

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Саратовский государственный аграрный университет  
имени Н.И. Вавилова»

# ДИНАМИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ



Саратов 2016

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072

Р е ц е н з е н т ы:

Доктор биологических наук, профессор кафедры  
«Микробиология, биотехнология и химия»  
ФГБОУ ВО СГАУ им. Н.И.Вавилова  
*А.А. Щербаков*

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры  
«Факультетской хирургии и онкологии»  
ГБОУ «Саратовский ГМУ им. С.В. Разумовского»  
*В.Л. Мещеряков*

**Динамическая биохимия:** учебное пособие по выполнению лабораторных работ для направлений подготовки **19.03.01. Биотехнология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03 Продукты питания животного происхождения; 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания;** и специальности **36.05.01 Ветеринария**

/ Сост.: Л.Г. Ловцова, О.С.Ларионова, П.В. Смутнев, Е.Г. Жничкова//  
ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2016. – 135 с.

ISBN 978-5-9907899-0-6

Учебное пособие «Динамическая биохимия» составлено в соответствии с программой дисциплины и предназначено для студентов направлений подготовки 19.03.01 Биотехнология, 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья, 19.03.03 Продукты питания животного происхождения; 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания; и специальности 36.05.01 Ветеринария.

Учебное пособие содержит краткое изложение тем входящих в ГОС ФПО дисциплины «Биохимия» и описание лабораторных методов изучения основных биологических объектов. Направлено на формирование у студентов навыка проведения биохимических исследований биологического материала. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих специалистов сельского хозяйства.

© ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ», 2016

## ВВЕДЕНИЕ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ** – это наука о молекулярной сущности жизни. Она изучает химическую природу веществ, входящих в состав живых организмов, их превращения, а также связь этих превращений с деятельностью клеток, органов и тканей и организма в целом, т.е. общих путей и принципов превращений веществ и энергии, лежащих в основе разнообразных проявлений жизни. Поэтому главной задачей биохимии является установление связи между молекулярной структурой и биологической функцией химических компонентов живых организмов.

Биохимия занимает особое место в системе биологического, врачебного, зооинженерного образования, а также в учебном процессе при подготовке технологов для пищевой промышленности. Она принадлежит к наукам, которые обеспечивают формирование научного мировоззрения у будущего высококвалифицированного специалиста сельского хозяйства, работающего в области животноводства, пищевой промышленности, ветеринарии и биотехнологии.

В результате изучения дисциплины студенты должны знать химический состав органов и тканей и биохимические процессы протекающие в живых организмах; иметь представление об обмене веществ и энергии как едином взаимосвязанном процессе, об основных принципах биологического окисления; знать роль биологически активных веществ (витаминов, ферментов и гормонов); уметь правильно интерпретировать данные, полученные при исследовании пищевых продуктов; владеть основными методами биологических исследований сырья животного и растительного происхождения и готовых изделий. Изучение свойств и состава веществ, входящих в животные и растительные организмы, дает возможность подготовить студентов к научно-обоснованному составлению сбалансированных рационов питания для различных групп населения.

По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования, пример расчета, тестовые задания, форма записи и список литературы.

## **ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

1. Работать в лаборатории разрешается только в халате в отведенное время под контролем преподавателя или лаборанта.
2. Необходимо соблюдать тишину, чистоту и порядок. Запрещается держать на рабочем столе посторонние предметы.
3. Категорически запрещается принимать и хранить пищу, пить воду, пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества следует осторожно, не поднося сосуд близко к лицу, а лишь направляя к себе пары или газы легким движением руки, при этом не следует делать полный вдох.
4. Приступать к работе можно только после усвоения всей техники ее выполнения. Если вы испытываете какие-либо сомнения в методике проведения эксперимента или в технике безопасности, прежде чем продолжать работу, проконсультируйтесь с преподавателем.
5. Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде. Посуду и руки следует мыть сразу после окончания эксперимента.
6. Запрещается нагревать, смешивать и взбалтывать реактивы вблизи лица. При нагревании нельзя держать пробирку или колбу отверстием к себе или в направлении работающего соседа.
7. Запрещается выливать в раковину остатки кислот и щелочей, огнеопасных и взрывоопасных, а также сильно пахнущих веществ. Для слива веществ в вытяжном шкафу должны находиться специальные сосуды с плотно притертыми крышками и соответствующими этикетками («СЛИВ КИСЛОТ», «СЛИВ ЩЕЛОЧЕЙ», «СЛИВ ОРГАНИКИ»).
8. Нельзя бросать в раковину различный мусор, бумагу и вату.
9. Необходимо внимательно следить за горящими газовыми кранами и включенными электрическими приборами. Нельзя оставлять их без присмотра.
10. После завершения работы отключите газ, воду, вытяжные шкафы и электроэнергию.
11. В обязанности дежурного входит следить за соблюдением студентами техники безопасности. После окончания работы дежурный проверяет чистоту рабочих мест и сдает аудиторию преподавателю.

## ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ НЕСЧАТНЫХ СЛУЧАЯХ

При попадании на кожу щелочи обожженное место обильно промывают проточной водой, а затем протирают 2%-ным раствором уксусной или борной кислоты.

1. При попадании на кожу кислоты обожженное место обильно промывают проточной водой, а затем протирают 2%-ным раствором аммиака или соды.

2. При сильных термических ожогах кожу смачивают крепким раствором перманганата калия или спиртовым раствором танина, спиртом, жировой эмульсией.

3. При поражении электрическим током, если пострадавший остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо **ВЫКЛЮЧИТЬ ТОК**.

4. При возникновении пожара немедленно **ПЕРЕКРОЙТЕ ГАЗ** во всей лаборатории. Потушите очаг пожара.

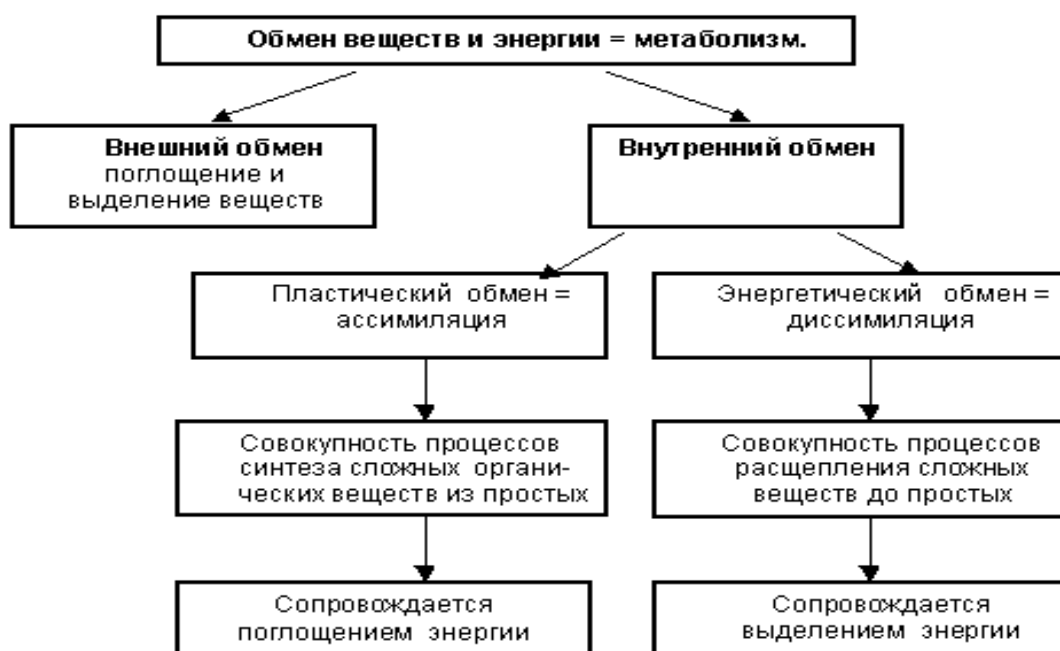
5. При возгорании одежды тушите ее водой или перекачиванием пострадавшего по полу.

## ТЕМА 1. МЕТАБОЛИЗМ

**Цель:** сформировать практические навыки по исследованию макроэргических соединений мышечной ткани.

**Актуальность темы:** Обмен веществ или метаболизм – это превращение соединений, которое происходит в живых организмах и лежит в основе их жизнедеятельности.

Живые организмы находятся в постоянной и неразрывной связи с окружающей средой. Эта связь осуществляется в процессе обмена веществ, который включает 3 этапа: поступление веществ в организм, метаболизм и выделение конечных продуктов из организма. Поступление веществ в организм происходит в результате дыхания (кислород) и питания. В ЖКТ продукты питания перевариваются (расщепляются до простых веществ) в процессе гидролиза полимеров (белков, полисахаридов, жиров) до мономеров, которые всасываются в кровь и включаются в промежуточный обмен.



Промежуточный обмен (внутриклеточный метаболизм) - это совокупность химических реакций, протекающих в живых клетках и обеспечивающих организм веществами и энергией для его жизнедеятельности, роста и размножения. Включает 2 типа реакций: катаболизм и анаболизм (рис. 1).

- **Катаболизм (диссимиляция)** – процесс расщепления сложных органических макромолекул (белки, жиры, углеводы) до простых конечных продуктов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и мочевины). В процессы катаболизма включаются метаболиты, образующиеся как при пищеварении, так и при распаде структурно-функциональных компонентов клеток. Распад сопровождается выделением свободной энергии (т.е. экзергонические реакции), которая используется и преобразуется в другие формы энергии – механическую, электрическую, тепловую.

- **Анаболизм (пластический обмен или ассимиляция)** – это биосинтез из малых молекул (аминокислот, моносахаридов, глицерина, азотистых оснований, жирных кислот) сложных макромолекул. Биосинтез связан с увеличением размеров молекул и усложнением их

структуры, поэтому требует затрат энергии, которая освобождается при катаболизме (т.е. эндергонические реакции).

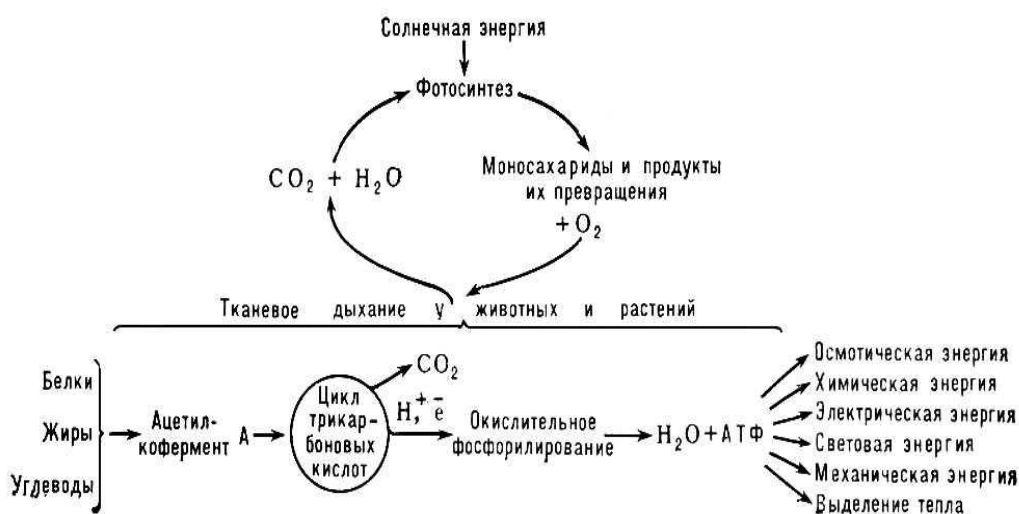
Катаболизм и анаболизм протекают в клетке одновременно и связаны между собой.



**Рисунок 1 - Общая схема обмена веществ и энергии и их взаимосвязь**

*Питание (кормление)* – это составная часть обмена веществ, поскольку основным источником энергии для живых организмов является энергия, запасенная в химических связях компонентов пищи.

Известно, что растения строят сложные органические вещества из таких простых, как вода, углекислый газ и минеральные вещества, причем энергия, необходимая для этой синтетической деятельности, образуется за счет поглощения солнечных лучей в процессе фотосинтеза (Схема 1). Животные организмы, напротив, нуждаются в пище, состоящей из воды, минеральных компонентов и сложных органических веществ. Проявления жизнедеятельности и синтез веществ, входящих в состав тела, обеспечиваются за счет химической энергии, освобождающейся при окислении сложных органических веществ. В связи с этим, растения, не использующие для своей жизнедеятельности вещества органической природы, называются *аутотрофными организмами*, животные являются *гетеротрофными*.



**Схема 1 – Образование энергии в живых организмах**

Микроорганизмы бывают как ауотрофы, так и гетеротрофы и для них характерным признаком считается наличие специфических химических веществ и реакций, не встречающихся в клетках животных и растений.

### Обмен энергии. Биологическое окисление

Процессы катаболизма в клетках животных сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии, которая необходима организмам для осуществления различных видов работы. Небиологические системы могут совершать работу за счёт тепловой энергии, биологические системы функционируют в изотермическом режиме и для осуществления процессов жизнедеятельности используют химическую энергию. Изучением превращений энергии, сопровождающих химические реакции, занимается *биоэнергетика*, или *биохимическая термодинамика*. Живые организмы с точки зрения термодинамики - открытые системы. Между системой и окружающей средой возможен обмен энергии, который происходит в соответствии с *законами термодинамики*:

Первый закон – закон сохранения энергии, т.е. общая энергия системы и окружающей среды - величина постоянная. Внутри рассматриваемой системы энергия может переходить от одной её части к другой или превращаться из одной формы в другую.

Второй закон – все физические и химические процессы в системе стремятся к необратимому переходу полезной энергии в хаотическую, неуправляемую форму. Мерой перехода служит величина, называемая энтропией (S), она достигает максимума, когда система приходит в истинное равновесие с окружающей средой.

Каждое органическое соединение, поступающее в организм извне или входящее в состав живой материи, обладает определённым запасом внутренней энергии (E). Часть этой внутренней энергии может быть использована для совершения полезной работы. Такую энергию системы называют свободной энергией (G).

Для биологических систем при постоянных температуре (25°C) и давлении (в 1 атм.) соотношение между изменением свободной энергии системы ( $\Delta G$ ) и изменением энтропии ( $\Delta S$ ) можно представить следующим уравнением:

$$\Delta G = \Delta H - T \times S,$$

где  $\Delta H$  - изменение энтальпии (внутренней энергии или теплоты, содержащейся в системе); T - абсолютная температура. В условиях, при которых протекают биохимические реакции,  $\Delta H$  приблизительно равно  $\Delta E$  (изменению внутренней энергии системы в результате реакции).

Направление химической реакции определяется значением свободной энергией (G). Если эта величина отрицательна, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют экзергоническими. Если  $\Delta G$  положительно, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такие реакции называют эндергоническими. Если абсолютное значение  $\Delta G$  велико, то система

устойчива, и реакция в таком случае практически не осуществляется. При  $\Delta G$ , равном нулю, система находится в равновесии.

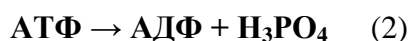
В биологических системах термодинамически невыгодные (эндергонические) реакции могут протекать лишь за счёт энергии экзергонических реакций. Такие реакции называют энергетически сопряжёнными. Многие из этих реакций происходят при участии аденозинтрифосфата (АТФ), играющего роль сопрягающего фактора.

Рассмотрим энергетику сопряжённых реакций на примере реакции *фосфорилирования глюкозы* свободным фосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата (эндергоническая реакция):



$$\Delta G = +13,8 \text{ кДж/моль}$$

Для протекания такой реакции в сторону образования глюкозо-6-фосфата необходимо её сопряжение с другой реакцией, величина свободной энергии которой больше, чем требуется для фосфорилирования глюкозы.



$$\Delta G = -30,5 \text{ кДж/моль}$$

При сопряжении процессов 1 и 2 в реакции, катализируемой гексокиназой, фосфорилирование глюкозы легко протекает в физиологических условиях:



$$\Delta G = -16,7 \text{ кДж/моль}$$

### Высокоэнергетические фосфаты. Роль АТФ в организме

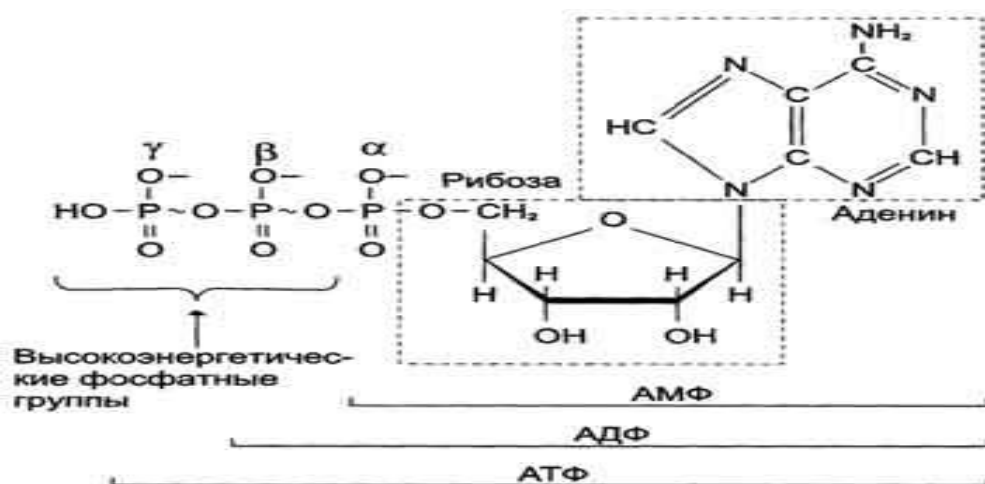
В живых организмах существует целая группа органических фосфатов, гидролиз которых приводит к освобождению большого количества свободной энергии. Такие соединения называют высокоэнергетическими (макроэргическими) фосфатами (таблица 1). К таким соединениям относят: АТФ, УТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ, кеатинфосфат, фосфоэнолпируват, 1,3-дифосфаглицерат. Разные фосфорилированные соединения обладают разным запасом свободной энергии ( $\Delta G$ ).

**Таблица 1 - Свободная энергия гидролиза некоторых органических фосфатов**

<i>Соединение</i>	<i>Продукты реакции</i>	<i>- <math>\Delta G^{0'}</math>, ккал/моль</i>	<i>- <math>\Delta G^{0'}</math>, кДж/моль</i>
Фосфоэнолпируват	Пируват + $\text{H}_3\text{PO}_4$	14,8	61,86
1,3-Бисфосфоглицерат	3-фосфоглицерат + $\text{H}_3\text{PO}_4$	13,0	54,34
Карбамоилфосфат	Карбамат + $\text{H}_3\text{PO}_4$	12,0	51,83

Креатинфосфат	Креатин + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10,3	43,05
Ацетилфосфат	Уксусная кислота + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10,3	43,05
АТФ	АДФ + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,3	30,51
АДФ	АМФ + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,6	27,59
Дифосфат(H <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	2 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6,6	27,59
Глюкозо-1-фосфат	Глюкоза + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5,0	20,90
Фруктозо-6-фосфат	Фруктоза + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,8	15,88
Глюкозо-6-фосфат	Глюкоза + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,3	13,79
Глицеролфосфат	Глицерин + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,2	8,36

Центральное место среди этих соединений занимает аденозинтрифосфорная кислота или АТФ (рис. 2) – это молекула, богатая энергией, т.к. содержит две фосфоангидридные связи: β, γ (обозначены на рисунке знаком «~» тильда).



