

**ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Биохимия

Учебно-методическое пособие

НОВОСИБИРСК 2015

УДК 577.1 (075)
ББК 28.072, Я73
Б 638

Кафедра физиологии и биохимии человека и животных

Составители: канд. мед. наук, проф. *И.В. Тюньков*
канд. биол. наук, доц. *О.С. Котлярова*
канд. биол. наук, доц. *Н.В. Батенева*
ст. преподаватель *Т.В. Гарматарова*

Рецензент: канд. с.-х. наук, доц. *О.В. Рявкин*

Биохимия: учебно-методическое пособие/ сост.: И.В. Тюньков, О.С. Котлярова, Н.В. Батенева, Т.В. Гарматарова// Новосиб. гос. аграр. ун-т; Биолого-технолог. ф-т;. – Новосибирск, 2015. – 143 с.

Учебно-методическое пособие по биохимии предназначено для студентов по специальности 36.05.01 - Ветеринария и направлениям подготовки 06.03.01 - Биология; 19.03.03 - Продукты питания животного происхождения; 36.03.01 - Ветеринарно-санитарная экспертиза; 27.03.01 - Стандартизация и метрология; 38.03.07 - Товароведение; 19.03.04 - Технология продукции и организация общественного питания для всех форм обучения.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом БТФ (протокол № 8 от 20 мая 2014).

Ответственный за выпуск: профессор Смирнов П.Н.

Новосибирский государственный аграрный университет, 2015

Введение

Целью изучения биохимии при подготовке специалистов и бакалавров является приобретение необходимых знаний и навыков и использование методов этой науки с целью контроля за обменом веществ и механизмом его регуляции.

Задачами биохимии являются:

- изучение механизмов и взаимосвязи различных этапов метаболических превращений в организме человека и животных. Определение их роли в решении актуальных проблем в биологической промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

- приобретение навыков по качественному и количественному исследованию продуктов животноводства, а также жидкой среды организма.

Самое поразительное свойство живых организмов – это их способность к самовоспроизведению. Свойство, которое можно считать сущностью состояния, называемое «жизнью». Для явления жизни необходимо наличие постоянно идущих химических процессов в этих сложных структурах. Поэтому для изучения жизненных явлений вместе с морфологическими науками очень важное значение имеет биологическая химия.

Данное учебно-методическое пособие может быть использовано как источник информации по дисциплинам биологического и биохимического профилей для формирования компетенций у студентов следующих специальностей и направлений подготовки:

- 36.05.01 Ветеринария - использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности (ОК-11);

- 19.03.03 Продукты питания животного происхождения - способность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности (ВПК-1;)

- 27.03.01 Стандартизация и метрология - способность применять знание основных законов естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности (ВПК -1);

- 06.03.01 Биология - способностью применять знание принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности (ОПК- 5); - способностью применять современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой (ОПК – 6- способностью эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ (ПК – 1);

- 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза – способность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ОК-10);

- 38.03.07. Товароведение - возможность использовать знания основных законов естественнонаучных дисциплин для обеспечения качества и безопасности потребительских товаров (ПК-5); - способность применять знания в области естественнонаучных и прикладных инженерных дисциплин для организации торгово-технологических процессов (ПК-6).

19.03.04. Технология продукции и организация общественного питания – способность использовать основные законы и методы математики, естественных, гуманитарных и экономических наук при решении профессиональных задач (ПК-1); – использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования. Уметь использовать нормативные правовые документы своей деятельности(ПК-3)

Тема 1. Основы физической химии.

Физическая химия является теоретическим обобщением всей химии. В отличие от тех отраслей химической науки, которые изучают конкретные формы материи (неорганическая химия, органическая химия), физическая химия изучает общие закономерности химических явлений, используя физические законы и методы исследований. Законы физической химии широко используются такими науками как общая химия, биология, агрохимия, почвоведение и др. Основные теоретические положения и методы физической химии рассматриваются в таких разделах как физиология, микробиология, биологическая химия и т.д.

Из истории. Основателем физической химии является великий русский ученый Л.В. Ломоносов. Он первым ввел термин «Физическая химия», выдвинул и обосновал целый ряд положений, которые составляют основу физической химии. Ломоносов создал кинетическую теорию материи и объяснил движение молекул, установил различие между

молекулами и атомами. Обосновал процесс растворения и выполнил ряд работ по изучению растворов. Первый в мире учебник по «Физической химии» был создан Н.Н. Любавиным. Основоположником химического строения органических соединений является А.М. Бутлеров. Большое значение для науки и промышленности имеют труды Д.И. Менделеева. Он разработал периодический закон химических элементов. К.А. Тимирязев был учеником Д.И. Менделеева, а Д.Н. Прянишников является приемником К.А. Тимирязева. Д.Н. Прянишников внес большой вклад в развитие агрохимии. И.А. Каблуков установил сущность химического взаимодействия ионов в процессе электролитической диссоциации (ЭД).

Физическая химия включает в себя несколько основных разделов:

1. Строение вещества. Этот раздел изучает связь между строением веществ, их физические и химические свойства и агрегатное состояние веществ. Учение агрегации изучает вопросы взаимодействия молекул и их свойств, когда вещество находится в различных физических состояниях (газообразном, жидком, кристаллическом).

Усовершенствуются данные о строение атомов и молекул и взаимодействие сил между ними благодаря таким методам как рентгенография, электронная микроскопия, ультразвуковые исследования.

2. Химическая термодинамика. По законам термодинамики проводят расчеты химических реакций и химического равновесия и наблюдают направление самопроизвольного течения любого химического процесса. Термодинамика изучает такие процессы как испарение,

растворение, кристаллизацию, адсорбцию и т.д. Кроме того, в том разделе очень важным является изучение тепловых эффектов химических реакций.

3. Учение о растворах. Этот раздел изучает состав растворов, их свойства, образование растворов, реакции, которые в них протекают и процессы растворимости.

4. Электрохимия. Рассматривает вопросы свойства и строения электролитов, процессы электролиза, коррозию металлов, электросинтез веществ и т.д.

5. Химическая кинетика. Изучает скорость химических реакций, зависимость их от температуры, давления, концентрации среды и т.д. В этом разделе также рассматривается вопрос механизма действия биологических катализаторов – ферментов.

Растворы и их свойства.

Растворами называют состоящие из двух или нескольких веществ гомогенные (однородные) системы, состав которых может изменяться в довольно широких пределах. Физические свойства растворов (плотность, температура кипения, температура замерзания, вязкость и др.), как правило, изменяются постоянно. В отличие от химических соединений состав растворов может изменяться в зависимости от количества взятых компонентов. Кроме того, растворы имеют слабые водородные связи. При растворении веществ, происходит определенное взаимодействие между частицами, образующими раствор. Вещество, которое при растворении не меняет своего агрегатного состояния или же входит в состав раствора в преобладающем количестве, обычно называют растворителем. Различные биологические жидкости: плазма

крови, лимфа, соки растительных организмов содержат в растворенном состоянии органические и неорганические вещества, т.е. растворы – являются наиболее распространенными системами в природе.

По агрегатному состоянию растворы делят на три группы: 1) растворы газов в газах (газовые смеси), 2) жидкие растворы, 3) твердые растворы. Физическая химия рассматривает только жидкие растворы. Жидкие растворы в свою очередь подразделяются на: 1) растворы газов в жидкостях, 2) растворы жидкостей в жидкостях, 3) растворы твердых тел в жидкостях. Особое значение имеют водные растворы.

Процесс растворения нельзя рассматривать, как простое механическое распределение одного вещества в другом. При растворении происходит физико-химическое взаимодействие растворенного вещества с молекулами растворителя. Процесс растворения происходит с выделением или поглощением теплоты и уменьшением или увеличением объема раствора. Это говорит о том, что молекулы растворенного вещества образуют с молекулами растворителя химические соединения.

В состав любого живого организма помимо различных органических и неорганических веществ обязательно входит вода. Она является средой, в которой растворены все высокомолекулярные соединения, которые образуют коллоидные растворы, а кроме того вода участвует во всех обменных реакциях организма. Вода в организме встречается в различных состояниях:

1. Гидростатическая – связана, в основном, с частями клетки, особенно с белками.

2. Лиофильная – содержится между молекул волокнистой структуры. Не выделяется при измельчении ткани.

3. Свободная – содержится в плазме, моче, лимфе, пищеварительном соке и т.д.

Потребность в воде у животных различна. Она определяется условиями кормления, продуктивности и т.д. Выводится вода из организма с мочой, через кожу, с калом. Испарение воды поверхностью тела животных или растений регулирует их температуру при колебаниях температуры внешней среды.

Животные очень чувствительны к потере воды. Если в процессе голодания организм может перенести полную потерю запаса жиров, 50% потерю белков, 20% потеря воды приводит к гибели организма. Собак без пищи может прожить до 100 дней, без воды менее 10 дней. Человек без пищи больше месяца, без воды – несколько дней. Эмбрион человека содержит 97% воды, новорожденный – 75%, а взрослый – 63%. Отдельные органы и ткани содержат разное количество воды: сердце – 79%, а скелет – 25%.

В организме животного все вещества находятся в растворенном состоянии и представляют собой растворы органических и неорганических веществ. Растворителем является вода. Все природные воды (морская, речная, воды минеральных источников) представляет собой растворы минеральных солей. Несмотря на простоту формы, вода обладает рядом уникальных свойств. Молекула воды представляет собой диполь (это система, состоящая из положительно и отрицательно заряженных электронов, равных по величине и противоположных по знаку и расположенных на определенном расстоянии друг от

друга). Поскольку молекулы воды имеют равный объем, форму и полярность они способны ассоциироваться (объединяться) в сложные комплексы с помощью водородных связей. Благодаря этому в воде очень хорошо растворяются электролиты. Вода имеет высокую диэлектрическую проницаемость, высокую теплоёмкость. Наибольшая плотность воды определяется при 4°C . Это связано со специфической структурой воды, которая образует кристаллическую решетку (подобную решетке льда). Но эта структура, в отличие ото льда, обладает высокой подвижностью и текучестью.

Существует несколько способов выражения концентрации растворов:

- молярная концентрация. Она выражает, какое количество молей вещества растворено в 1 литре раствора.

- процентная концентрация. Выражает количество грамм вещества, растворенного в 100 гр. раствора.

Растворы могут быть истинными, коллоидными и т.д.

В истинных растворах растворенное вещество имеет диаметр, не превышающий длину световой волны. Обычно это растворы электролитов. Луч света спокойно проходит через такой раствор и не рассеивается.

В коллоидных растворах размеры частиц превышают длину световой волны. Луч света, проходя через такой раствор, становится заметен, так как он, этими частицами рассеивается. Этот процесс получил название - явление Тиндаля.

Осмотические явления.

Очень многие вещества, входящие в состав жидкостей организма находятся в них в виде молекулярно-дисперсных

растворов (глюкоза, сахароза и т.д.). Изучение состояния веществ в молекулярно-дисперсных растворах и их свойств, связано с изучением явлений диффузии, осмоса, и осмотического давления.

Изучение разбавленных растворов показало, что между газообразным состоянием вещества и состоянием его в разбавленных растворах существует большое сходство. Если в цилиндр нальем концентрированный раствор сахарозы, а сверху нальём воды, то постепенно молекулы сахарозы равномерно распределятся по всему объёму жидкости. Это явление называется диффузия.

Диффузия – это самопроизвольный процесс выравнивания концентраций ионов, молекул или коллоидно-дисперсных частиц за счет их беспорядочного теплового движения.

Процесс диффузии зависит от температуры растворов, атмосферного давления и механического перемещения жидкости. Явление диффузии имеет место в клетках и тканях живого организма. Диффузия продолжается до тех пор, пока концентрация молекул сахарозы не станет одинаковой во всех слоях жидкости.

Если между сахарозой и водой поместить полупроницаемую перегородку, через которую могут проходить только молекулы воды. В этом случае выравнивание концентрации будет происходить только вследствие перемещения молекул воды. Молекулы воды в большем числе диффундируют в раствор, чем обратно.

В том случае, если в растворе или жидкости имеются полупроницаемые мембраны способные пропускать только ионы растворителя, то возникает явление называемое

осмосом. Это односторонняя диффузия через полупроницаемую перегородку.

В свою очередь ионы растворенного вещества оказывают на мембраны давление, которое получило название - **осмотическое давление** - это сила, способствующая движению растворителя, через полупроницаемую мембрану из раствора с меньшей концентрацией в раствор с большей концентрацией. Оно соответствует, равновесию перехода через полупроницаемую мембрану растворителя из наружной среды во внутреннюю и наоборот. Мембраны клеток живого организма и другие его структуры обладают свойствами полупроницаемых мембран. Это имеет огромное значение для нормального функционирования органов и тканей организма.

Определение осмотического давления.

Вант-Гофф установил, что величина осмотического давления для разбавленных растворов может быть выражена уравнением совершенно сходным с уравнением газового состояния.

$$PV=RT$$

P – осмотическое давление,

V – объём раствора, содержащий 1 гр/моль растворенного вещества,

R – универсальная газовая постоянная, 0,082,

T – абсолютная температура по Кельвину.

Если заменить в этом уравнении объёмно-молярную концентрацию на молярную концентрацию, выраженную в молях на литр, то получим более удобное уравнение для вычисления осмотического давления.

$$P_{\text{осм}}=CRT$$

С – концентрация вещества в молях/л,
R – универсальная газовая постоянная, 0,082,
T – абсолютная температура по Кельвину.

В том случае, если определяется осмотическое давление электролита, то в данную формулу вводится коэффициент электролитической диссоциации (i).

$$P_{\text{осм}} = iCRT$$

В биологической практике, в зависимости от концентрации растворенных солей, растворы принято делить на: гипотонические, изотонические, гипертонические. Эти растворы проявляют различное действие по отношению к клеткам живого организма.

Растворы, вызывающие уменьшение объема клеток - называются гипертоническими, они имеют высокое осмотическое давление и большую концентрацию солей, чем протоплазма клеток.

Растворы, вызывающие увеличение объема клеток - называются гипотоническими, они имеют меньшее осмотическое давление и меньшую концентрацию солей, чем протоплазма.

Растворы не вызывающие изменения состояния клеток называются изотоническими, или физиологическими. Физиологические растворы используются при расстройствах ЖКТ у молодняка вместо питьевой воды.

Процесс растворения веществ обусловлен взаимодействием частиц растворенного вещества с молекулами растворителя. Механизм растворения рассмотрим на примере хлорида натрия и воды. Молекулы натрия и хлора соединяются с помощью ионной связи, а молекулы воды с помощью водородной, а между ионами

натрия и хлора с одной стороны и молекулами воды с другой стороны возникает ионно-дипольная связь. При погружении кристаллика в воду ее молекулы к натрию присоединяются отрицательными полюсами, а к хлору – положительными. В результате ионно-дипольная связь оказывается сильнее межионной натрия и хлора и происходит полный разрыв ионов. В результате этого наступает самопроизвольный процесс диффузии ионов по всему объему растворителя.

Явление осмоса играет большую роль в жизнедеятельности организма животных и человека. Например, при воспалении тканей происходит перемещение жидких частей в зону воспаления, в результате набухательного действия ткани. В очаге воспаления возрастает осмотическое давление тканевых жидкостей. Только в условиях изотонии, в клетках крови и в межтканевых жидкостях, возможно нормальное течение биохимических и физиологических процессов. Повышение осмотического давления в тканях приводит к отёкам. Уменьшение осмотического давления в крови вызывает гемолиз эритроцитов. Многие заболевания внутренних органов (почек, сердца) сопровождаются повышением осмотического давления в крови.

Активная реакция среды, водородный показатель и методы определения концентрации водородных ионов.

Теория электролитической диссоциации.

Аррениус высказал основные положения этой теории:

1. Молекулы элементов при растворении в воде в большей или меньшей степени распадаются на ионы.

2. Ионы, отличаясь от нейтральных атомов, или молекул наличием электрического заряда обладают и совершенно иными свойствами. Например, ион H^+ не похож на газообразный H_2 , который практически не растворим в воде, в то время как ионы H^+ могут содержаться в воде в очень больших количествах.

3. Разложение на ионы идет не под влиянием электрического тока, а при растворении электролита в воде.

Электролитическая диссоциация это – распад электролита под действием растворителя на ионы.

Известно, что чистая вода, хотя и очень слабо проводит электрический ток, однако обладает – электропроводимостью. Следовательно, вода подвергается диссоциации на ионы H^+ и OH^- . В обычных условиях продиссоциировано 10^{-7} молекул воды. Ионы гидроксила и водорода имеют различные химические свойства. Ионы водорода придают раствору кислый вкус, ионы гидроксила – щелочной вкус и по-разному действуют на биологические ткани. Кроме того, биологические ферменты требуют для своей максимальной активности определенное соотношение концентрации ионов водорода и гидроксила. Для определения этой величины введено определение – водородный показатель, или рН. Он представляет собой отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов, выраженный в грамм ионов на литр (гр/л). Эта величина в различных органах и тканях организма животного имеет различную величину. Так, например, рН желудочного сока составляет 1,5-2,5, а рН 12-ти перстной кишки находится в пределах от 8 до 9.

Методы определения концентрации водородных ионов.

pH или концентрацию водородных ионов в биологических тканях и жидкостях можно определить несколькими методами. Наиболее важные из них:

- колориметрический метод
- электрометрический метод

В основе колориметрического метода лежит метод, основанный на изменении окраски соответствующих индикаторов в зависимости от реакции среды. Индикаторы представляют собой органические соединения (очень слабые кислоты или основания). Этот метод практически заключается в сравнении окраски испытуемого раствора, к которому прибавлен индикатор с окраской стандартных растворов, имеющих определенное значение pH. Колориметрический метод позволяет измерять концентрацию ионов водорода с точностью до 0,1. Этот метод удобен тем, что им можно пользоваться в полевых условиях. Он не требует большого количества реактивов и аппаратуры.

Электрометрический метод является более точным и более современным. Точность составляет 0,01 pH. Этот метод основан на изменении электродвижущей силы (ЭДС) исследуемой жидкости, в сравнении с ЭДС стандартного раствора. Приборы, созданные для определения этого метода, получили название pH-метры. С помощью такого прибора за короткий промежуток времени можно сделать большое количество анализов. Но он требует подключения электросети или стационарного источника тока.

Изолированное действие ионов.

Образовавшиеся в процессе электролитической диссоциации ионы увеличивают общую концентрацию растворенного вещества и тем самым повышают осмотическое давление раствора. Ионы придают растворам более высокую химическую активность и наделяют растворы биологической активностью. Растворы электролитов при действии на клетки органов и целые органы могут повышать или понижать их физиологическую активность.

Изолированное действие некоторых ионов на одноклеточные организмы обычно заканчивается быстрой гибелью одноклеточных организмов, за счёт перевозбуждения или чрезмерного угнетения.

Ионы, возникающие при диссоциации калиевых или натриевых солей, вызывают сильное возбуждение клетки и последовательную их гибель.

Ионы, возникающие при диссоциации кальциевых и магниевых солей, угнетают функции клетки и при продолжительном действии вызывают их гибель.

Смесь одновалентных и двухвалентных ионов, взятых в строго определенных соотношениях не вызывают отклонений в физиологическом состоянии клетки. В такой смеси происходит взаимное уничтожение ядовитого действия ионов, вследствие ионного антагонизма.

Изотонические растворы, приготовленные из солей одновалентных и двухвалентных металлов, взятых в определенном соотношении, не обладающие ядовитым действием на организм называются – физиологическими (эквilibрированными) растворами.

Физиологические растворы используются для приготовления питательных сред в бактериологической практике, для внутривенных инъекций при значительных кровопотерях, при обезвоживании организма и т.д.

Практическое занятие 1.

Лабораторная работа 1. Диффузия.

Реактивы. Крупные кристаллы марганцовокислого калия, двуххромовокислого калия, кристалвиолет или другие окрашенные вещества. Жидкий силикатный клей.

Ход работы. Кристаллик окрашенного вещества на несколько секунд погружают в силикатный клей и переносят в цилиндр с водой. По мере растворения клея частички окрашенного вещества постепенно распространяются по всему объему растворителя в цилиндре, окрашивая равномерно раствор в соответствующий цвет.

Лабораторная работа 2. Влияние температуры на скорость диффузии.

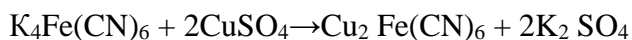
Реактивы. Крупные кристаллы марганцовокислого калия. Кристаллы двуххромовокислого калия.

Ход работы. Наливают 25-30 мл воды в два химических стакана. В одном стакане воду нагревают до кипения на электроплитке. Затем в оба стакана помещают пинцетом кристаллы одного из окрашивающих веществ. Диффузия в стакане с горячей водой идет значительно быстрее.

Лабораторная работа 3. Искусственные полупроницаемые мембраны.

Реактивы. 2% р-р железосинеродистого калия; 16% р-р сернокислой меди на 10% р-ре сахарозы; кристаллы хлористых солей меди, кобальта, марганца и железа, силикатный клей с водой (1:3).

Ход работы. *Опыт 1.* В химический стакан наливают 3-4 мл раствора железосинеродистого калия и осторожно пипеткой вносят в него каплю раствора сернокислой меди так, чтобы капля находилась у поверхности жидкости. При взаимодействии железосинеродистого калия и сернокислой меди на границе растворов образуется резко очерченная мембрана в виде ячейки коричневого цвета – осадок железосинеродистой меди. Это образовалась осадочная мембрана с характерными свойствами полупроницаемой мембраны.



Раствор, окружающий мембрану, имеет меньшее осмотическое давление, чем осмотическое давление внутри ячейки, поэтому вода будет проникать через полупроницаемую мембрану внутрь ячейки. В результате ячейка лопаается. Вытекающий из лопнувшей ячейки железосинеродистый калий при соприкосновении с сернокислой медью раствора опять образует мембраны железосинеродистой меди.

Опыт 2. В химический стакан наливают водный раствор силикатного клея (1:3), затем пинцетом опускают в него кристаллы хлористых солей меди, кобальта, марганца и железа. В результате реакции между солями и растворимым стеклом около кристаллов возникают полупроницаемые мембраны кремневокислых солей меди, кобальта, железа, марганца, образуя ячейки с заключенными в них солями.

Осмотическое давление более высокое внутри ячеек, чем в окружающем растворе, поэтому вода насасывается в ячейки, и они лопаются. В стакане в результате этого возникают разного цвета деревца причудливой формы.

Лабораторная работа 4. Влияние растворов с разным осмотическим давлением на эритроциты и растительные клетки.

Реактивы. Цитратная кровь, лук; хлористый натрий (0,1; 0,8% и 10% р-ры).

