно оценить по формуле

$$Q = 60 * (0,197 * W + 4,284),$$

где Q – энергозатраты на мышечную деятельность, кДж; W – вес тела человека, кг.

Для определения общего количества затраченной энергии необходимо знать время, в течение которого совершалась работа,

$$Q_{\text{общ}} = Q * t,$$

где $Q_{\text{общ}}$ – энергозатраты на мышечную деятельность кДж / ч; t – время, затраченное на мышечную деятельность, ч.

$$\text{Для пешей прогулки } t = S / U = S / 3 \text{ км /ч,}$$

где S – пройденный путь, км.

Основными пищевыми веществами являются жиры, белки, углеводы.

Долю энергии, поступающую в организм с белками, для компенсации энергозатрат на мышечную деятельность можно определить по формуле:

$$Q_{\text{э1}} = Q_{\text{общ}} D_{\text{Э1}} * 0,01,$$

где $Q_{\text{э1}}$ – доля энергии, поступающая в организм человека с белками, кДж; $D_{\text{Э1}}$ – доля энергии белков в общих энергозатратах, \%.

Расчёты показывают, что $D_{\text{Э1}}$ в пище составляет от 9,0 до 12 \%.

Долю энергии, поступающую в организм с жирами, можно определить по формуле:

$$Q_{\text{э2}} = Q_{\text{общ}} * D_{\text{Э2}} * 0,01,$$

где $Q_{\text{э2}}$ – доля энергии, поступающей в организм с жирами, кДж;

$D_{\text{Э2}}$ – доля энергии жиров в общих энергозатратах, \%.

Расчёты показывают, что $D_{\text{Э2}}$ в пище составляет от 21 до 31 \%.

Долю энергии, поступающую в организм человека с углеводами, можно определить по формуле

$$Q_{\text{э3}} = Q_{\text{общ}} * (100 - D_{\text{Э1}} - D_{\text{Э2}}) * 0,01.$$

Известно, что энергетическая ценность пищевых веществ в пересчёте на один грамм составляет:

белки...17 кДж / г;

жиры...38 кДж/г;

углеводы...17 кДж / г.

Таким образом, сочетание источников энергии в виде пищевых веществ, потребляемых для поддержания баланса в организме человека, можно определить по следующим формулам:

$$1) \text{ количество белков, г: } K_{\text{б}} = Q_{\text{э1}} / 17;$$

$$2) \text{ количество жиров, г: } K_{\text{ж}} = Q_{\text{э2}} / 38;$$

$$3) \text{ количество углеводов } K_{\text{у}} = Q_{\text{э3}} / 17.$$

Ход работы

1. Оцените энергозатраты человека и общие энергозатраты на мышечную деятельность (на примере пешей прогулки).

2. Сравните полученные энергозатраты с энергозатратами в состоянии покоя.

3. Определите долю энергии, поступающей с белками, жирами и углеводами.

4. Определите сочетание источников энергии, потребляемой для поддержания баланса в организме человека.

5. Оформите отчёт.

3. Контрольные вопросы

1. Что такое анаболизм?
2. Что такое катаболизм?
3. Что представляет собой обмен веществ?
4. Какие неорганические вещества должны поступать в организм?

Лабораторная работа №8

Тема: Биологическое окисление

Цель: ознакомить студентов с разновидностями биологического окисления, их механизмами. Привить знания об особенностях протекания биологического окисления, а также об образовании активных форм кислорода, уметь определять пероксидазу.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть

Обмен веществ состоит из 4 этапов.

Освобождается 1% энергии

I этап – расщепление в желудочно-кишечном тракте белков, жиров и углеводов до мономеров (аминокислот, высших жирных кислот и глицерина, моносахаридов). В процессе пищеварения теряется видовая специфичность питательных веществ.

Освобождается 20-30% энергии

II этап – внутриклеточный катаболизм- глюкоза, высшие жирные кислоты, аминокислоты подвергаются специфическим

превращениям до образования ацетил-КоА (гликолиз, β -окисление высших жирных кислот, трансаминирование аминокислот и др.)- процессы протекают в цитоплазме.