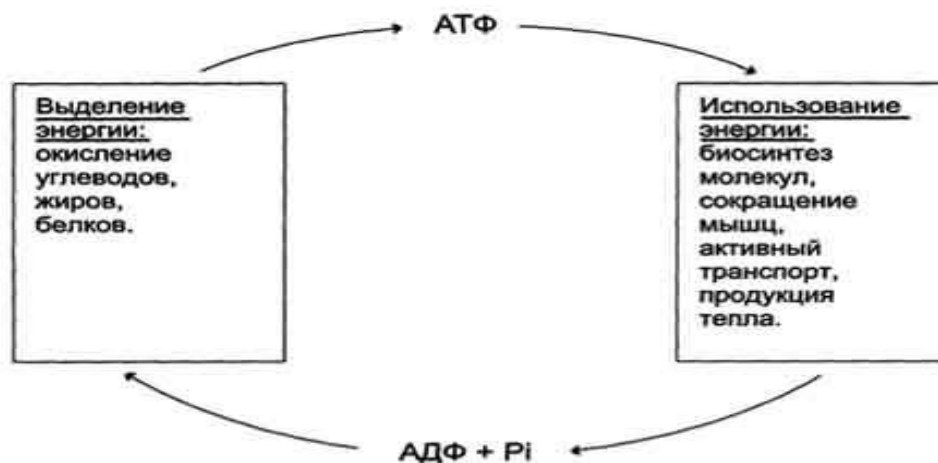
**Рисунок 2 - Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ)**

При гидролизе концевой фосфоангидридной связи АТФ превращается в АДФ и ортофосфат (P<sub>i</sub>). При этом изменение свободной энергии составляет - 7,3 ккал/моль. При условиях, существующих в клетке в норме (рН 7,0, температура 37°С), фактическое значение ΔG<sup>0</sup> для процесса гидролиза составляет около - 12 ккал/моль. Величина свободной энергии гидролиза АТФ делает возможным его образование из АДФ за счёт переноса фосфатного остатка от таких высокоэнергетических фосфатов, как, например, фосфоенолпируват или 1,3-бисфосфоглицерат.

АТФ участвует в эндергонических реакциях: фосфорилирование глюкозы или глицерина; выступает в роли донора энергии в анаболических процессах. Наконец, за счёт свободной энергии АТФ совершаются различные виды работы, лежащие в основе жизнедеятельности организма, например, мышечное сокращение или активный транспорт веществ.

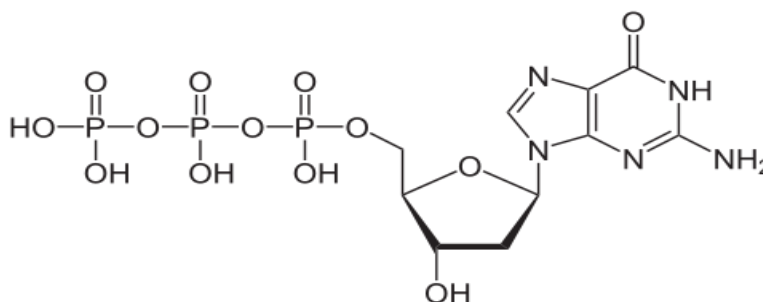
Таким образом, АТФ - главный, непосредственно используемый донор свободной энергии в биологических системах. В клетке молекула АТФ расходуется в течение одной минуты после её образования. У млекопитающих количество АТФ, равное массе тела, образуется и разрушается каждые 24 ч.

Использование АТФ как источника энергии возможно только при условии непрерывного синтеза АТФ из АДФ за счёт энергии окисления органических соединений (рис. 3). Цикл АТФ-АДФ - основной механизм обмена энергии в биологических системах, а АТФ - универсальная "энергетическая валюта".



**Рисунок 3. Цикл АТФ-АДФ**

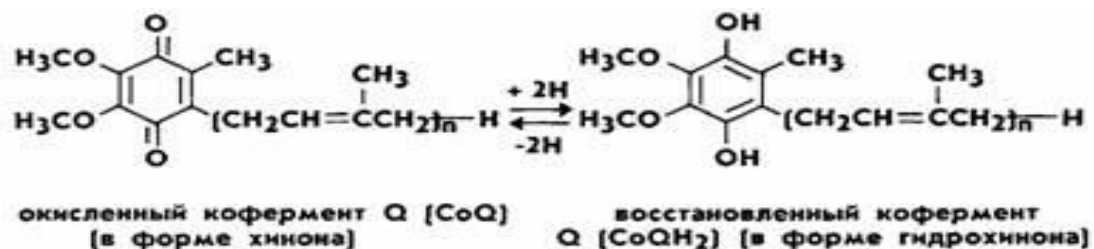
Некоторые биосинтетические реакции в организме могут протекать при участии других нуклеозидтрифосфатов, аналогов АТФ. К ним относят гуанозинтрифосфат (ГТФ), уридинтрифосфат (УТФ) и цитидинтрифосфат (ЦТФ). Все эти нуклеотиды, в свою очередь, образуются при использовании свободной энергии концевой фосфатной группы АТФ.



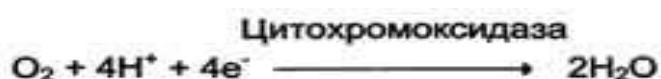
**Рисунок 4 - Гуанозинтрифосфат**

### **Организация и функционирование дыхательной цепи**

В процессе ферментативного окисления метаболитов специфическими дегидрогеназами освобождается энергия. Электроны, обладающие высоким энергетическим потенциалом, передаются от восстановленных коферментов НАДН и ФАДН<sub>2</sub> к кислороду через цепь *переносчиков*, локализованных во внутренней мембране митохондрий (убихинон или коэнзим Q; сложные белки, в состав которых входят небелковые компоненты: ФМН, железо в составе железосерных белков и порфириновых колец, ионы Cu).



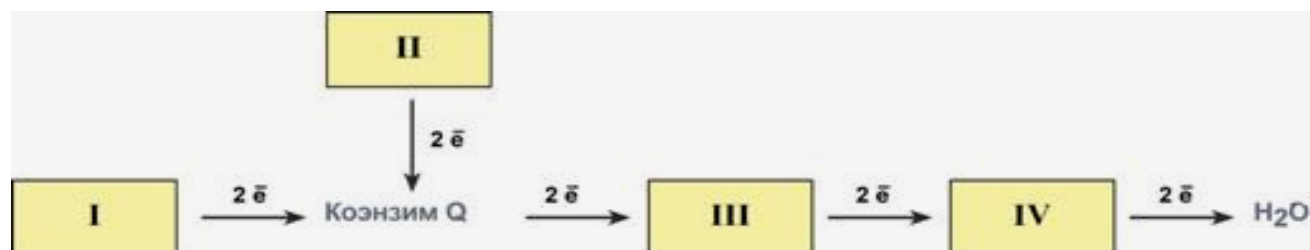
Каждый переносчик способен присоединять электроны от предыдущего компонента и передавать следующему. Так возникает цепь окислительно-восстановительных реакций, в результате которых происходят восстановление кислорода и синтез воды. Другими словами, восстановление молекулы O<sub>2</sub> происходит в результате переноса 4 электронов. При каждом присоединении к кислороду 2 электронов, поступающих к нему по цепи переносчиков, из матрикса поглощаются два протона и образуется молекула H<sub>2</sub>O:



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

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

Цитохромы (гемопротеины) присутствуют во всех типах организмов. В клетках эукариотов они локализованы в митохондриальных мембранах и эндотелиальном ретикуле (ЭР). Известно около 30 различных цитохромов, которые в качестве простетической группы содержат гем. В зависимости от способности поглощать свет в определённой части спектра цитохромы делят на группы а, b, с. Внутри каждой группы отдельные виды с уникальными спектральными свойствами обозначают цифровыми индексами (b, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> и т.д.). Структурные особенности разных видов цитохромов определяют различие в их окислительно-восстановительных потенциалах. В дыхательной цепи участвуют 5 типов цитохромов: а, а<sub>3</sub>, b, с, с<sub>1</sub>. За исключением цитохрома с, все остальные находятся во внутренней мембране митохондрий в виде сложных белковых комплексов.



**Схема 2 - Функционирование дыхательной цепи**

*I* – НАДН; *II* – Флавопротеид + АТФ; *III* – Цитохром b + АТФ → Цитохром с<sub>1</sub>;

*IV* – Цитохром с + АТФ → Цитохром а → Цитохром а<sub>3</sub>

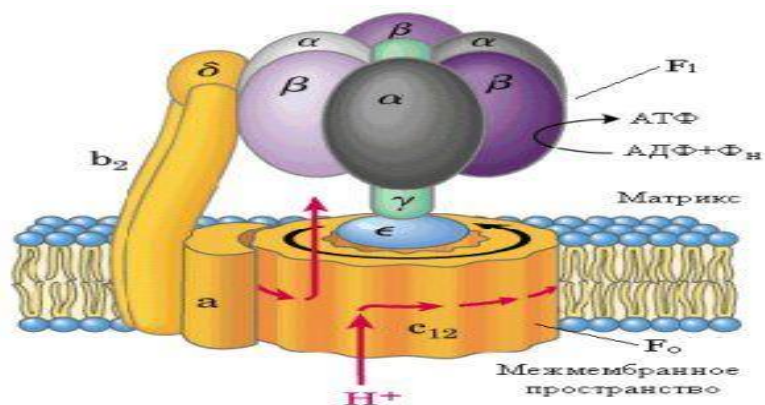
**1 комплекс:** имеет рабочее название НАДН-КоQ-оксидоредуктаза или НАДН-дегидрогеназа. Содержит ФМН, 22 белковых молекулы, из них 5 железосерных белков. *Функция:* принимает электроны от НАДН и передает их на убихинон; переносит 4 иона  $H^+$  на наружную поверхность внутренней митохондриальной мембраны.

**2 комплекс:** ФАД-зависимые дегидрогеназы. Данный комплекс как таковой не существует, его выделение условно. Он включает в себя ФАД-зависимые ферменты, расположенные на внутренней мембране – например, ацил-SКоА-дегидрогеназа (осуществляет окисление жирных кислот), сукцинатдегидрогеназа (участвует в цикле трикарбоновых кислот), митохондриальная глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа (это челночный механизм переноса НАДН в митохондрию). *Функция:* восстановление ФАД в окислительно-восстановительных реакциях; обеспечение передачи электронов от ФАДН<sub>2</sub> на железосерные белки внутренней мембраны митохондрий; далее эти электроны попадают на коэнзим Q.

**3 комплекс** – КоQ-цитохром-с-оксидоредуктаза. Он включает цитохромы b, c<sub>1</sub> и 2 железосерных белка. *Функция:* принимает электроны от коэнзима Q и передает их на цитохром c; переносит 2 иона  $H^+$  на наружную поверхность внутренней митохондриальной мембраны.

**4 комплекс:** Цитохром-с-кислородоксидоредуктаза (цитохромоксидаза). В этом комплексе находятся цитохромы a и a<sub>3</sub>. Содержит 6 полипептидных цепей и 2 иона меди. Комплекс цитохромов a-a<sub>3</sub> непосредственно реагирует с молекулярным кислородом. *Функция:* принимает электроны от цитохрома c и передает их на кислород с образованием воды; переносит 4 иона  $H^+$  на наружную поверхность внутренней митохондриальной мембраны.

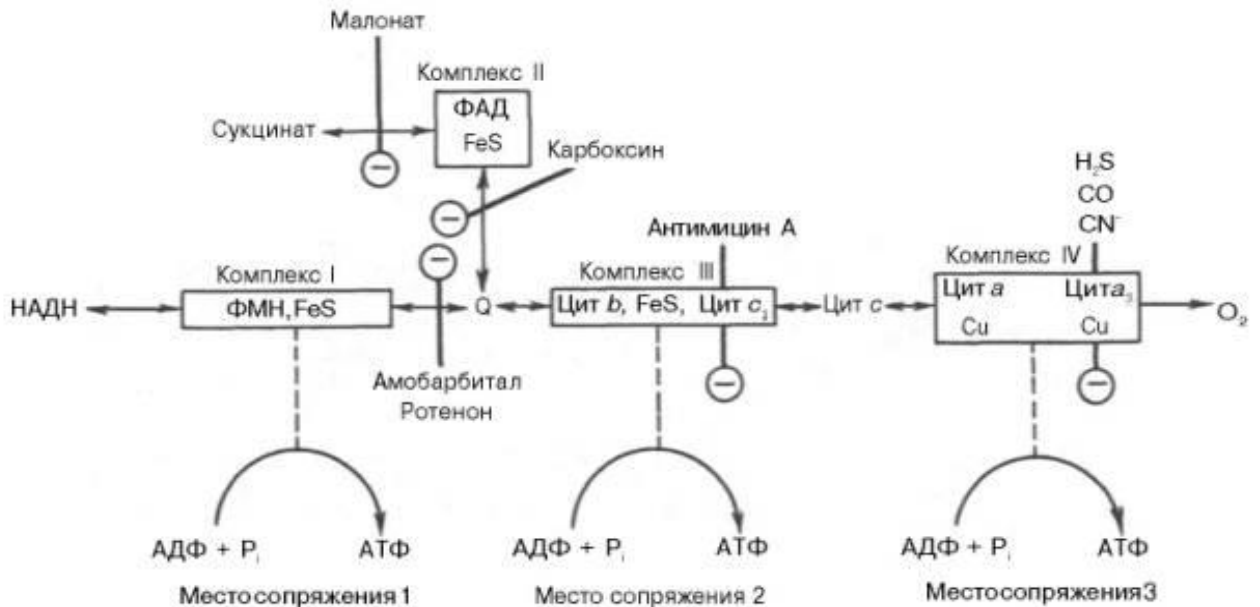
Чтобы понять связь между транспортом электронов по дыхательной цепи и синтезом АТФ, познакомимся с **5 комплексом** внутренней мембраны митохондрий — ферментом, осуществляющим реакцию синтеза АТФ и называемым протонной АТФ-синтазой, Комплекс состоит из множества белковых цепей, подразделенных на две большие группы: одна группа формирует субъединицу F<sub>0</sub> (о – олигомицин-чувствительная), она встроена в мембрану и пронизывает ее насквозь (Рис. 5). Функция: каналобразующая, по ней выкачанные наружу протоны водорода устремляются в матрикс. Другая группа образует субъединицу F<sub>1</sub> – по форме напоминает шляпку гриба или дверную ручку и обращена в матрикс митохондрии, ее функция каталитическая, именно она, используя энергию протонов, синтезирует АТФ. Упрощенно считают, что для синтеза 1 молекулы АТФ необходимо прохождение приблизительно 3-х протонов  $H^+$ .



**Рисунок 5 - Пятый комплекс внутренней мембраны митохондрий**

## Механизм сопряжения окисления с фосфорилированием

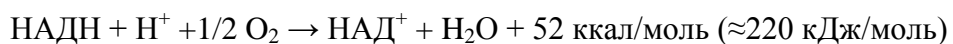
Транспорт электронов по ЦПЭ к кислороду сопровождается снижением свободной энергии, которое происходит на каждом этапе ЦПЭ, и энергия электронов выделяется порциями.



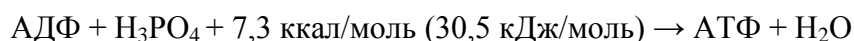
**Рисунок 6 – Взаимное расположение компонентов дыхательной цепи с указанием мест фосфорилирования и специфических ингибиторов**

Вместе с тем в дыхательной цепи можно выделить 3 участка (местоположения), в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии (Рис. 6). Эти этапы способны обеспечить энергией синтез АТФ, так как количество выделяющейся свободной энергии приблизительно равно энергии, необходимой для синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Экспериментально было подтверждено, что процесс переноса электронов по ЦПЭ и синтез АТФ энергетически сопряжены.

*Первый процесс* (экзергонический) - перенос электронов от восстановленных коферментов НАДН и ФАДН<sub>2</sub> через ЦПЭ на кислород. Например:



*Второй процесс* (эндергонический) - фосфорилирование АДФ, или синтез АТФ:



Синтез АТФ из АДФ и H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> за счёт энергии переноса электронов по ЦПЭ называют окислительным фосфорилированием.

Окисление молекулы НАДН в ЦПЭ сопровождается образованием 3 молекул АТФ; электроны от ФАД-зависимых дегидрогеназ поступают в ЦПЭ на КоQ, минуя первый пункт сопряжения. Поэтому образуются только 2 АТФ. Отношение количества фосфорной кислоты

(P), использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода (O), поглощённого в процессе дыхания, называют коэффициентом окислительного фосфорилирования и обозначают P/O. Следовательно, для НАДН  $P/O = 3$ , для сукцината (или флавопротеида)  $P/O = 2$ . Эти величины отражают теоретический максимум синтеза АТФ, фактически эта величина меньше.

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ  
ПО ТЕМЕ: МЕТАБОЛИЗМ  
РАБОТА 1. СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА МЫШЦ И КОНКУРЕНТНОЕ  
ТОРМОЖЕНИЕ ЕЁ АКТИВНОСТИ**

**Принцип метода.** Метод основан на инактивации фермента путем действия температуры.

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином и прочно связана с клеточной структурой. В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол (синего цвета), который, восстанавливаясь, превращается в бесцветную лейкоформу. Источником фермента служит отмытая мышечная ткань (кашица). Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты ( $\text{HO}-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), являющейся структурным аналогом янтарной кислоты.

**Ход анализа.**

1. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды, затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку, и промывают 25 мл дистиллированной воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой с 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки.

2. Содержимое первой пробирки кипятят в течение 1-2 минут для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактив.

Через 15 минут наблюдают исчезновение синей окраски только во второй пробирке (табл.6).

Таблица 6

№ пробы	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Краситель
1	1	0,5	-	2 капли
2	1	0,5	-	2 капли
3	-	0,5	-	2 капли
4	1	-	0,5	2 капли

**Оборудование**

- 1.Материал исследования: мышечная кашица.
- 2.Реактивы и оборудование: 1% янтарная кислота, 1% малоновая кислота, 0,01% 2,6-дихлорфенолиндофенол.
- 3.Пробирки.
- 4.Воронки, стеклянные палочки.
- 5.Бюретки, ступки.
- 6.Марлевые фильтры, пинцеты.
- 7.Водяная баня.
- 8.Термостат.

## **РАБОТА 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЫШЦ (АТФ И КРЕАТИНФОСФАТА)**

**Принцип метода.** Метод основан на фотоколориметрическом определении оптической плотности неорганического фосфора и фосфатных солей в экстракте мышечной ткани.

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцы большим количеством энергии.

Основным путём образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе.

Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфорный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде – так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после гидролиза даёт представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

### **Ход анализа.**

1. 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в неё 5 мл охлаждённого раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 минут. Экстракт фильтруют в мерную колбу, стоящую в ледяной бане.

Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 минут на холоде. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную колбу и доводят общий объём до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая пробирка - контрольная, вторая - опытная.

В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 н HCl, закрывают фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 минут для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 н гидроксида натрия.

В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 н раствора соляной кислоты и 1 мл 1 н гидроксида натрия.

В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объема 10 мл.

3. Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробирками. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 минут.

4. Контрольную и опытную пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе – только фосфатные соли.

5. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

*Р а с ч ё т.* Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 100 г сырой ткани, учитывая разведение:  $X = A \cdot 3,3 \cdot 400 \cdot 100$ , где X – содержание макроэргических соединений в пересчёте на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани, мг/100 г; А – содержание АТФ в пробе, мг;  $3,3 \cdot 400$  – коэффициент пересчёта на 1 г ткани с учётом разведения растворов.