Ход работы. *Опыт 1.* Наливают в три пробирки по 2-3 мл следующих растворов хлористого натрия: в пробирку №1 – 10%, в пробирку №2 – 0,8%, в пробирку №3 – 0,1%. Приливают в каждую пробирку по 1-2 капли цитратной крови. Тщательно перемешивают содержимое всех пробирок и сразу же берут стеклянной палочкой каплю содержимого из пробирки №3 на предметное стекло, покрывают его покровным стеклом и рассматривают под микроскопом при большом увеличении. При быстром выполнении работы в поле зрения микроскопа можно увидеть отдельные эритроциты, быстро увеличивающиеся в объеме и постепенно теряющие очертания в связи с наступлением гемолиза.

Затем берут по капле содержимого из пробирок №1 и №2, помещают на предметные стекла, покрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом при большом увеличении.

Опыт 2. Наливают в три пробирки по 2-3 мл растворов хлористого натрия разных концентраций, как в предыдущем опыте. Препарируют иглой тоненькие плёнки лука и

опускают их в каждую из пробирок, помещают на предметные стекла, накрывают покровными стеклами и рассматривают под микроскопом при большом увеличении.

Контрольные вопросы

1. Какое значение для осмотического давления крови имеет выделение мочи, Δt_z которой 1,3-2,0?

2. Депрессия крови в норме 0,56-0,58. Если депрессия в патологических случаях составляет 0,8-1,0, то это указывает на осмотическую гипертонию или гипотонию крови?

3. Покажите графически, что раствор должен кипеть при более высокой и замерзать при более низкой температуре, чем растворитель.

4. Зависит ли криоскопическая постоянная от природы растворенного вещества?

5. Как можно вычислить осмотическое давление раствора, если известно понижение температуры замерзания?

6. Чему равны температура замерзания и осмотическое давление крови?

7. Объяснить, почему ртуть в термометре Бекмана при определении точки замерзания растворителя сначала опускается, затем быстро поднимается и останавливается?

8. Почему кристалл льда, брошенный в раствор, способствует более быстрому достижению температуры замерзания?

9. Будут ли отличаться температура замерзания 1М раствора хлористого натрия и 1М раствора глюкозы?

10. Будет ли отличаться осмотическое давление 0,1% раствора глюкозы от 1% раствора белка?

Тема 2. Буферные системы.

Буферные растворы – это растворы, которые имеют устойчивую концентрацию H^+ . pH буферного раствора мало зависит от разведения раствора и также мало изменяется при добавлении небольших количеств сильной кислоты или основания.

В ходе обмена веществ кислых продуктов образуется больше, чем щелочных. Однако сдвиг pH в кислую сторону, не происходит, потому что щелочных элементов в крови больше, чем кислых, т.е. в крови создается щелочной резерв. Следует подчеркнуть, что в крови имеется постоянное и определенное кислотно-щелочное равновесие.

В животных организмах, в клетках органов и тканях поддерживается стабильная концентрация водородных ионов. Так, например, pH крови животных имеет величину $pH=7,4$, у человека $pH=7,36$. Изменение этого показателя на 0,1 уже говорит о серьезных нарушениях, происходящих в живом организме. Эта величина поддерживается на постоянном уровне с помощью буферных систем.

Буферные системы представляют собой двух компонентные растворы, состоящие из:

- слабой кислоты и её соли,
- слабого основания и его соли,
- двух солей.

Буферная система считается наиболее сильной тогда, когда оба компонента (соль и кислота) находятся в приблизительно равных количествах.

В крови животного находятся 4 буферные системы:

- белковая система. Белок амфотерен, вследствие чего может нейтрализовать кислоту и щелочь.

- гемоглобиновая система составляет 75% всех буферов крови. Гемоглобин может связывать, как кислые элементы, так и щелочные элементы.

- фосфатная система состоит из одно- и двузамещенного фосфорнокислого натрия. Однозамещенный фосфорнокислый натрий проявляет свойства слабой кислоты и нейтрализует щелочные продукты. Двузамещенный фосфорнокислый натрий проявляет свойства щелочи и связывает кислые элементы.

- карбонатная система состоит из слабой угольной кислоты и бикарбонатов Na и K. Щелочные компоненты связывает угольная кислота, а бикарбонаты вступают в реакцию со щелочами, образуя нейтральную соль.

Эти буферные системы обеспечивают стабильное значение концентрации ионов водорода в крови животных. Буферная система характеризуется буферной емкостью.

Буферная ёмкость – это величина, определяющая количество децинормальной (0,1 Н) кислоты или щелочи, которой нужно добавить к 1 литру молярного буферного раствора, чтобы сдвинуть рН на 1 единицу.

Практическое занятие 2.

Лабораторная работа 1. Приготовление буферных растворов

Реактивы: уксусная кислота, 0,1Н раствор; уксуснокислый натрий, 0,1Н раствор; универсальный индикатор.

Ход работы: Нумеруют шесть пробирок, наливают в них растворы уксусной кислоты и уксуснокислого натрия в следующих соотношениях:

Раствор	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
0,1Н р-р уксусной кислоты	9	8	5	3	2	1
0,1Н р-р уксуснокислого натрия	1	2	5	7	8	9
Значение рН, вычисленное	3,7	4,0	4,6	5,0	5,2	8,6
Значение рН, найденное в опыте						

К приготовленным смесям добавляют 2 капли универсального индикатора и по характеру окраски судят о значении рН для каждой смеси.

Лабораторная работа 2. Определение общей кислотности.

Общую кислотность составляет сумма активной и потенциальной кислотности. Титруемая или аналитическая кислотность определяется титрованием щелочью и называется общей кислотностью. Общая кислотность выражается количеством миллилитров 0,1Н р-ра гидроксида натрия (NaOH), которая идет на нейтрализацию 100 мл исследуемого раствора.

Реактивы: Соляной кислоты 0,1Н р-р; уксусная кислота 0,1Н р-р; едкий натр 0,1Н р-р; фенолфталеин - спиртовой раствор.

Ход работы: Наливают в колбу 5 мл соляной кислоты, приливают 2-3 капли спиртового раствора фенолфталеина и титруют раствором едкого натра до появления розовой окраски. Повторяют титрование еще раз, берется для расчета среднеарифметическая величина. Между результатами титрования расхождение не должно составлять 0,1 мл.

Общую кислотность раствора уксусной кислоты определяют аналогичным способом.

Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{y \cdot 100}{y_1}, \text{ где}$$

X – общая кислотность, выраженная в мл раствора NaOH;

y – количество, мл раствора NaOH, пошедшее на титрование (среднее значение);

y₁ – количество мл кислоты, взятое для титрования.

Общая кислотность одинакова у всех кислот равной нормальности, соотношение потенциальной и активной кислотности определяется степенью диссоциации.

Лабораторная работа 3. Буферное действие растворов.

Реактивы: уксусная кислота 0,1Н р-р; уксуснокислый натрий 0,1Н р-р; универсальный индикатор; раствор фенолфталеина; раствор Конго красный; едкий натр 0,1Н р-р; соляной кислоты 0,1Н р-р; дистиллированная вода.

Ход работы: В колбу отмеряют 4 мл уксусной кислоты и 16 мл уксуснокислого натрия, тщательно перемешивают. Нумеруют 4 пробирки. В пробирку №1 и №3 отмеряют по мл приготовленной буферной смеси, а в пробирки №2 и №4 по 5 мл дистиллированной воды. В пробирки №1 и №2 добавляют по 1-2 капли фенолфталеина и титруют щелочью, ведя счет каплям до появления розового окрашивания.

В пробирки №3 и №4 добавляют по 1-2 капли Конго красного и титруют соляной кислотой, считая капли до появления синего окрашивания.

Объяснить, почему при изменении реакции в пробирку №1 надо добавить больше щелочи, чем в пробирку №2, а в пробирку №3 больше кислоты, чем в пробирку №4.

Лабораторная работа 4. Влияние разведения на pH буферного раствора.

Реактивы: уксуснокислый натрий 0,1Н раствор; вода дистиллированная; универсальный индикатор; раствор фенолфталеина; едкий натр 0,1Н раствор.

Ход работы: Берут 3 колбы. В каждую из них отмеряют по 5 мл уксуснокислого натрия. Содержимое колбы №1 оставляют неразбавленным, содержимое колбы №2 разбавляют в 2 раза, для чего к полученной буферной смеси добавляют равный объем воды (10 мл), и содержимое колбы №3 разбавляют в 4 раза, для чего добавляют 30 мл воды. Растворы в каждой колбе перемешивают и используют для опытов.

Опыт 1. Нумеруют 3 пробирки и в них соответственно отмеряют по 2 мл буферных растворов: 1- неразбавленный, 2 - разбавленный в 2 раза и 3 - разбавленный в 4 раза. Затем к каждому из растворов добавляют по 3 капли универсального индикатора и по окраске учитывают реакцию (pH) буферного раствора. Изменяется ли pH буферного раствора? Изменяется ли pH буферного раствора при разведении? Изменяется ли pH? Если нет, то почему?

Опыт 2. Нумеруют 3 пробирки и в них отмеряют по 2 мл соответственно, разведенного в 2 и в 4 раза буферных

растворов. В каждую пробирку добавляют по 2-3 капли фенолфталеина и титруют щелочью, ведя счет каплям до появления розового окрашивания. Как влияет разведение на буферную емкость раствора?

Лабораторная работа 5. Буферная емкость биологических жидкостей

Реактивы: едкий натр 0,1Н р-р; соляной кислоты 0,1Н р-р; фенолфталеин, спиртовой раствор; раствор Конго красный; универсальный индикатор; вода, молоко, сыворотка крови, слюна.

Ход работы: При помощи универсального индикатора определяют рН растворов в фарфоровой чашке, для того чтобы убедиться, что они нейтральны, т.е. рН=7.

Отмеряют по 5 мл исследуемых растворов в пробирки, к каждой добавляют по 2-3 капли фенолфталеина и титруют щелочью, ведя счет каплям до появления розового окрашивания. Результат записывают в тетрадь. После этого снова отмеряют по 5 мл жидкости и добавляют 2-3 капли Конго красного и титруют кислотой, ведя счет каплям до появления синего окрашивания. Результат записывают в тетрадь.

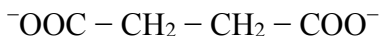
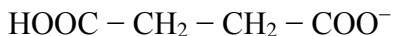
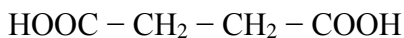
Написать отчет о работе. Сопоставить буферную емкость сыворотки крови по кислоте и щелочи. Исходя из соотношения соли и кислоты в карбонатной и фосфатной буферных системах крови, объяснить, почему буферная емкость сыворотки крови по кислоте больше емкости щелочи.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность колориметрического метода определения pH?
2. Меняется ли концентрация водородных ионов буферной смеси при небольшом разбавлении? Объясните, что при этом происходит с буферной емкостью.
3. Что такое точка перехода индикатора?
4. Почему в качестве стандартных растворов с известным pH удобно брать буферные смеси?
5. Что такое активная и общая кислотность? Можно ли определить pH слабой кислоты титрованием?
6. Как вычислить C_n^+ растворов слабых кислот, если известны их концентрация и степень диссоциации или концентрация и константы диссоциации?
7. Степень диссоциации, 1N CH_3COOH равна 0,013, чему равна степень диссоциации 0,001N CH_3COOH ?
8. Для муравьиной, уксусной и угольной кислот значение pH соответственно равны 3,75; 4,76; 6,1. В каком из этих растворов при одной и той же концентрации наибольшее значение pH, и в каком растворе наибольшая потенциальная кислотность?
9. Для двух оснований пиридина и аммиака константы диссоциации соответственно равны $K_{\text{пиридина}} = 1,4 \cdot 10^{-9}$; $K_{\text{аммиака}} = 1,8 \cdot 10^{-5}$. При равной их концентрации, у какого из этих оснований выше концентрация ионов водорода?
10. Зависит ли константа диссоциации кислоты от ионной силы раствора?
11. В какой из биологических жидкостей: в желудочном соке (pH 1,5 – 2,5), в кишечном соке (pH 7,5-8,2) или в

крови (рН 7,36) будет наибольшая концентрация HCO_3^- , если $\text{pK H}_2\text{CO}_3 = 6,1$?

12. Диссоциация янтарной кислоты протекает в две ступени:



Причем $\text{pK}_1 = 4,21$; $\text{pK}_2 = 5,64$.

В каком виде (молекул, одно или двухзарядных ионов) находится янтарная кислота в клетке при физиологических значениях рН?

13. Каков механизм буферного действия?

14. Каково значение буферных смесей для организма?

15. Какой из двух буферных растворов с $\text{pH} = \text{pH} + 1$ или с $\text{pH} = \text{pH} - 1$ более стоек к добавлению кислоты основания?

16. Что такое буферная емкость? Как приготовить буферный раствор, чтобы его емкость была наибольшей?

17. Какой буфер карбонатный или ацетатный лучше взять для приготовления буферной смеси с рН 6,0?

Тема 3. Основы коллоидной химии.

Если физическая химия изучает молекулярные или истинные системы, состоящие из больших молекул или ионов. Кроме этого имеются системы с частицами, образованными группами небольших молекул, т.е. представляющими собой обломки кристаллических решеток или аморфных веществ. Коллоидными или дисперсными системами называются системы, в которых вещество раздроблено до частиц размером 1-100 мкм. Коллоидная

химия изучает физико-химические свойства, гетерогенных высокодисперсных систем и высокомолекулярных соединений в твердом состоянии и в растворах.

Если одно вещество в более или менее раздробленном (дисперсном) состоянии равномерно распределено в массе другого вещества, такую систему называют дисперсной. Раздробленное вещество в коллоидной системе образует дисперсную фазу. Дисперсной средой является среда, в которой частицы находятся во взвешенном состоянии. В дисперсной среде дисперсная фаза нерастворима и отделена от нее поверхностью раздела, поэтому коллоидные системы являются коллоидными системами. Коллоидная система называется золем, если дисперсная фаза – твердое вещество, а дисперсная среда – жидкость.

Все дисперсные системы можно разделить на три группы: грубодисперсные, коллоидно-дисперсные и молекулярно-дисперсные. Молекулярно-дисперсные системы являются равновесными, устойчивыми, они могут образоваться самопроизвольно (они еще называются истинными растворами). Коллоидно-дисперсные системы не устойчивы, так как гетерогенны, потому что стремятся к разделению фаз, а, следовательно, уменьшению межфазовой поверхности и снижению свободной энергии.

Из истории. Как самостоятельная наука, коллоидная химия возникла только в начале XX века, однако сведения о ней известны еще от древних алхимиков. Ученый Ломоносов четко разделил явления кристаллизации и коагуляции (склеивания) растворов. Ученый Ловиц открыл явление адсорбции из растворов на твердом адсорбенте. Профессор Рейсс установил движение дисперсной фазы и

дисперсной среды под влиянием электрического поля. Итальянский химик Сельми установил, что биологические жидкости – сыворотка, молоко, кровь – отличаются от истинных растворов, и назвал их псевдорастворами. Основоположником коллоидной химии считают английского химика Грэма, который ввел термин и понятие «коллоиды». Он разделил все существующие растворы на коллоиды и кристаллоиды. Однако профессор Борщов считал, что коллоидные частицы имеют кристаллическую структуру и существует определенная связь между поверхностью коллоидных частиц и молекулами растворителя. Такой же точки зрения придерживался и Менделеев.

Общее понятие о коллоидных растворах.

Что же такое «коллоиды». Организм животного, как полидисперсная система (т.е. имеет коллоидное состояние).

Об агрегатном состоянии протоплазмы живой клетки организма в науке долгое время существовало две мнения:

- протоплазма находится в организме в жидком состоянии
- протоплазма находится в твёрдом состоянии

Мнение о том, что протоплазма жидкость подтверждается быстрым течением в ней химических реакций, как в растворах. Но с другой стороны, живой организм сохраняет свою форму, хотя более чем на 60% состоит из воды. Следовательно, протоплазма твёрдое вещество, но в твёрдых телах реакции идут очень медленно. Это противоречие разрешимо, если организм животных и человека рассматривать с точки зрения коллоидной химии.

Доказано, что живой организм представляет собой коллоидную систему. Коллоиды в живом организме могут переходить в жидкое состояние – золь и твёрдое состояние – гель. Основное вещество клеток – образуют золи и гели. Следовательно, протоплазма клетки является одновременно и твердым и жидким телом. Протоплазма – это жидкость со свойствами твердого тела и наоборот. Значит, протоплазма клетки, и весь организм в целом, находятся в коллоидном состоянии. Все вещества, входящие в состав организма можно разделить на две группы:

- кристаллоиды
- коллоиды

Кристаллоиды легко диффундируют через полупроницаемую мембрану. При высушивании из растворов они образуют кристаллы, кристаллоиды: все соли, кислоты, щелочи, аминокислоты, сахара. То есть все вещества, молекулы которых сравнительно не велики.

Коллоиды не диффундируют через полупроницаемую мембрану. Их молекулярная масса больше, чем у кристаллоидов. При высушивании они образуют клееобразную массу. В организме животного, где растворителем является вода, к коллоидам относятся белки, углеводы, липиды, имеющие большую молекулярную массу. Тем не менее, большой разницы между коллоидами и кристаллоидами нет. Почти любой кристаллоид в особых условиях может превратиться в коллоид. Рентгенографический анализ свидетельствует о том, что коллоидные частицы имеют кристаллическое строение. Коллоидные растворы, как и кристаллоидные, обладают осмотическим давлением, но оно во много раз ниже, чем у

кристаллоидов. Коллоидная частица играет большую роль в перемещение ионов через клеточную стенку. Коллоидный ион, как бы притягивает внутрь клетки ионы кристаллоидов. Следовательно, коллоидное состояние имеет большое значение в перемещение ионов в клетку и из неё и тем самым играет определенную роль в обмене веществ.

Организм животного представляет собой полидисперсную систему, состоящую из растворителя (вода), кристаллоидов (крупных дисперсных взвешенных частиц) и коллоидов. Коллоидные растворы представлены, в основном, гидрозольми. В организме имеются грубые дисперсные системы типа суспензий, в которых находятся частицы значительно большего размера, чем коллоидные. Например, кровь – это суспензия, к которой растворены лимфоциты, эритроциты, гемоглобин и т.д. Если в дисперсной среде (растворитель) распределить капельки жидкости (жир в молоке), то такая система будет называться эмульсией. Грубые взвеси (суспензии и эмульсии) отличаются от коллоидных растворов мутностью и тем, что их частицы видны под обычным световым микроскопом, а коллоидные видны только под электронным микроскопом.

С изменением дисперсности (раздробленности) изменяются свойства коллоидных растворов: на поверхности коллоидных частиц возникает свободная энергия. Истинные растворы (кристаллоиды) такой формой энергии не обладают. В организме животных и человека имеется огромное количество поверхностей, на которых идут адсорбционные процессы.

К этим поверхностям относятся стенки кровеносных сосудов, поверхности стенок желудочно-кишечного тракта, различные мембраны, поверхности всех клеток, ядер, митохондрий, лизосом, вакуолей, а также коллоидные частицы. Без такой адсорбции метаболические превращения веществ были бы невозможны.

Что такое адсорбция? Адсорбция – это процесс самопроизвольного изменения концентрации вещества у поверхности раздела двух фаз, или как говорят – это повышение концентрации одного вещества у поверхности раздела двух фаз, из которых одна обычно является твердым телом.

Организм животных и человека построен главным образом из лиофильных коллоидов, обладающих ясно выраженным сродством с дисперсной средой. Они имеют гидрофильные, функциональные группировки. Такие как: - NH_2 , - COOH , - OH . Характерные особенности всех коллоидов состоят в самопроизвольном изменении во времени. Этот спонтанный процесс в коллоидах идет по второму закону термодинамики и называется старением коллоидов. Истинные растворы (кристаллоиды) стабильны, они могут стареть многие годы, а коллоидные растворы не статичны, а динамичны. Они стареют. Процесс старения может идти от нескольких дней до многих лет. Он связан с понижением степени дисперсности и увеличением размеров коллоидных частиц, при этом изменяется цвет коллоидов.

При изучении таких изменений коллоидных систем было обращено внимание на аналогию, существующую между эволюцией коллоидов и старением организмов. Как коллоидные системы, так и организм в целом имеет стадии

молодости, зрелости и старения. Жизненные процессы в организме постепенно затухают, в связи с непрерывным старением коллоидов, составляющих цитоплазму клеток.

Методы получения коллоидных растворов.

Основные методы получения коллоидных растворов – физические. К физическим методам относятся методы получения коллоидных частиц на шаровых мельницах, где частицы могут быть измельчены до размеров, не превышающих 100 мкм. Кроме того, существуют ультразвуковые методы. Кроме физических методов существуют химические методы. К ним относятся методы окисления и восстановления, гидролиза 2-го обмена и др.

Коллоидные растворы можно получить как из молекулярной и ионно-дисперсных систем, так и их грубодисперсных систем.

Кристалл – коллоид - суспензия

Раствор - раствор

При получении коллоидных систем из молекулярно и ионно-дисперсных систем надо вызвать процессы единения молекул и ионов до размеров коллоидных частиц.

При получении коллоидных растворов из грубодисперсных систем (суспензии и эмульсии) надо вызвать процесс раздробления частиц до размеров коллоидного состояния

Все методы получения коллоидных растворов делятся на:

-методы конденсации (объединения)

-методы дисперсии (раздробления)

Соединение молекул и ионов в коллоидные частицы может быть достигнуто различными способами (окисления, восстановления, обменного разложения, гидролиза, замены

растворителя). В их основе лежит раздробление твердых тел до частиц коллоидных размеров.

Процесс раздробления можно осуществить различными методами (механическое или электрическое дробление, простое растворение, действие ультразвука).

Методы очистки коллоидных растворов.

К методам очистки коллоидных растворов относятся:

- Диализ. Он основан на свойстве полупроницаемых мембран, пропускать ионы и молекулы и при этом задерживать коллоидные частицы. Задержка происходит потому, что размеры коллоидных частиц значительно больше размера пор в мембране, поэтому коллоидные частицы не проходят сквозь неё. Диализ проводят в специальных приборах – диализаторах.

- Ультрафильтрация. Под ней понимают фильтрование коллоидных растворов через полупроницаемые мембраны. В результате чего происходит разделение фаз коллоидного раствора. Этот метод нашёл широкое применение в биохимии и микробиологии. В биохимии, таким образом, определяют размеры белков, ферментов и других макромолекул. В микробиологии его применяют при изучении размеров вирусов и бактериофагов.

Устойчивость коллоидных систем. Коллоидная защита. Золотое число.

Устойчивые коллоидные системы – это системы, в которых в большей или меньшей степени задержаны процессы, ведущие к коагуляции.

Стабилизаторы – это вещества, создающие устойчивость коллоидных растворов. К ним относятся

высокомолекулярные соединения: жиры, углеводы, спирты, белки, крахмал.