III этап – общий путь катаболизма – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).

70-80% энергии

IV этап – терминальная фаза окисления- тканевое дыхание, ЦПЭ- цепь переноса электронов (дыхательная цепь).

Окисление органических веществ в клетках, сопровождающееся потреблением кислорода и синтезом воды, называют тканевым дыханием, а цепь переноса электронов (ЦПЭ) – дыхательной цепью.

Особенности биологического окисления:

1. Протекает при температуре тела;
2. В присутствии H_2O ;
3. Протекает постепенно через многочисленные стадии с участием ферментов-переносчиков, которые снижают энергию активации, происходит уменьшение свободной энергии, в результате чего энергия выделяется порциями. Поэтому окисление не сопровождается повышением температуры и не приводит к взрыву.

Электроны, поступающие в ЦПЭ, по мере их продвижения от одного переносчика к другому теряют свободную энергию. Значительная часть этой энергии запасается в АТФ, а часть рассеивается в виде тепла.

Перенос электронов от окисляемых субстратов к кислороду происходит в несколько этапов. В нем участвует большое количество промежуточных переносчиков, каждый из которых способен присоединять электроны от предыдущего переносчика и передавать следующему. Так возникает цепь окислительно-восстановительных реакций, в результате чего происходят восстановление O_2 и синтез H_2O .

Согласно современной теории БО, окисление происходит как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В аэробных организмах существует несколько путей использования O_2 . Реакции БО необходимы для получения энергии, синтеза новых веществ и разрушения чужеродных веществ. БО является сложным, многостадийным процессом, в котором ведущую роль играют ферменты оксидоредуктазы.

Окислительно-восстановительные реакции (ОВР) – реакции, в которых меняется степень окисления субстрата за счет присоединения/отщепления: 1) $1 e^-$; 2) $2e^-$ и $2H^+$; 3) атомов кислорода.

Биологическое окисление (БО) совокупность окислительно-восстановительных реакций, которые протекают во всех живых клетках. Основная функция БО - обеспечение организма энергией в доступной для использования форме (АТФ).

Субстрат БО – вещество, способное отдавать электрон.

Тканевое дыхание – окисление органических веществ в клетках, сопровождающееся потреблением O_2 и выделением воды.

Субстрат тканевого дыхания – это вещество, которое отдает электрон непосредственно в цепь окислительного фосфорилирования.

Дыхательная цепь – цепь переноса электронов. В переносе электронов от субстратов БО к O_2 принимают участие: 1) НАД и НАДФ зависимые ДГ; 2) ФАД и ФМН зависимые ДГ; 3) цитохромы; 4) коэнзим Q; 5) белки, содержащие негеминовое железо.

Свободная энергия. Каждое органическое вещество обладает определенным запасом внутренней энергии (E). Часть этой внутренней энергии может быть использована для совершения полезной работы, такую энергию называют свободной (G). Направление химической реакции определяется значением ΔG . У катаболических реакций ΔG отрицательно, эти реакции протекают самопроизвольно (экзергонические реакции). У анболических реакций ΔG положительно, они протекают только при поступлении свободной энергии извне (эндергонические реакции).

Редокс-потенциалы. В каждой окислительно-восстановительной системе участвует окисленная и восстановленная формы одного соединения, которые образуют сопряженную окислительно-восстановительную или **редокс-пару**. Разные редокс-пары обладают различным сродством к электрону. Мерой сродства редокс-пары к электрону служит окислительно-восстановительный потенциал, или редокс-потенциал (E_o'), величина которого прямо пропорциональна изменению свободной энергии ΔG . Величину E_o' выражают в вольтах; чем она отрицательнее, тем меньше сродство вещества к электронам и наоборот.