## **Оборудование**

1. Материал исследования: мышечная ткань
2. Реактивы: 2,5% ТХУ, 1 н соляная кислота, 1 н гидроксид натрия, 1% молибдат аммония, 1% аскорбиновая кислота.
3. Пробирки; пипетки.
4. Воронки, фильтры.
5. Мерная пробирка или цилиндр вместимостью 10 мл.
6. Ледяная и кипящая водяные бани
7. Фотоэлектроколориметр.
8. Кюветы с толщиной слоя 1 см.

## **ЛИТЕРАТУРА**

### **Основная**

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 2012. - 704 с. ISBN 978-5-2251-0013-1.
2. *Данилова, Н. С.*, Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов : учебное пособие / Н. С. Данилова. - М. : Колос С, 2008. - 280 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0513-9

3. *Пустовалова, Л. М.*, Основы биохимии для медицинских колледжей [Текст] : учебное пособие / Л. М. Пустовалова. - Ростов н/Д. : Феникс, 2003. - 448 с. - (Серия "Медицина для вас"). - ISBN 5-222-03395-3

Д о п о л н и т е л ь н а я

1. *Гидранович, В.И.* Биохимия. Минск: ТетраСистемс, – 2012. – 528 с. ISBN 978-985-536-244-0

2. *Ловцова, Л.Г.*, Биохимия. Методические указания./ Смутнев П.В., – Саратов, 2013. – 70с. ISBN 978-5-9999-1808-6

3. *Таганович, А.Д.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с. ISBN 978-985-528-710-1.

## ТЕМА 2. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

**Цель:** приобрести практические навыки по исследованию продуктов белкового обмена.

**Актуальность темы:** В организме все белки подвергаются постоянному распаду и синтезу. Для оценки состояния обмена белков весьма точным критерием является определение азотистого баланса.

Обмен белков занимает особое место в многообразных превращениях веществ. Выполняя ряд уникальных функций, белки определяют не только микро- и макроструктуру отдельных субклеточных образований, специфику организации клеток, органов и целостного организма, но и в значительной степени динамическое состояние между организмом и окружающей его средой. Белковый обмен строго специфичен, направлен на обеспечение непрерывности воспроизводства и обновления белков организмов.

В животных организмах из белков состоит мышечная ткань, эпидермис, гладкая мускулатура, форменные элементы крови, хрящи. Все необходимые аминокислоты получают с белковой пищей. В процессе пищеварения, разлагая белки пищи до исходных аминокислот, используют их для создания своих специфических белков.

Кроме того, как известно, при сгорании белков освобождается энергия, которая может быть заменена энергией окисления углеводов и липидов, однако при длительном исключении последних из пищи у животных не наблюдается существенных патологических отклонений. Тогда как исключение белков из пищи (малобелковая диета) даже на короткий срок приводит к выраженным нарушениям – белковая недостаточность (уменьшение массы тела, органов, тканей, снижение активности ферментов, замедление процессов биосинтеза белков и т.д.).

**Азотистый баланс:** Поскольку часть пищи представлена белками (в 100г белка – 16г азота) считают, что критериями правильной оценки состояния обмена белков является определение *азотистого баланса* – количественная разница между введением с пищей азота и выделением его в виде конечного продукта.

Если в организме за сутки выводится меньше азота, чем было введено его с пищей, то такой баланс называют *положительный азотистый баланс*. При нем преобладают процессы анаболизма белков органов и тканей. Характерен для растущих организмов и для периода беременности.

Если количество азота, принятого с пищей, оказывается меньше выводимого с калом и мочой, то баланс называется *отрицательным*, при нем усиливаются процессы распада белков органов и тканей. Наблюдается при голодании, белковой недостаточности разной степени, инфекциях, тяжелых заболеваниях и в пожилом возрасте.

В состоянии *азотистого равновесия* количество азота, выделившегося организмом равен количеству получаемого с пищей. Характерно для взрослых животных, находящихся на здоровой полноценной диете.

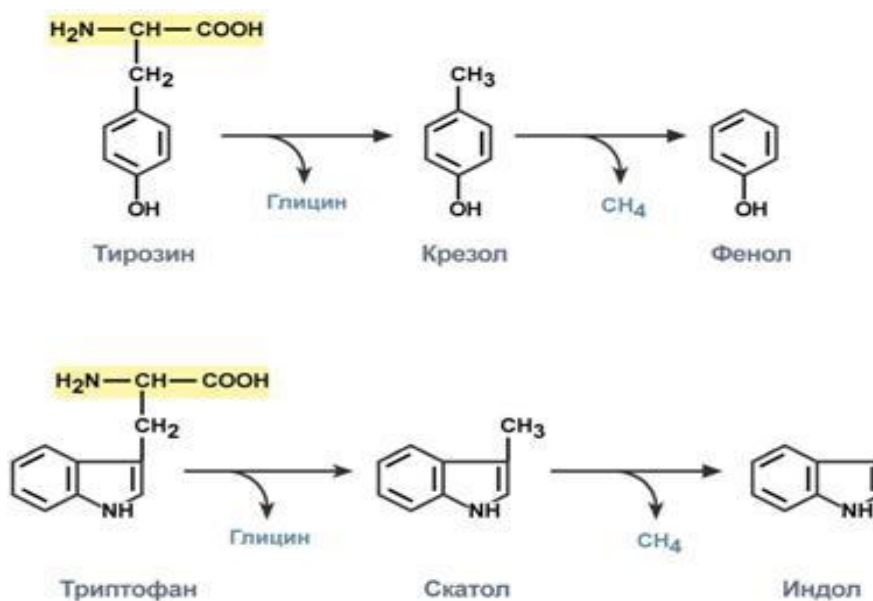
## Переваривание белков и всасывание продуктов распада в желудочно-кишечном тракте. Гниение белков в кишечнике

В желудке имеются все условия для переваривания белков, т.к. в желудке содержится активный фермент *пепсин* и *свободная соляная кислота*, которая переводит неактивный пепсиноген в активный пепсин и создает оптимальные условия для его действия (рН 1,5-2,5). Также в присутствии соляной кислоты происходят набухание белков, частичная денатурация и, возможно, гидролиз сложных белков. Она стимулирует выработку секретина в двенадцатиперстной кишке, ускоряет всасывание железа и оказывает бактерицидное действие.

Пепсин, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных остатками ароматических аминокислот, расщепляет практически все природные белки, исключение составляют некоторые кератины, проламины, гистоны и мукопротеины. У молодняка эту функцию выполняет белок – *ренин*.

Дальнейшее превращение белков пищи осуществляется в тонкой кишке под действием ферментов панкреатического и кишечного соков. *Трипсин* и *химотрипсин* действуют в слабокислой среде (рН 7,2-7,8) аналогично пепсину, разрывают другие пептидные связи, образуя различной длины пептиды и свободные аминокислоты. После этого на белки действуют ферменты – *пептидазы*, которые отщепляют по одной аминокислоте от полипептида, образуя вначале дипептиды, затем аминокислоты. Свободные аминокислоты всасываются через мембраны стенки кишечника в кровь.

Часть не расщепившихся белков и не всосавшихся аминокислот подвергаются в толстом кишечнике гниению, под действием микроорганизмов, ферменты которых способствуют катаболизму и образованию 4 видов газов: метана, сероводорода, аммиака и углекислого газа, а также ядовитых веществ: фенола, индола, скатола, крезола и других (Рис. 7). Все эти превращения аминокислот, вызванные деятельностью микрофлоры кишечника, получили общее название «гниение белков в кишечнике»:



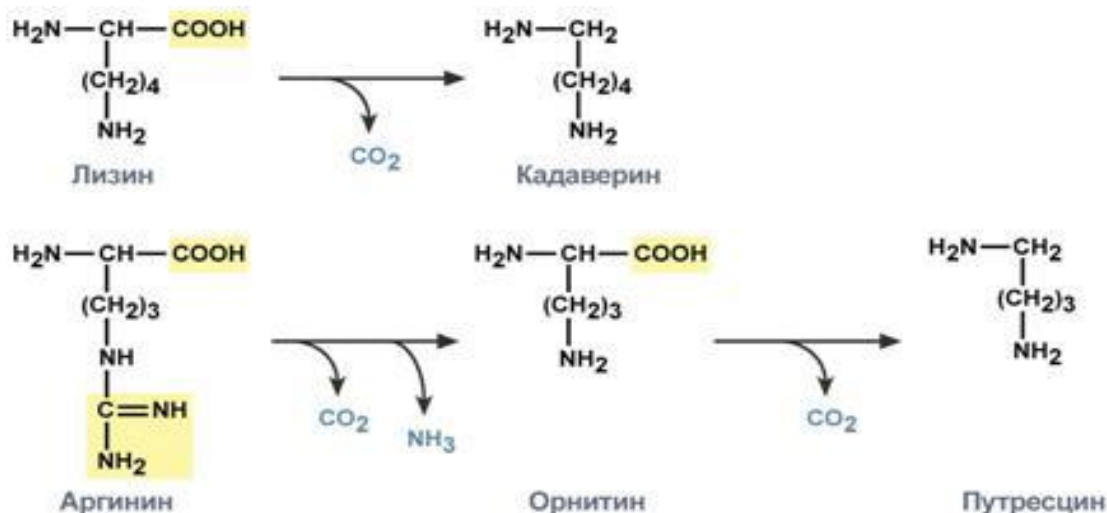


Рисунок 7 – Гниение аминокислот в кишечнике

После всасывания эти продукты через воротную вену попадают в печень, где подвергаются обезвреживанию с образованием нетоксических веществ, которые выделяются с мочой.

### Общие пути промежуточного обмена аминокислот в тканях

Всосавшиеся аминокислоты с кровью доносятся до всех органов и тканей. Здесь они используются либо для синтеза белка, либо сгорают или расщепляются до конечных продуктов. Условно промежуточный обмен аминокислот можно разделить на общие пути обмена и индивидуальные превращения отдельных аминокислот.

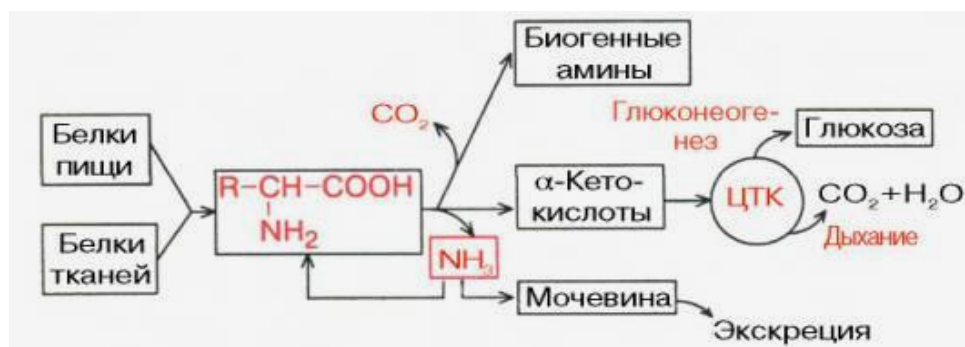
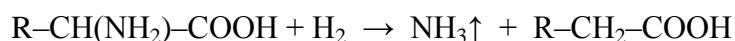


Рисунок 8 – Катаболизм аминокислот

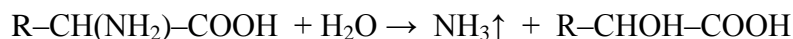
Общие пути обмена аминокислот:

**Дезаминирование аминокислот** – это отщепление аминогруппы в виде аммиака. Различают 4 вида дезаминирования:

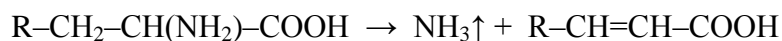
*Восстановительное дезаминирование*



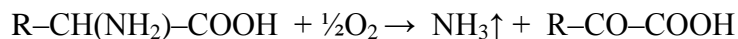
*Гидролитическое дезаминирование*



*Внутримолекулярное дезаминирование*

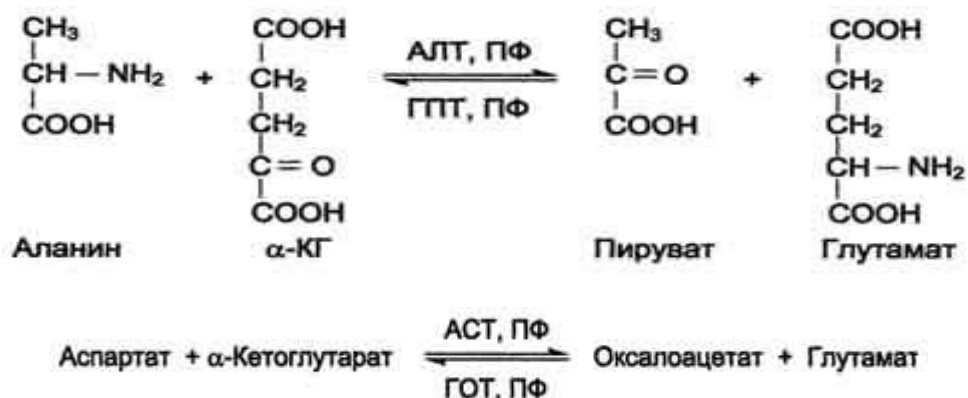


*Окислительное дезаминирование*

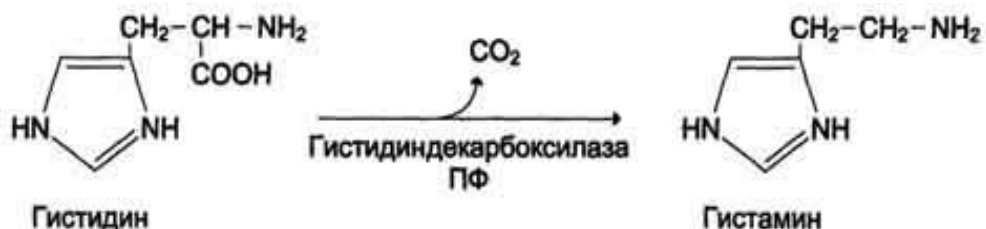


Помимо аммиака продуктами дезаминирования являются жирные кислоты, окси- и кетокислоты, которые затем поступают в соответствующие циклы или цепи биохимических реакций. Важную роль для животных тканей играет окислительное дезаминирование, поставляя кетокислоты, из которых затем синтезируются заменимые аминокислоты и другие соединения.

2. **Трансаминирование аминокислот** – это реакции межмолекулярного переноса аминогруппы от аминокислоты на кетокислоту без промежуточного образования аммиака. Это обратимые реакции, в ходе которых образуются новые аминокислоты и кетокислоты, катализируются ферментами – аминотрансферазами:



3. **Декарбоксилирование** – отщепление карбоксильной группы в виде углекислого газа. В результате этих реакций образуются биогенные амины, оказывающие сильное фармакологическое действие на организм. В отличие от других процессов промежуточного обмена аминокислот они являются необратимыми и происходят под действием ферментов – декарбоксилаз аминокислот:

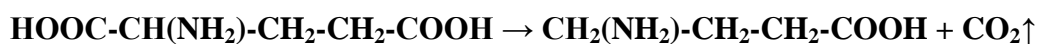


Гистамин усиливает деятельность желез внутренней секреции, обладает сосудорасширяющим свойством, поэтому большое количество его образуется в области воспаления, ускоряя приток лейкоцитов, способствуя активации защитных сил организма. Участвует в секреции соляной кислоты в желудке, поэтому широко используется в клинике при изучении секреторной деятельности желудка (гистаминовая проба). Содержание гистамина увеличивается при аллергических реакциях.

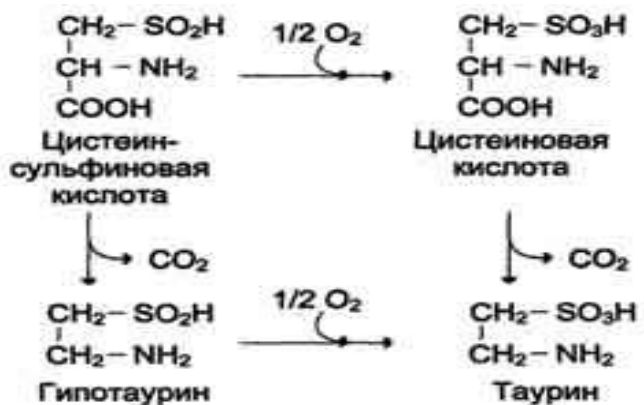
Серотонин обладает сосудосуживающим действием, регулирует артериальное давление, температуру тела, интенсивность дыхания, почечную фильтрацию, является медиатором нервных процессов.



При декарбоксилировании глутаминовой кислоты образуется  $\alpha$ -аминомасляная кислота (ГАМК), которая накапливается в мозговой ткани и тормозит скорость прохождения нервных импульсов, у животных приводит к утрате условных рефлексов:



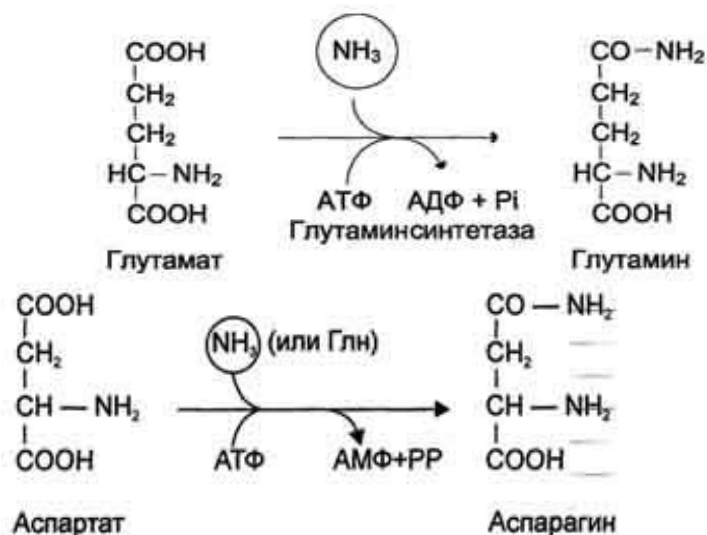
В животных тканях декарбоксилируются также два производных цистеина – цистеиновая и цистеинсульфиновая кислоты. В ходе реакций образуется таурин, который используется в организме для синтеза парных желчных кислот:



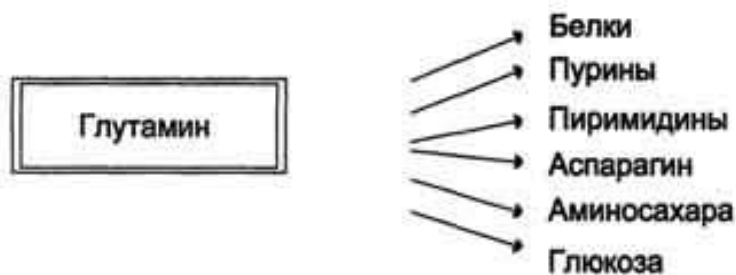
### Конечные продукты белкового обмена

Млекопитающие и человек выводят аммиак в виде мочевины и называются *уреотелическими* организмами. Птицы и наземные рептилии выделяют полужидкую мочу, в которой содержатся кристаллы мочевой кислоты и называются *урикотелическими* организмами. Следовательно, аммиак, мочевина, мочевая кислота являются конечными продуктами белкового обмена.