Известно, что добавление к неустойчивым (лиофобным) коллоидным растворам некоторого количества леофильных растворов или стабилизатора позволяет получить неустойчивые коллоиды с большей концентрацией и сделать их более устойчивыми.

Коллоидная защита – это метод повышенной устойчивости леофильных коллоидов посредством добавления к ним стабилизаторов.

Явления коллоидной защиты чрезвычайно широко распространены в природе. Они обнаружены не только в организме животных и человека, но и в природе (в воздухе, почве, воде).

Леофильные коллоиды обладают разной защищающей способностью. Поэтому возникла необходимость определения их *защитной силы*. Ученый Жигмонди предложил для характеристики защитной силы коллоидов определять их *золотое число* – это минимальное количество защитного вещества, выраженное в мг, которое нужно добавить к 10 мл. коллоидного раствора золота, чтобы задержать переход красного цвета золя в фиолетовый, под действием одного мл NaCl (защита идет от NaCl). Иногда вместо определения золотого числа определяют *рубиновое число*, когда вместо золя золота берется раствор индикатора Конго рубинового, обладающего большей чувствительностью к электролитам и изменяющего свою окраску в те же цвета, как и золь золота. Но это менее точное определение. Есть и железное число.

Эти числа одного и того же вещества различны. Эти числа в спинномозговой жидкости и сыворотке крови имеют диагностическое значение при диагностике заболеваний (менингит). Коллоидная защита имеет большое биологическое значение – ею, например, объясняется устойчивость крови как коллоидной системы, в состав которой входят форменные элементы крови (эритроциты, лейкоциты, гемоглобин и т.д.), которые находятся во взвешенном состоянии, не слипаются и не выпадают в осадок. Механизм защиты заключается в том, что высокомолекулярные вещества (ВМВ) адсорбируются (прилипают) на коллоидные частицы. Иногда одна молекула стабилизатора ВМВ захватывает несколько коллоидных частиц и придает им гидрофильные свойства. Устойчивость коллоидных систем увеличивается, если молекула стабилизатора имеет тот же заряд, что и гранула. При нарушении коллоидной защиты в организме возможны значительные патологические изменения. При нарушении коллоидной защиты с коллоидных частиц снимается заряд, остается ядро, представляющее собой кристаллик соли. Соли выпадают в осадок, из них образуется песок, а из него камни. Возникает мочекаменная болезнь. Холестерин в норме находится в коллоидном состоянии, при нарушении коллоидной защиты, он выпадает в осадок в виде тончайших частичек. Из них формируются бляшки на стенках кровеносных сосудов, что способствует возникновению атеросклероза, который является основой для гипертонии и даже инсульта, инфаркта миокарда и др. Камни печени на 99% состоят из холестерина – желчекаменная болезнь.

Строение коллоидной частицы.

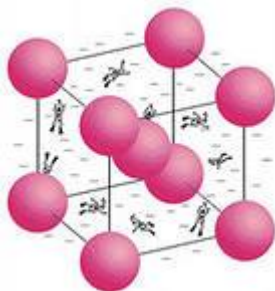
Коллоидные растворы можно получать различными способами, в частности методом конденсации. Из курса химии известно, что реакции приводят к образованию нерастворимых соединений, которые выпадают в осадок.

$\text{AgNO}_3 + \text{KJ} = \text{AgJ} + \text{KNO}_3$ – в результате образуется AgJ выпадающий в осадок.

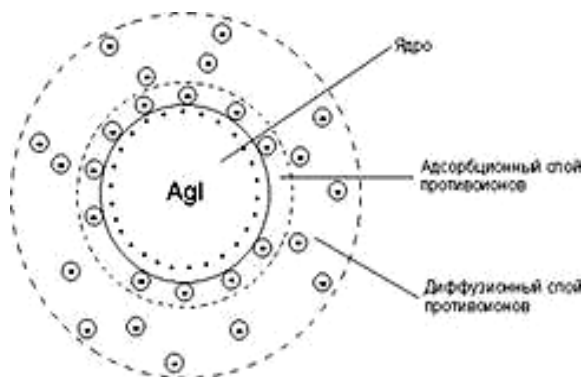
Чтобы получить коллоидный раствор методом конденсации, необходимо:

- чтобы концентрация реагирующих веществ была небольшой,
- чтобы один из реагентов был взят в избытке.

AgJ выпадающий в осадок образует кристаллическую решетку, которая формирует ядро коллоидной частицы. В междоузлиях этой решетки находится AgJ.



Кристаллическая решетка будет достраиваться ионами серебра, имеющими положительный заряд. Это соединение получило название – ядро коллоидной частицы.



Вокруг ядра коллоидной частицы формируется абсорбционный слой, состоящий из ионов противоположного знака. Ядро вместе с этим слоем получило название – гранула. Абсорбционный слой полностью не компенсирует заряд ядра, поэтому образуется следующий слой, получивший название - диффузный. Этот слой полностью компенсирует заряд ядра и образуется коллоидная частица, которая носит название – мицелла. Если кристаллическая решетка будет достраиваться ионами J, тогда абсорбционный слой будет представлен ионами K.

Свойства коллоидных растворов.

Коллоидные растворы имеют, по сравнению с истинными растворами, большую вязкость, иную гидропроводимость и диэлектрическую проницаемость. Под действием различных физико-химических факторов может происходить разрушение коллоидных растворов. К таким факторам относятся: температура, крепкие кислоты и щелочи, тяжелые металлы. Ряд органических соединений способны защищать коллоидные растворы. К таким веществам относятся: белок, крахмал и др.

высокомолекулярные соединения. Изменение структуры коллоидных растворов носит название – коагуляция коллоидов.

Электрокинетические свойства коллоидов были открыты в 1808 году Рейсом. Он в суспензию глины поместил два электрода и обнаружил, что глина движется к аноду, а вода к катоду. Из чего он сделал вывод, что коллоидная частица имеет заряд. В дальнейшем это явление назвали – электрофорезом.

Электрофорез – это движение частиц дисперсной фазы (растворенное вещество) к электроду, имеющему заряд гранулы. Дисперсионная среда (растворитель) при этом перемещается к противоположному электроду. В дальнейшем был обнаружен эффект в электрическом поле названный – электроосмосом. Оба эти явления связаны тем, что вся мицелла электронейтральна, а заряд несет гранула. Границы движения в электрическом поле проходят между гранулой и диффузной частью. В электрическое поле перемещается гранула, а дисперсная среда с диффузной частью движутся в противоположную сторону. Явления электрофореза и электроосмоса вызваны перемещением частиц в электрическом поле.

Седиментация (осаждение). Под действием силы тяжести все коллоидные частицы независимо от их природы оседают в растворе. Если в сосуде с коллоидным раствором началось осаждение коллоидных частиц, то верхний слой раствора приобретает заряд диффузной части, а нижний – заряд гранул. При отсутствии противодействующих сил седиментация коллоидных частиц привела бы к осаждению коллоида на дне сосуда. Этого обычно не происходит, так

как движению частиц препятствует тепловое движение, при котором коллоидные частицы стремятся равномерно распределиться по всему объему раствора. В результате противодействия сил тяжести и диффузии частиц, состояние системы становится устойчивым.

Коагуляция – процесс слипания частиц, образование более крупных агрегатов в результате потери седиментационной устойчивости и последующим разделением фаз (разрушение дисперсной системы). Образующиеся коагуляты представляют собой осадки различной структуры – плотные, творожистые, хлопьевидные, волокнистые, кристаллоподобные.

Кроме перечисленных электрокинетических свойств коллоидов: электрофорез, электроосмос, седиментация (осаждение), коагуляция (слипание), они также обладают агрегативной устойчивостью.

Агрегативная устойчивость дисперсных систем в очень сильной степени зависит от состава дисперсной среды и может быть резко изменена введением в нее даже очень малых количеств чужеродных электролитов в случае лиофобных коллоидов; лиофильные коллоидные системы коагулируют, если концентрация прибавляемого электролита очень большая.

Агрегативная устойчивость – это способность системы сохранять степень дисперсности (раздробленности), то есть противодействовать слипанию коллоидных частиц. Она объясняется наличием у коллоидных частиц заряда. Установлено, что коллоидные частицы способны сближаться, при этом диффузные слои их перекрываются, и начинается отталкивание одноименно заряженных частиц.

Поэтому коллоидные частицы в норме не слипаются. Обнаружено, что коллоидные частицы имеют гидратные оболочки (шубы). Вокруг коллоидных частиц выстраиваются определенным образом молекулы воды. Гидратная оболочка – это особое состояние воды. Она придает плотность и упругость коллоидной частице. Если соединить два золь с противоположным зарядом гранул, то произойдет взаимная коагуляция. Для того чтобы коллоидная система стала неустойчивой (произошла коагуляция), надо лишить коллоидную частицу заряда и разрушить гидратные оболочки. Легче всего это сделать с помощью электролита.

Биологическое применение электрофореза.

Методом электрофореза в организм животных и человека вводят лекарственные препараты в электрическом поле. При этом на пораженный участок (опухоль, воспаление) наносится лекарственный препарат и прикладывается два электрода. В результате движение лекарственного препарата направляется к пораженному участку.

Гели и студни.

Растворы высокомолекулярных веществ способны при особых условиях претерпевать изменения, в частности терять текучесть – застудневать, при этом образуются студни или гели. Гелями называются структуры, образуемые коллоидными частицами или молекулами полимеров в форме пространственных сеток, ячейки которых обычно заполнены растворителем.

В живом организме присутствует большое количество молекулярных полимеров. Они способны образовывать специфические структуры, удерживающие большое

количество воды и имеющие пространственную форму. Такие структуры имеют место в хрящевой ткани, суставной или межклеточной жидкости. Наибольшее значение имеют структурные образования, называемые коллагеном.

Коллаген представляет собой белок, имеющий специфический аминокислотный состав и входящий в состав хрящевой ткани, сухожилий, связок и стекловидного тела.

Гели или студни обладают способностью со временем терять воду, которую они удерживают. Это явление получило название синерезис. Процесс синерезиса происходит по мере старения организма. Синерезис – довольно распространенное явление. Так, очерствение хлеба – результат выделения из студня, таковым является хлеб, части воды; крахмальный клейстер при стоянии выделяет воду, объем его уменьшается, клеящая способность снижается.

Практическое занятие 3.

Получение золь и эмульсий

Лабораторная работа 1. Получение золя йодистого серебра

Реактивы: 0,1N раствор йодистого калия; 0,1N раствор азотного серебра.

Ход работы: Наливают в колбу 2 мл 0,1N KJ и разбавляют водой до 25 мл. В другую колбу наливают 1 мл 0,1N AgNO₃ и доливают водой до 25 мл. При взбалтывании постепенно вливают раствор AgNO₃ в раствор KJ. Написать формулу мицеллы.

Лабораторная работа 2. Получение золь берлинской лазури

Реактивы: 0,1% раствор $K_4Fe(CN)_6$; 2% раствор $FeCl_3$.

Ход работы: При энергетическом взбалтывании к 20 мл 0,1% раствора $K_4Fe(CN)_6$ приливают 5-6 капель 2% раствора $FeCl_3$. Получается золь темно-синего цвета.

В колбу наливают 20 мл 2% раствора, при взбалтывании ($FeCl_3$) содержимого колбы прибавляют 5-6 капель 0,1% раствора $K_4Fe(CN)_6$. Получают золь, окрашенный в зеленый цвет.

Для синего и зеленого золь берлинской лазури написать формулы мицеллы.

Лабораторная работа 3. Получение золя железосинеродистой меди

Реактивы: 0,1% раствор $K_4Fe(CN)_6$; 1% раствор $CuSO_4$.

Ход работы: В колбу наливают 20 мл 0,1% раствора $K_4Fe(CN)_6$, приливают 1 мл 1% раствора $CuSO_4$. Золь окрашивается в красно-коричневый цвет. Написать формулу мицеллы.

Лабораторная работа 4. Получение золя гидроокиси железа

Реактивы: вода; 2% раствор $FeCl_3$.

Ход работы: К 50 мл кипящей воды быстро, но по частям приливают 10 мл 2% раствора $FeCl_3$. Получают золь, окрашенный в красно-бурый цвет. Написать формулу мицеллы.

Лабораторная работа 5. Получение золя канифоли

Реактивы: вода; 1% спиртовой раствор канифоли.

Ход работы: К 20 мл воды, нагретой до появления пара, приливают 1 мл 1% спиртового раствора канифоли. Наблюдают образование коллоидного раствора.

Лабораторная работа 6. Получение разбавленной эмульсии

Реактивы: вода; 1% спиртовой раствор касторового масла.

Ход работы: Наливают в пробирку 6 мл воды и 2 мл 1% спиртового раствора касторового масла, встряхивают и наблюдают образование эмульсии. Объясните, почему получается эмульсия без применения эмульгатора.

Контрольные вопросы

1. Что будет с коллоидной системой, если полностью удалить присутствующий в ней электролит?

2. Какова структура мицеллы золя, если для его приготовления взяты H_2SO_4 и избыток BaCl_2 ?

Какой из электролитов KCl ; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; CaCl_2 ; AlCl_3 – будет иметь наименьший порог коагуляции для получения золя?

3. Имеются два золя равной весовой концентрации. Радиус частиц дисперсной фазы первого золя 20 нм, а второго 100 нм. У какого золя больше осмотическое давление и во сколько раз?

4. Если концентрация золя золота 1 г/л, частицы имеют форму куба с ребром 0,04 мкм и плотность золота 19,5 г/см³, рассчитайте:

а) сколько частиц в 1 л золя;

- б) какова общая поверхность частиц;
- в) при какой температуре замерзает раствор и каково осмотическое давление раствора при 25⁰?
5. Какие системы называются коллоидными?
6. Каков размер коллоидных частиц?
7. Какими способами можно отличить коллоидные растворы от истинных?
8. Чем определяется стабильность коллоидной системы? Что такое электрокинетический потенциал?
9. Как связана величина электрокинетического потенциала с количеством противоионов в адсорбционном слое?
10. Почему электрокинетический потенциал меньше полного скачка потенциала, возникающего на границе твердое вещество – жидкость?
11. Что такое мицелла, и какова ее структура?
12. Что такое кинетическая и агрегативная устойчивость золей? От каких факторов зависит каждая из них?
13. Что такое седиментация и коагуляция?
14. Почему добавка электролита в коллоидную систему вызывает коагуляцию?
15. Какова зависимость порога коагуляции от заряда коагулирующего иона?
16. В чем проявляется особенность коагуляции золей под действием смеси электролитов? Приведите пример антагонизма ионов в организме.
17. Какое практическое применение находит взаимная коагуляция золей?
18. В чем сущность явления перезарядки коллоидных частиц?

19. Укажите методы получения коллоидных растворов.
20. Что такое эмульгатор? Приведите пример гидрофильных и гидрофобных эмульгаторов.
21. Что такое пептизатор?
22. Как можно определить заряд коллоидных частиц?
23. Как можно очистить коллоидную систему от избытка электролита?

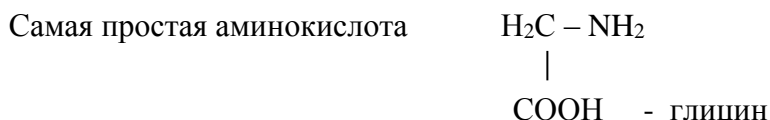
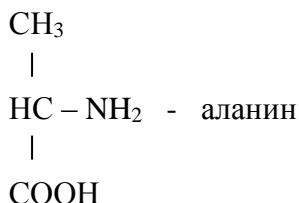
Тема 4. Биохимия белков.

Термин «протеин» ввел голландский ученый Г. Мульдер и обозначил его «Pr», По его мнению белок имел следующую формулу $C_{40} H_{62} N_{10} O_{12}$. Белок сыворотки крови – $10PrS_2P$. Открытие белков привело к тому, что их стали считать важнейшими органическими соединениями, с которыми связана жизнь. Развитие биологической науки полностью подтвердило особое значение белков для живых организмов. Они выполняют важнейшие функции в живых организмах. С ними связан иммунитет, биологический катализ, сократимость мышечных волокон и ряд других неизменно важных функций.

Строение белковой молекулы.

Молекулярная масса белков колеблется в пределах от 1000 до нескольких миллионов атомных единиц. Опыты показали, что в состав белков входят 20 органических соединений, получивших название – аминокислоты. Всего насчитывается больше 100 аминокислот, но в состав растительных и живых организмов входят только 20. В составе микробов, вирусов могут находиться другие аминокислоты, но человеком и животными эти

аминокислоты не усваиваются. В состав аминокислоты входит обязательно аминогруппа и карбоксильная группа.



Аминокислоты обладают оптической активностью, то есть, способностью отклонять плоскость поляризованного луча влево или вправо. Поэтому признаку их делят на L и D аминокислоты. В состав растительных и живых организмов входят только L-аминокислоты. D-аминокислоты или правовращающиеся встречаются у микробов, грибов и некоторых других соединений. Организмом человека и животных эти аминокислоты не усваиваются.

Аминокислоты по своему строению могут иметь различное количество функциональных групп. Так существуют аминокислоты, имеющие в своем составе две аминогруппы и одну карбоксильную группу. Имеются ещё циклические аминокислоты, в основе которых лежит бензольное или гетероциклическое кольцо.

По современным представлениям белковая молекула имеет сложную пространственную структуру. Поэтому у

белковой молекулы принято выделять в строении четыре уровня.

1. Первичная структура белковой молекулы. Определяется последовательность расположения аминокислот в молекуле белка, то есть за аланином – глицин – лизин.

2. Вторичная структура белковой молекулы. Представляет собой нить белковой молекулы, закрученную в спираль.

3. Третичная структура белковой молекулы представляет собой белковую спираль свернутую в клубок, имеющую трёхмерное строение. Отдельные участки белковой молекулы связаны между собой с помощью ковалентных, водородных связей и электроосмотических сил.

4. Четвертичная структура белковой молекулы. Она возникает тогда, когда несколько молекул белка объединяются между собой, образуя одну молекулу. Многие биокатализаторы-ферменты имеют четвертичную структуру.

Белки обладают определенными физико-химическими свойствами.

Химические свойства белков связаны с наличием на поверхности белковой молекулы таких реакционных групп, как аминогруппа (NH_2), карбоксильная группа (COOH), сульфгидрильная (SH). Белковая молекула имеет электрический заряд зависящий от состояния амино- и карбоксильной групп и от pH среды. Значение pH раствора белка, при котором белок становится электронейтральным, называется – изоэлектрической точкой данного белка. Каждый белок имеет свое значение pH, при котором он

находится в изоэлектрическом состоянии. В этом состоянии вязкость белков наименьшая. Белки чувствительны к температуре, при 40⁰С происходит изменение структуры белковой молекулы. Этот процесс получил название – денатурация. При нагревании белковой молекулы свыше 70⁰С белок теряет свои прижизненные свойства и может выпадать в осадок.

Классификация белков.

В современной классификации белки делят на протеины (простые белки) и протеиды (сложные белки). Простые белки состоят только из аминокислот, сложные белки состоят из небелковой части, которая может быть представлена углеводом, липидом, нуклеиновой кислотой, металлом и др. соединениями.

Простые белки.

Простые белки делятся на: альбумины и глобулины, которые занимают значительный процент в составе простых белков. Альбумины встречаются у растений и у животных. Молекулярная масса альбуминов находится в пределах от 1000 до 10000 атомных единиц. Они хорошо растворимы в воде.

Состав аминокислот альбуминов включает заменимые, незаменимые и частично заменимые аминокислоты. Заменимые аминокислоты синтезируются в организме, незаменимые – не синтезируются. Незаменимых аминокислот 8: валин, лейцин, изолейцин, метионин, трионин, лизин, триптофан, фенилаланин. Заменимых аминокислот тоже 8: аланин, аспарагин, глутамин, глицин, пролин, серин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота. Частично заменимых аминокислот 4: аргинин,

гистидин, цистеин, тирозин. Белки, включающие в свой состав все заменимые, незаменимые и частично заменимые аминокислоты – называются полноценными белками. Полноценные белки имеют животное происхождение (молоко, яйцо, рыба и т.д.). Белки, которые содержат в своем составе часть незаменимых аминокислот, или неполное их количество – называются неполноценными белками. Это белки растительного происхождения. Большое количество альбуминов находится в крови животных. Количество их является величиной постоянной.

В организме животного находится большое количество простых белков глобулинов. Молекулярная масса глобулинов находится в пределах от 10 тыс. до 1,5 млн. атомных единиц.

С помощью физико-химических методов глобулины можно разделить на несколько фракций (α_1 , α_2 , β , γ). К числу α_1 глобулинов относятся гликопротеины, которые связывают до 60% глюкозы плазмы крови. α_2 глобулин содержит в своем составе медьсодержащий белок – церулоплазмин и тиреоглобулин, который переносит тироксин (гормон щитовидной железы). β глобулин транспортирует фосфолипиды, холестерин, стероидные гормоны и ряд катионов. Они связывают до 70% липидов плазмы крови. Кроме того, в его составе находится белок, который связывает железо плазмы крови – трансферин. В составе γ глобулиновой фракции содержится белок – фибриноген и антитела. Фибриноген участвует в свертывании крови, а антитела выполняют защитную функцию. Определение этих фракций имеет важное значение в клинической практике.

Альбумины создают осмотическое давление крови, регулируют равновесие воды и электролитов между плазмой и тканями, и сохраняют необходимый объем крови для нормальной циркуляции. Они удерживают воду в кровяном русле. Альбумины переносят растворимые промежуточные продукты обмена (мочевина, мочевая кислота, пуриновые основания, креатин, молочная, пировиноградная кислоты и др. соединения) от одной ткани к другой. Они активно участвуют в переносе свободных жирных кислот из печени в периферические ткани, обеспечивают транспорт билирубина в печень.

Глобулины плазмы крови – это множество различных белков. Они транспортируют липиды, гормоны, жирорастворимые витамины, жирные кислоты, соли желчных кислот, желчные пигменты, йод, цинк, медь, железо.

Альбумины и глобулины находятся в определенном соотношении. Это соотношение называется белковым коэффициентом. Альбумины и фибриноген синтезируются в печени, а глобулины – в лимфатических узлах, селезенке, костном мозге.

Функции белков плазмы крови.

1. Обеспечивают вязкость крови.
2. Поддерживают осмотическое и онкотическое давление крови.
3. Входят в состав буферных систем. Поддерживают pH крови.
4. Транспортная функция.
5. Защитная функция.
6. Пластический материал (альбуминовая фракция).

Следующий вид простых белков протоны и гистоны. Эти белки отличаются высоким содержанием диаминомонокарбоновых кислот. Большое количество этих кислот содержится в молоках рыб.