Самое низкое сродство к электрону $-0,42В$ у водорода. Самое высокое сродство к электрону $+0,82В$ у O_2 . Компоненты дыхательной цепи имеют редокс-потенциалы, занимающие промежуточное положение между $-0,42В$ и $+0,82В$. В дыхательной цепи, вещества переносащие электрон, располагают-

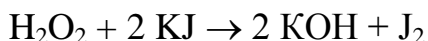
ся в порядке увеличения их редокс-потенциала. Электрон перемещается по дыхательной цепи от веществ с низким сродством к электрону к веществам с более высоким сродством к электрону, при этом происходит высвобождение свободной энергии, часть которой фиксируется в виде макроэргических соединений. Электроны в дыхательную цепь поставляют субстраты тканевого дыхания.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Качественная реакция на пероксидазу молока.

Реактивы: сырое молоко, 1%-й раствор крахмала, 10%-й раствор йодистого калия, 0,5%-й раствор пероксида водорода.

Пероксидаза расщепляет пероксид водорода, а образовавшийся атомарный кислород окисляет йодистый калий, о появление свободного йода, который обнаруживается цветной реакцией с крахмалом, по схеме:



крахмал + $\text{J}_2 \rightarrow$ синее окрашивание

В две пробирки наливают по 5 мл сырого молока. В пробирке № 2, служащей контролем, молоко кипятят. Затем в обе пробирки добавляют по 0,5 мл 1 % раствора крахмала и по 2 капли 10 % раствора йодистого калия и по 5 капель 0,5 % раствора пероксида водорода. В пробирке № 1 появляется синее окрашивание.

Пероксидаза присутствует только в сыром молоке. При нагревании до 80° она разрушается, поэтому о степени пастеризации молока судят по активности в молоке пероксидазы. Простота, точность определения позволяют широко применять этот метод в практической работе при проведении экспертизы молока.

Качественная реакция на каталазу слюны.

Реактивы: 1 - 2 мл слюны и 2 - 3 мл 0,1 % раствора пероксида водорода.

Содержится каталаза во всех тканях и жидкостях организма и предохраняет его от токсического действия пероксида водорода, образующегося в процессе биологического окисления в тканях.

Она катализирует реакцию разложения перекиси водорода с освобождением молекулярного кислорода по схеме:



В пробирку помещают 1 - 2 мл слюны и 2 - 3 мл 0,1 % раствора пероксида водорода. Тотчас же начинается выделение пузырьков кислорода.

Качественная реакция на каталазу крови.

Реактивы: 1 капля крови, 2 - 3 мл 0,1 % раствора пероксида водорода.

В пробирку берут 10-15 капель 1% раствора пероксида водорода и добавляют 1 каплю крови. Жидкость вспенивается, так как происходит бурное выделение пузырьков кислорода.

Обнаружение пероксидазы в крови

Реактивы: 1%-й раствор бензидина, 3%-й раствор пероксида водорода, разбавленная кровь, вода.

Пероксидазы катализируют окисление субстрата в присутствии пероксида водорода, который расщепляется с выделением атомарного кислорода. В организме животных слабой пероксидазной активностью обладает гемоглобин, миоглобин, цитохромы.

Об активности пероксидазы можно судить по изменению окраски бензидина. Окисленный бензидин приобретает вначале зеленую, затем синюю и постепенно переходящую в бурую окраску.

В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора бензидина и по 5 капель 3% пероксида водорода. В первую пробирку добавляют 5 капель разбавленной крови, во вторую - 5 капель воды. Наблюдают за изменением окраски. Сделать выводы.

3. Контрольные вопросы

1. Перечислите этапы обмена веществ?
2. Что такое биологическое окисление?
3. Каковы особенности биологического окисления?
4. На каком этапе обмена веществ выделяется больше всего энергии?

Лабораторная работа №9

Тема: Взаимосвязь обмена белков, углеводов и липидов.

Цель: изучить особенности взаимосвязи обмена белков, углеводов и липидов.

План занятия

1. Теоретическая часть
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

1. Теоретическая часть

Живой организм и его функционирование находятся в постоянной зависимости от окружающей среды. Интенсивность обмена с внешней средой и

скорость внутриклеточных процессов обмена веществ поддерживают постоянство внутренней среды и целостность организма.