Аммиак является мощным цитотоксическим ядом. Одним из путей связывания и обезвреживания аммиака в организме, в частности в мозге, сетчатке, почках, печени и мышцах является биосинтез глутамина и аспарагина (*процесс амидирования*):



Высокий уровень глутамин в крови и лёгкость его поступления в клетки обуславливают использование глутамин во многих анаболических процессах. *Глутамин - основной донор азота в организме.* Амидный азот глутамин используется для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, аспарагин, аминсахаров и других соединений:

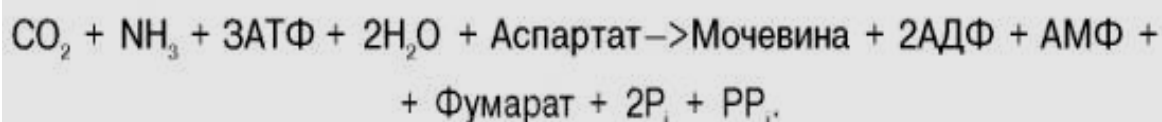


**Рисунок 2** Использование глутамин в организме

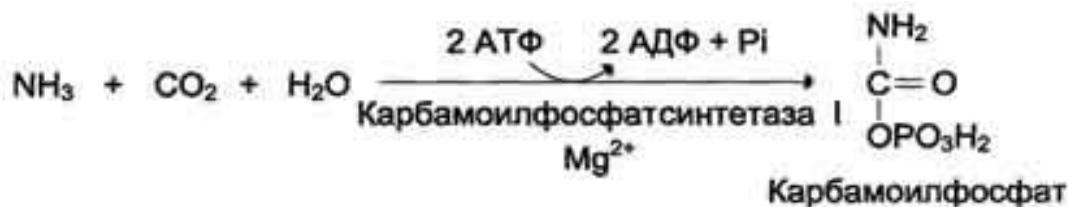
Наиболее значительные количества аммиака обезвреживаются в печени путём *синтеза мочевины*. В норме с мочой млекопитающие выделяют за счет солей мочевины около 90% азота, солей аммония - 4%, креатинина – 5% и мочевой кислоты – 1% (она образуется при распаде пуриновых азотистых оснований).

В 40-х годах XX века немецкие биохимики Г. Кребс и К. Гензелейт установили, что синтез мочевины представляет собой циклический процесс, состоящий из нескольких стадий, ключевым соединением которого, замыкающим цикл, является орнитин. Поэтому процесс синтеза мочевины получил название "*орнитиновый цикл*", или "*цикл Кребса-Гензелейта*".

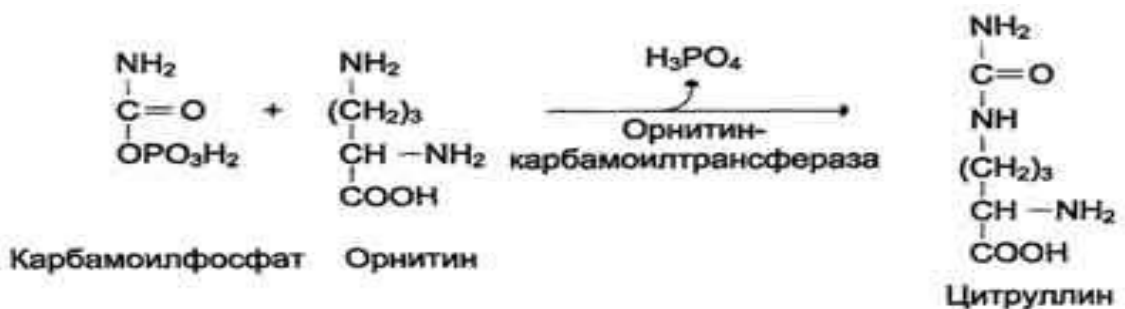
*Суммарная реакция синтеза мочевины:*



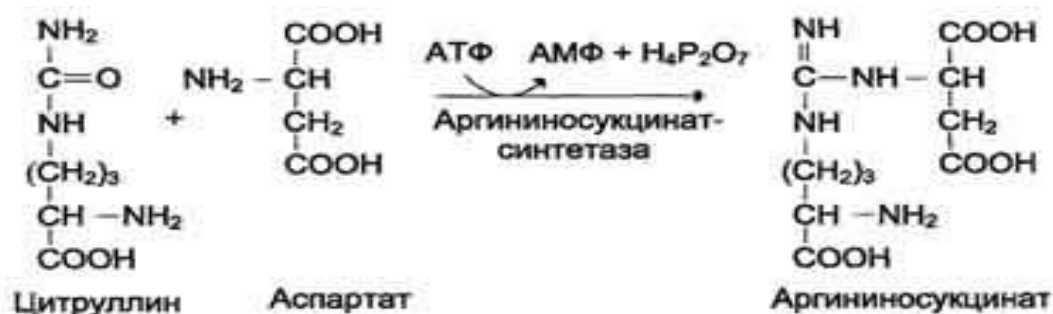
В первой реакции процесса аммиак связывается с диоксидом углерода с образованием карбамоилфосфата, при этом затрачиваются 2 молекулы АТФ. Реакция происходит в митохондриях гепатоцитов под действием фермента карбамоилфос-фатсинтетазы.



Карбамоилфосфат конденсируется с орнитином с образованием цитруллина. Реакцию катализирует орнитин-карбамоилтрансфераза:



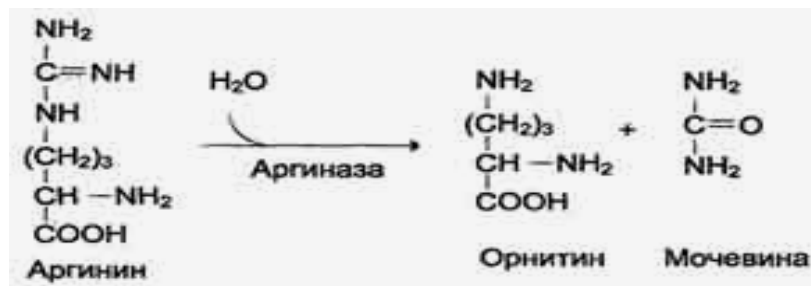
Далее аргининосукцинатсинтетаза связывает цитруллин с аспартатом и образует аргининосукцинат (аргининоянтарную кислоту). Этот фермент нуждается в ионах  $\text{Mg}^{2+}$ . В реакции затрачивается 1 моль АТФ, но используется энергия двух макроэргических связей:



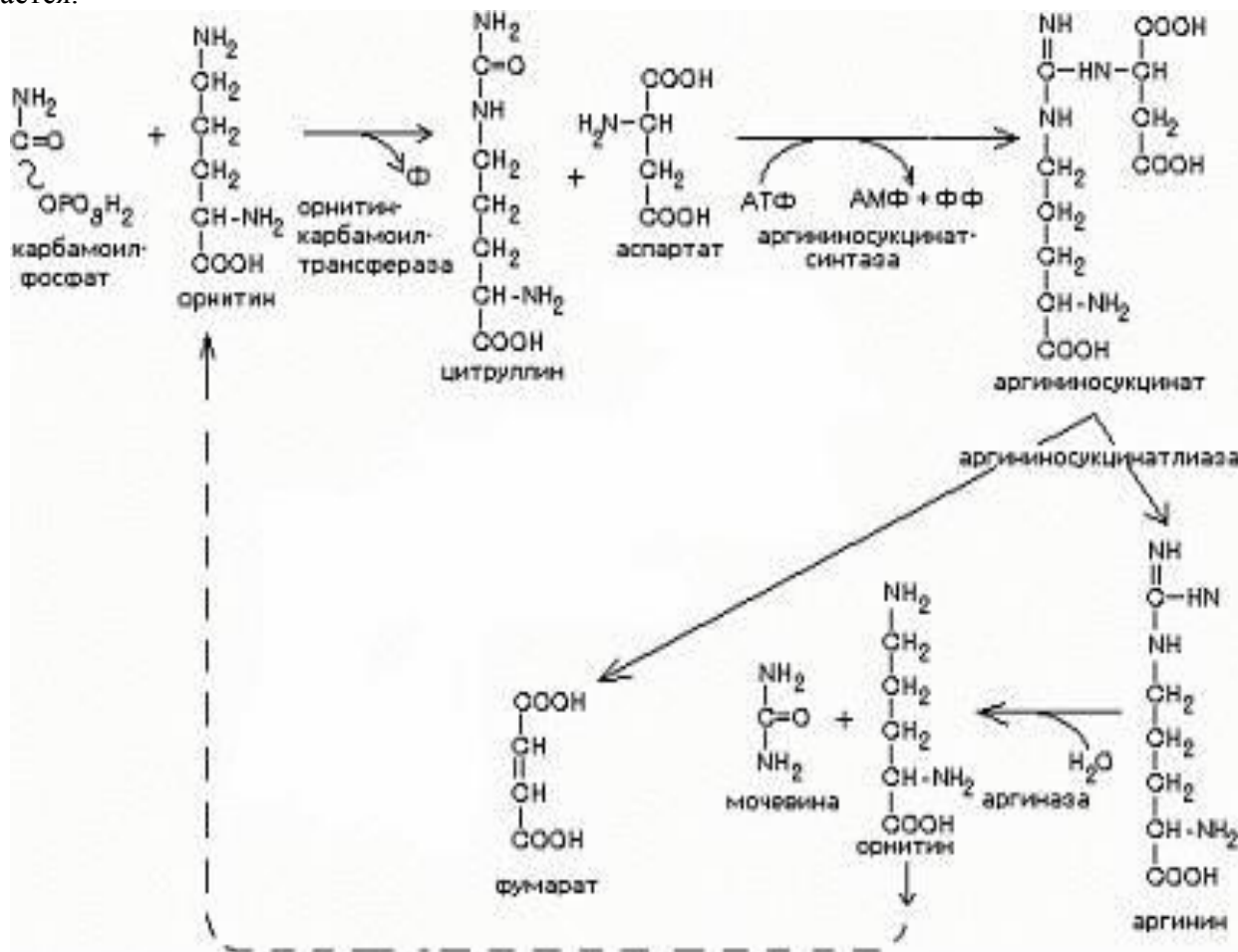
Фермент аргининосукцинатлиаза (аргининосукциназа) расщепляет аргининосукцинат на аргинин и фумарат, при этом аминогруппа аспартата оказывается в молекуле аргинина:



Аргинин подвергается гидролизу под действием аргиназы, при этом образуются орнитин и мочевина. Кофакторами аргиназы являются ионы  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ . Высокие концентрации орнитина и лизина, являющихся структурными аналогами аргинина, подавляют активность этого фермента:



Образующийся орнитин взаимодействует с новой молекулой карбамоилфосфата, и цикл замыкается.



Первые две реакции процесса происходят в митохондриях гепатоцитов. Затем цитруллин, являющийся продуктом этих реакций, транспортируется в цитозоль, где и осуществляются дальнейшие превращения. В реакциях орнотинового цикла расходуются четыре макроэргических связи трёх молекул АТФ на каждый оборот цикла.

**Биологическая роль цикла:** в печени выполняет 2 функции: 1) превращение азота аминокислот в мочевину, которая экскретируется и предотвращает накопление токсичных продуктов, главным образом, аммиака; 2) синтез аргинина и пополнение его фонда в организме.

Эффективность работы орнотинового цикла при нормальном питании и умеренных физических нагрузках составляет примерно 60% его мощности. Запас мощности необходим для избежания гипераммониемии (**повышение содержания аммиака в крови**) при изменениях количества белка в пище. Увеличение скорости синтеза мочевины происходит при длительной физической работе или длительном голодании, которое сопровождается распадом тканевых

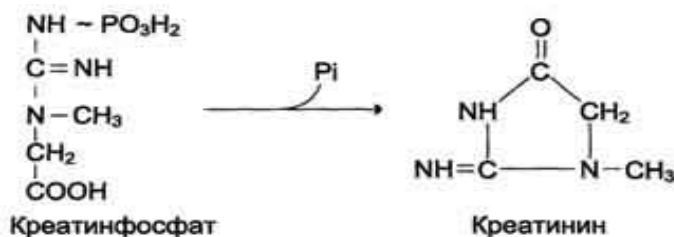
белков. Некоторые патологические состояния, характеризующиеся интенсивным распадом белков тканей (сахарный диабет и др.), также сопровождаются активацией цикла. При избыточном белковом питании количество ферментов орнитинового цикла в печени увеличивается, что приводит к интенсификации синтеза мочевины.

### Синтез креатинина

В форме креатинина, который образуется из креатина и креатинфосфата, из организма выделяется значительная часть азота аминокислот. Креатин с кровотоком переносится в мышцы и клетки мозга, где из него образуется высокоэнергетическое соединение – креатинфосфат. Эта реакция легко обратима и катализируется ферментом креатинкиназой. Фермент локализован в цитозоле и митохондриях клеток, обладает органоспецифичностью. В норме активность его в крови очень мала:



Креатинфосфат играет важную роль в обеспечении энергией работающей мышцы в начальный период. В результате неферментативного дефосфорилирования, главным образом в мышцах, креатинфосфат превращается в креатинин, выводимый с мочой. Суточное выделение креатинина у каждого индивидуума постоянно и пропорционально общей мышечной массе:



Определение содержания креатина и креатинина в крови и моче используется для характеристики интенсивности работы мышц и при некоторых патологических состояниях. Определение активности фермента креатинкиназы и его изоферментных форм в крови используется для диагностики таких заболеваний, как инфаркт миокарда, миопатии, мышечные дистрофии и др.

### Обмен сложных белков. Катаболизм пуриновых нуклеотидов

У человека и животных основной продукт катаболизма пуриновых нуклеотидов - мочевая кислота.

От АМФ и аденозина аминогруппа удаляется гидролитически аденозиндезаминазой с образованием ИМФ или инозина. ИМФ и ГМФ превращаются в соответствующие нуклеозиды: инозин и гуанозин под действием 5'-нуклеотидазы. Пури́ннуклеозидфосфори́лаза катализирует расщепление N-гликозидной связи в инозине и гуанозине с образованием рибозо-1-фосфата и азотистых оснований: гуанина и гипоксантина. Гуанин дезаминируется и превращается в

ксантин, а гипоксантин окисляется в ксантин с помощью ксантинооксидазы, которая катализирует и дальнейшее окисление ксантина в мочевую кислоту (рисунок 3).

Ксантинооксидаза - аэробная оксидоредуктаза, простетическая группа которой включает ион молибдена, железа ( $Fe^{3+}$ ) и FAD. Подобно другим оксидазам, она окисляет пурины молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода. В значительных количествах фермент обнаруживается только в печени и кишечнике.

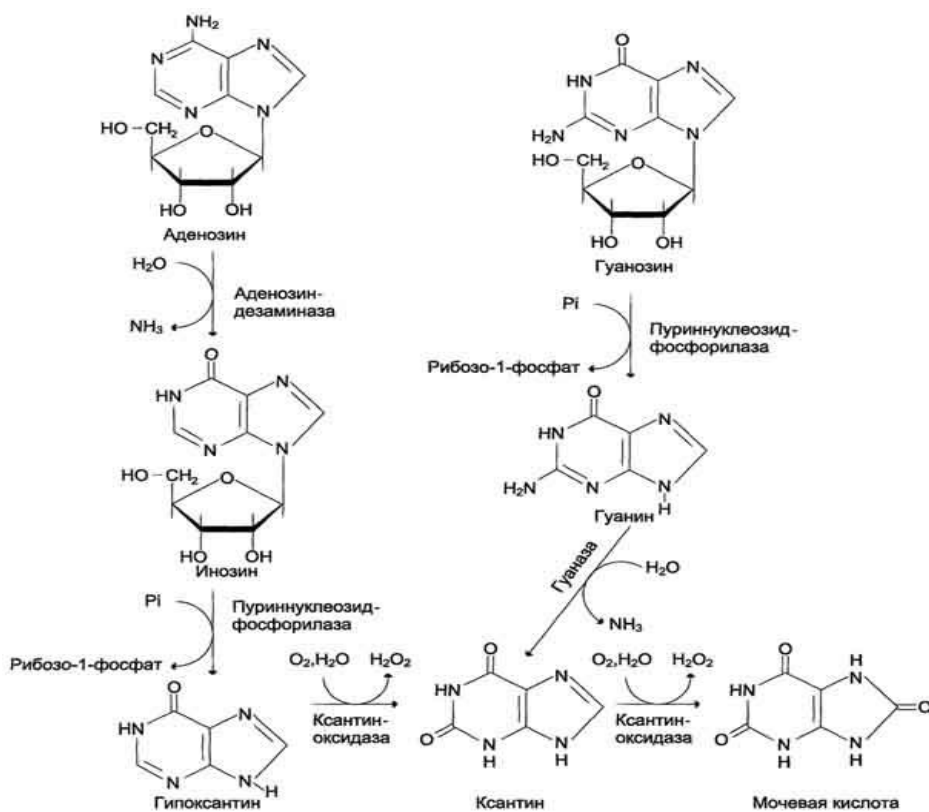
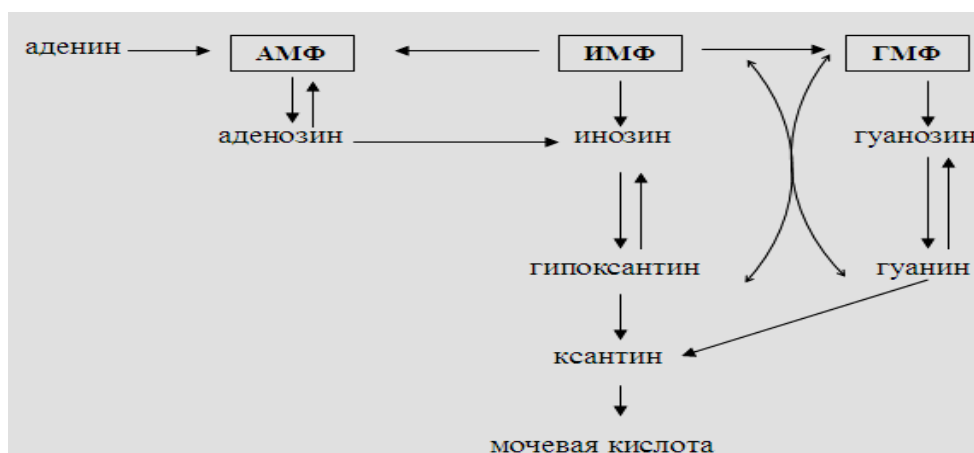


Рисунок 3 - Катаболизм пуриновых нуклеотидов до мочевой кислоты

Мочевая кислота удаляется из организма с мочой и немного через кишечник с фекалиями. У всех млекопитающих, кроме приматов и человека, имеется фермент уриказы, расщепляющий мочевую кислоту с образованием аллantoина, хорошо растворимого в воде.

Амфибии, птицы и рептилии, подобно человеку, лишены уриказы и экскретируют мочевую кислоту и гуанин в качестве конечных продуктов обмена.

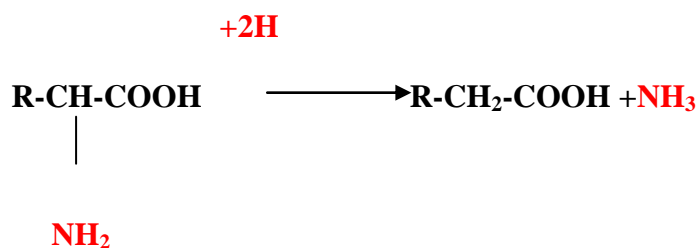
Мочевая кислота является слабой кислотой. Содержание недиссоциированной формы и солей (уратов) зависит от pH раствора. При физиологических значениях pH у мочевой кислоты может диссоциировать только один протон из трёх (pK = 5,8), поэтому в биологических жидкостях присутствует как недиссоциированная кислота в комплексе с белками, так и её натриевая соль.