Важным простым белком является коллаген. Этот белок входит в состав костной, хрящевой и соединительной ткани. Волокна этого белка отличаются высокой прочностью. Он находит широкое применение в пищевой промышленности, для приготовления заливных блюд, студней и т.д. (имеет коммерческое название – желатин).

Белок эластин входит в состав суставных тканей, связок и сухожилий. Отличается небольшим набором аминокислот и высокой прочностью.

В составе молекулы белка кератина содержится большое количество серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин). Белок входит в состав кожного эпителия, шерсти, рогов, копыт животных.

Наиболее важными из растительных белков являются глюteniны и пролактинy. Они содержатся в зернах злаковых культур (пшеница, рожь, овес, ячмень). Но в них содержится небольшое количество такой важной незаменимой аминокислоты, как лизин.

Сложные белки.

К ним относятся протеиды, которые состоят из белка и нуклеиновой кислоты. Белковая нить обычно в нуклеопротеидах обвивает нити нуклеиновых кислот, поддерживая тем самым стромовидную структуру нуклеопротеида. Хромопротеиды – это сложные белки, содержащие в своей структуре сложно организованные комплексы, в состав которых входят металлы. Наиболее

важным представителем хромопротеида является гемоглобин – это сложный белок, содержащийся в эритроцитах крови. Он состоит из белка глобина и 4-х молекул гема. Гем присоединяет к себе 2-х валентное железо. Существует два вида гемоглобина: гемоглобин А и F (А- это гемоглобин взрослых животных, F – это гемоглобин плодов. Он обладает большое сходство с кислородом и способен его депонировать. Оксигемоглобин НвО – переносит кислород. Гемоглобин, который отдал кислород - называется восстановленным или редуцированным. Гемоглобин, который связал углекислый газ - называется карбогемоглобином.

К патологическим соединениям гемоглобина, в которых железо из двухвалентного состояния переходит в трехвалентное состояния (не способное связывать кислород) – называется карбоксигемоглобином. Это гемоглобин, связанный с угарным газом. Метгемоглобин, образуется под воздействием сильных окислителей (анилин, перманганат калия KMnO_4). Соляно-кислый гематин, образуется под действием соляной кислоты. В этом соединении железо тоже трехвалентное. Миоглобин – данный вид гемоглобина содержится с мышечной ткани. Молекулярная масса глобина в миоглобине меньше, чем в гемоглобине, поэтому он тоже способен к депонированию кислорода. Важным элементом, входящим в состав хромопротеида является железо. Эти два белка тесно связаны с транспортом кислорода. Содержание гемоглобина в крови является важным показателем, характеризующим состояние здоровья человека и животных.

К сложным белкам относятся липопротеиды. В таких белках имеется липидная часть, которая может быть представлена фосфолипидами, стеринами, или стероидами. В состав гликопротеидов входят различные соединения углеводов. Многие из этих белков обладают иммунными свойствами. В состав этих кислот входят глюкуроновая и гексуоновая кислоты.

Протеины (простые)	Протеиноиды	Протеиды (сложные)
Альбумины	Кератин	Хромопротеиды
Глобулины	Эластин	Липопротеиды
Гистоны	Коллаген	Нуклеопротеиды (ДНК или РНК и простой белок – гистона)
Протамины	Фибраин (белок шелка)	Фосфопротеиды (фосфорная кислота, простой белок, казеин)
Проламины		Гликопротеиды
Глютамины		Металлопротеиды (ферретин, трансферин, гемосидемин)

По структуре строения белки бывают глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки состоят из макромолекул шаровидной, эллипсоидной формы. Они хорошо растворимы в воде, то есть обладают гидрофильностью. Содержатся в основном в биологических жидкостях: в крови, лимфе, протоплазме клеток. Так как основой жизнедеятельности живого организма служит

обмен веществ (метаболизм), то эти белки выполняют основную метаболическую функцию.

Фибриллярные или волокнистые белки – состоят из макромолекул в виде тонких вытянутых нитей, соединенных между собой. В эту группу входят белки, являющиеся составными частями кожи и сухожилий (коллаген, желатин), волоса и рога (кератин), мышц (миозины) и др. В организме они выполняют механические функции, хотя некоторые обладают биологической активностью. Фибриллярные белки при комнатной температуре обычно нерастворимы в воде, однако способны набухать в ней, что говорит об их гидрофильных свойствах.

Характер связей в фибриллярных и глобулярных белках одинаков. Молекулярная масса обоих основных структурных видов белка примерно одинакова, но форма значительно отличается. У фибриллярных белков длина макроглобула в сотни и тысячи раз превышает их толщину.

Современные методы изучения структуры и свойств белков.

В настоящее время белки активно исследуются с помощью рентгеноструктурного анализа, газовой хроматографии, электронной микроскопии, электрофореза, гель-фильтрации, радиоизотопных, иммуноферментных методов. В настоящее время при изучении белков используют метод масс-спектрофотометрии.

Практическое занятие 4.

Химические свойства белков.

Лабораторная работа 1. Биуретовая реакция (на обнаружение пептидных связей в белках)

Реактивы: 1% раствора белка; 10% раствора щелочи (NaOH или KOH); 1% раствора сульфата меди.

Ход работы: К 1 мл 1% раствора белка (желатина, яичного белка или сывороточного альбумина) добавляют 1 мл 10% раствора щелочи (NaOH или KOH) и 1 каплю 1% раствора сульфата меди. Появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание.

Лабораторная работа 2. Реакция Фоля (на цистеин и цистин)

Реактивы: 1% раствор яичного белка или кусочек шерстяной нити; 30% раствор NaOH; 5% раствор ацетата свинца; 1% раствор желатина.

Ход работы: К 1 мл 1% раствора яичного белка или кусочку шерстяной нити добавляют 1 мл 30% щелочи и 3-4 капли 5% раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость окрашивается в бурый или черный цвет.

Реакцию Фоля проводят с 1% раствором желатина, в составе которого нет серосодержащих аминокислот. Черный осадок сульфида свинца не образуется.

Лабораторная работа 3. Ксантопротеиновая реакция (на ароматические аминокислоты)

Реактивы: 1% раствор альбумина или яичного белка; концентрированная азотная кислота; концентрированный раствор аммиака; 0,1% раствор желатина.

Ход работы: К 1 мл 1% раствора альбумина или яичного белка прибавляют 5 капель концентрированной азотной кислоты. Появляется осадок. При осторожном нагревании

смесь окрашивается в желтый цвет. После охлаждения осторожно добавляют 10 капель концентрированного раствора аммиака (или 30% раствора едкого натра), при этом желтая окраска переходит в оранжевую.

Проделать ксантопротеиновую реакцию с ароматической аминокислотой, взяв вместо раствора белка 0,1% раствор желатина.

Лабораторная работа 4. Реакция Адамкевича (на триптофан)

Реактивы: 1% раствор яичного белка; 1 ледяная (концентрированная) уксусная кислота; концентрированная серная кислота.

Ход работы: К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 1 мл ледяной (концентрированной) уксусной кислоты и осторожно нагревают до растворения осадка. После охлаждения к смеси осторожно добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты (по каплям по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешались). Через 5-10 минут на границе раздела двух слоев наблюдают образование красно-фиолетового кольца.

Лабораторная работа 5. Выделение белков мышечной ткани.

Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы

мышечных клеток) растворимы в воде или в солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5% раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Реактивы: мышечная ткань; 5% раствор хлорида калия.

Ход работы: Взвешивают 2 г мышечной ткани. Измельченную ножницами навеску помещают в фарфоровую ступку, добавляют 2 мл 5% раствора хлорида калия и растирают со стеклянным песком до гомогенного состояния. К гомогенату добавляют 3 мл раствора хлорида калия и растирают кашицу в течение 5 минут, после чего прибавляют еще 5 мл 5% раствора хлорида калия и продолжают растирание 5 минут. Полученный гомогенат фильтруют через два слоя марли или центрифугируют в течение 15 минут при 4000 об/мин. С фильтратом (или центрифугатом) проводят цветные реакции на белки (биуретовую или ксантопротеиновую реакции).

Лабораторная работа 6. Выделение яичного альбумина.

Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70% яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Реактивы: яйцо; дистиллированная вода.

Ход работы: 1. Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают отверстие в скорлупе яйца с двух концов и выливают белок в стакан емкостью 500 мл, затем в стакан добавляют 250 мл дистиллированной воды и содержимое перемешивают стеклянной палочкой с резиновым наконечником.

2. Раствор переносят в мерный цилиндр и объем доводят дистиллированной водой до 300 мл. Раствор оставляют на 30 минут при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

3. 20 мл полученной суспензии дважды фильтруют через складчатый фильтр.

4. С фильтратом, содержащим яичный альбумин, проделывают цветные реакции на белки (биуретовую и ксантопротеиновую, реакции)

Лабораторная работа 7. Растворимость белков.

Многие белки растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп. Растворимость белка в воде зависит от структуры белка, реакции среды, присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислыми свойствами, а в щелочной - белки, обладающие основными свойствами. Альбумины хорошо растворяются в дистиллированной воде, а глобулины растворимы в воде только в присутствии электролитов.

Не растворяются в воде белки опорных тканей (коллаген, кератин, эластин и др.).

Реактивы: яйцо; дистиллированная вода; 5% раствор хлорида калия;

Ход работы: 1. К 2 каплям неразведенного яичного белка прибавляют 1 мл дистиллированной воды и перемешивают. При этом яичный альбумин растворяется, а яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка.

2. К 2 каплям яичного белка прибавляют 1 мл 5% раствора хлорида калия. В слабом солевом растворе растворяются как альбумины, так и глобулины.

3. Проверяют растворимость в воде и 5% растворе хлористого калия белка кератина, содержащегося в шерсти и волосах.

Лабораторная работа 8. Осаждение белков

Реакции осаждения белков в зависимости от применяемого осадителя бывают необратимыми и обратимыми.

Необратимое осаждение белков (денатурация)

Необратимые реакции осаждения приводят к денатурации белков, при этом разрушается пространственная структура молекулы и белки утрачивают свои естественные биологические и физико-химические свойства. Денатурацию белков можно вызвать физическими воздействиями (кипячение, замораживание, высокое давление, вибрация, радиоактивное излучение и др.) и химическими осадителями.

Ход работы:

1. Осаждение белков неорганическими осадителями.

а) Осаждение белков минеральными кислотами.

В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной азотной кислоты. Затем, наклонив пробирку, медленно по стенке добавляют 1 мл 1% раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок в виде белого кольца.

Такую же реакцию проделывают с концентрированной соляной и серной кислотами.

б) Осаждение белков солями тяжелых металлов.

В две пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка и добавляют по 3-4 капли: в первую пробирку - 7% раствора сульфата меди, во вторую - 5% раствора ацетата свинца. Во всех пробирках образуется осадок.

2. Осаждение белков органическими осадителями.

а) осаждение белков органическими кислотами.

В 2 пробирки наливают по 2 мл 1% раствора белка и добавляют в одну пробирку 4-5 капель 10% раствора сульфосалициловой кислоты, в другую - 5-10 капель 10% трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

б) Осаждение белков органическими растворителями.

К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96% этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

3. Осаждение белков при нагревании.

В пять пробирок наливают по 0,5 мл 1% раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагревают до появления опалесценции (помутнения раствора).

К раствору белка во второй пробирке осторожно добавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты, нагревают и наблюдают вначале появление опалесценции, а затем выпадение белого хлопьевидного осадка белка. Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии.

К раствору белка в третьей пробирке добавляют 1-2 капли 10% раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок не образуется, так как в кислой среде частицы белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд.

К раствору белка в четвертой пробирке добавляют 1-2 капли 10% раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Выпадает осадок вследствие адсорбции ионов электролита (образование двойного электрического слоя) и нейтрализации заряда на частицах белка.

К раствору белка в пятой пробирке добавляют 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

Обратимое осаждение белков (высаливание)

При добавлении к водным растворам белков сульфатов или хлоридов щелочных и щелочно-земельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 и др.) происходит дегидратация и нейтрализация белковых частиц, при этом белки выпадают в осадок без изменения нативной структуры. Такой тип осаждения белков называется высаливанием. Высаливание - обратимый процесс, и после удаления соли (разбавлением водой, диализом) белок вновь приобретает природные свойства. Поскольку разные белки высаливаются при

различных концентрациях солей, этот метод используется для фракционирования белков. Для разделения белков методом высаливания широко применяется сульфат аммония.

Фракционное осаждение белков плазмы крови сульфатом аммония.

Фибриноген выпадает в осадок при 33% насыщении плазмы сернокислым аммонием, глобулины - при полунасыщении а альбумины - при полном насыщении.

Ход работы:

1. К 2 мл плазмы крови добавляют 5 мл дистиллированной воды, 3,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадает фибриноген (можно наблюдать лишь незначительное помутнение), который отделяют фильтрованием. Наличие белка на фильтре проверяют биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром переносят в чистую пробирку и на фильтр наливают 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди. Фильтрат (№1) используют для дальнейшей работы.

2. К 4 мл фильтрата №1 добавляют 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадают глобулины, которые отделяют фильтрованием. Получают осадок, с которым проделывают биуретовую реакцию, и фильтрат №2.

3. К фильтрату №2 добавляют при постоянном перемешивании стеклянной палочкой кристаллический сульфат аммония до насыщения (пока соль не перестанет растворяться). Выпадают в осадок альбумины, наличие которых проверяют биуретовой реакцией: 1 мл смеси

переносят в чистую пробирку, добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди.

Лабораторная работа 9. Выделение казеина из молока.

80% белков молока приходится на долю специфического фосфопротеида казеина. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеин выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются фильтрованием.

Ход работы: 1. В химический стакан емкостью 50 мл отмеряют мерной пробиркой 3 мл молока и 7 мл дистиллированной воды. К смеси постепенно, слегка перемешивая, добавляют 10-15 капель 1% раствора соляной кислоты до начала образования рыхлого осадка. (Кислоту добавлять аккуратно по каплям, так как в избытке ее осадок казеина растворяется!)

2. Для удаления кислоты в стакан наливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и через 5 минут жидкость осторожно сливают с осадка. К осадку еще раз приливают 10 мл дистиллированной воды, содержимое стакана осторожно перемешивают и через 5 минут фильтруют через бумажный фильтр.

3. Осадок с фильтра переносят стеклянной палочкой в колбочку (небольшую часть осадка оставляют на фильтре и проверяют на биуретовую реакцию). В колбочку приливают 6 мл 10% раствора гидроксида натрия, присоединяют

обратный холодильник и нагревают на песочной бане в течение 1 часа.

4. К охлажденному гидролизату добавляют 20-30 капель концентрированной азотной кислоты слабокислой реакции на лакмус. При нейтрализации выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза казеина. После отстаивания жидкость фильтруют.

5. Проводят с фильтратом биуретовую реакцию и молибденовую пробу на фосфорную кислоту:

а) к 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл 10% щелочи и 1 каплю 1% раствора сульфата меди;

б) к 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл молибденового реактива (смесь молибдата аммония и концентрированной азотной кислоты), доводят до кипения и кипятят несколько минут. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет.

При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок.

Контрольные вопросы

1. Строение белковой молекулы.
2. Пространственные структуры белковой молекулы.
3. Физико-химические свойства белков.
4. Денатурация. Причины. Изоэлектрическая точка белка.
5. Классификация белков.
6. Протеины.
7. Протеиды.
8. Фибриллярные и глобулярные белки.
9. Функции белков в плазме крови.

10. Хромопротеиды.
11. Липопротеиды.
12. Глюкопротеиды.
13. Нуклеопротеиды.
14. Качественная реакция на наличие белка в растворе.
15. Реакция Адамкевича.
16. Осаждение белков кипячением.
17. Альбумины.
18. Глобулины.
19. Осаждение белков органическими кислотами.
20. Аминокислоты. Строение. Физико-химические свойства.

Тема 5. Биохимия ферментов.

Организм животного неразрывно связан с множеством химических реакций. Эти реакции протекают под действием специфических белков – ферментов. Ферменты выполняют функции катализа химических реакций, т.е. не расходуются в процессе реакции, при этом скорость реакции могут увеличивать в несколько раз.

В молекуле фермента различают белковую и небелковую части. Белковая часть носит название – апофермент, не белковая часть называется - кофермент. Не белковой частью могут быть витамины, особенно группы В, а также микроэлементы (медь, цинк, кобальт, никель, марганец и др.). Кроме того, коферменты могут быть представлены металлами или более сложными органическими соединениями.

Молекулярная масса ферментов находится в диапазоне от 10000 до нескольких миллионов. Средняя масса аминокислоты составляет 100 дальтонов. Отсюда следует, что фермент с наименьшей молекулярной массой 10000 содержит примерно 100 аминокислот. Большинство субстратов имеют намного меньшие размеры молекул, чем ферменты, которые действуют на них. Размеры молекул многих субстратов близки к размеру молекул одной аминокислоты. При действии фермента на субстрат образуется фермент субстратный комплекс.



В момент создания комплекса фермент так влияет на субстрат, что связи становятся не устойчивыми и происходит перераспределение энергии. В каталитическом контакте принимает участие не вся молекула фермента. От молекулы фермента можно отделить часть и каталитическая активность его не изменится. Фермент Эренида содержит в своем составе 124 аминокислоты. Если отделить от неё 20 аминокислот, то каталитическая активность фермента не нарушится. Непосредственное участие в каталитическом контакте принимает только определенная часть молекулы фермента, которая называется активным центром фермента.

Классификация и номенклатура ферментов

Номенклатура ферментов не носит строгого характера, ряд ферментов сохраняют старые названия (трипсин), для названия других прибавляют суффикс «аза», к названию субстрата который они катализируют (липаза).

Международный биохимический съезд 1961 г. утвердил 6 классов ферментов на основе типа химической реакции, которую они катализируют.

1. Оксидоредуктазы. – это ферменты, осуществляющие реакции окисления и восстановления, или перенос электронов от донора к акцептору. Окисление – это отнятие атома водорода от субстрата, восстановление – это присоединение атома водорода к акцептору.

2. Трансферазы – это ферменты, осуществляющие перенос функциональной группы, не содержащей электронов водорода, с одной молекулы на другую. Так в результате реакции трансаминирования происходит образование новой аминокислоты и кетокислоты.

3. Гидролазы – это ферменты, которые расщепляют субстрат, вводят в него молекулы воды с помощью специфических связей. Это все ферменты пищеварительных соков.

4. Лиазы – это ферменты, расщепляющие внутримолекулярные связи в молекулах субстратов не гидролитическим путем с удалением молекулы воды или углекислого газа. Участвуют в сложных реакциях типа цикла Кребса.

5. Изомеразы – это ферменты, участвующие в реакциях внутримолекулярной изомеризации.

6. Лигаза – это ферменты, обеспечивающие синтез веществ протекающие с затратами энергии.

Свойства ферментов

Ферменты являются специфическими белками. Они обладают специфическими свойствами, которых нет у неорганических веществ.

1. Высокая скорость химических реакций.

Число оборотов – сколько раз в 1 минуту 1 молекула фермента может преобразовать молекулу субстрата.

Например, фермент каталаза расщепляет H_2O_2 на O_2 и H_2O . Для этого процесса число оборотов равно 5 млн. Фермент ацетилхолинэстераза имеет число оборотов 18 млн. Чтобы молекула вступила в химическую реакцию, она должна быть проактивирована. Запас энергии в активированных молекулах больше, чем средний запас энергии в усредненных молекулах. Отличительной чертой всех ферментов является то, что они уменьшают реакцию активации и H_2O_2 может спонтанно расщепляться на O_2 и H_2O при хранении в открытом сосуде при комнатной температуре. При добавлении в раствор H_2O_2 неорганического катализатора энергетическая активность фермента снижается. Ферменты проводят энергетические реакции в обход энергетического барьера.

На скорость ферментативных реакций оказывает влияние температура, концентрация водородных ионов и концентрация фермента и реагирующего вещества. Повышение температуры на 10^0C вдвое увеличивает скорость ферментативной реакции. Каждый фермент имеет оптимальную скорость при определенном значении концентрации водородных ионов (pH). Например, фермент пепсин, который содержится в желудочном соке, имеет наибольшую активность при pH от 1,5 – 2,5. В то же время, фермент трипсин, который входит в состав сока поджелудочной железы, наибольшую активность имеет при pH от 8 – 9. У большинства ферментов максимальная активность развивается при pH = 7. В организме животного

ферменты осуществляют каталитические процессы при температуре находящейся в пределах $35^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$. Дальнейшее повышение температуры приводит к денатурации белковой молекулы и снижению ферментативной активности. Существуют вещества, которые способны значительно снижать активность ферментов. Это в первую очередь соли тяжелых металлов (ртуть, мышьяк, свинец, кадмий). Все эти элементы являются ядовитыми. Активность ферментов может увеличиваться при действии на них слабых окислителей и восстановителей (например, аскорбиновая кислота).

Факторы, действующие на активность фермента.

- скорость синтеза (образования) фермента.

- проницаемость клеточных мембран для данного фермента. В норме мембраны слабо пропускают ферменты, а для некоторых ферментов мембраны не проницаемы.

- мощность лизиса (разрушение) и некроза (отмирание) ткани. При них клетки гибнут, и ферменты из них выходят в кровь.

- в кровяном русле происходит активация ферментов.

2. Ферменты характеризуются высокой специфичностью действия.

По специфичности действия ферменты делятся на две группы:

- ферменты с абсолютной специфичностью действия
- ферменты с относительной специфичностью действия

Например, аминокислота аргинин гидролизруется (разлагается) в клетках печени животных ферментом – аргиназой, с образованием мочевины и орнитина. Если в аргинине заменить 1 атом H_2 на метиловую группу CH_3

(получится эфир), то аргиназа не будет расщеплять это соединение.

Таким образом, ферменты с абсолютной специфичностью действия требовательны к наличию в субстрате определенной связи, которую они расщепляют. Также структура субстрата в целом не должна быть нарушена, то есть необходимо как химическое, так и геометрическое соответствие.

Однако известна большая группа ферментов с относительной специфичностью действия. Например, фермент липаза расщепляющий жиры (триглицериды). Этот фермент чувствителен к присутствию в субстрате определенной химической связи и безразличен к структуре субстрата в целом.

3. Чувствительность фермента к концентрации субстрата.

Для определения чувствительности введено понятие насыщение фермента субстратом. У разных ферментов скорость насыщения различна. Количественной оценкой скорости насыщения фермента субстратом является – константа Михаелиса. Это такая концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна $\frac{1}{2}$ максимальной скорости. У каждого фермента своя константа Михаелиса. Если константа Михаелиса малая величина, то такой фермент способен быстро насыщаться субстратом. Если константа Михаелиса большая величина, то такой фермент медленно насыщается субстратом и долго может участвовать в химической реакции. Это очень важно для организма. Например, в клетках различных органов животных и человека находится фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Субстратом для него является

молочная кислота. В сердечной мышце константа Михаелиса для ЛДГ равна 3×10^{-3} м/л. Для скелетной мышцы константа Михаелиса равна 9×10^{-5} м/л.