Как было указано, обмен веществ в организме человека протекает не хаотично; он интегрирован и тонко настроен. Все превращения органических веществ, процессы анаболизма и катаболизма тесно связаны друг с другом. В частности, процессы синтеза и распада взаимосвязаны, координированы и регулируются нейрогормональными механизмами, придающими химическим процессам нужное направление. В организме человека, как и в живой природе вообще, не существует самостоятельного обмена белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот. Все превращения объединены в целостный процесс метаболизма, подчиняющийся диалектическим закономерностям взаимозависимости и взаимообусловленности, допускающий также взаимопревращения между отдельными классами органических веществ. Подобные взаимопревращения диктуются физиологическими потребностями организма, а также целесообразностью замены одних классов органических веществ другими в условиях блокирования какого-либо процесса при патологии.

В настоящее время экспериментально обосновано существование четырех главных этапов распада молекул углеводов, белков и жиров, которые интегрируют образование энергии из основных пищевых источников.

Первый этап.

На I этапе полисахариды расщепляются до моносахаридов (обычно гексоз); жиры распадаются на глицерин и высшие жирные кислоты, а белки – на составляющие их свободные аминокислоты. Следует подчеркнуть, что указанные процессы в основном являются гидролитическими, поэтому освобождающаяся в небольшом количестве энергия почти целиком используется организмами в качестве тепла.

Второй этап

На II этапе мономерные молекулы (гексозы, глицерин, жирные кислоты и аминокислоты) подвергаются дальнейшему распаду, в процессе которого образуются богатые энергией фосфатные соединения и ацетил-КоА. В частности, при гликолизегексозы расщепляются до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Этот процесс сопровождается образованием ограниченного числа богатых энергией фосфатных связей путем субстратного фосфорилирования. На этом этапе высшие жирные кислоты аналогично распадаются до ацетил-КоА, в то время как глицерин окисляется по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Для ами-

нокислот ситуация на II этапе несколько отлична. При преимущественном использовании аминокислот в качестве источника энергии (при дефиците углеводов или при сахарном диабете) некоторые из них непосредственно превращаются в метаболиты лимоннокислого цикла (глутамат, аспартат), другие – опосредованно через **глутамат** (пролин, гистидин, аргинин), третьи – в пируват и далее в ацетил-КоА (аланин, серин, глицин, цистеин). Наконец, ряд аминокислот, в частности лейцин, изо-лейцин, расщепляется до ацетил-КоА, а из фенилаланина и тирозина, помимо ацетил-КоА, образуется оксалоацетат через фумаровую кислоту. Как видно, II этап можно назвать этапом образования ацетил-КоА, являющегося по существу единым (общим) промежуточным продуктом катаболизма основных пищевых веществ в клетках.

Третий этап

На III этапе ацетил-КоА (и некоторые другие метаболиты, например α -кетоглутарат, оксалоацетат) подвергаются окислению («сгоранию») в цикле ди- и трикарбоновых кислот Кребса. Окисление сопровождается образованием восстановленных форм НАДН + H^+ и ФАДН₂.

Четвёртый этап

На IV этапе осуществляется перенос электронов от восстановленных нуклеотидов на кислород (через дыхательную цепь). Он сопровождается образованием конечного продукта – молекулы воды. Этот транспорт электронов сопряжен с синтезом АТФ в процессе окислительного фосфорилирования

Регуляция и взаимосвязь метаболизма

Для нормального функционирования организма должна осуществляться точная регуляция потока метаболитов по анаболическим и катаболическим путям. Все сопутствующие химические процессы должны протекать со скоростями, отвечающими требованиям организма как единого целого в условиях окружающей среды. Генерация АТФ, синтез макромолекул, транспорт, секреция, реабсорбция и другие процессы должны чутко реагировать на изменения в окружении, в котором находится клетка, орган или весь организм. Клеточный метаболизм основан на принципе максимальной экономии. Клетка потребляет в каждый данный момент как раз такое количество питательных веществ, которое позволяет ей удовлетворять свои энергетические нужды. Такая высокая организация и скоординированность метаболизма достигается с помощью регуляторных механизмов. Эти механизмы достаточно разнообразны.