В сыворотке крови в норме содержание мочевой кислоты составляет 0,15-0,47 ммоль/л или 3-7 мг/дл. Ежедневно из организма выводится от 0,4 до 0,6 г мочевой кислоты и уратов.

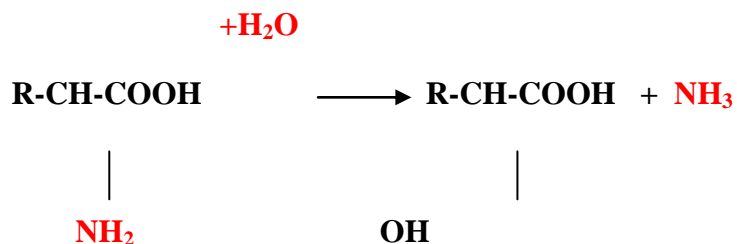
### Общие пути обмена аминокислот

А. Дезаминирование – отщепление аминогруппы различают следующие его виды: восстановительное (встречается у анаэробных микроорганизмов), гидролитическое (обнаружено у плесеней, бактерий, в отношении ароматических аминокислот у животных), внутримолекулярное (характерно для растений, микроорганизмов, у животных так дезаминируется гистидин), окислительное (наблюдается у животных и человека):

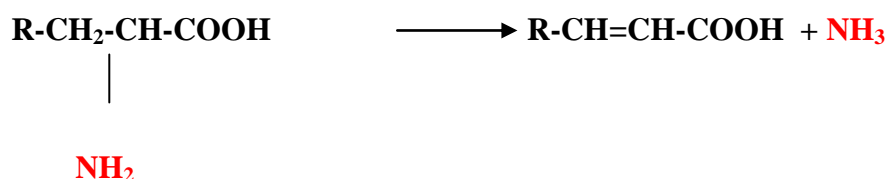
#### 1. Восстановительное дезаминирование



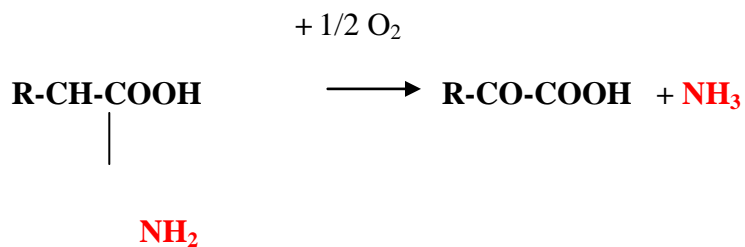
#### 2. Гидролитическое дезаминирование



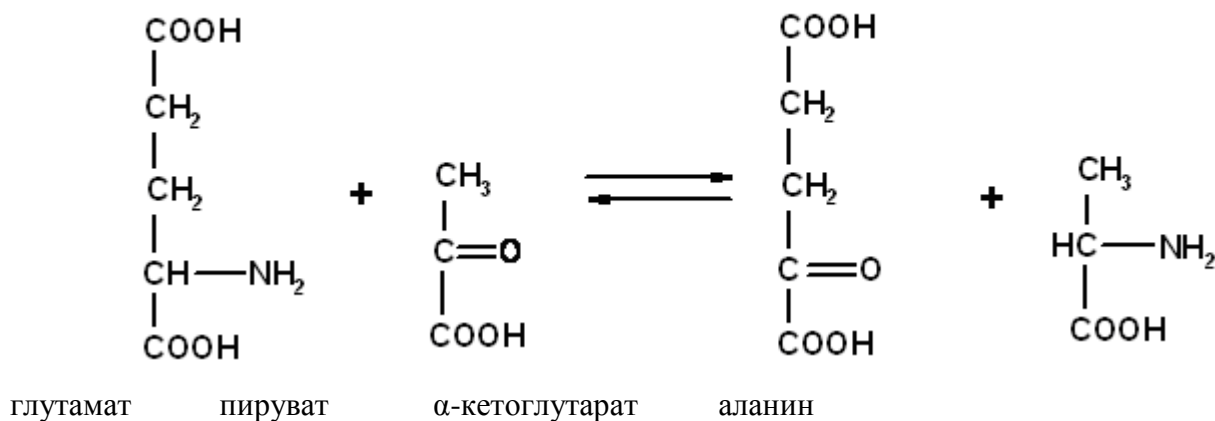
#### 3. Внутримолекулярное дезаминирование



#### 4. Окислительное дезаминирование



Б. трансаминирование (переаминирования) – процесс переноса аминогруппы аминокислоты на кетокислоту с образованием новой аминокислоты и кетокислоты без выделения высокотоксического аммиака

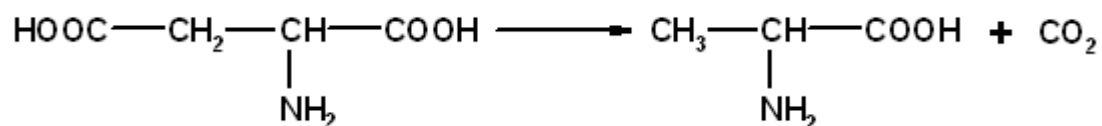


В. Декарбоксилирование – процесс отщепления карбоксильной группы в виде диоксида углерода.

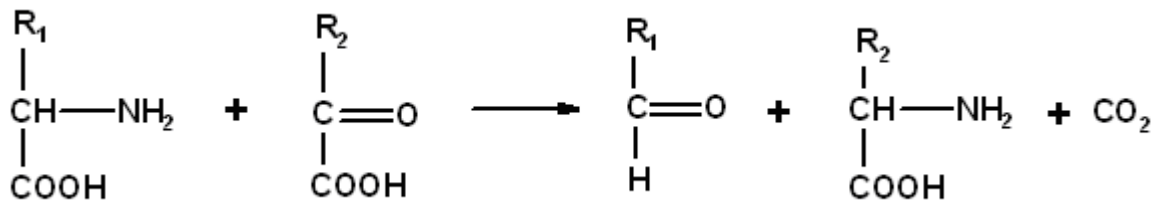
Известно четыре типа декарбоксилирования аминокислот, которые возможны в живых организмах:

1. α-Декарбоксилирование, характерно для тканей животных, при этом от аминокислот отщепляется карбоксильная группа, стоящая по соседству с α-углеродным атомом.

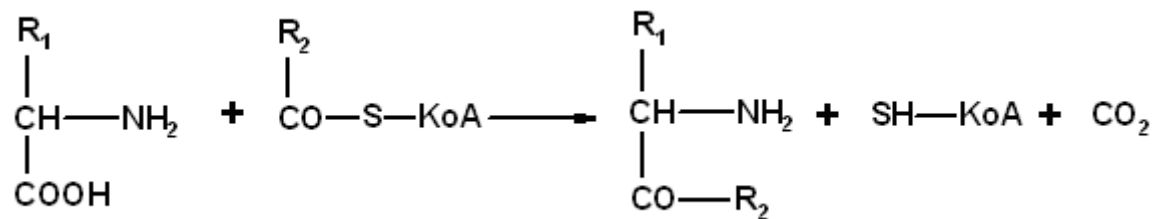
2. ω-Декарбоксилирование, свойственное микроорганизмам. Например, из аспарагиновой кислоты этим путем образуется α-аланин:



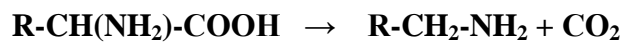
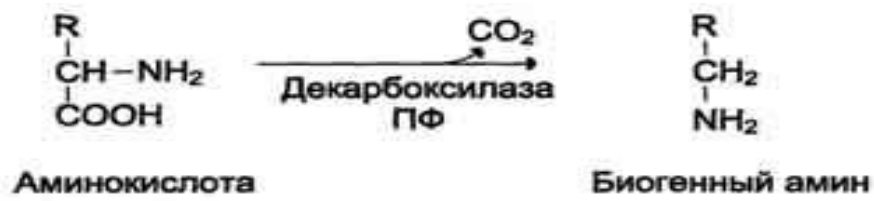
3. Декарбоксилирование, связанное с реакцией трансаминирования:



4. Декарбоксилирование, связанное с реакцией конденсации двух молекул:



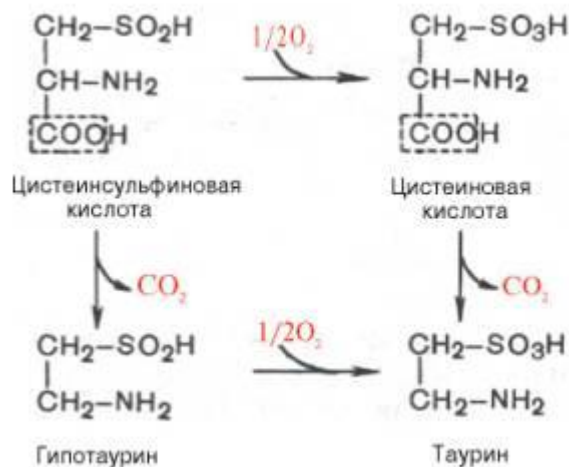
Из большинства аминокислот под влиянием декарбоксилаз образуются первичные амины, их называют иначе протеиногенными или биогенными аминами:



аминокислота

биогенный амин

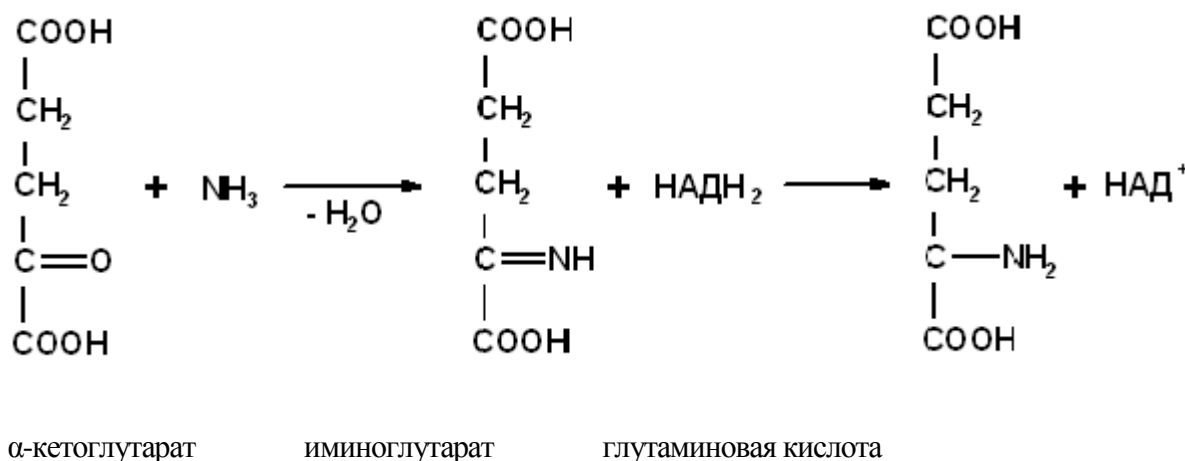
Образование биогенных аминов – сущность гнилостного распада белков.



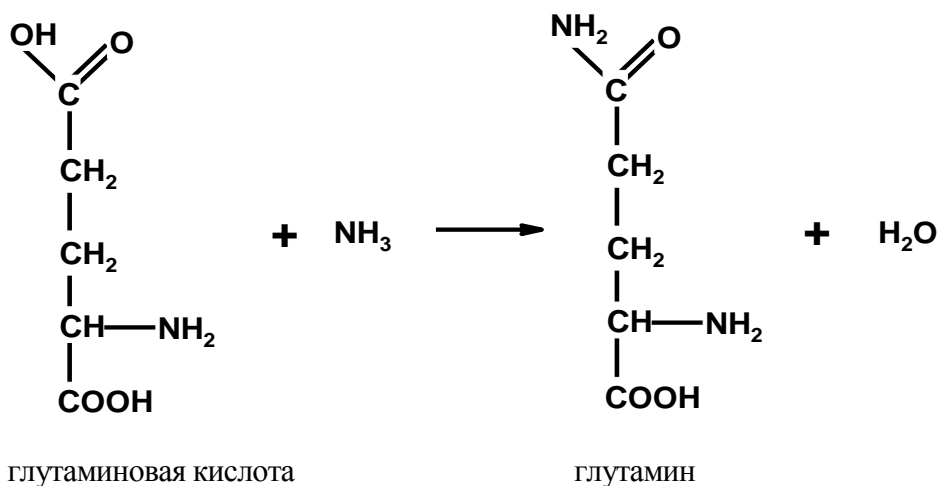
**Обезвреживание аммиака в организме.**

Млекопитающие и человек выводят аммиак, главным образом, в виде мочевины, они называются **уреотелическими** организмами. Костные рыбы выделяют аммиачный азот в виде аммиака - это **аммонителические** организмы. Наконец, птицы и наземные рептилии выделяют полужидкую мочу, в которой содержатся кристаллы мочевой кислоты; они называются **урикотелическими** организмами. Аммиак, мочевины, мочевая кислота – конечные продукты азотистого обмена.

Эволюционно выработалось несколько механизмов детоксикации аммиака. Так, аммиак в виде аммонийных солей постоянно выводится из организма с мочой. В процессе восстановительного аминирования аммиак связывается с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой с образованием глутаминовой кислоты:



Важнейшим механизмом обезвреживания аммиака является не только синтез глутаминовой кислоты, но и двух амидов: глутамина и аспарагина:

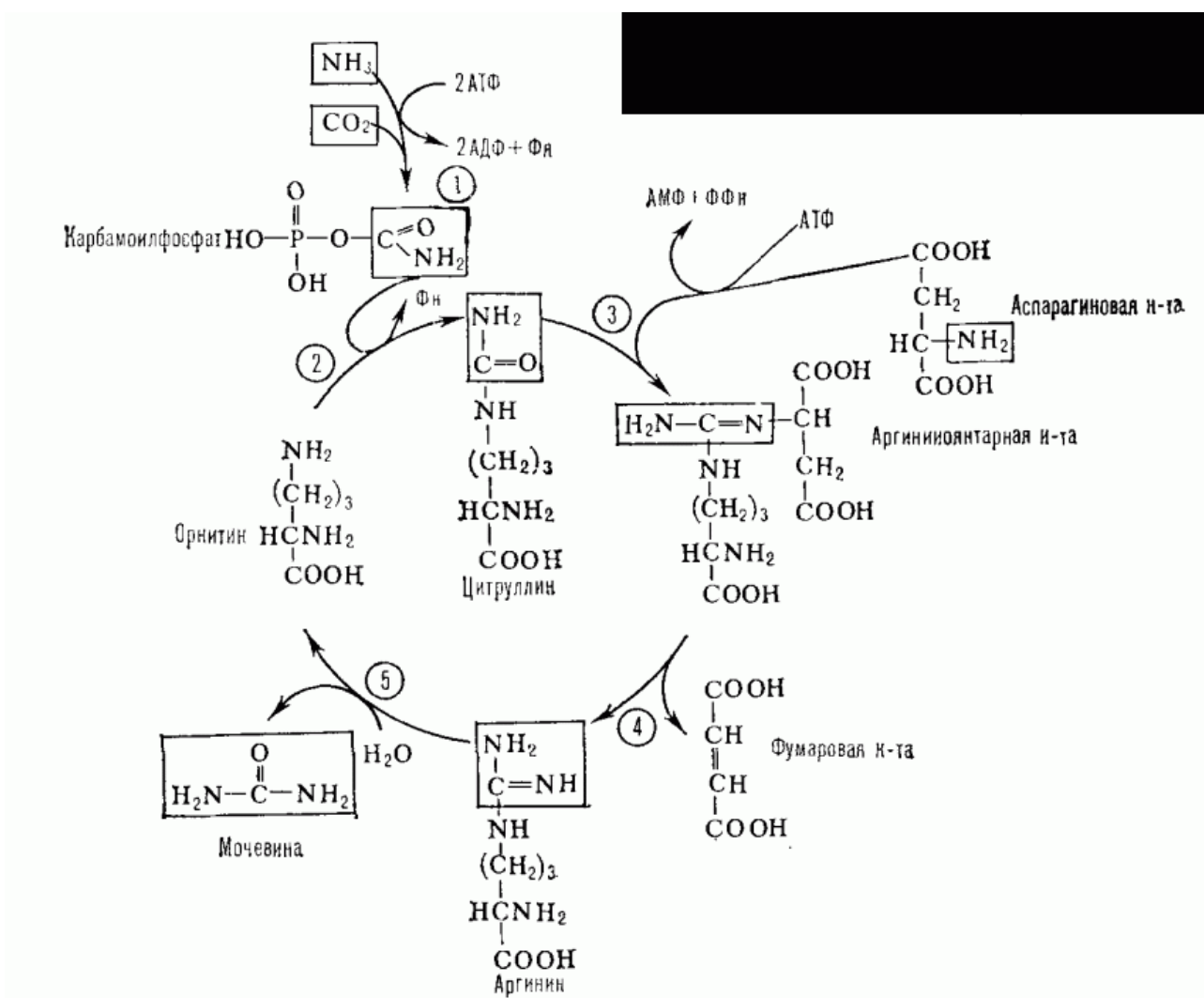


Этот процесс протекает в мозге, сетчатке, почках, печени и мышцах, он называется амидированием. В качестве примера приведем образование глутамина. Второй амид – аспарагин, образуется по аналогичной схеме.

Однако основной путь детоксикации аммиака связан с синтезом мочевины. В норме с мочой люди выделяют за счет солей мочевины около 90% азота, а за счет солей аммония около 4%. Впервые

И.П.Павлов и его ученики (Н.В.Ненцкий, И.Залеский, С.С.Салазкин) показали на основании своих экспериментов, что мочевина образуется в печени. Современные представления о биосинтезе мочевины в организме высших животных и человека связаны с именем Кребса и его сотрудников. Еще в 1932г они, инкубируя срезы печени со многими аминокислотами, показали, что лишь орнитин, цитруллин и аргинин значительно увеличивали скорость синтеза мочевины. Причем, катализатором этого процесса являлся орнитин. Так было постулировано наличие **орнитинового цикла мочевинообразования**.

Реакции биосинтеза мочевины последовательно катализируют следующие ферменты: карбамоилфосфатсинтетаза I, орнитин-карбамоилтрансфераза, аргининсукцинатсинтетаза, аргининосукциназа и аргиназа. Для орнитинового цикла синтеза мочевины характерно: реакции до стадии образования цитруллина происходят в митохондриях, остальные – в цитозоле; один атом азота мочевины образуется за счет аммиака, а второй – за счет аспартата; для синтеза 1 моля мочевины расходуется 3 моля АТФ. Последовательность реакций цикла мочевинообразования следующая:



## **ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ**

### **РАБОТА 1. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕПСИНА**

**Принцип метода.** Метод основан на влиянии температурного режима на активность пепсина.

Пепсин действует на внутренние пептидные связи, расщепляя белки на пептиды. О действии пепсина на белок, например на фибрин (нерастворимый белок плазмы), можно судить наблюдая растворение кусочков фибрина. Полученный раствор дает положительную биуретовую реакцию, указывающую на появление в растворе пептидов.

#### **Ход анализа.**

1. В три пробирки наливают по 1 мл раствора пепсина или желудочного сока. Содержимое первой пробирки кипятят 2 мин и охлаждают под струей воды. Содержимое второй пробирки нейтрализуют раствором гидрокарбоната натрия о щелочной реакции (3-4 капли 10% гидрокарбоната натрия). Третью пробирку оставляют без изменений.