4. Чувствительность ферментов.

Ферменты отличаются очень высокой чувствительностью к определенным химическим соединениям, например, к ингибиторам – веществам, вызывающим торможение реакции. Ингибиторами ферментов часто являются лекарственные препараты, например, антибиотики.

Стенка бактерии покрыта оболочкой, состоящей из муреина. Муреин – это вещество, состоящее из полисахаридных цепей, соединенных мостиками. Для образования муреина необходим фермент транспептидаза. Этот фермент в муреине образует пептидные связи, соединяющие тетрапептиды в октопептиды. При введении пенициллина действие транспептидазы ингибируется. При этом не будет завершаться процесс образования муреина. Муреин будет прорываться и через образовавшееся отверстие выливаться в содержимое клетки, то есть пенициллин будет осуществлять бактерицидный эффект.

Механизм действия ферментов.

В настоящее время существует несколько теорий ферментативного катализа. В основе этого процесса лежит представление о том, что фермент снижает энергетическую активность химических связей того вещества, на которое он действует. Современной теорией ферментативного катализа является теория промежуточных соединений, по которой фермент, действуя на какое-либо вещество, образует с ним промежуточные соединения. В этот момент связи у

вещества ослабевают, и оно распадается, а фермент вновь принимает участие в ферментативных реакциях.

Характеристика мультиферментных комплексов.

МФК комплексы имеют большую молекулярную массу. Эти комплексы включают в себя несколько ферментов. Они осуществляют сложные процессы, состоящие из нескольких стадий. Например, в организме животных и человека есть такое соединение, как пировиноградная кислота, которая затем, превращается в молочную кислоту. Этот процесс осуществляется при действии трех ферментов (пируватдегидрогеназа, липоамиддегидрогеназа, липоацетилтрансфераза). МФК комплексы имеют ряд преимуществ. В нем необходимо однократное столкновение комплекса с субстратом, после чего образуется субстрат ферментативного комплекса. В результате действия первого фермента образуется продукт первой реакции. Он не диффундирует в окружающую среду, а передается активному центру второго фермента, (продукт первой реакции является субстратом для второго фермента), в результате образуется продукт второй реакции. На поверхности фермента без диффузии превращается в продукт третьей реакции.

МФК ферментативные реакции осуществляет значительно быстрее, чем отдельные ферменты. Такие комплексы могут иметь и более сложное строение. Они играют большую роль в образовании липопротеидных мембран. Отдельные ферменты являются субстратными компонентами самой мембраны. В комплексе ферменты собираются в ансамбли, которые осуществляют

многостадийные процессы (например, процесс тканевого дыхания).

Характеристика изоферментов.

Изоферменты – это множественные молекулярные формы одного и того же фермента, которые характеризуются той же специфичностью действия, но отличаются друг от друга по целому ряду свойств (продолжительность жизни, константе Михаелиса, оптимальной реакции среды, оптимальной температуре и т.д.). Изоферменты одного и того же фермента имеют разную электрофоритическую подвижность.

Появление изоферментов может определяться генетически для большей части ферментов. Первый фермент, из которого были открыты изоферменты – лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Существует 5 форм (5 изоферментов) данного фермента. Все 5 форм имеют одну и ту же молекулярную массу – 134000 Дальтон (Д) и содержат 4 полипептидных цепи. 5 изоферментов соответствуют 5-ти различным комбинациям и 2-м различным типам полипептидных цепей (М и Н-цепи). Один из них преобладает в мышечной ткани, который составлен из 4-х идентичных М-цепей и обозначается М₄ – 1. Другой изомер преобладает в сердечной мышце, содержит 4-идентичных Н-цепи (Н₄ – 2). Остальные 3 изомера представляют собой 3 различных сочетания М и Н-цепей. Наблюдают генетически обусловленные структурные различия между этими изомерами. Известно, что ЛДГ – 5 изомер имеет продолжительность жизни в 10 раз дольше, чем ЛДГ – 1.

Перспективы развития ферментологии велики. Ферменты имеют важное народнохозяйственное значение. Они находят широкое применение в кожевенной, пищевой, молочной промышленности. Кроме того, широко используются в медицине, ветеринарии, в бытовой химии, в научных исследованиях и т.д.

Практическое занятие 5.

Химические свойства ферментов.

Лабораторная работа 1. Сравнительное действие ферментов и катализаторов неорганической природы

Реактивы: 1% раствор крахмала, 10% раствор гидроксида натрия (NaOH), 1% раствор сульфата меди (CuSO₄), раствор Люголя (йод, 1% раствор в KJ, 2,5%), 10% раствор соляной кислоты (HCl), вода дистиллированная

Ход работы: В три пробирки вносят по 5 мл 1%-го раствора крахмала. В первую пробирку (№1) добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую (№2) – 1 мл 10% р-ра HCl, а в третью (№3) – 1мл препарата амилазы слюны (приготовление препарата фермента указано ниже). Пробирку №2 помещают в кипящую водяную баню, а пробирки №1 и №3 после перемешивания в термостат на 37°С. После инкубирования в течение 20 минут все пробирки охлаждают и из каждой отбирают пробы для определения содержания крахмала по реакции с раствором Люголя, и глюкозы - по реакции Троммера.

Делают заключение о степени гидролиза крахмала в каждой из пробирок.

Сравнивают гидролитическую активность амилазы слюны и раствора соляной кислоты.

Приготовление разбавленного раствора амилазы слюны

1. Предварительно рот ополаскивают дистиллированной водой.

2. Затем в рот набирают приблизительно 20-25 мл дистиллированной воды и

выдерживают ее в течение 5 минут.

3. Далее раствор собирают и фильтруют.

Лабораторная работа 2. Определению каталитической активности ферментов

Реактивы: 3%-ый раствор пероксида водорода, пробирки, пинцет, ткани растений (кусочки сырого и варёного картофеля) и животных (кусочки сырого и варёного мяса), песок, ступка и пестик.

Ход работы:

1. Приготовьте четыре пробирки со свежим 3%-ый раствором пероксида водорода, затем поместите в первую пробирку кусочек сырого картофеля, во вторую – кусочек варёного картофеля, в третью – кусочек сырого мяса, в четвёртую – кусочек варёного мяса. Пронаблюдайте, что будет происходить в каждой пробирке.

2. Составьте таблицу, показывающую активность каждой ткани при различной обработке.

3. Измельчите в ступке кусочек сырого картофеля с небольшим количеством песка. Перенесите измельчённый картофель вместе с песком в пробирку и капните туда немного пероксида водорода. Сравните активность измельчённой и целой растительной ткани.

4. Объясните полученные результаты.

Образец отчёта по лабораторной работе

Что делали?	Что наблюдали?	Выводы.
-------------	----------------	---------

1. В пробирку с раствором H_2O_2 положили кусочек сырого картофеля.	Бурное выделение пузырьков кислорода.	В клетках картофеля присутствуют ферменты, ускоряющие расщепление H_2O_2 : $2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
2. В пробирку с раствором H_2O_2 положили кусочек варёного картофеля.	Изменений с раствором не происходит. Признаков разложения H_2O_2 нет.	Ферменты утратили свои каталитические свойства: при варке от нагревания произошла денатурация белков.
3. В пробирку с раствором H_2O_2 положили кусочек сырого мяса.	Бурное выделение пузырьков кислорода.	В клетках мышечной ткани животного есть ферменты, ускоряющие расщепление H_2O_2 : $2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
4. В пробирку с раствором H_2O_2 положили кусочек варёного мяса.	Изменений с раствором не происходит. Признаков разложения H_2O_2 нет.	При варке ферменты потеряли свою каталитическую активность вследствие денатурации белковых молекул.
5. В пробирку с раствором H_2O_2 положили кусочек измельчённого сырого картофеля.	Выделение пузырьков кислорода стало более интенсивным чем до измельчения.	При измельчении клеток картофеля количество ферментов, ускоряющих расщепление H_2O_2 увеличилось, поэтому скорость реакции стала больше: $2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Лабораторная работа 3. Специфичность действия ферментов

Реактивы: 1% раствора крахмала, 2% раствор сахарозы, раствор сахаразы.

Ход работы:

В пробирку №1 и №2 налить по 10 капель 1% раствора крахмала, в пробирки №3 и №4 налить по 10 капель 2%

раствора сахарозы. Затем в пробирки №1 и №3 добавить по 4 капли слюны, разведенной в 5 раз, а в пробирки №2 и №4 налить по 4 капли раствора сахаразы (фермента). Перемешать и поместить в водяную баню при температуре 37° на 15 минут. После этого с содержимым всех четырех пробирок проводят реакцию с йодом и сульфатом меди.

Результаты опыта занести в таблицу.

Определение специфичности действия ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция с сульфатом меди
1	Крахмал	Амилаза	-	+
2	Крахмал	Сахараза	+	-
3	Сахароза	Амилаза	-	-
4	Сахароза	Сахараза	-	+

Лабораторная работа 4. Инактивация ферментов высокой температурой

Реактивы: раствор слюны (свежую слюну разводят водой в 5 раз); 1%-й раствор крахмала; раствор йода в иодиде калия (р-р Люголя); 5 %-й раствор гидроксида натрия; 5 %-й раствор сульфата меди.

Ход работы: в две пробирки налейте по 1 мл разведенной слюны. Содержимое одной пробирки нагрейте до кипения и прокипятите 2-3 мин. Затем в обе пробирки добавьте по 1 мл раствора крахмала и поставьте их на 10 мин. в водяную баню, нагретую до 38°С.

Из опытной и контрольной пробирок задания 1 отлейте в отдельные пробирки по 1 мл их содержимого. Добавьте в

каждую пробирку по 1 капле раствора йода и тщательно перемешайте.

Сравните окраску полученных растворов.

Обнаружение мальтозы.

К оставшимся растворам опытной и контрольной пробирок добавьте по 1 капле раствора сульфата меди и по 5 капель раствора щелочи. Содержимое пробирок перемешайте и поместите их в кипящую водяную баню.

Сравните окраску полученных растворов.

Контрольные вопросы

1. Ферменты. Определение понятия.
2. Ферментативный катализ. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры, pH, концентрации фермента и субстрата.
3. Константа Михаэлиса как мера сродства фермента к субстрату.
4. Химическая природа ферментов. Простые и сложные ферменты.
5. Строение сложных ферментов. Холофермент. Апофермент. Кофакторы, коферменты. Роль витаминов.
6. Номенклатура и классификация ферментов.
7. Механизм действия ферментов. Образование фермент-субстратного комплекса. Активный центр ферментов.
8. Регуляторный (аллостерический) центр фермента. Эффекторы. Конформационные изменения активного центра.
9. Активаторы и ингибиторы ферментов. Типы ингибиторов: обратимые и необратимые, конкурентные и неконкурентные. Эндогенные ингибиторы ферментов.

10. Антиферменты. Лекарственные препараты-ингибиторы ферментов.

11. Аллостерические ферменты, белки четвертичной структуры. Кооперативные свойства аллостерических ферментов.

11. Различия ферментного состава органов и тканей, органоспецифические ферменты, ферменты плазмы крови.

12. Изоферменты (на примере ЛДГ).

13. Единицы измерения активности ферментов.

14. Применение ферментов, их активаторов и ингибиторов при лечении заболеваний. Имобилизованные ферменты.

Тема 6. Биохимия углеводов.

Углеводы – это органические соединения, которые содержат в своем составе углерод, водород и кислород. Многие из углеводов содержат фосфор, серу и азот. Название углеводов было дано в 1840 году Шмидтом. Именно он представил формулу углевода в виде $C_n H_{2n} O_n$.

Основные функции углеводов в организме.

1. Энергетическая функция (глюкоза, гликоген).

2. Структурная функция (хондроитинсерная, гиалуроновая кислоты и др. гетерогенсахариды).

3. Защитная функция. Проявляется в синтезе иммунных тел в ответ на антигены, которые поступают в организм, а также в выработке мукополисахаридов (слизь из носа). К защитной функции относится антитвертывающая функция крови, выполняет её гепарин (используется при инфарктах и инсультах для разжижения крови)

4. Осморегуляторная функция выполняется за счёт стабильной концентрации глюкозы в организме.

Классификация углеводов.

I группа Моносахариды и их производные

Собственно моносахариды: триозы (диоксиглицерин), тетрозы (эритроза), пентозы (рибоза, дезоксирибоза, ксилоза (сахар для диабетиков)).

Производные моносахаридов: ароновые, урановые кислоты, аминсахара, гликозиды, фосфосахара. Представителями производных моносахаридов являются: гексозы (глюкоза, фруктоза, галактоза). Кроме того, к простым сахарам относятся гептозы (сегопептулоза – пептозофосфат – путь окисления углеводов), октозы, нанозы, декозы.

Глюкозе и ее изомеру фруктозе принадлежит ведущая роль в обмене веществ. В водных растворах они присутствуют в циклической и ациклической форме. Все простые сахара оптически активные соединения, то есть вследствие наличия в их структуре асимметрических атомов углерода, обладают способностью вращать плоскость поляризованного света. d-глюкоза существует в виде двух стерео изомерных форм: α - d-глюкоза, с удельным вращением в водной среде $+111^{\circ}$ и β -d-глюкоза, с удельным вращением $+19^{\circ}$. При стоянии растворов глюкозы устанавливается равновесие между двумя формами, благодаря чему вращение раствора меняется до равновесного состояния с удельным вращением $+52^{\circ}$ (явление мутаротации).

Все простые углеводы легко растворяются в воде, обладают сладким вкусом и могут быть обнаружены по их восстановительным свойствам.

Наряду со свободными сахарами в организмах весьма распространены фосфорнокислые эфиры простых сахаров. Среди производных простых сахаров определенное место принадлежит продуктам их окисления – глюкуроновой и галактурановой кислотам. Продуктами восстановления простых сахаров являются шестиатомные спирты: d-сорбит и d-маннит.

II группа Олигосахариды

В состав олигосахаридов входят соединения, содержащие число моносахаридов от 2 до 10. Большое значение в обмене растительных организмов и как пищевые вещества для животных имеют дисахариды. Наиболее распространенный дисахарид в растениях – сахароза (свекловичный сахар, тростниковый сахар). Сахароза построена из глюкозы и фруктозы, соединенных между собой глюкозидной связью. Дисахарид лактоза или молочный сахар – основной углевод молока – синтезируется в молочных железах животных. Лактоза в своем составе содержит глюкозу и галактозу. Некоторое значение как продукт питания и промежуточный продукт распада крахмала имеет дисахарид мальтоза (виноградный сахар) построенный из двух молекул глюкозы. Все дисахариды легко растворимы в воде (несколько хуже растворим молочный сахар), хорошо кристаллизуются, имеют сладкий вкус (особенно сахароза, менее – лактоза), хорошо усваиваются организмами.

III группа Полисахариды

Гомополисахариды: крахмал, гликоген, целлюлоза (клетчатка), инсулин (сахарид земельной группы). В растениях, в результате фотосинтеза, образуются два наиболее распространенных полисахарида: крахмал и клетчатка.

Крахмал накапливается в качестве запасного питательного вещества в виде аморфных глыбок, различных по форме, у разных растений в зеленых листьях, в зерне, картофеле, плодах и овощах. Содержание крахмала в зернах пшеницы, кукурузы, риса достигает 70-80%. В клубнях картофеля 12-14%. Природный крахмал представляет собой систему из двух полимеров глюкозы – амилоза и амилопектин. Амилоза растворяется в воде с йодом и дает синее окрашивание. Реакция с йодом часто используется для открытия крахмала. Эта реакция очень чувствительна и позволяет обнаружить частичные следы крахмала. Амилопектин – полимер глюкозы, плохо растворим в воде, и придает полученным при нагревании коллоидным растворам крахмала способность застывать при охлаждении в студень или гель.

Клетчатка или целлюлоза – распространенный полисахарид стенок растительных клеток. Это линейный полимер глюкозы, с высокой степенью полимеризации. Нитевидные молекулы клетчатки соединены в прочные устойчивые волокна. В состав клетчатки входит α и β -глюкоза. Ассоциация нитевидных молекул клетчатки обуславливает большую прочность ее волокон. Они не растворимы в воде, кислотах и слабых щелочах. В качестве запасного питательного вещества гликоген в значительных количествах откладывается в печени и мышечной ткани. Он

имеет компактное строение, образует сферические глобулы, которые обуславливают его хорошую растворимость в воде с образованием маловязких коллоидных растворов. Молекулярный вес гликогена может варьировать в широких пределах от 400 тысяч до 4 миллионов. С йодом гликоген дает красно-фиолетовое окрашивание.

Гетерополисахариды: гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат.

Гепарин — низкомолекулярный смешанный полимер глюкозамина и глюкуроновой кислоты. Для него характерно наличие эфирно-связанной серной кислоты. Гепарин, присутствуя почти во всех тканях животного организма в небольших количествах, выполняет ответственные функции регулятора вязкости живой плазмы. В организме он образуется в базофилах, в тучных клетках соединительной ткани, в легких, в печени и мышцах. Он является одной из противосвертывающих систем крови, предотвращает образование тромбопластина, тромбина и фибрина. Поэтому применяется как стабилизатор при хранении крови и как лечебное средство в борьбе с тромбозами.

Гиалуроновая кислота — смешанный полимер, построенный из ацетилированного глюкозамина и глюкуроновой кислоты. Эта кислота дает очень вязкие растворы, имеет большой молекулярный вес. Она входит в состав соединительной ткани кожи, стенок капилляров, стекловидного тела и роговицы глаза. Богаты ею пупочные канатики, из которых ее легче, чем из других тканей получить в изолированном виде. Проницаемость тканей в

значительной мере зависит от степени полимерности присутствующей в них гиалуроновой кислоты.

Хондроитинсульфат – смешанный полимер, построенный из аминсахаров и глюкуроновой кислоты. Он участвует в построение соединительной и хрящевой тканях животных. Близкие к ним по строению вещества присутствуют в слезях животного и растительного происхождения.

Пектиновые вещества – комплексные полисахариды, весьма распространенные в растительном мире, входят в состав многих фруктов. Состоят из галактозы, арабинозы, метилированной галактуроновой кислоты. В присутствии сахара и кислоты пектины образуют желеобразные студни, что позволяет их широко использовать в кондитерской промышленности для приготовления желе, джема, пастилы, мармелада и т.д.

Практическое занятие 6.

Химические свойства углеводов

Лабораторная работа 1. Обнаружение лактозы и мальтозы.

Реактивы: концентрированный раствор аммиака, 1% раствор лактозы, 1% й раствор мальтозы, 20 % й раствор гидроксида калия.

Ход работы. В две пробирки, содержащие по 1 мл лактозы и мальтозы, добавляют по 0,5 мл раствора аммиака, 50 мкл гидроксида калия и нагревают на водяной бане до появления красно–коричневого цвета.

Лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде образуют окрашенное соединение.

Лабораторная работа 2. Обнаружение восстанавливающих сахаридов реакцией Троммера.

Реактивы: 1 % – й растворы глюкозы, мальтозы, сахарозы, крахмала, 10 % раствор гидроксид натрия, 5 % раствор сульфата меди.

Ход работы. Моносахариды и некоторые дисахариды, в молекулах которых есть карбонильная группа, в щелочной среде восстанавливают оксид меди (II) в оксид меди (I).

В 4 пронумерованные пробирки внести по 10 капель одного из углеводов: глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала. Добавить по 10 капель гидроксида натрия и по 2 капли сульфата меди, нагревают до кипения. В пробирках с мальтозой и глюкозой выпадает осадок оксида меди (I) кирпично–красного цвета.

Лабораторная работа 3. Обнаружение крахмала.

Реактивы: 1 % – й раствор крахмала, 1% раствор йода.

Ход работы. К 10 каплям раствора крахмала добавить 1 – 2 капли йода. Наблюдается ярко–синее окрашивание.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

Лабораторная работа 4. Обнаружение крахмала в продуктах питания.

Крахмал основной резервный углевод растений, представляет смесь двух полисахаридов, линейного (амилозы) и разветвленного (амилопектина), дает цветную реакцию с раствором йода в иодиде калия – окрашивается в темно–синий цвет. Крахмал белое аморфное вещество, не растворимое в холодной воде, выделяют из картофеля.

Реактивы: крахмал; картофель; отварной рис; мука; яблоко; лимон; растительное масло; раствор иода в иодистом калии (1 г иодистого калия растворяют в нескольких миллилитрах воды, в концентрированном растворе соли растворяют 1 г иода и разбавляют водой до 300 см³) или спиртовой раствор иода; дистиллированная вода.

Ход работы

Исследуемые твердые продукты (картофель, отварной рис, яблоко, лимон) по отдельности разотрите до кашецеобразного состояния в ступке.

В семь пронумерованных пробирок поместите по 0,5 – 1 г растертых продуктов.

Во все пробирки добавьте по 2 – 3 см³ дистиллированной воды и пробы тщательно перемешайте. Добавьте в пробирки по 1 – 2 капли раствора йода. Отметьте пробирки, в которых наблюдается синее окрашивание.

Оформите проведенные исследования в виде таблицы. Сделайте вывод о содержании крахмала в изученных продуктах.

№ пробирки	Исследуемый продукт	Наблюдаемая окраска	Содержание крахмала

Контрольные вопросы

1. Углеводы. Определение.
2. Классификация углеводов.
3. Моносахариды. Определение.
4. Открытые и закрытые формы рибозы глюкозы, фруктозы, галактозы. α - и β -изомеры.

5. Дисахариды. Определения. Строение, гликозидные связи.

6. Мальтоза, сахароза, лактоза.

7. Гомополисахариды. Крахмал, гликоген, клетчатка. Состав, строение.

8. Гетерополисахариды, синонимы. Состав мономеров, структурные единицы (димеры).

9. Кислые ГАГ: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, гепарин. Нейтральные: нейраминовая и сиаловые кислоты.

10. Функции углеводов в организме.

11. Углеводы крови, тканей.

12. Качественные реакции на наличие крахмала.

13. Проба Троммера.

Тема 7. Биохимия липидов (жиров)

К липидам относятся органические вещества, извлекаемые из тканей растительных и животных организмов органическими растворителями (эфир, хлороформ, бензол, ацетон, четырёххлористый углерод, который наиболее ядовит и др.). Эти вещества совсем не имеют или имеют мало гидрофильных групп (ОН, СООН, NH₂). И в то же время богаты гидрофобными группами (эфирные группы). Это и делает их нерастворимыми или плохо растворимыми в воде и хорошо растворимыми в неводных растворителях. В живом организме, именно в силу этих свойств, они часто играют роль второй, неводной фазы в тонком строении тканей и клеток организма. Липиды имеют важное биологическое значение. Они способны аккумулировать энергию, защищать от ушибов

мягкие ткани. Они входят в состав клеточных мембран и нервной ткани. До сих пор не существует четкой классификации липидов. Одна из наиболее употребляемых классификаций делит их на нейтральные жиры и липоиды.