Различают несколько уровней регуляции метаболизма:

1. Молекулярный.
2. Клеточный.
3. Органный (тканевой).
4. Организменный.

По времени достижения регуляторного эффекта различают быструю регуляцию (действующую в течение секунд и минут) и медленную регуляцию (в течение часов и суток).

Основными регуляторными механизмами являются:

1. Регуляция на уровне мембран.
2. Регуляция с участием циклических нуклеотидов и других вторичных посредников.
3. Регуляция количества ферментов.
4. **Регуляция ферментативной активности.**
5. Гормональная регуляция.

Регуляция на уровне мембран может осуществляться посредством нескольких механизмов. Во-первых, это избирательная проницаемость мембран для различных метаболитов и ионов. Во-вторых, способность мембран фиксировать гормоны с помощью рецепторов. В-третьих, ферментативная активность мембран. На уровне мембран реализуются, по крайней мере частично, такие регуляторные факторы, как доступность субстратов и коферментов, удаление продуктов реакции.

Циклические нуклеотиды и другие вторичные посредники участвуют в реализации действия целого ряда гормонов.

Регуляция количества ферментов. Концентрация любого фермента определяется соотношением скоростей его синтеза и распада. Скорость синтеза белков-ферментов регулируется с помощью механизмов, общих для регуляции синтеза других белков. Влияние регуляторных факторов может интегрально проявляться в виде репрессии или индукции синтеза фермента. Данный механизм относится к медленному типу регуляции метаболизма.

Регуляция активности ферментов. Это один из наиболее разнообразных методов регуляции метаболизма. Он может реализоваться по целому ряду механизмов.

2. Выполнение заданий по теме занятия

1. Некоторые бактерии, дрожжи, паразитирующие черви не нуждаются в кислороде. Какой из двух способов образования АТФ используется у этих организмов для аккумуляции энергии?

2. Животному внутривенно ввели стерильный раствор сахарозы. Появится ли сахароза в моче?
3. Один спортсмен пробежал дистанцию 100 м, а другой – 5000 м. У которого из них будет выше содержание молочной кислоты в крови и почему?
4. Какой процесс является источником энергии для скелетных мышц в начальный период их интенсивных сокращений, в условиях, когда физическая работа выполняется через 3-4 часа после обеда? Из представленного ниже перечня выберите метаболиты и составьте схему этого процесса.

Пируват

Гликоген

УДФ-глюкоза

Глюкоза

Глюкозо-1-фосфат

Лактат

Глюкозо-6-фосфат

Метаболиты цитратного цикла

Ацетил-КоА

CO₂ и H₂O

5. Может ли этанол превращаться в организме в гликоген? Ответ поясните.

3. Контрольные вопросы

1. Что происходит с углеводами, жирами и белками на первом этапе обмена?
2. Каковы особенности второго этапа обмена?
3. Перечислите основные регуляторные механизмы обмена метаболитов?
4. Какие вам известны уровни регуляции метаболизма?

Список рекомендуемой литературы

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: Учебник. - М.: Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
3. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учебник. -М.: Высшая школа, 2000. - 479с.
4. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия [Текст] : учебник для студентов вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. - 3-е изд., испр. - М. : Высшая школа, 2003. - 479 с.
5. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1-3. Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 1055 с.
6. Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянов Г.А. Практикум по общей биохимии: Учебник. – М.: Просвещение, 1982. – 311 с.
7. Биохимия [Текст] : учебник / Под ред. В. Г. Щербакова. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб. : ГИОРД, 2003. - 440 с
8. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии [Текст] : учебное пособие / А. А. Чиркин. - М. : Новое знание, 2002. - 512 с