2. Во все три пробирки добавляют по маленькому кусочку фибрина или яичного белка. Пробирки выдерживают в термостате при 37<sup>0</sup>С 30-45 мин. Затем их вынимают, встряхивают, отмечают видимые изменения белка (растворение, набухание) и прodelьвают биуретовую реакцию. Положительная биуретовая реакция получается только в третьей пробирке.

#### **Оборудование**

1. Материал исследования: желудочный сок или 0,1 % пепсин в 0,2% соляной кислоте.
2. Реактивы: кусочки фибрина или кусочки белка сваренного яйца, 10% гидрокарбонат натрия, биуретовый реактив.
3. Универсальная индикаторная бумага
4. Термостат, пробирки, пипетки

### **РАБОТА 2. ОБНАРУЖЕНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ОБМЕНА БЕЛКОВ В МОЧЕ**

**Принцип метода.** Метод основан на качественных реакциях обнаружения мочевины в моче.

#### **Ход анализа.**

*1. Обнаружение мочевины.* К 2-3 мл мочи прибавить равный объем 10% раствора азотистокислого натрия и 2-3 капли 2 н раствора соляной кислоты. Отметить появление пузырьков газа.

*2. Обнаружение мочевой кислоты.* 10 мл мочи выпарить досуха на голом огне, добавить к сухому остатку 1-2 капли азотной кислоты и осторожно выпарить под тягой на открытом огне. Коричнево-красному остатку дать остыть, после чего смочить его раствором аммиака. Отметить появление пурпурно-красного окрашивания. Если вместо аммиака остаток обработать раствором едкого натрия, то образуется сине-фиолетовое окрашивание.

### **Оборудование**

1.Материал исследования: свежая моча.

2.Реактивы: 10% азотистокислый натрий ( $\text{NaNO}_2$ ), 2 н соляная кислота, концентрированная азотная кислота, раствор аммиака, 10% гидроксид натрия, пробирки, пипетки, выпаривательная чашка.

### **РАБОТА 3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КРЕАТИНИН**

**Принцип метода.** Метод основан на качественных реакциях обнаружения креатинина в моче.

#### **Ход анализа.**

*1. Реакция Яффе.* При взаимодействии креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде образуется пикрат креатинина оранжево-красного цвета.

В микрохимической пробирке смешивают 3-4 капли мочи, 2 капли раствора пикриновой кислоты и столько же капель едкого натра. Появляется оранжево-красная окраска.

*2. Реакция Вайля.* Креатинин при взаимодействии с нитропруссидом в щелочной среде превращается в нитрозокреатинин красного цвета. Такую же окраску при обработке нитропруссидом дает ацетон. Для того чтобы различить реакцию, даваемую креатинином и ацетоном, необходимо знать, что:

- окраска креатинина быстро исчезает, а окраска ацетона стабильна;

- при добавлении уксусной кислоты красное нитрозопроизводное креатинина обесцвечивается, а окраска, даваемая ацетоном, напротив, усиливается.

К 5 каплям мочи добавляют 1 каплю раствора нитропруссид натрия и 1 каплю раствора едкого натра. Возникает красное окрашивание, при стоянии переходящее в желтое. Переход красной окраски в желтую можно ускорить, добавив несколько капель уксусной кислоты.

### **Оборудование**

1.Материал исследования: моча.

2.Реактивы: насыщенный раствор пикриновой кислоты, 10% гидроксид натрия, 10% свежеприготовленный нитропруссид натрия, концентрированная уксусная кислота.

### **РАБОТА 4. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА АММИАК**

**Принцип метода.** Метод основан на качественных реакциях обнаружения аммиака в молоке.

Увеличение содержания газов в молоке отражает загрязнение его газообразующими бактериями. Появление в молоке большого количества аммиака свидетельствует о выдаивании или хранении молока в плохо проветриваемых скотных дворах и о плохом уходе за животными.

### **Ход анализа.**

К 2 мл молока прибавляют 1 мл известковой воды. В отверстие пробирки помещают влажную универсальную индикаторную бумагу. Синий цвет индикаторной бумаги при небольшом нагревании содержимого пробирки свидетельствует о присутствии в молоке аммиака.

### **Оборудование**

1. Материал исследования: молоко.
2. Реактивы: известковая вода.
3. Универсальная индикаторная бумага.

## **ЛИТЕРАТУРА**

### **Основная**

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 2012. - 704 с. ISBN 978-5-2251-0013-1.
2. *Данилова, Н. С.*, Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов : учебное пособие / Н. С. Данилова. - М. : Колос С, 2008. - 280 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0513-9
3. *Пустовалова, Л. М.*, Основы биохимии для медицинских колледжей [Текст] : учебное пособие / Л. М. Пустовалова. - Ростов н/Д. : Феникс, 2003. - 448 с. - (Серия "Медицина для вас"). - ISBN 5-222-03395-3

### **Дополнительная**

1. *Гидранович, В.И.* Биохимия. Минск: ТетраСистемс, – 2012. – 528 с. ISBN 978-985-536-244-0
2. *Ловцова, Л.Г.*, Биохимия. Методические указания./ Смутнев П.В., – Саратов, 2013. – 70с. ISBN 978-5-9999-1808-6
3. *Таганович, А.Д.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с. ISBN 978-985-528-710-1.

### ТЕМА 3. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

**Цель:** приобрести практические навыки по исследованию продуктов углеводного обмена.

**Актуальность темы:** Углеводы являются самыми распространенными соединениями на планете. Они входят в состав любого компонента нашей биосферы, хотя и в широко варьируемых количествах. Так, в растениях они могут составлять до 80% от общей массы. В животных тканях же углеводов значительно меньше - всего 2%. В зависимости от строения углеводы делят на три основные класса (рис.13): моносахариды (эритроза, рибоза, арабиноза, глюкоза, манноза, галактоза, седогептулоза и др.), которые содержат от четырех до восьми атомов углерода; олигосахариды (сахароза, лактоза, мальтоза, трегалоза, рафиноза, генциоза и др.), состоящие из 2-10 остатков моносахаридов; полисахариды (крахмал, гликоген, целлюлоза и др.) - высокомолекулярные соединения, в составе которых сотни и тысячи моносахаридов

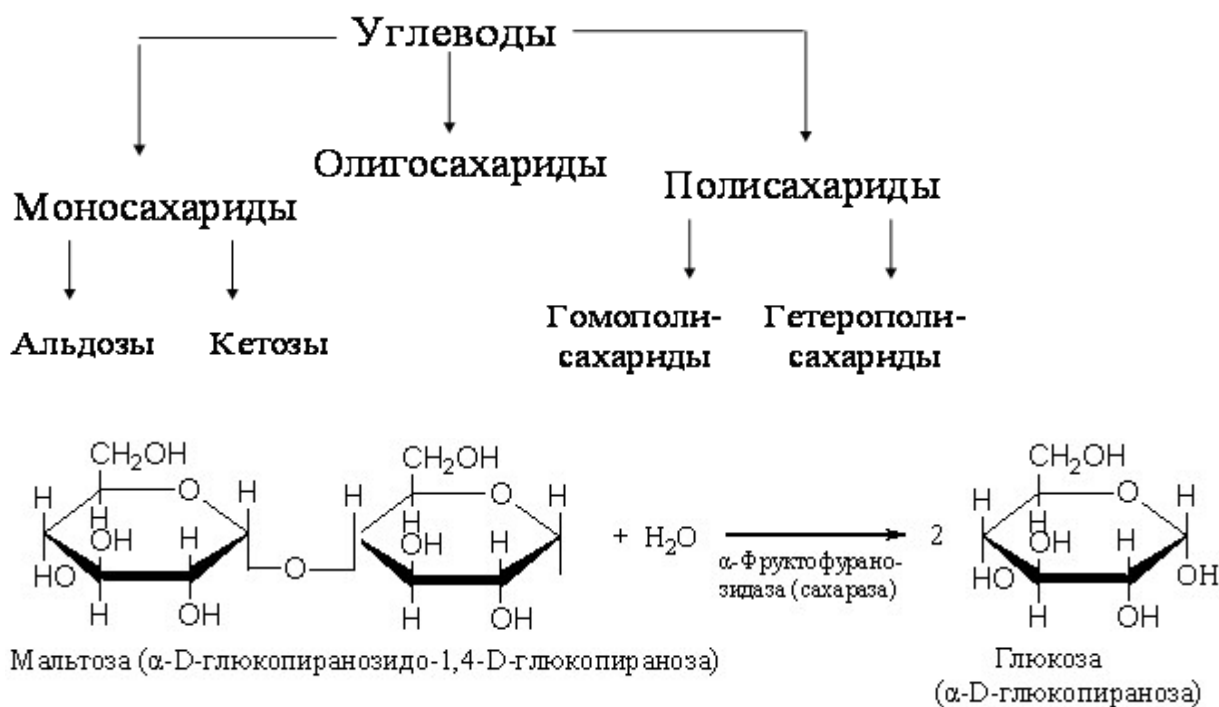
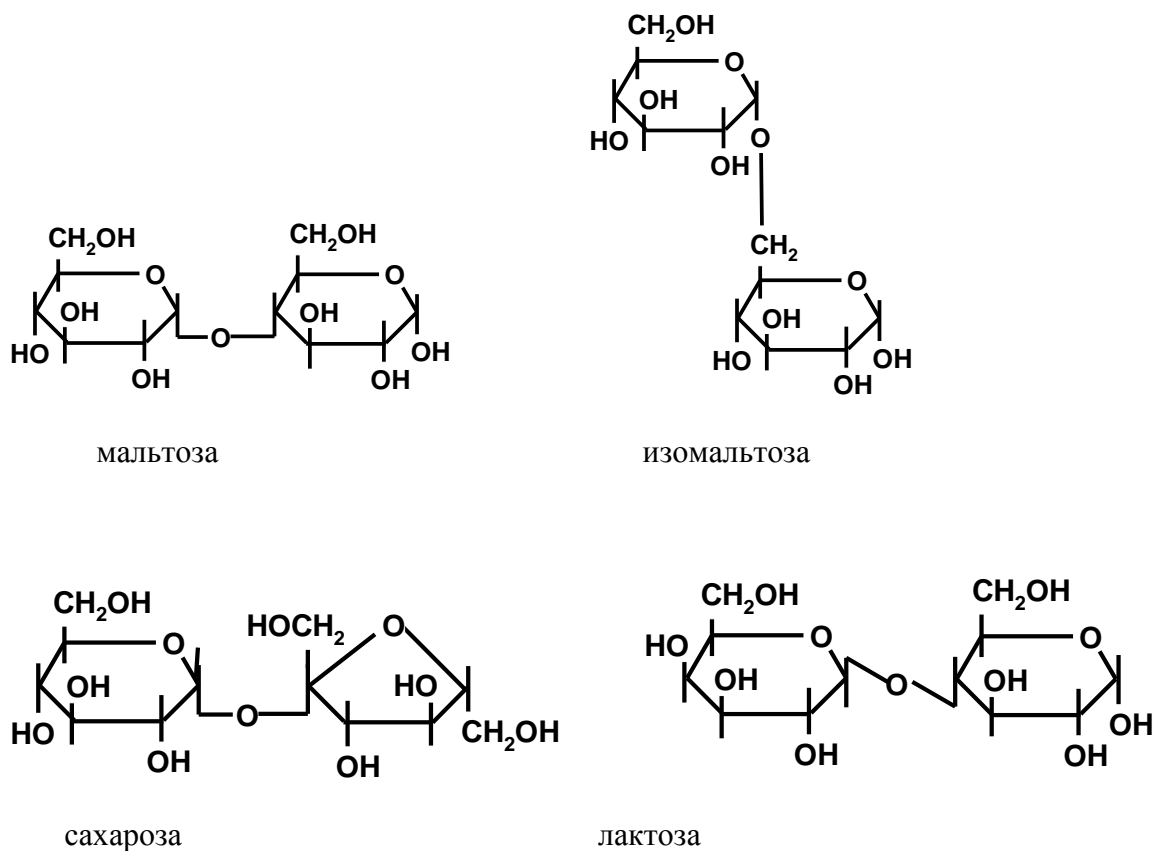


Рис. 13. Классификация углеводов

**Переваривание** углеводов в желудочно-кишечном тракте осуществляют гликозидазы, которые катализируют гидролиз гликозидных связей. Полисахариды, в частности крахмал, под влиянием амилазы (α-1,4-гликозидаза) слюны начинает расщепляться уже в полости рта. Однако здесь пища находится короткое время, поэтому крахмал переваривается частично. Затем пища поступает в желудок, в соке которого нет ферментов, расщепляющих углеводы. Однако в полости желудка, благодаря мощному протеолитическому ферменту пепсину,

происходит распад сложных белков (гликопротеины, протеогликаны), что облегчает переваривание углеводов в кишечнике. Распад олиго-, полисахаридов завершается в тонком кишечнике, благодаря амилазе поджелудочной железы. Действительно, в результате действия этой гликозидазы образуются мальтоза и изомальтоза, которые вместе с сахарозой и лактозой пищи формируют основной фонд дисахаридов. Строение этих дисахаридов приведено ниже:

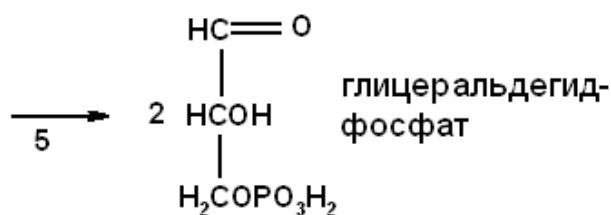
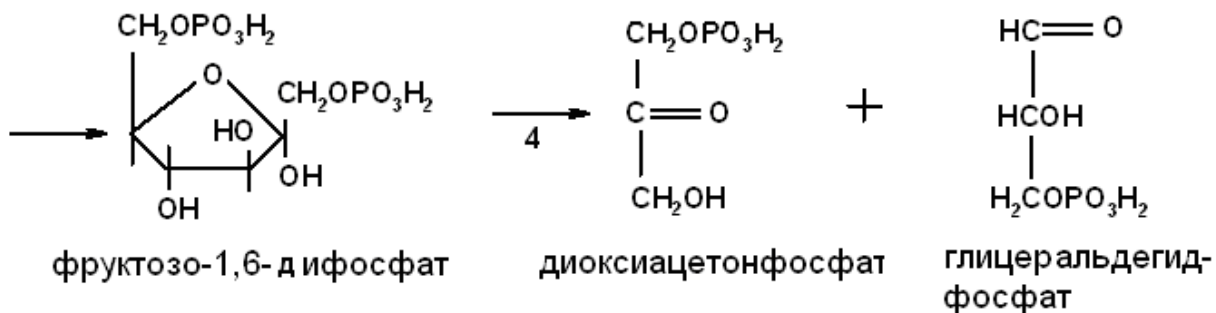
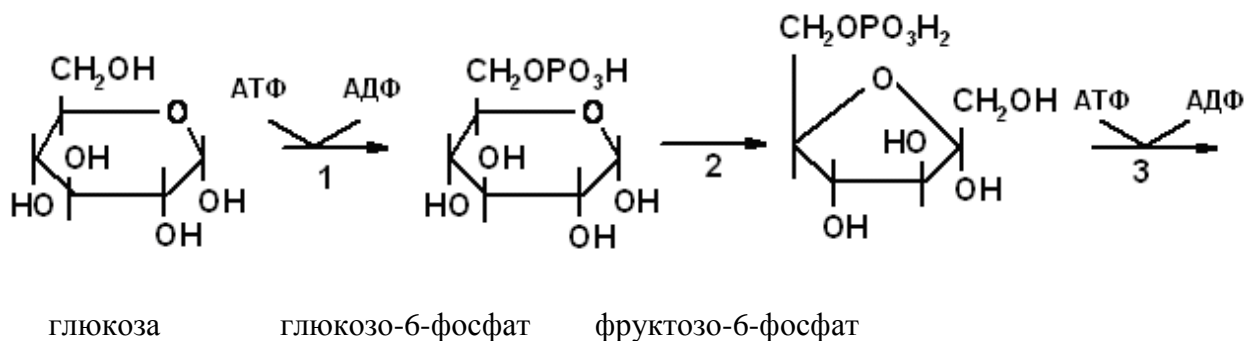


Только после образования дисахаридов вступают в действие высокоспецифические ферменты щетиночного эпителия тонкого кишечника: мальтаза, изомальтаза, сахараза и лактаза. Под влиянием указанных ферментов образуется всего три моносахара – глюкоза, фруктоза и галактоза, т.к. мальтоза и изомальтоза состоят из двух молекул глюкозы, сахараза – из глюкозы и фруктозы, а лактоза – из глюкозы и галактозы. Они, а также моносахариды пищи, всасываются в кровь либо путем облегченной диффузии, либо за счет активного транспорта, используя энергию АТФ и работу натриевого насоса. Клетчатка метаболизируется в толстом отделе под влиянием ферментов микроорганизмов. Причем, образовавшиеся моносахара служат, как правило, для поддержания жизнедеятельности микрофлоры кишечника. Из просвета кишечника моносахара, в объемном отношении это в первую очередь глюкоза, с кровью воротной вены поступают в печень, где задерживаются, депонируются или транзитом достигают клеток различных органов и тканей.

**Аэробный и анаэробный гликолиз.** В норме у аэробных организмов преобладает аэробный распад глюкозы до диоксида углерода и воды. В этом сложном процессе условно можно выделить 3 части: *аэробный гликолиз; окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и цикл лимонной кислоты; а также митохондриальную цепь переноса электронов.*

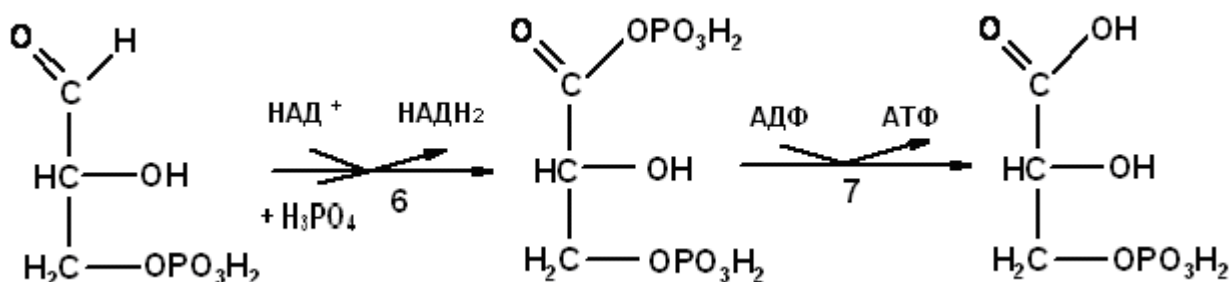
В первой части в результате действия 10 ферментов гликолиза и расщепления глюкозы, в конечном счете из шестиуглеродного соединения, главным образом глюкозы, а также фруктозы, галактозы и маннозы образуется две молекулы пировиноградной кислоты. Этот процесс назван аэробным, т.к. водород от образовавшихся при распаде глюкозы восстановленных коферментов (НАДН<sub>2</sub>) через цепь переноса электронов передается на кислород воздуха с образованием воды.