Липиды бывают: простые и сложные. Простые – жиры и воски. Жиры – это триглицериды и др. нейтральные жиры. Сложные – это фосфолипиды, липопротеиды, гликопротеиды, стероиды, холестерин. Фосфолипиды – глицерофосфолипиды и сфинголипиды. Гликопротеиды – это цереброзиды, сульфатиды, ганглиозиды. Глицерофосфолипиды – фосфотидилхолины, фосфотидилэтаноламины, фосфотидилсерин, фосфотидилглиозиды, плазмалогены.

Нейтральные жиры относятся к простым липидам и находятся в организме в форме протоплазматического жира или запасного (резервного) жира. Нейтральные жиры являются сложными эфирами трёхатомного спирта, глицерина и высших жирных кислот. Свойства этих соединений определяются свойствами жирных кислот входящих в состав жиров. Жирные кислоты триглицеридов могут быть насыщенными и ненасыщенными. Наиболее важными жирными кислотами, чаще входящими в состав жиров являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая аминокислоты. Из этих кислот первые две имеют полностью насыщенные связи. Поэтому жиры, содержащие в своей основе пальмитиновую, стеариновую кислоты будут иметь высокую температуру плавления.

Животные жиры, обычно содержат насыщенные жирные кислоты, поэтому при комнатной температуре они твердые (например, в сале в большом количестве присутствуют

пальметиновая и стеариновая кислоты). Кроме того, жирные кислоты могут иметь двойные связи, тройные связи и сопряженные двойные связи. Наличие таких связей существенно влияет на физико-химические свойства жиров. Чем больше двойных связей будут иметь жирные кислоты, тем ниже будет температура плавления жиров. Жиры, в состав которых входят, ненасыщенные кислоты, при комнатной температуре жидкие (растительное масло содержит в своем составе большое количество олеиновой кислоты).

Воски – это сложные эфиры жирных кислот и 12 атомных спиртов. Воски могут входить в состав жира, покрывающего кожу, шерсть, перья. Наиболее распространены карнаубский и льняной воски, выделенные из растений, ланолин и пчелиный воск – животного происхождения. Воски в химическом отношении сравнительно инертные вещества, мало изменяются при хранении. Покрытие из воска не пропускает влаги. Многие растения образуют восковые налеты на листья, плодах для предохранения их от потери влаги, защиты от инфекций. Воски находят широкое применение в медицине, парфюмерии и технике.

Сложные липиды делятся на несколько классов.

Глицерофосфолипиды – содержатся в печени, головном мозге, легких. Сфинголипиды - эти соединения имеют сложную структуру и входят в состав мембран клеток нервной ткани, ткани печени, почек.

Цереброзиды входят в состав головного мозга, в большом количестве содержатся в миелиновых оболочках. Характеризуется присутствием в молекуле сахара

галактозы, ненасыщенного аминоспирта- сфингозина и высшей жирной кислоты. Цереброзиды благодаря наличию гидратированной молекулы сахара, обладают гидрофобными и гидрофильными свойствами.

Ганглиозиды находятся преимущественно в сером веществе мозга и сосредоточены в глиальных клетках.

Липопротеиды – в их составе переносится жир в крови.

Стероиды – входят в состав мужских и женских половых гормонов, провитамина D, солей желчных кислот, холестерина.

Холестерин содержится во всех тканях животного организма. Его много в мозговом веществе, стенках сосудов, в крови. Он выводит яды из организма, входит в состав нервной ткани. Из него образуются стероидные гормоны, желчные кислоты, витамин D. Холестерин не растворим в воде, но легко в ней набухает и дает эмульсии. При разбавлении водой спиртовых растворов он может быть получен в кристаллическом виде.

Практическое занятие 7.

Химические свойства липидов

Лабораторная работа 1. Физико–химические свойства жиров

Реактивы: растительное масло; твердый жир; яблоко; картофель; гексан (бензин); этиловый спирт; ацетон; 2 % раствор карбоната натрия; 2 % раствор мыла; дистиллированная вода.

Ход работы:

Задание 1. Образование масляного пятна.

Каплю растительного масла нанесите на кусочек бумаги. Образуется пятно. Кусочек свиного сала, яблока, картофеля раздавите на кусочке бумаги с образованием пятна. Нагрейте бумагу с пятнами на слабо нагретой плитке. Пятно, образованное жиром, не исчезает при нагревании.

Задание 2. Растворимость жиров.

Поставьте два ряда пробирок по 4 в каждом. В пробирки первого ряда внесите по 3 капли растительного масла, в пробирки второго ряда – по кусочку твердого жира. В первую пробирку каждого ряда прилейте 2 мл дистиллированной воды, во вторую – столько же гексана или бензина; в третью – ацетона и в четвертую – спирта.

Все пробирки взболтайте и наблюдайте за растворимостью жиров в различных растворителях. Пробирки со спиртом рекомендуется нагреть на водяной бане.

Задание 3. Эмульгирование жирных масел.

В три пробирки внесите по 5 капель растительного масла.

В первую пробирку добавьте 2 мл дистиллированной воды, во вторую – 2 мл 2 %-го раствора карбоната натрия, в третью – столько же 2 %-го раствора мыла.

Содержимое пробирок сильно взболтайте. В первой пробирке образуется неустойчивая эмульсия масла в воде, в остальных – устойчивая эмульсия благодаря действию эмульгаторов, которые, адсорбируясь на поверхности жировых капель, придают им одинаковый заряд и снижают поверхностное натяжение.

Оформите результаты проведенных исследований в виде таблицы.

№	Краткое	Наблюдаемое	Вывод
---	---------	-------------	-------

задания	описание опыта	явление	

Лабораторная работа 2. Проба на омыление.

Реактивы: пробы, исследуемые на наличие жира; спиртовой раствор NaOH или KOH 20 %.

Ход анализа. Нагревают 2–3 капли испытуемого вещества в пробирке с 5мл. раствора спиртовой щелочи. После удаления спирта нагреванием в пробирку приливают дистиллированную воду. Образовавшееся мыло легко растворяется в воде, а мыльный раствор при встряхивании дает пену:

Лабораторная работа 3. Обнаружение лецитина в желтке куриного яйца.

Лецитины относятся к группе фосфолипидов, не растворяются в воде и ацетоне, но хорошо растворяются в спирте, хлороформе, эфире. При добавлении к раствору лецитинов ацетона, последние легко осаждаются.

Реактивы: ацетон, спиртовой раствор лецитина (к 1/2 желтка куриного яйца приливают 40 мл горячего спирта помешивая палочкой. Раствор охлаждают и фильтруют. Реактив готовят перед употреблением.).

Ход работы. В сухую пробирку приливают 10 капель ацетона и по каплям добавляют спиртовой раствор лецитина. Отмечают наблюдения.

В сухую пробирку приливают 20 капель спиртового раствора лецитина и по каплям добавляют

дистиллированную воду до образования устойчивой эмульсии.

Контрольные вопросы

1. Определение липидов.
2. Классификация липидов.
3. Функции липидов в организме.
4. Физико-химические свойства липидов.
5. Липиды тканей и пищи. Суточная потребность.
6. Высшие жирные кислоты. Классификация. Строение. Биологическая роль.
7. Простые липиды - ацилглицерины. Животные жиры и растительные масла.
8. Строение и биологическая роль животных и растительных жиров.
9. Жировые константы. Воска.
10. Сложные липиды - глицерофосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды. Строение и биологическая роль. Представители.
11. Стероиды. Строение и биологическая роль холестерина.
12. Эфиры холестерина. Желчные кислоты, свободные и парные.

Тема 8. Биохимия витаминов

К витаминам относят низкомолекулярные органические вещества, обладающие высокой биологической активностью. В основном эти вещества должны поступать с пищей в организм. Наибольшая часть витаминов может синтезировать в организме человека и животных. Обычно

это происходит с помощью сапрофитной микрофлоры. Считают, что впервые витамины были открыты русским учёным Луниным. Он проводил опыты на мышах, которым давал необходимое количество очищенных белков, жиров, углеводов. У таких животных наблюдалось отставание в росте, различные нарушения и затем гибель. После того, когда опытной группе животных в рацион добавили молоко, то они стали нормально развиваться. Был сделан вывод, что кроме белков, жиров, углеводов организм должен получать какие-то вещества, которые являются жизненно необходимыми. Последующие исследования учёных подтвердили это предположение. Польским учёным Функом из растительных продуктов было выделено кристаллическое вещество, обладающее биологическими свойствами. Этот учёный впервые назвал это вещество витамином. Это название в дальнейшем присвоили целой группе биологически активных веществ.

Классификация витаминов

По отношению к растворителям витамины делят на две большие группы:

- водорастворимые
- жирорастворимые

Каждому витамину присвоена заглавная буква латинского алфавита. Кроме того, витамины имеют названия в зависимости от того заболевания, которое они предотвращают. Например, витамин Д носит название – антирахитический, витамин В₁ – антиневритный, витамин В₁₂ – антианемический.

Жирорастворимые витамины

Витамин А – ретинол (антиксерофтальмический). Он является одним из важнейших жирорастворимых витаминов, играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, относится к витаминам роста, активно влияет на иммунитет. Высоким содержанием витамина А отличается печень рыб и морских животных, рыбий жир, желток яиц, сливочное масло. В растительных продуктах этот витамин находится в виде каротина, который представляет собой структуру, состоящую из двух молекул витамина А. Недостаточность витамина А влияет на рост и развитие животных, иммунитет, продуктивность, а длительный авитаминоз этого витамина вызывает поражение органов зрения. Возникает заболевание ксерофтальмия, при котором нарушается функция зрения и в итоге возможно разрушение глазного яблока. В начальных стадиях заболевания животное плохо видит в темноте, этот симптом носит название «Куриная слепота». Недостаток витамина А можно ликвидировать, вводя в рационы животных источники богатые этим витамином (корнеплоды, препараты витамина А). Активность этого витамина выражается в международных единицах (ИЕ).

Витамин D - кальциферол (антирахитический). Высокое содержание витамина D отмечается в печени рыб и морских животных, а так же в яичном желтке и сливочном масле. Установлено, что этот витамин регулирует фосфорно-кальциевый обмен. Недостаточность этого витамина приводит к заболеванию животного рахитом. При этом истощаются кости скелета, падает содержание кальция и фосфора в костях. Существует несколько форм витамина D, наиболее активными являются D₂ и D₃. Этот витамин может

образовываться под действием ультрафиолетовых лучей, ланостерина, холестерина и других стероидов. Многие животные удовлетворяют потребность в этом витамине, слизывая летом с шерсти витамин D образовавшийся под действием ультрафиолетовых лучей. Недостаток витамина D можно компенсировать с помощью препаратов этого витамина, дополнительно вводимых в рацион. Передозировка может вызвать тяжелые последствия для организма, не менее серьезное, чем его недостаточность.

Витамин E – токоферол (антиоксидантный). Играет существенную роль в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в организме животного. Этот витамин содержится во многих пищевых продуктах. Однако фармакологические препараты этого витамина используются в качестве профилактики радиационных поражений. Кроме того, этот витамин используется в качестве добавки в продукты, для предотвращения их окисления. Много этого витамина содержится в растительных маслах. Недостаточность этого витамина приводит к бесплодию.

Витамин K – нафтохинон (антигеморрагический). В животноводстве этот витамин применяется при промышленном выращивании птицы, так как отсутствие этого витамина в кормах приводит у птиц к кровоизлияниям в мышечную ткань. Много этого витамина содержится в люцерне. Существует несколько химических аналогов этого витамина.

Витамин F (комплекс жирных ненасыщенных кислот, антихолестериновый). К таким кислотам относятся кислоты, содержащие в своем составе двойные

сопряженные и тройные связи. Наиболее известные жирные кислоты: линолевая, линоленовая, арахидоновая. Используются в организме животных для синтеза гормональных препаратов простагландинов. Эти гормоны оказывают влияние на тонус гладкой мускулатуры и сосудов.

Водорастворимые витамины

Витамины группы В

Витамин В₁ – тиамин (антиневритный). Высоким содержанием этого витамина отличаются оболочки злаковых культур (отруби), хлебные дрожжи, мясо, печень. Он играет важную роль в обмене углеводов. Недостаточность этого витамина приводит к заболеваниям нервной системы.

Витамин В₂ - рибофлавин (антидерматитный). Входит в состав окислительно-восстановительных ферментов, содержащихся в митохондриях, поэтому участвует во всех окислительно-восстановительных процессах в организме. Высоким содержанием этого витамина, как и витамина В₁ отличаются отруби, пивные дрожжи, печень и т.д.

Витамин В₃ - пантотеновая кислота (антидерматитный). Этот витамин участвует в обмене углеводов и липидов. В большом количестве содержится в дрожжах, пшеничных, рисовых отрубях, горохе, почках, печени, цветочной пыльце и зернах злаковых культур. Недостаток приводит к нарушению эпителиальных тканей и кожных покровов, выпадению шерсти.

Витамин РР, В₅ никотинамид (антипеллагрический). Играет большую роль в окислительно-восстановительных

процессах, обмене углеводов и белков. Большое влияние никотиновая кислота оказывает на тонус сосудов.

Витамин В₆ пиридоксин (адермин). Принимает активное участие в обмене белков, он необходим для синтеза белков в печени. Оказывает влияние на регенерацию эпителия роговицы глаза. Участвует в образовании соединительной ткани и форменных элементов крови.

Витамин В₁₂ – цианокобаламин (антианемический). В состав этого витамина входит кобальт, поэтому этот микроэлемент часто добавляют в рацион животных для улучшения синтеза витамина В₁₂. У жвачных витамин синтезируется микрофлорой преджелудков.

Витамин С - аскорбиновая кислота (антицинготный). Участвует в окислительно-восстановительных процессах. Недостаточность его вызывает заболевание цингу. У животных этот витамин синтезируется в печени. В отдельные периоды жизни животным необходимо вводить витамин С в рацион.

Практическое занятие 8.

Качественные реакции на витамины

Лабораторная работа 1. Реакция окисления тиамин.

В щелочной среде тиамин окисляется железосинеродистым калием (феррицианидом калия) с образованием окрашенного в желтый цвет тиохрома. Тиохром обладает синей флуоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора в флуороскопе, и это свойство используется при количественном определении тиамина.

Реактивы: 5% раствор тиамин, 10% раствор гидроксида натрия, раствор железосинеродистого калия.

Ход работы: 1 каплю 5%-го раствора тиамин смешивают в пробирке с 5-10 каплями 10%-го раствора гидроксида натрия и затем добавляют 1-2 капли раствора железосинеродистого калия. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие окисления тиамин в тиохром.

Лабораторная работа 2. Реакция восстановления витамина В₂ (рибофлавина).

Реактивы: раствор рибофлавина, концентрированная соляная кислота, металлический цинк.

Ход работы: В пробирку наливают 10 капель раствора рибофлавина, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Наблюдают бурное выделение пузырьков водорода и изменение окраски жидкости.

Лабораторная работа 3. Реакции на витамин РР (никотиновую кислоту, никотинамид).

При нагревании никотиновой кислоты с раствором уксуснокислой меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли витамина РР.

Реактивы: никотиновая кислота, 10% раствор уксусной кислоты, 5%-го раствор ацетата меди.

Ход работы: 5-10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10-20 каплях 10%-го раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5%-го раствора ацетата меди. Жидкость

становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок никотината меди.

Лабораторная работа 4. Феррохлоридная проба на витамин В₆.

Реактивы: 1% раствор витамина В₆, 1%-го раствора хлорида железа

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора витамина В₆, добавляют 2 капли 1%-го раствора хлорида железа и содержимое встряхивают. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Лабораторная работа 5. Качественные реакции на витамины группы Р (биофлавоноиды).

Реактивы: насыщенного водного раствора рутина, 1% раствор хлорида железа, концентрированная серная кислота.

Ход работы: 1) К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют 3-5 капель 1%-го раствора хлорида железа (FeCl₃). Появляется зеленое окрашивание.

2) К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки добавляют 0,5-1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

Лабораторная работа 6. Реакция восстановления феррицианида калия с витамином С.

Реактивы: 1% раствор витамина С, дистиллированная вода, 10% раствор гидроксида калия, 5% раствор

железосинеродистого калия, 10% раствор соляной кислоты, 1%-го раствора хлорида железа.

Ход работы: В одну пробирку (опыт) вносят 5 капель 1%-го раствора витамина С, а в другую (контроль) 5 капель дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 1 капле 10%-го раствора гидроксида калия и 1 капле 5%-го раствора железосинеродистого калия, перемешивают, после чего добавляют по 3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и 1 капле 1%-го раствора хлорида железа. В опытной пробирке выпадает темно-синий осадок берлинской лазури, который при осторожном насаивании воды становится более отчетливым.

Лабораторная работа 6. Реакция восстановления метиленовой сини витамином С.

Реактивы: раствор Люголя, дистиллированная вода, 1% раствор аскорбиновой кислоты,

Ход работы. В две пробирки (опыт и контроль) наливают по 10 капель дистиллированной воды и 2 капли раствора Люголя. В опытную пробирку добавляют 5-10 капель 1%-го раствора аскорбиновой кислоты, в контрольную – столько же дистиллированной воды. В опытной пробирке раствор обесцвечивается.

Лабораторная работа 7. Реакция на витамин Е

Реактивы: раствор токоферола, концентрированная азотная кислота

Ход работы: В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1%-го спиртового раствора токоферола и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое

пробирки встряхивают, появляется красное окрашивание. Если образовавшуюся окрашенную эмульсию поместить в водяную баню при 70 °С она расслаивается, при этом верхний масляный слой имеет красный цвет.

Лабораторная работа 8. Реакция токоферола с хлоридом железа (III).

Реактивы: 0,1% спиртовой раствор токоферола, 1% раствор хлорного железа.

Ход работы. 4-5 капель 0,1%-го спиртового раствора токоферола смешивают с 0,5 мл 1%-го раствора хлорного железа. Смесь тщательно перемешивают и наблюдают появление красного окрашивания.

Контрольные вопросы

1. Витамины. Определение. Характеристика.
2. Понятие об авитаминозах, гипо и гипervитаминозах.
3. Витамины группы Д.
4. Витамин А. Характеристика и значение для организма.
5. Витамин Е, характеристика и значение для организма.
6. Витамин F, связь с простогланидами.
7. Витамин А. Характеристика и значение для организма.
8. Витамин К. Характеристика и значение для организма.
9. Витамин РР и его роль в ферментативных процессах.
10. Витамин В₁ и его связь с ферментативными процессами.

11. Витамин В₆, его характеристика и связь с ферментативными процессами.
12. Витамин В₂, его связь с ферментами.
13. Витамин В₁₂.
14. Витамин С.
15. Фолиевая кислота.
16. Пантотеновая кислота.

Тема 9. Обмен веществ. Белковый обмен

Общие понятия и основные этапы обмена веществ

В процессе жизнедеятельности в живом организме постоянно происходит распад и синтез органических веществ. Ежедневно в организм поступает большое количество питательных веществ, которые, расщепляясь, дают организму животного энергию и строительный материал. Часть веществ выводится из организма в неизмененном виде. Обмен веществ условно делят на три этапа.

Начальный обмен

Промежуточный обмен

Конечный обмен

На первом этапе обмена происходит механическое измельчение пищи, образование пищевого кома и расщепление питательных веществ в желудочно-кишечном тракте. На втором этапе происходит превращение питательных веществ в клетках и тканях животного организма. На этом этапе происходит образование энергии из пищевых продуктов, а также синтез веществ и структур характерных для данного вида животного. Конечный обмен связан с выделением продуктов распада и не переваренных

остатков пищи. Эти продукты выделяются с выдыхаемым воздухом, потом, калом и мочой.

Методы изучения обмена веществ

Существуют методы изучения обмена веществ, которые позволяют судить о характере физиологических и биохимических процессов, протекающих в организме животного. Наиболее известные из них:

Метод балансовых опытов. В этих исследованиях изучают количество потребленных и выделенных питательных веществ и на основании этого делают выводы о состоянии обмена веществ у животного.

Метод дыхательного коэффициента. В этом случае изучают количество поглощенного кислорода и выделенного углекислого газа.

Морфологические методы. Эти методы позволяют изучить структуру и состояние клеток отдельных тканей.

Метод электронной микроскопии. Он позволяет изучить состояние структурных элементов клетки (ядра, митохондрий, рибосом и т.д.)

Радиоизотопные методы. Суть их заключается в том, что в организм животного вводится радиоактивный элемент, например, углерод. По интенсивности излучения в отдельных органах и тканях судят о характере обмена веществ.

Обмен белков

1. Обмен белков изучают с помощью метода азотного баланса, при этом учитывают, что в 100 гр. белка находится 16% азота. Проводя азотистый баланс, учитывают поступающий азот с кормом и выделяющийся с калом, мочой и потом.

Отрицательный азотистый баланс – это когда выводится азота больше, чем поступает (свидетельствует о превалировании катаболистического процесса).

Положительный азотистый баланс – это когда азота выводится меньше, чем поступают (преимущество анаболистического процесса).

Азотистое равновесие – это когда количество поступившего азота соответствует выделенному азоту (анаболистический и катаболистический процессы в равновесии).

Количество белка необходимое для поддержания азотистого равновесия – называют белковым минимумом.

Белковый минимум, превышающий количество белка, которое выводится из организма в покое и без белкового питания – называется коэффициентом белкового изнашивания.

2. Превращение белков в желудочно-кишечном тракте животных.

В ротовой полости животных происходит механическое измельчение кормов, образование пищевого кома, который пропитывается слюной. С белками в ротовой полости ничего не происходит. Затем белок с кормовыми массами попадает в желудок у моногастричных животных (однокамерный желудок) и в первый преджелудок (рубец) у жвачных животных (всего у них три преджелудка: рубец, книжка, сетка).

В рубце у жвачных белки расщепляются за счет протеолитических ферментов, которые синтезируются микробами и простейшими, заселяющими этот отдел желудка. Аминокислоты, которые при этом образуются в

первую очередь, используются микробами и простейшими. Микробы отмирают и попадают в сычуг (истинный желудок), где расщепляются ферментами, находящимися в нем до пептидов и аминокислот, которые попадают в тонкий кишечник и всасываются в кровь животного.