Катаболизм глюкозы до пирувата можно разделить на два этапа: от глюкозы до глицеральдегидфосфата и от глицеральдегидфосфата до пировиноградной кислоты. На первом из этих этапов расходуются две молекулы АТФ, фосфорилируются гексозы и происходит превращение гексозы в триозы. Последовательность этих реакций приведена ниже:

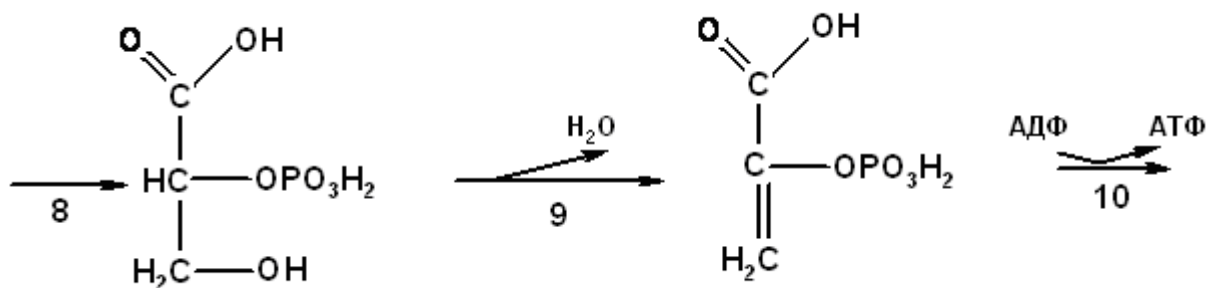


Ферменты этой части гликолиза следующие: гексокиназа или глюкокиназа (1), фосфоглюкоизомераза (2), фосфофруктокиназа (3), альдолаза фруктозо-1,6-дифосфата (4) и фосфотриозоизомераза (5).

Вторая часть этого этапа распада глюкозы включает реакции, связанные с синтезом АТФ:

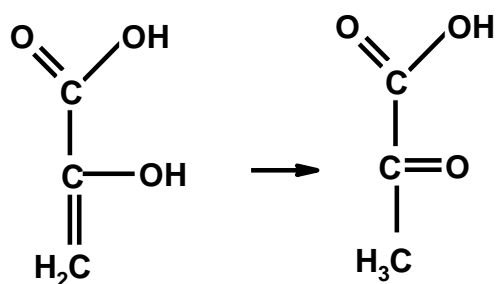


глицеральдегидфосфат    1,3-дифосфоглицерат    3-фосфоглицерат



2- фосфоглицерат

фосфоенолпируват

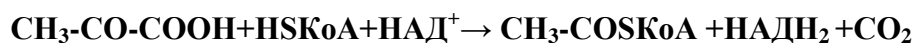


пируват

В этом этапе также участвуют пять ферментов: дегидрогеназа глицеральдегидфосфата (6), фосфоглицераткиназа (7), фосфоглицеромутаза (8), енолаза (9) и пируваткиназа (10). На рисунке 65 представлена общая схема аэробного распада глюкозы.



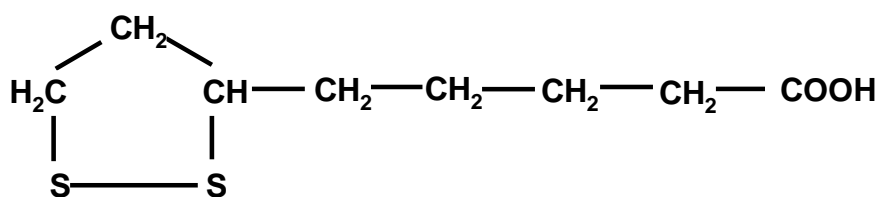
**Окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты.** Образовавшийся в результате гликолиза пируват подвергается окислительному декарбоксилированию сложным комплексом ферментов – пируватдегидрогеназным комплексом по следующей схеме:



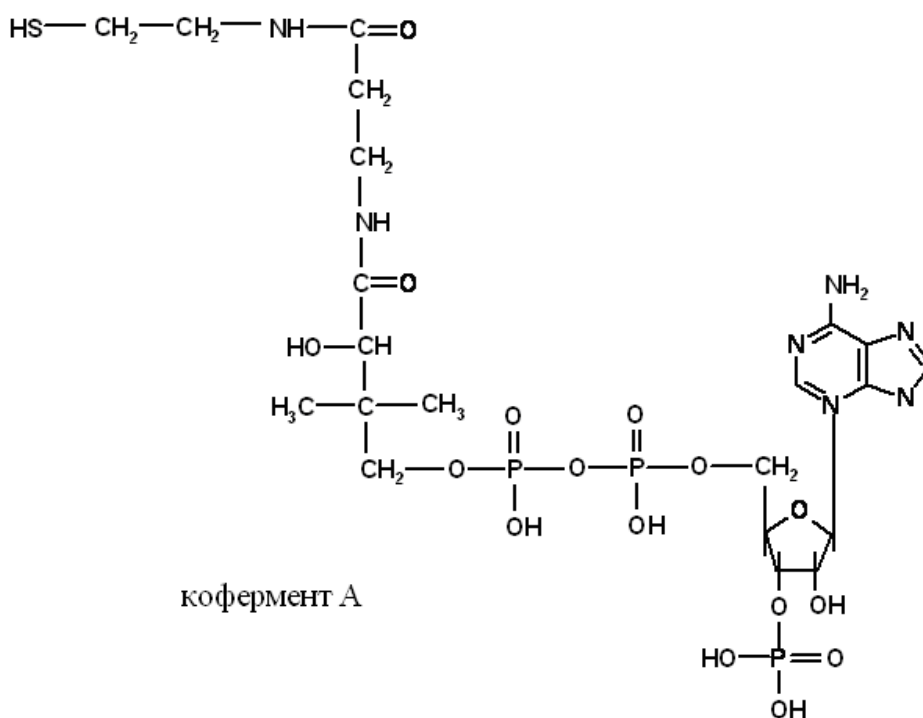
пируват

ацетил-КоА

Пируватдегидрогеназный комплекс содержит от 10 до 30 молекул каждого из 3 ферментов: пируватдекарбоксилазы, ацетилтрансферазы и дегидрогеназы дигидролипоевой кислоты, а также пять коферментов: никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид, тиаминдифосфат, липоевая кислота и кофермент А (КоА). Строение липоевой кислоты и кофермента ацилирования представлено на рисунке 15.



липоевая кислота



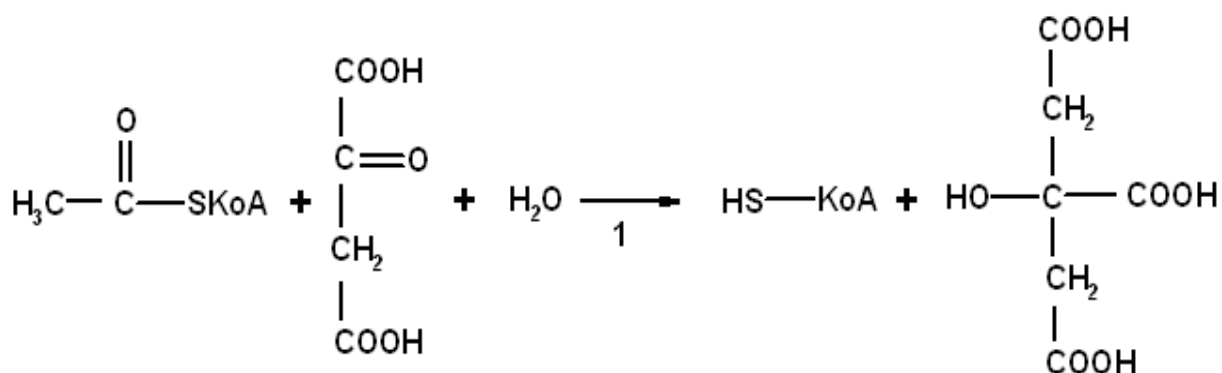
кофермент А

**Рис. 15. Строение коферментов**

В результате действия пируватдегидрогеназного комплекса, образовавшийся ацетильный остаток затем окисляется в цитратном цикле, а водород с НАДН<sub>2</sub> поступает в цепь переноса

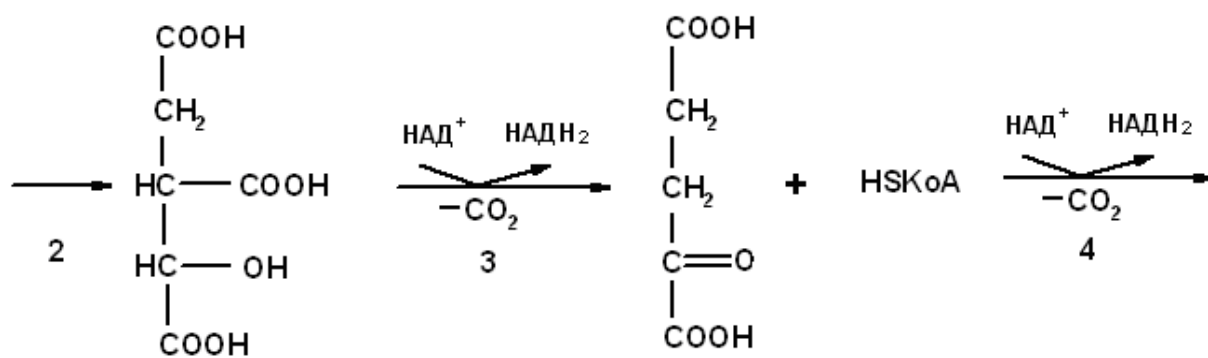
электронов и протонов.

**Цикл лимонной кислоты** (цитратный цикл, цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса) – важнейший метаболический цикл, в котором образуются первичные доноры водорода. Они при участии дегидрогеназ поступают в дыхательную цепь. Следовательно, в результате сопряженного действия цитратного цикла и дыхательной цепи ацетильный остаток окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Реакции цикла лимонной кислоты приведены ниже:



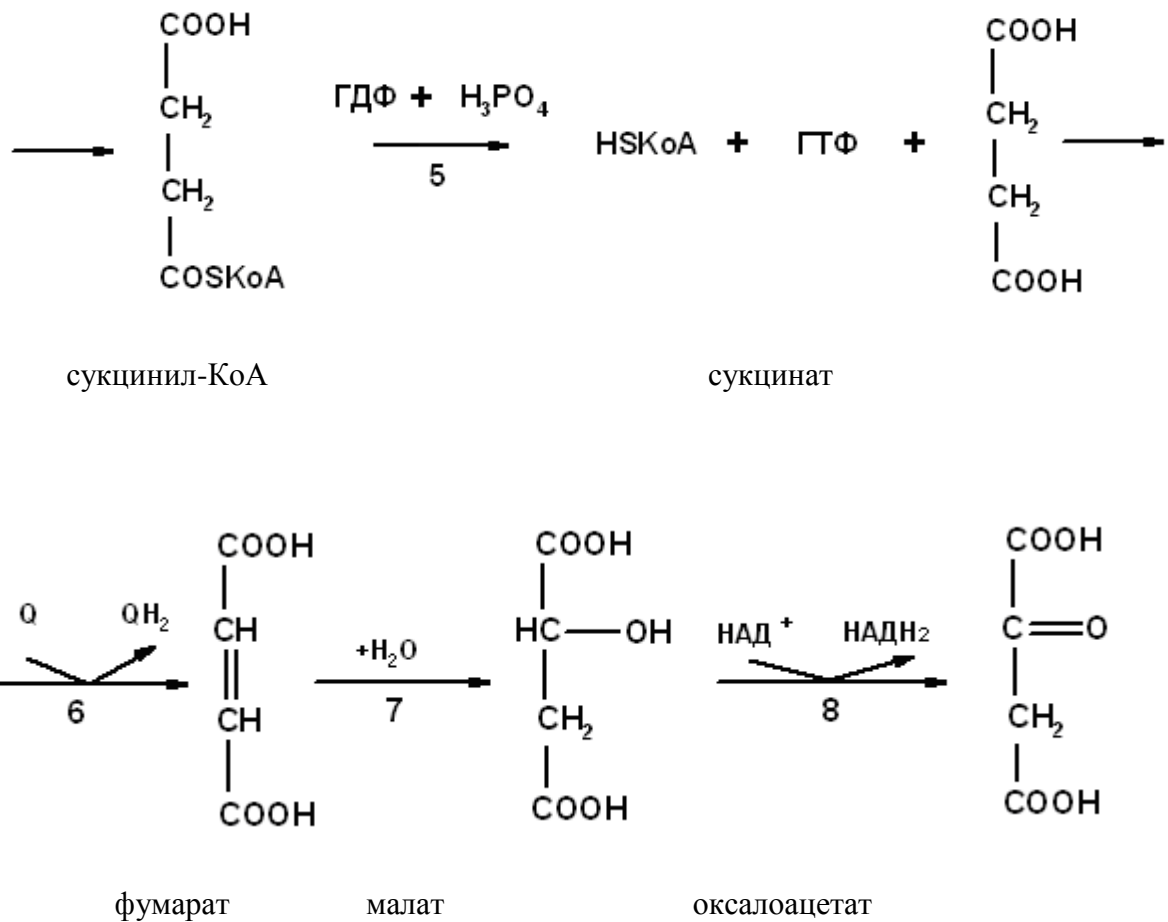
оксалоацетат

цитрат



изоцитрат

$\alpha$ -кетоглутарат



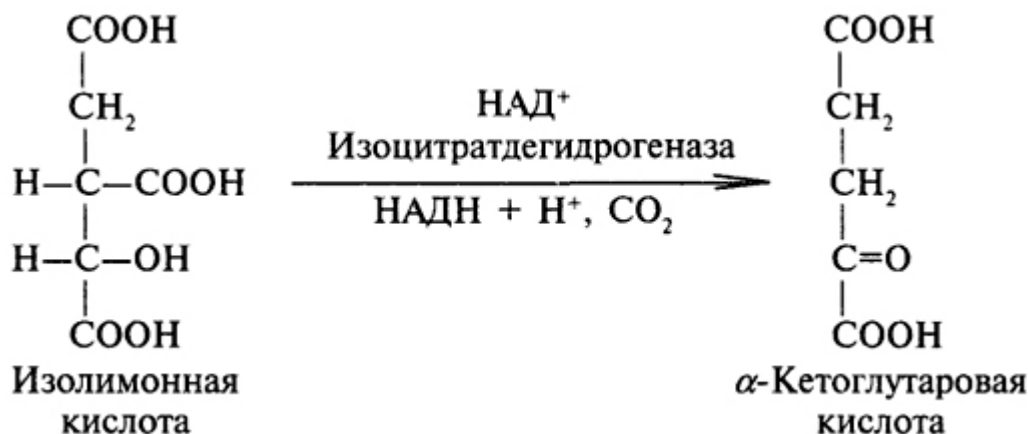
Эти реакции катализируют следующие ферменты: цитратсинтаза (1), аконитаза (2), изоцитратдегидрогеназа (3),  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс (4), сукцинаттиокиназа (5), сукцинатдегидрогеназа (6), фумараза (7) и малатдегидрогеназа (8).

Итак, сначала конденсация ацетил-КоА и оксалоацетата приводит к образованию лимонной кислоты. Она изомеризуется в изолимонную кислоту, которая затем одновременно декарбоксилируется и дегидрируется, превращаясь в  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту. Последняя, под влиянием  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (аналог пируватдегидрогеназного комплекса), превращается в сукцинил-КоА, а затем в сукцинат. Последующее действие трех ферментов (сукцинатдегидрогеназы, фумаразы и малатдегидрогеназы) приводит к образованию оксалоацетата, т. е. он регенерирует. После этого возможен новый оборот цикла.

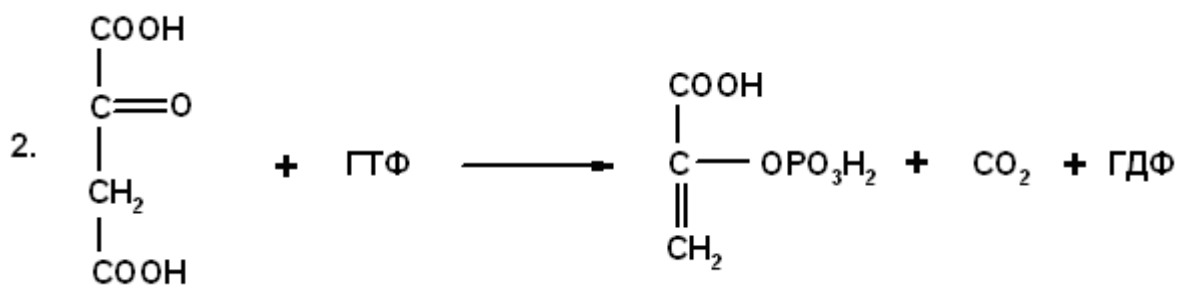
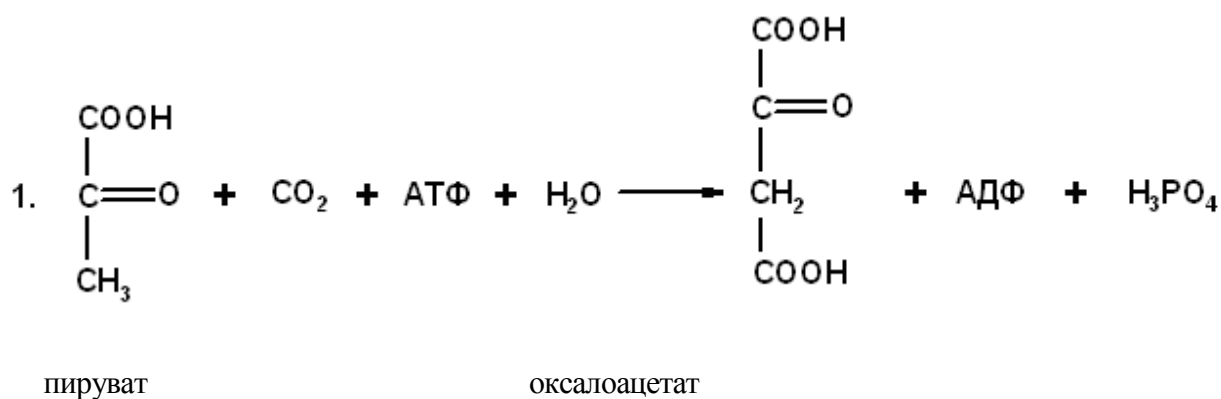
В результате таких последовательных реакций, из каждой молекулы ацетил-КоА извлекается восемь атомов водорода, которые направляются в дыхательную цепь. Следовательно, в общем пути катаболизма (окислительное декарбоксилирование пирувата и цикл лимонной кислоты) углеродный скелет предшествующей глюкозы через пирувиноградную кислоту и ацетил-КоА полностью распадается, образуя молекулы  $\text{CO}_2$ , которые выделяются с выдыхаемым воздухом, и восстановленные эквиваленты. В цикле лимонной кислоты все реакции протекают в аэробных условиях, цикл локализован в митохондриях, его метаболиты не фосфорилированы, окисление их происходит путем реакций дегидрирования и окислительного декарбоксилирования, все реакции цикла, за исключением окислительного декарбоксилирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, обратимы. Цикл лимонной

кислоты является заключительным этапом окисления углеводов, липидов, белков. Он выполняет важные анаболические функции:

- из метаболитов цикла (пируват,  $\alpha$ -кетоглутарат, оксалоацетат) могут синтезироваться соответственно аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты;
- ацетил-КоА является предшественником жирных кислот;
- сукцинил-КоА используется для синтеза гема.