У животных с однокамерным желудком белки с кормом попадают в желудок, где на них действует фермент пепсин, который расщепляет белок до пептонов. Пептоны – это фрагменты молекул белков, состоящие из десятков аминокислот. Далее пептоны попадают в 12-перстную кишку, где на них воздействует фермент трипсин. Этот фермент вырабатывается в поджелудочной железе, в виде неактивного трипсиногена. В 12-перстной кишке трипсиноген активизируется ферментом энтерокиназой и превращается в активный трипсин. Он в свою очередь расщепляет пептоны до пептидов, которые поступают в тонкий кишечник. На пептиды в тонком кишечнике действуют ферменты пептидазы, которые расщепляют пептиды до аминокислот. Аминокислоты всасываются через стенку тонкого кишечника в кровь животного.

При поступлении аминокислот в кровь, а затем в печень с ними происходят определенные превращения. Часть аминокислот используется для построения новых аминокислот необходимых организму. Из данных аминокислот синтезируются необходимые для организма белки. Излишек аминокислот превращается в жир и гликоген. Часть аминокислот служит для образования энергии. При этом окислении аминокислот образуется вода, углекислый газ и аммиак.

Аммиак, образовавшийся в клетках и тканях, является очень ядовитым веществом для организма. Он обезвреживается в печени, в цикле Кребса, с образованием безвредного соединения мочевины и выводится с мочой. В этом процессе принимают участие аминокислоты: орнитин, цитруллин, аргинин. У рептилий и птиц из аммиака образуется мочева кислота. У жвачных животных большая часть мочевины поступает из печени в кровь, слюну и затем в рубец. Из мочевины в рубце используется микрофлорой аминокислота для построения белка. Те белки и аминокислоты, которые не усвоились и, попали в толстый кишечник, могут подвергаться в нем гниению с образованием вредных продуктов таких как: фенол, индол, скатол, кадаверин. Эти продукты могут всосаться в кровь животного и вызвать интоксикацию организма. В печени животных и человека существуют системы, способные обезвреживать эти ядовитые продукты. В процессе обезвреживания образуются безвредные соединения, которые почками выводятся из организма.

Биосинтез белка в клетках и тканях животного

Аминокислоты, всосавшиеся в кровь, используются для синтеза белка. Этот процесс является много стадийным и протекает на рибосомах клетки. На первой стадии процесса образуется информационная РНК, которая образуется в ядре клетки и поступает на рибосомы. Важную роль в биосинтезе белка играет транспортная РНК, которая доставляет аминокислоты к месту синтеза белка. Каждой аминокислоте соответствует своя транспортная РНК. На рибосомах синтезируется белок, имеющий трехмерную

структуру. Он может поступать как для нужд клетки, так и для внешнего потребления.

Катаболизм (расщепление аминокислот в тканях и клетках)

У взрослых животных в среднем около 400 гр белка ежедневно распадается и восстанавливается. Белки имеют продолжительность жизни примерно 10 дней, белки плазмы крови живут примерно 18 дней. Они постепенно заменяются. В тканях и клетках содержатся особые белки ферменты – катепсины. Они делятся на: катепсин А – по механизму действия аналогичен пепсину (фермент желудочного сока), катепсин В – аналогичен действию трипсина и химотрипсина (ферменты сока поджелудочной железы), катепсин С – аналогичен карбокси- и амилопептидазам (ферменты сока поджелудочной железы), катепсин D – аналогичен дипептидазам (то же самое).

Промежуточный обмен белков

Известен ряд превращений общий почти для всех аминокислот. К этим превращениям относятся реакции: дезаминирования, декарбоксилирования, трансаминирования.

Дезаминирование – это отщепление аминогруппы от аминокислоты с образованием кетокислот и аммиака. Способы дезаминирования: восстановительное и гидролитическое. Они характерны для большинства бактерий, населяющих преджелудки жвачных и толстый отдел кишечника других видов животных. Внутримолекулярное дезаминирование свойственно некоторым растениям и бактериям, а в живом организме для аминокислоты – гистидин.

Декарбоксилирование – это отщепление карбоксильной группы от аминокислоты с образованием биологически активных аминов. В живых тканях с высокой скоростью протекает реакция декарбоксилирования, с образованием гистамина. При различных патологических состояниях выделяется большое количество гистидина, который превращается в гистамин. Гистамин обладает широким спектром биологического действия (понижает артериальное давление, повышает проницаемость капилляров, понижает уровень сахара в крови). Гистамину приписывается роль медиатора боли. Болевой синдром является сложным процессом, в котором доказано участие гистамина. Аминокислота тирозин декарбоксилируется до тирамина. Тирамин в большом количестве содержится в почках. При дальнейшем метаболизме из тирамина синтезируются гормоны – тироксин, адренолин, норадренолин.

Трансаминирование – под трансаминированием понимают реакции межмолекулярного переноса аминогруппы (NH_2) от аминокислоты на кетокислоту с образованием другой аминокислоты. Эта реакция необходима для синтеза заменимых аминокислот. Кроме того, трансаминирование необходимо для активности фермента глутаматдегидрогеназы, в результате действия которой в тканях накапливается α -кетоглutarовая кислота, которая необходима для цикла трикарбоновых кислот и служит субстратом для трансаминирования с другими аминокислотами.

Регуляция и нарушения белкового обмена

Обмен белков регулируется нейроэндокринной системой. Центр регуляции находится в гипоталамусе

промежуточного мозга. В регуляции обмена белков большую роль играет кора больших полушарий. Из гормонов большое влияние на обмен белков оказывают гормоны гипофиза (гормон роста), щитовидной железы (тироксин), коркового слоя надпочечников (глюкокортикоиды), мозгового слоя (адреналин), половые гормоны. Нарушение белкового обмена может возникнуть при несбалансированном кормлении животных, при инфекционных и других заболеваниях. Очень важно, чтобы в рацион животных поступал биологически полноценный белок.

Практическое занятие 9.

Обнаружение продуктов белкового обмена в моче

Лабораторная работа 1. Обнаружение белка в моче.

Проба с сульфосалициловой кислотой.

Реактивы: моча, 20% раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход работы: В пробирку вносят 3-4 мл профильтрованной мочи и 5-6 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Появление хлопьев или помутнения в пробе указывают на наличие белка (положительная проба). Чувствительность пробы 0,015 г/л.

Лабораторная работа 2. Кольцевая проба Геллера

Реактивы: Азотистая кислота концентрированная, или реактив Ларионовой (насыщенный раствор хлорида натрия: 20-30 г соли растворяют в 100 мл воды при подогревании, дают отстояться до охлаждения; надосадочную жидкость сливают, фильтруют; к 99 мл фильтрата прибавляют 1 мл

крепкой азотной кислоты; вместо азотной кислоты можно добавить 2 мл концентрированной соляной кислоты).

Ход работы: В пробирку наливают 1-1,5 мл азотной кислоты или реактив Ларионовой и пипеткой осторожно по стенке пробирки наслаивают мочу, стараясь не взбалтывать жидкость в пробирке. При наличии белка на границе двух жидкостей появляется белое кольцо. Беловатые кольца, появляющиеся выше границы наслоения, образуются за счет выпадения солей. Эти кольца исчезают при осторожном подогревании.

Проба с реактивом Ларионовой имеет ряд преимуществ: на границе наслоения не бывает пигментных колец, которые часто образуются при наслаивании мочи на азотную кислоту и мешают распознаванию белкового кольца; кольца получаются более четкие, чем с азотной кислотой; экономится азотная кислота; реактив более удобен в работе, попадая на ткань, не прожигает ее.

Лабораторная работа 3. Обнаружение билирубина.

Проба Розина

Реактивы: Люголевский раствор (1 г йода, 2 г йодида калия и 300 мл дистиллированной воды) или 1% спиртовой раствор йода.

Ход работы: В пробирку наливают 4-5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца свидетельствует о наличии билирубина.

Контрольные вопросы

1. Переваривание белков в желудке. Роль соляной кислоты.
2. Переваривание белков в тонком кишечнике. Всасывание аминокислот.
3. Судьба всосавшихся аминокислот. Транспорт аминокислот в клетки, роль гаммаглутамилтранспептидазы.
4. Синтез белков плазмы крови. Функции белков плазмы крови.
5. Превращения аминокислот в тканях. Общие специфические пути.
6. Переаминирование. Трансаминазы.
7. Интегральная роль реакций трансаминирования в обмене веществ. АЛТ и АСТ - органоспецифичные ферменты, диагностическое значение определения активности трансаминаз в сыворотке крови.
8. Дезаминирование аминокислот, виды. Окислительное дезаминирование, роль глутаматдегидрогеназы. Непрямое дезаминирование.
9. Образование и пути обезвреживания аммиака в организме. Образование амидов дикарбоновых кислот.
10. Синтез мочевины в печени (орнитиновый цикл Кребса) - главный путь обезвреживания аммиака.
11. Декарбоксилирование аминокислот. Биогенные амины: гистамин, серотонин, гаммааминомасляная кислота, катехоламины. Биологическая роль. Обезвреживание биогенных аминов, моноаминооксидаза.

Тема 10. Обмен углеводов

Биологическое значение углеводов

Животные с кормом употребляют до 70% от общего количества корма углеводов. В кормах углеводы представлены крахмалом, клетчаткой, целлюлозой, а также моно- и дисахаридами. Основная роль углеводов – энергетическая, однако многие структуры в своем составе содержат углеводы. В этих структурах углеводы выполняют не только механическую роль, но и активно участвуют в обмене веществ. В крови животных постоянно поддерживается определенная концентрация углеводов. В плазме крови животных основным углевод представлен глюкозой, а в эритроцитах в основном содержится фруктоза и пентоза. Содержание углеводов в крови имеет важное физиологическое значение. Уровень глюкозы регулируется нейроэндокринной системой. Процесс возбуждения в нервной системе увеличивает содержание углеводов в крови. Такие гормоны как норадренолин, глюкагон, кортикостерон – увеличивают содержание углеводов в крови. У животных среднее содержание углеводов в крови 5,0-5,5 мкм/л. Наиболее интенсивно снижает уровень углеводов в крови гормон поджелудочной железы – инсулин. Благодаря инсулину избыточное количество глюкозы используется для синтеза полисахарида – гликогена, который откладывается в печени и мышцах. Гликоген является запасным питательным веществом. Запасов гликогена в печени может хватить в среднем животному на 12 часов. Гормональные нарушения могут вызывать повышение уровня углеводов в крови животных, что приводит к заболеванию «сахарный диабет». Но у

животных это заболевание встречается значительно реже, чем у человека.

Механизм анаэробного расщепления углеводов.

Углеводы, в организме животных расщепляясь, дают энергию в виде тепла и АТФ. Эволюционно в организме животных сложилось несколько путей окисления углеводов. Этот процесс может происходить как с участием кислорода, так и без него. Процесс без кислородного окисления углеводов носит название – анаэробное окисление углеводов (гликолиз). Он представляет собой многоступенчатый процесс, на каждой стадии которого принимает участие фермент, или комплексная ферментная система. В результате гликолиза при окислении одной молекулы глюкозы образуется молочная кислота и две молекулы АТФ. Анаэробное окисление происходит почти во всех тканях организма (мышцы, головной мозг, печень). Значение гликолиза – это основной процесс снабжения тканей энергией в анаэробных условиях. При активной мышечной работе энергии гликолиза хватает на первые две минуты работы.

Механизм аэробного окисления углеводов.

Наибольший вклад в энергетику организма вносит аэробное окисление углеводов. В этом процессе при окислении одной молекулы глюкозы образуется до 28 молекул АТФ. Процесс аэробного окисления углеводов на начальных этапах совпадает с анаэробным окислением углеводов, а расхождение начинается на стадии образования пировиноградной кислоты. В этом процессе принимает участие витамин В₁. В итоге из пировиноградной кислоты образуется вещество, которое называется -

ацетилкоэнзим $\text{CH}_3\text{-CO-S-KoA}$. Это соединение вступает в реакцию конденсации с щавелево-уксусной кислотой. В результате образуется лимонная кислота. С лимонной кислоты начинается путь окисления углеводов – лимоннокислый цикл, или цикл Кребса. В этом цикле происходит основное окисление углеводов. Сам этот процесс локализован в структуре клеток - митохондриях. Они являются основной энергетической станцией клетки. Аэробное окисление углеводов интенсивно протекает в ЦНС, печени, почках, сердечной мышце. Это основной путь окисления углеводов.

Пентозофосфатный путь окисления углеводов.

В организме животных существует окисление углеводов, протекающее по пентозофосфатному пути. Этот вид обмена интенсивно протекает в эритроцитах, в жировой ткани, а также в печени, в почках и некоторых других тканях. Пентозный цикл не имеет никакого энергетического значения. Особенностью этого пути окисления углеводов является то, что здесь образуются пентозы (рибоза, дезоксирибоза), которые используются для синтеза нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты на 40% состоят из углеводов. Пентозный цикл имеет большое пластическое значение. Активность его максимальна в молодом растущем организме. Во взрослом организме процессы пентозного цикла затухают.

Расщепление углеводов в желудочно-кишечном тракте.

Через кишечную стенку в кровь без предварительного расщепления всасываются только простые, хорошо растворимые в воде сахара (моносахариды).

Сложные углеводы (полисахариды) подвергаются химическим превращениям в полости рта, потому что в слюне содержатся ферменты, расщепляющие углеводы. Например, амилаза способна расщеплять крахмал до мальтозы. Этот фермент наиболее активен у свиней, а у крупного рогатого скота его активность в 100 раз ниже. В желудке действие амилазы слюны прекращается, так как желудочно-кишечный сок имеет резко-кислую реакцию среды. Превращения углеводов у разных видов животных имеют большие отличия. У жвачных животных углеводы (клетчатка, крахмал, целлюлоза) основные превращения претерпевают в рубце (самом большом отделе преджелудков). Под влиянием микробов и простейших организмов углеводы расщепляются до летучих жирных кислот (уксусная, масляная, пропионовая, капроновая). Затем эти ЛЖК всасываются в кровь животного и используются как источник энергии. Более половины энергии дают именно эти кислоты.

У животных с однокамерным желудком наиболее важная фаза расщепления крахмала протекает в двенадцатиперстной кишке, под действием амилазы панкреатического (поджелудочного) сока. В состав кишечного сока входят такие ферменты, как мальтаза, сахараза, лактаза расщепляющие соответствующие углеводы. Например, мальтаза расщепляет мальтозу на две молекулы глюкозы. Сахараза расщепляется сахарозой до глюкозы и фруктозы и т.д. В результате последнего воздействия перечисленных ферментов углеводы корма превращаются в моносахариды (простые сахара). Эти простые сахара (преимущественно глюкоза, фруктоза,

галактоза) всасываются кишечной стенкой. Всасывание углеводов, так же как других веществ, в том числе и различных минеральных солей, надо рассматривать как физиологический процесс, требующий затрат энергии. Слизистая тонкого кишечника имеет исключительно активный обмен веществ, превосходящий по своей интенсивности метаболизм в почках и печени. Во время всасывания некоторая часть моносахаридов, например фруктоза и галактоза, превращаются в глюкозу.

Практическое занятие 10.

Определение глюкозы в биологических жидкостях

Лабораторная работа 1. Обнаружение и определение глюкозы в моче. Проба Гайнеса.

Реактивы: а) 13,3 г меди сульфата ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 400 мл дистиллированной воды; б) 50 г натрия (калия) гидроксида растворяют в 400 мл дистиллированной воды; в) 15 г глицерина растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Растворы «а» и «б» смешивают и добавляют раствор «в». Реактив длительно сохраняется в холодильнике.

Ход работы: К 6-8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки – контроль. При наличии глюкозы в верхней части пробирки в моче появляется желтая окраска.

В моче здоровых животных концентрация глюкозы ничтожно мала и обнаружить или определить ее невозможно. Повышение содержания глюкозы в моче (глюкозурия) отмечается при сахарном диабете, нарушении

почечной фильтрации (почечная глюкозурия, «почечный диабет»), поражении печени, стрессах, гипертиреозе и многих других патологических состояниях. Наибольшее клиническое значение имеет контроль глюкозы в моче при диагностике и лечении сахарного диабета.

Лабораторная работа 2. Определение глюкозы в крови по методу Хагедорна-Йенсена

Реактивы: Для осаждения белков: едкий натр, 0,1N раствор; цинк сернокислый, 0,45% раствор.

Для определения сахара: раствор красной кровяной соли, 0,005N; 3-хлорцинкйодистый раствор; уксусная кислота, 3% раствор; 0,005N раствор гипосульфита; крахмал, 1% раствор в насыщенном растворе хлористого натрия.

Ход работы: *Первый этап* – осаждение белков.

Белки крови осаждают гидратом окиси цинка и кипячением. Для этого предварительно готовят гидрат окиси цинка. В 2 пробирки вносят по 5 мл сернокислого цинка и по 1 мл 0,1N едкого натра. При этом образуется белый коллоидный осадок гидрата окиси цинка. Кровь (0,1 мл) берут микропипеткой. Кончик микропипетки, после взятия крови, вытирают фильтровальной бумагой, и пробу крови вносят в раствор гидрата окиси цинка. Пипетку двукратно промывают этим раствором, методом пипетирования. Кровь набирают только в 1 пробирку, а другая пробирка служит контролем, реактивы без крови (для определения редуцирующих свойств реактивов). Обе пробирки ставят на 3 минуты в кипящую водяную баню. Белки свертываются в виде серых сгустков, а жидкость становится бесцветной и прозрачной. Содержимое

пробирок фильтруют через заранее промытую горячей водой вату в широкие пробирки. Осадок дважды промывают водой по 3 мл. Промывные воды фильтруют через ту же вату.

Второй этап – определение глюкозы. К фильтрату крови, не содержащему белка и контрольной пробе приливают (точно!) по 2 мл раствора красной кровяной соли. Обе пробирки ставят на 15 минут в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают и в каждую из них прибавляют по 3 мл 3-хлорцинкйодистого раствора и по 2 мл 3% уксусной кислоты. Жидкость желтеет от выделившегося йода. Добавляют по 2 капли крахмала в пробирку и на белом фоне титруют из микробюретки гипосульфитом до исчезновения синего окрашивания.

Расчет. Содержание сахара в крови вычисляют по таблице (приложение 2). В первой вертикальной колонке указываются взятые миллилитры и их десятые доли миллилитров. Пересечение вертикальной и горизонтальной линии показывает количество сахара в миллиграммах на 100 мл крови.

Например, на титрование в опытной пробирке пошло 1,32 мл 0,005N раствора гипосульфита. В первой вертикальной колонке находят 1,3, а в первом горизонтальном ряду – 2. На месте пересечения вертикальной и горизонтальной линии, идущих от этих цифр стоит 120. Из этой величины нужно вычесть то количество миллиграммом сахара (редуцирующих веществ), которое пошло на контрольный опыт.

Например, на титрование контрольных пробирок пошло 1,86 мл гипосульфита, что соответствует в таблице

значению 024. Эту величину вычитают из 120 и получают 0,96 мл сахара, т.е. 96 мг/% или 0,096% сахара.

Глюкоза – главный источник энергии для клеток организма. На ее долю приходится более 90% всех низкомолекулярных углеводов.

Относительно постоянный уровень глюкозы в крови поддерживается благодаря сахароснижающему свойству инсулина и сахароповышающему свойству адреналина, глюкагона и глюкокортикоидов.

Концентрация глюкозы в венозной крови на 10% меньше, чем в капиллярной, она быстро снижается благодаря гликолизу. Поэтому глюкозу в крови определяют сразу после ее взятия или проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой непосредственно на ферме или добавляют ингибитор.

Снижение сахара в крови (гипогликемия) бывает при кетозе, вторичной остеодистрофии, послеродовом парезе, некоторых формах ожирения, токсических поражениях печени. Часто оно следствие недостатка в кормах легкоусвояемых углеводов, большой потребности в глюкозе при высококонцентрированном типе кормления, преобладании в рационах кислых кормов. К гипогликемии приводят передозировки инсулина.

Повышение сахара в крови (гипергликемия) может быть стойким и непродолжительным – при скармливании скоту больших количеств сахаристых кормов, а также при испуге, высокой температуре, стрессовом состоянии. Стойкая гипергликемия бывает при сахарном диабете. Однако следует иметь в виду то обстоятельство, что при сахарном диабете, сопровождаемой выраженной глюкозурией,

содержание глюкозы в крови может быть в пределах нормы. Это обусловлено понижением почечного порога (ослабление реабсорбции глюкозы в почечных канальцах).

В моче здоровых животных глюкозу, как правило, не обнаруживают. Появление ее в моче (глюкозурия) бывает при сахарном диабете, когда уровень глюкозы в крови превышает пороговую концентрацию. Почечный порог глюкозы в крови у собак 6,66 ммоль/л.

Почечную глюкозурию отмечают при снижении почечного порога вследствие дистрофии почечных канальцев даже при нормальной концентрации глюкозы в крови. Это так называемый «почечный» диабет.

Контрольные вопросы

1. Переваривание и всасывание углеводов. Ферменты (гликозидазы) слюны, панкреатического сока, эпителия тонкого кишечника.

2. Продукты переваривания. Всасывание.

3. Судьба всосавшейся глюкозы.

4. Метаболизм гликогена, роль гормонов. Роль печени в углеводном обмене.

5. Анаэробный и аэробный пути распада углеводов. Значение.

6. Аэробный путь распада глюкозы. Ткани где преобладает аэробный путь. Связь аэробного пути со снабжением клетки кислородом.

7. Четыре стадии аэробного пути распада глюкозы.

8. Цикл трикарбоновых кислот - цикл Кребса (ЦТК).

9. Апопомический путь распада глюкозы, пентозный цикл. Физиологическое значение пентозного цикла.

10. Глюконеогенез, сущность процесса. Биосинтез глюкозы, как путь обратный гликолизу, три необратимые стадии, их ферменты.

Тема 11. Обмен липидов

Расщепление жиров в желудочно-кишечном тракте

Жиры попадают в организм животного с кормом. Животные получают жиры одного состава и превращают их в собственные жиры другого состава. Жиры, содержащие более 90 ненасыщенных жирных кислот (растительные масла), биологически более ценны, чем твердые жиры.

В ротовой полости жиры превращениям не подвергаются, вследствие того, что в слюне нет ферментов расщепляющих жиры. В желудке может происходить гидролиз жиров в очень ограниченном размере, так как содержится мало активная липаза. У взрослых животных не эмульгированные жиры проходят сквозь стенку кишечника. В кишечнике благоприятные условия для быстрого эмульгирования жиров. Наиболее мощным эмульгирующим действием обладают желчные кислоты. Вместе с желчью, изливающейся в полость 12-перстной кишки, попадают содержащиеся в желчи желчные кислоты. Адсорбируясь на поверхности капель жира, желчные кислоты образуют на них тончайшую пленку, препятствующую склеиванию мельчайших капелек жира в более крупные капли. Желчные кислоты близки по строению холестерину, их можно рассматривать как производные холиновой кислоты. К ним относятся: фолевая, дезоксифолевая и др. В результате воздействия на жиры желчных кислот в кишечнике образуется чрезвычайно тонкая эмульсия. Эмульгирование

жира облегчает ферментативный гидролиз, а, следовательно, и всасывание жира. Химическое расщепление жиров происходит при действии липолитических ферментов, наиболее активной из них является липаза. Липаза панкреатического сока выделяется в малоактивной форме. Процесс расщепления жира липазой, предварительно активированной желчными кислотами протекает по схеме: Триглицерид под действием липазы превращается в глицерин и жирную кислоту. Глицерин, как хорошо растворимое соединение хорошо всасывается слизистой оболочкой кишечника. Жирные кислоты, не растворимые в воде, поэтому могут всасываться только при наличии только особых условий. Всасыванию жирных кислот способствуют жирные кислоты, особенно дезоксиголевая, в которой могут соединяться с жирными кислотами, с образованием растворимых в воде комплексов.

Желчные кислоты стимулируют 3 процесса:

1. Эмульгирование жиров.
2. Активирование липазы панкреатического сока.
3. Всасывание свободных высших жирных кислот.

Промежуточный обмен липидов

Внутриклеточный липолиз

В стенке кишечника синтезируются жиры, в значительной степени специфические для данного вида животного. Они отличаются по своей природе от жировой формы, которая обеспечивается тем, что в синтезе триглицеридов, фосфолипидов в кишечной стенке принимает участие на ряду с экзогенными и эндогенными жирными кислотами. Однако, способность осуществления в стенке кишечника синтеза жира, специфического для

данного вида животного ограничено. При скармливании животному, особенно предварительно голодавшему, больших количеств чужеродного жира часть его обнаруживается в жировой ткани животного в неизменном виде. Жировое депо является единственной тканью, где могут откладываться чужеродные жиры. Липиды входящие в состав протоплазмы клетки других органов и тканей отличаются высокой специфичностью, их состав и свойства мало зависят от жиров корма. Расщепление фосфолипидов происходит при участии ферментов – фосфолипаз.

Различают несколько видов фосфолипаз:

-фосфолипаза A_1

-фосфолипаза A_2

Фосфолипаза A_2 катализирует каталитическое расщепление жирных кислот, при этом образуется продукт называемый лизофосфотидилхолин. Он токсичен и вызывает разрушение мембран клеток. Высокая активность фосфолипазы A_2 в яде змей и скорпионов приводит к тому, что при их укусе гемолизируются эритроциты. Накопление лизофосфолипидов в кишечнике может быть устранено, если одновременно на фосфолипиды действует обе фосфолипазы (A_1 и A_2), в результате образуется не токсичный для организма продукт. Вновь синтезируемые в эпителиальных клетках кишечника триглицериды и фосфолипиды, а также поступившей в клетки из полости кишечника холестерин, соединяются с белком. Эти липиды образуют относительно стабильные комплексы – липопротеидные частицы – хиломикроны. Они содержат

примерно 2% белка, 7% фосфолипидов, 8% холестерина, свыше 80% - триглицеридов.

Липопроотеиды плазмы крови – это сложные комплексные соединения, в состав которых входит кроме белка липидный комплекс. Плазменные липопроотеиды имеют характерное строение. Липопроотеидная частица представляет жирную каплю, содержащую триглицериды и холестерин. Сверху жирная капля покрыта оболочкой, которая составляет $\frac{1}{2}$ толщины фосфолипидного слоя 2-х клеток мембран. Поэтому, плазменные фосфолипиды содержат фосфолипидный монослой.

Следует учитывать, что помимо плазменных липопроотеидов в организме присутствуют и мембранные липопроотеиды. Они имеют несколько другое строение и функции их тесно связаны с метаболизмом клетки. Белки входящие в состав липопроотеидов называются – аполиппроотеидами (Апо).

Различают несколько классов липопроотеидов:

α - липопроотеиды (липиды высокой плотности) – ЛПВП

β - липопроотеиды (липиды низкой плотности) – ЛПНП

α и β - липиды могут проникать внутрь сосудистой стенки.

ЛПВП имеют в своем составе наибольший процент белка и фосфолипидов, способны метаболизировать в сосудистую стенку быстрее, чем богатые холестерином и триглицеридами липопроотеиды очень низкой плотности и хиломикроны. Благодаря большим размерам хиломикроны не способны проникать из эндотелиальных клеток кишечника в кровеносные капилляры и диффундируют в лимфоидную систему, а из нее в грудной лимфотический

проток. Тем временем они проникают в кровеносное русло, то есть с их помощью осуществляется транспорт триглицеридов и холестерина из кишечника через лимфатическую систему в кровь. Через 1-2 часа после приема корма содержащего жиры, наблюдается алиментарная гипергликемия – это физиологическое явление, характеризующееся повышением концентрации триглицеридов в крови и появлением в ней хиломикронов. Через 10-12 часов хиломикроны полностью исчезают из кровеносного русла. Печень и жировая ткань играют наиболее существенную роль в дальнейшей судьбе хиломикронов. Они свободно проникают из плазмы крови в межклеточное пространство печени. Допускается, что гидролиз триглицеридов и хиломикронов происходит как внутри печеночных клеток, так и на их поверхности. Хиломикроны не способны проникать в клетки жировой ткани, связи с этим триглицериды хиломикронов подвергаются гидролизу на поверхности эпителия капилляров. В результате образуются жирные кислоты и глицерин. Часть жирных кислот проходит внутрь жировой клетки, а другая связывается с альбуминами сыворотки крови и уносится с ее током. С током крови могут покидать жировую ткань и триглицериды. Главным источником жирных кислот, использующихся в качестве химической энергии, может служить резервный жир, содержащийся в жировой ткани. При физической работе требующей повышение затрат энергии, потребление триглицеридов повышается, так как в качестве источников энергии используются свободные триглицериды. Они нейтрализуются до глицерина и свободных жирных кислот,

которые из жирового депо переходят в плазму крови, и происходит мобилизация ВЖК. Липаза – фермент, расщепляющий жиры может активизироваться рядом гормонов (адреналин, норадреналин).

Биосинтез липидов

Способность животных запасать полисахариды ограничена, поэтому глюкоза может служить материалом для синтеза жирных кислот и глицерина. В настоящее время изучается механизм синтеза жирных кислот, а также ферментативные системы, катализирующие этот механизм. Синтез жирных кислот происходит в митохондриях, в процессе декорбоксилирования ацетилэнзима А. Существует путь переноса ацетилэнзима А из митохондрий в плазму. Ферментативная система, синтезирующая ВЖК, состоит из нескольких ферментов связанных между собой определенным образом.

Мультиферментный комплекс осуществляет синтез жирных кислот – синтетазой жирных кислот. Он состоит из 7 ферментов, эти ферменты связаны между собой белком, этот белок термостабилен и вовлекается в процесс синтеза жирных кислот на всех этапах. Относительная молекулярная масса этого белка составляет 10000Дальтон.

Регуляция липидного обмена

Липидный обмен регулируется корой головного мозга и нижележащими отделами центральной нервной системы.

Установлен ряд механизмов лежащих в основе действия гормонов на липидный обмен. Известно, что длительный эмоциональный стресс, сопровождается повышенным выбросом адреналина и норадреналина в кровь и может вызвать значительное снижение живой массы. В жировой

ткани много нервных окончаний и их возбуждение сопровождается выделением норадреналина непосредственно в жировую ткань. Адреналин и норадреналин повышают скорость липолиза жировой ткани, в результате усиливается мобилизация жирных кислот из жирового депо и уменьшается живая масса. Адреналин стимулирует действие аденилатциклазы, которая действует на липазу. Гормон роста оказывает влияние на липидный обмен. Снижение его функции и приводит к ожирению.

Практическое занятие 11.

Показатели жирового обмена

Лабораторная работа 1. Метод определения общего холестерина (по Ильку).

Реактивы: реактив Илька представляет собой смесь из 1 части ледяной уксусной кислоты, 5 частей уксусного ангидрида, 1 части концентрированной серной кислоты. При смешивании ингредиентов следует избегать нагревания смеси. Для этого колбу, где приготавливается реактив, постоянно охлаждают, а серную кислоту добавляют в последнюю очередь (медленно, при постоянном перемешивании). Смесь должна быть бесцветной или слегка желтоватой и может долго храниться в холодильнике. При постановке реакции следует пользоваться совершенно сухими пробирками и пипетками.

Ход работы: к 2,1 мл реактива Илька добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки крови таким образом, чтобы она стекала по стенке пробирки. Пробирку тотчас же встряхивают короткими энергичными движениями 10 раз, помещают в водяную баню при 30⁰С и оставляют в темноте

на 20-25 мин. Жидкость окрашивается в зеленый цвет, ее колориметрируют на ФЭКе. Соотношение ингредиентов рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление мути говорит о наличии воды в реактиве или посуде.

Расчет производят по общепринятым правилам с учетом концентрации стандартного раствора. Для приготовления стандартного раствора к 90 мг холестерина добавляют 100 мл хлороформа. Рабочий раствор получают разведением стандартного раствора в 100 раз (10 мл стандартного раствора растворяют в хлороформе, доведя до метки 100 мл). 1 мл стандартного раствора соответствует 0,9 мг холестерина, а 1 мл рабочего раствора – 0,09 мг холестерина.

Построение калибровочной кривой на холестерин:

0,5 мл	рабочего раствора	соответствует	45 мг %
1,0 мл	”	”	90 мг %
1,5 мл	”	”	135 мг %
2,0 мл	”	”	180 мг %
2,5 мл	”	”	225 мг %
3,0 мл	”	”	270 мг %

Лабораторная работа 2. Проба Ланге

Реактивы: уксусная кислота 80%, нитропруссид натрия (свежеприготовленный 10% раствор), аммиак.

Ход определения. К 12 – 15 мл мочи приливают около 1 мл уксусной кислоты и около 0,5 мл раствора нитропруссиды натрия. Затем наслаивают аммиак. В положительном случае на границе двух жидкостей образуется фиолетовое кольцо. Кольцо может появиться не сразу, а в течение 2 – 3 мин.

Другая модификация этой пробы удобна тем, что можно использовать готовый реактив нитропруссид натрия.

Приготовление реактива. 6 г нитропруссид натрия растворяют в 100 мл 30% уксусной кислоты.

Ход определения. К 5 – 6 мл мочи прибавляют несколько капель реактива (до цвета чая) и наслаивают аммиак. В положительном случае на границе жидкостей появляется фиолетовое кольцо.

Лабораторная работа 3. Модифицированная проба Ротеры.

Реактивы. Нитропруссид натрия, раствор 50 г/л; готовят перед употреблением. Аммония сульфат. Аммиак водный – 25% раствор.

Ход определения. Приблизительно 200 мг сухого сульфата аммония, 5 капель мочи и 2 капли раствора нитропруссид натрия тщательно смешивают в пробирке, а затем на эту смесь тщательно наслаивают 10 – 15 капель раствора водного аммиака. При наличии кетоновых тел на границе раздела в течение 3 – 5 мин образуется красно-фиолетовое кольцо, интенсивность окраски которого позволяет ориентировочно судить о концентрации кетоновых тел в моче (см. таблицу).

Ориентировочная количественная оценка кетоновых тел в моче.	
Интенсивность окраски	Обнаруживаемые вещества, г/л Ацетоуксусная кислота
Следы	0,05
Умеренная	0,3
Интенсивная	0,8

При незначительной концентрации кетоновых тел слабое кольцо может появиться на 8 – 10 минуте.

Лабораторная работа 4. Проба Легалья

Реактивы. Свежеприготовленный 5% водный раствор нитропруссиды натрия. 10 – 15% раствор едкого натрия. Уксусная кислота ледяная.

Ход определения. К 5 – 6 мл мочи прибавляют несколько капель реактива № 1 и 0,5 мл реактива № 2. Получается красное окрашивание. Добавляют 0,5 – 1 мл реактива № 3. Если красный цвет исчезает, проба отрицательная, если сохраняется – положительная. Если получается слабо-розовая окраска, то проба считается также положительной.

Лабораторная работа 5. Проба Лестраде

Приготовление сухого реактива: нитропруссиды натрия 1 г, сульфата аммония 20 г, карбоната натрия безводного 20 г. Отвешенные реактивы тщательно растирают в ступке до получения мелкого однородного порошка. Порошок хранят в хорошо закупоренной стеклянной банке в сухом месте.

Ход определения. Предметное стекло кладут на лист фильтровальной бумаги. На стекло помещают небольшое количество (на кончике ножа) сухого реактива или таблетку и наносят на него 2 – 3 капли мочи. При наличии кетоновых тел получается окрашивание от розового до темно-фиолетового (появление окраски может наступить в течение 2 – 3 мин).

Контрольные вопросы

1. Пищевые жиры, физиологическая роль, переваривание.

2. Роль желчных кислот и панкреатической липазы в переваривании липидов.
3. Переваривание фосфолипидов и эфиров холестерина, ферменты. Всасывание продуктов переваривания. Холеиновые кислоты.
4. Транспортные формы липидов - липопротеиды плазмы крови.
5. Характеристика отдельных классов липопротеидов - физико-химические свойства, липидный состав, апопротеины. Атерогенные (ЛПНП) и антиатерогенные (ЛПВП) липопротеиды.
6. Роль печени в образовании и секреции липопротеидов. Липотропные факторы.
7. Резервирование и мобилизация триглицеридов в жировой ткани. Активация тканевой липазы адреналином и глюкагоном.
8. Окисление жирных кислот. Активация жирных кислот и транспорт в митохондрии, роль карнитина
9. Биосинтез жирных кислот. Потребность в CO_2 , роль биотина.
10. Синтетаза жирных кислот - мультиферментный комплекс. Последовательность реакций и ферменты, образование пальмитиновой кислоты. Связь синтеза жирных кислот с пентозным циклом.
11. Кетогенез. Реакции синтеза кетоновых тел из ацетил-КоА. Строение и биологическая роль кетоновых тел.
12. Окисление холестерина в желчные кислоты и стероидные гормоны, основной путь выведения холестерина из организма. Метаболическая и структурная роль холестерина в организме.

Тема 12. Водно-солевой обмен

Обмен воды в организме

Вода является важнейшим компонентом всего живого. Это универсальный биологический растворитель и незаменимая среда, обеспечивающая эвакуацию клеточного обмена. Одним из условий существования жизни животных является необходимость поддержания в тканях определенного количества воды. Для того чтобы поддерживать осмотический гомеостаз в организме существуют специальные физиологические механизмы. Важнейшими компонентами, из этих механизмов являются: реабсорбция (обратное всасывание) и фильтрация. Для воды характерна очень низкая вязкость, что придает водным растворам хорошую текучесть и быстрое перемещение жидкостей в организме. В теле животного содержится до 65-70% воды. Если животное лишит воды оно быстро погибнет.

Вода в организме встречается в различных состояниях:

1. Гидростатическая – связана, в основном, с частями клетки, особенно с белками. Она не замерзает при 0⁰C, имеет повышенную плотность, в ней не растворяются растворимые в обычной воде вещества.

2. Лиофильная – содержится между молекул волокнистой структуры. Не выделяется при измельчении ткани. Придает тканям упругость и способствует сохранению их постоянной формы.

3. Свободная – содержится в плазме, моче, лимфе, пищеварительном соке и т.д. Она обеспечивает приток к тканям питательных веществ и удаление из них конечных продуктов обмена.

Потребность в воде у животных различна. Она определяется условиями кормления, продуктивности и т.д. Выводится вода из организма с мочой, через кожу, с калом.

Минеральный обмен.

Для нормальной жизнедеятельности организма необходимы минеральные соли и оптимальные соотношения между ними. При нарушении этого обмена возникают отеки, слабость, тяжелые формы анемии, судороги. Минеральные вещества принимают участие в следующих физиологических процессах:

1. Распределение воды в организме.
2. Поддержание осмотического давления крови и межклеточной жидкости.
3. Регулируют кислотно-щелочное равновесие.
4. Выступают в роли катализаторов при многих химических реакциях.
5. Оказывают влияние на функции центральной нервной системы.

К макроэлементам относятся: Na, Ca, K, P, Mg, Fe, Cl, S.

Na – находится в организме в виде растворенной в воде соли. Высокая концентрация Na обнаруживается в плазме крови, в почках, костях скелета и хрящах. Он обуславливает постоянство осмотического давления крови. Играет важную роль в водном обмене. Влияет на активность ферментов. Его ионы возбуждают мышцы и необходимы для проведения импульсов по нервным волокнам. К избытку натрия чувствительны свиньи и домашняя птица.

K – находится в организме в виде растворимых соединений. Всасывается в основном в тонком отделе кишечника. Обеспечивает внутриклеточное осмотическое

давление. Активизирует многие ферменты. Повышает скорость аэробного и угнетает анаэробное окисление углеводов.

Са – используется как пластический материал, содержащийся в костной ткани. Он понижает проницаемость кровеносных сосудов, участвует в свертывании крови, понижает возбудимость нервной системы. Активизирует фагоцитоз лейкоцитов. При недостатке кальция у молодых животных развивается рахит.

P – играет важную роль в промежуточном обмене. Содержится в костной и зубной тканях, входит в состав АТФ. Участвует в образовании ферментов, гормонов, витаминов. Фосфорнокислые соли, содержащиеся в крови, образуют фосфатные буферные системы.

Mg – входит в состав мышц, костей, некоторых ферментов. Играет важную роль в процессах фосфорелирования. Активизирует биосинтез протеинов. Участвует в терморегуляции и необходим для сокращения нервно-мышечного аппарата.

S – входит в состав аминокислот и биологически активных веществ. Она участвует в процессах брожения в преджелудках и входит в состав волос, шерсти, рогов, копыт. Обезвреживает яды.

Cl – находится во всех жидкостях организма, во всех хлористых соединениях. Поддерживает осмотическое давление плазмы и других жидкостей. Активизирует работу некоторых ферментов, функцию центральной нервной системы и используется слизистой желудка для секреции HCl.

Fe – является составной частью белков, ферментов. 70% этого элемента входит в состав гема. Принимает большое участие в процессе гемопоэза и участвует в тканевом дыхании. Его недостаток в процессе эритропоэза вызывает анемию (малокровие).

Микроэлементы. Co, Mn, Cu, Zn, J, F, St.

Они содержатся в тканях в небольших количествах. Способствуют росту и развитию животных, повышению продуктивности, плодовитости и устойчивости к заболеваниям.

Co – активизирует ферменты: фосфотазу, аргиназу, каталазу, а также гликолитическую функцию крови. Большую роль кобальт принимает в пищеварении у жвачных животных, обеспечивая синтез в рубце витамина B₁₂ (цианкобаламин). При недостатке этого витамина изменяется микрофлора рубца, развивается заболевание – эндемическая сухотка, лизуха, «уровская болезнь».

Cu – входит в состав белковых соединений. Участвует в составе ферментов в процессах кроветворения. В крови обнаруживается в составе церулоплазмينا. При недостатке нарушается процесс роста, функции мышечной и кровеносной систем.

Mn – входит в состав всех органов и тканей. Много его в печени, почках, костях. При его недостатке задерживается рост, теряется способность к размножению.

Zn – входит в состав фермента уреазы, а также гормона инсулина и глюкагона. Он необходим для нормального функционирования органов размножения, а кроме того, задерживает свертываемость крови. Отсутствие или недостаток цинка в корме приводит к нарушению

пищеварения. Избыток его в кормах приводит к отравлению.

J – содержится во многих тканях, но основная его масса содержится в щитовидной железе. Он входит в состав гормона тироксина. Его недостаток приводит к снижению продуктивности и развитию эндемического зоба.

F – встречается во всех органах и тканях. Хорошо всасывается в кишечнике. В большом количестве содержится в зубах, в костях и сперме. При его недостатке нарушается обмен веществ и развивается кариес.

St – содержится во всех органах и тканях в костях и зубах. Отсутствие его в кормах вызывает кариес зубов, а избыток – стронциевый рахит.

Mo – в организме содержится в незначительных количествах. Влияет на метаболизм производных нуклеиновых кислот. Жвачным животным необходим для роста бактерий в преджелудках.

Список рекомендованной литературы

Основная литература

1. Основы биохимии: Учебное пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. - М.: НИЦ Инфра-М, 2013. - 400 с.: 60х90 1/16. - (Высшее образование: Бакалавриат). (переплет) ISBN 978-5-16-005295-3, 500 экз.

Дополнительная литература

1. Биохимия животных: учеб. для высш. с.-х. учеб. заведений по спец. "Зоотехния", "Ветеринария"/ А.В. Четчин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский; под ред. А.В. Четчина. — М.:Высш.шк.,1982. — 511 с. — Библиогр.: с. 505-506.

2. Березов Т.Т., Коровин Б.Ф. Биологическая химия. Учебник. 3-е изд., перераб. и доп.- М.: «Медицина», 2002.

3. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия.- Москва – Санкт-Петербург,- 1999 г.

4. Николаев А.Я. Биологическая химия.- М.,- 1998 г.

5. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В. Биохимия.- М.: «Медицина»,- 2000 г.

6. Степанов В.М. Структура и функции белков. М.: Высшая школа, 1996.

7. Фролов Ю.П., Серых М.М., Макурина О.Н., Кленова Н.А., Подковкин В.Г. Биохимия и молекулярная биология / Под. Ред. Ю.П. Фролова.- Самара: Изд-во Самарский университет, 2003.

8. Биохимия, морфология, физиология сельскохозяйственных животных и пушных зверей: Сб. статей / Редкол.: Г.П. Еремеев и др.; Ом. С.-х. ин-т им. С.М. Кирова. — Омск:ОмСХИ,1980. — 116с. — Библиогр.в конце статей.

9. Метревели Т.В. Биохимия животных: учеб. Пособие для студентов вузов / Т.В. Метревели; под ред. проф. Н.С. Шевелева.- СПб.: Лань, 2005.

10. Зайцев С.Ю. Биохимия животных: учеб. для студ. вузов: Фундаментальные и клинические аспекты / С.Ю. Зайцев, Ю.В. Конопатов.- СПб.: Лань, 2005.

11. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: учебн.-метод. пособие по спец. «Зоотехния» и «Ветеринария» / В.В. Рогожин. – СПб.: Лань, 2006. – 255с. – Библиогр. в конце гл.

Составители: Тюньков И.В.
Котлярова О.С.
Батенева Н.В.
Гарматарова Т.В.

Биохимия
Учебно-методическое пособие

Компьютерная верстка
Батенева Н.В.

Подписано к печати 2015 г.
Формат 60х84 1/16. Тираж 50 экз.
9,0 усл. печ. л. Изд. № 104.
Заказ №

Отпечатано в типографии ООО «Д2»