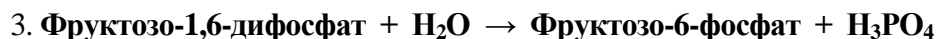


**Глюконеогенез. Биосинтез и распад гликогена.** Глюконеогенез – биосинтез глюкозы из неуглеводных соединений (лактат, пируват, оксалоацетат, глицерин, аминокислоты) – можно было бы рассматривать как реакции обращенного гликолиза. Однако три его стадии не вписываются в гликолитический путь. Эти реакции катализируются ключевыми ферментами глюконеогенеза: пируваткарбоксилазой (1), фосфоэнлпируваткарбоксикиназой (2), фруктозо-1,6-дифосфатазой (3) и глюкозо-6-фосфатазой (4). Благодаря этим ферментам обеспечивается протекание химических реакций в обход термодинамических барьеров гликолиза. Приведем эти реакции:

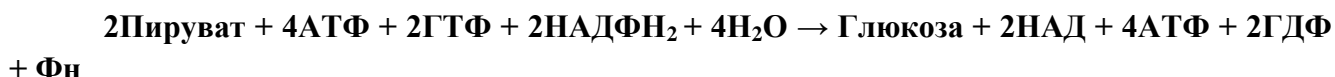


оксалоацетат

фосфоенолпируват

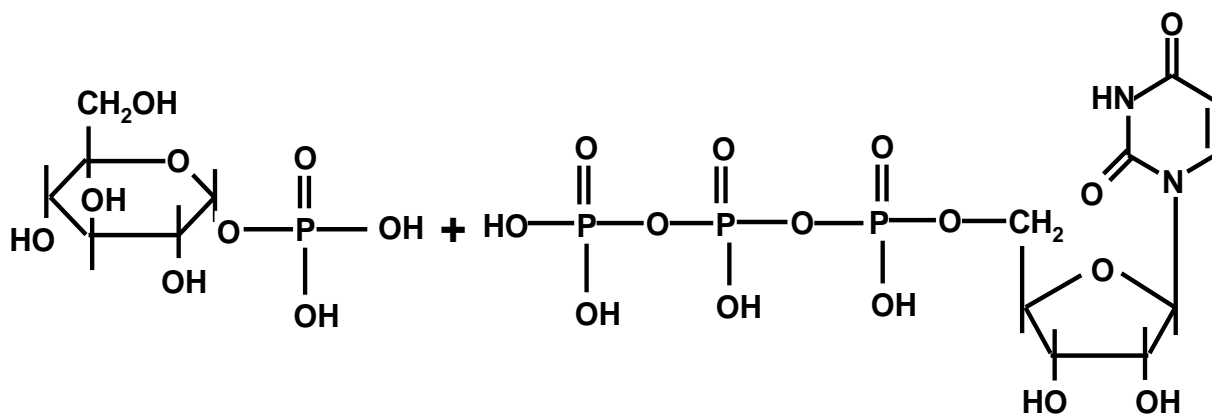


Считают, что глюконеогенез как процесс энергетически невыгоден для организма, т.к. на биосинтез одной молекулы глюкозы расходуется 4 молекулы АТФ и 2 молекулы ГТФ. Иначе говоря, для биосинтеза одной молекулы глюкозы из неуглеводных веществ расходуется шесть высокоэнергетических соединений.



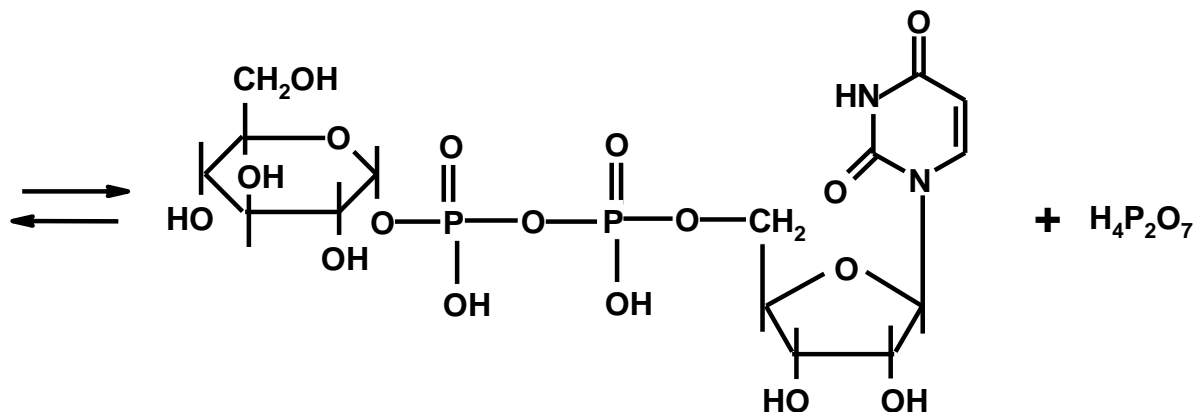
Однако синтез глюкозы из неуглеводных соединений абсолютно необходим в постабсорбционный период (особенно в период ночного голодания), ранний постнатальный период развития, при появлении различных заболеваний.

*Биосинтез и распад гликогена.* Биосинтез гликогена из глюкозы называется **гликогенозом**, он происходит во всех тканях, но энергичнее всего в печени и скелетных мышцах. Для того чтобы был возможен гликогеноз, свободная глюкоза должна сначала фосфорилироваться и стать метаболически активной. Донором такой глюкозы является уридиндифосфатглюкоза (УДФ-глюкоза), которая образуется при взаимодействии глюкозо-1-фосфата и УТФ:



глюкозо-1-фосфат

УТФ



### УДФ-глюкоза

Фермент, катализирующий эту реакцию называется УДФ-глюкозопирофосфорилазой. При синтезе гликогена УДФ-глюкоза присоединяется к олигосахаридам, содержащим не менее трех остатков глюкозы, связанных 1,4-гликозидной связью. Реакция в присутствии АТФ и ионов магния катализируется гексокиназой. Этот фермент находится во всех клетках, способных метаболизировать глюкозу. Гексокиназа недостаточно специфична, т.к. может фосфорилировать и другие моносахариды, однако, наибольшее сродство фермент имеет к глюкозе. Другой фермент глюкокиназа, в отличие от гексокиназы, фосфорилирует только глюкозу, он не ингибируется глюкозо-6-фосфатом и имеет низкое сродство к субстрату, т.е. к глюкозе.

Присоединение остатков глюкозы с УДФ-глюкозы к предсуществующей молекуле гликогена катализирует гликогенсинтаза, которая формирует 1,4-гликозидные связи в молекуле гликогена.

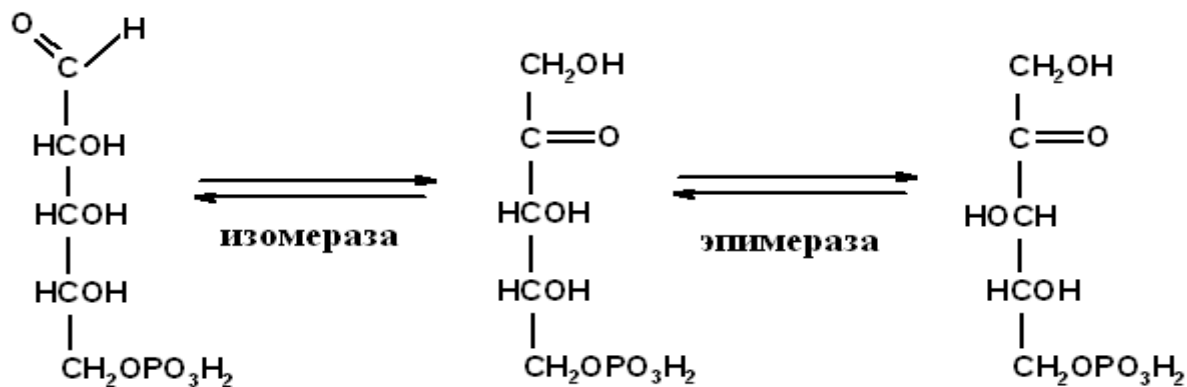
Биологический смысл же образования огромной молекулы гликогена (молекулярная масса  $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^8$ ; до 1 млн остатков глюкозы) состоит в том, чтобы сохранить энергетический материал, необходимый клеткам вне периодов пищеварения, а также препятствовать накоплению осмотически активной глюкозы, способной вызвать разрыв клеточных мембран.

Уже через 24 ч голодания в клетках печени практически нет гликогена. Его мобилизацию осуществляет гликогенфосфорилаза, расщепляющая в гликогене 1,4-гликозидные связи. Амило-1,6-гликозидные связи в молекуле гликогена расщепляет амило-1,6-гликозидаза, при этом образуется свободная глюкоза. Глюкозо-1-фосфат, образующийся из гликогена, под влиянием фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат. Затем этот фосфорилированный метаболит при участии глюкозо-6-фосфатазы в печени превращается в глюкозу, а в мышцах распадается аэробным или анаэробным путем.

**Пентозофосфатный путь (фосфоглюконатный цикл, апотомический путь).** Термин пентозный цикл (гексозомонофос-фатный шунт) означает набор реакций, происходящих в цитоплазме, в результате которых клетки животных получают NADPH, необходимый для реакций восстановления, и рибозо-5-фосфат - основное промежуточное вещество в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Если таких превращений не происходит, промежуточные вещества пентозного цикла трансформируются в глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат и включаются таким образом в гликолиз. Реакции пентозного цикла можно подразделить на две группы: 1) реакции прямого окисления глюкозы, катализируемые глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, глюконолактоназой и фосфоглюконатдегидрогеназой; 2) взаимные



5-фосфат, под действием эпимеразы из рибулозо-5-фосфата получается ксилулозо-5-фосфат. Нередко на этом этапе ПФП может быть завершен:

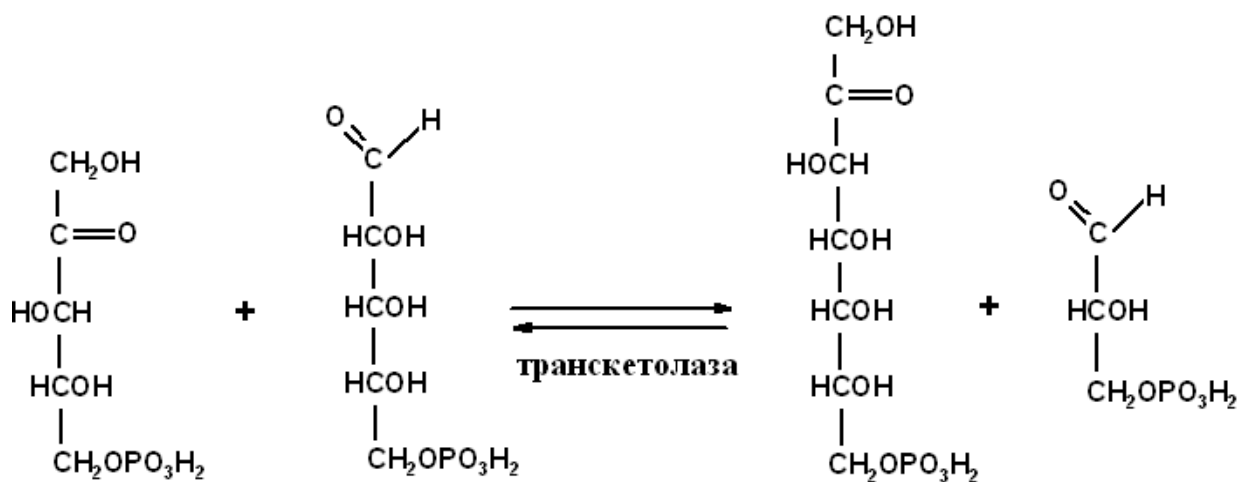


рибозо-5-фосфат

рибулозо-5-фосфат

ксилулозо-5-фосфат

При определенных условиях наступает неокислительный этап пентозофосфатного цикла. Его реакции протекают в анаэробных условиях и образуются продукты, характерные как для гликолиза (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, фосфотриозы), так и ПФП (седогептулозо-7-фосфат, пентозо-5-фосфаты, эритрозо-4-фосфат). Основными ферментами неокислительного этапа являются транскетолаза и трансальдолаза. Ниже приведены реакции неокислительного этапа ПФП:



ксилулозо-5-

фосфат

рибозо-5-

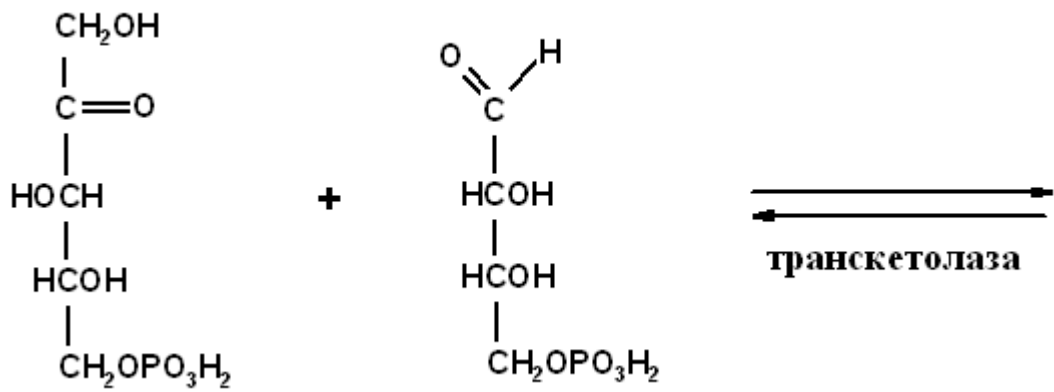
фосфат

седогептулозо-7-

фосфат

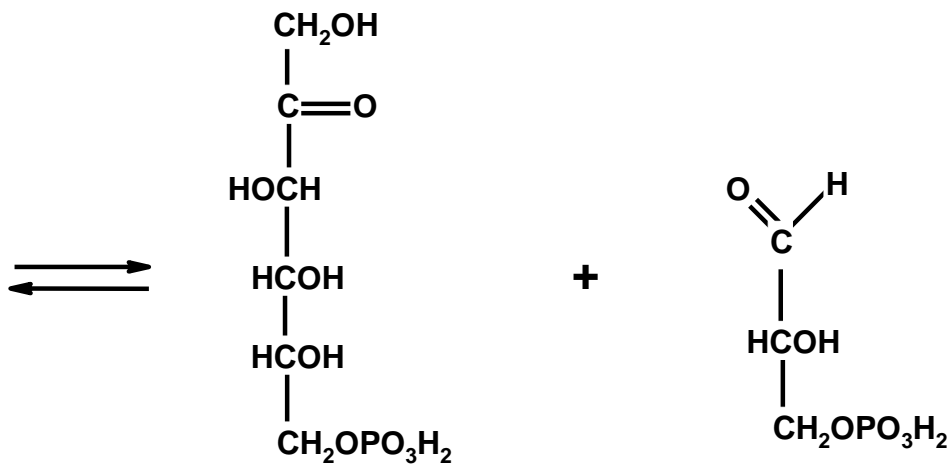
глицеральдегид-3-

фосфат

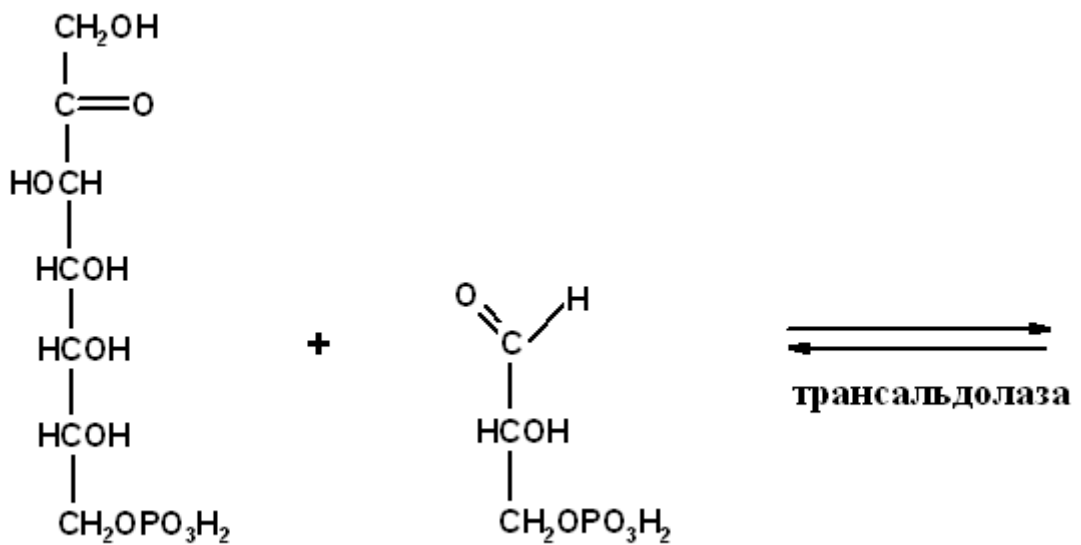


ксилулозо-5-фосфат      эритрозо-4-фосфат

**транскетолаза**

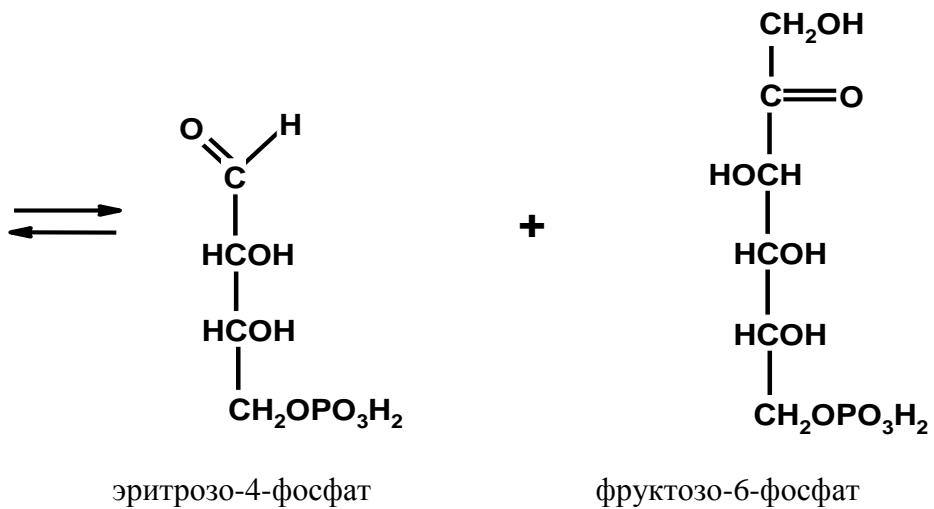


фруктозо-6-фосфат      глицеральдегид-3-фосфат



седогептулозо-7-фосфат      глицеральдегид-3-фосфат

**трансальдолаза**



Эти реакции обратимы и из шести молекул пентоз может образоваться пять молекул глюкозы. Иными словами, происходит возвращение пентоз в фонд гексоз.

## **ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: ОБМЕН УГЛЕВОДОВ**

### **РАБОТА 1. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ**

**Принцип метода.** Метод основан на качественной реакции обнаружения гликогена в мясе.

Гликоген служит резервным питательным веществом в организме животных. Содержание гликогена в печени животных достигает 20%, а в мышцах – 4%. Распадаясь до простых углеводов по пути гликогенолиза, гликоген обеспечивает потребность организма в энергии.

#### **Ход анализа.**

В центрифужную пробирку наливают 2 мл 60% раствора гидроксида калия, туда же помещают 1-2г ткани (предварительно измельчив ее). Пробирку ставят на 30 мин в кипящую баню. Затем охлаждают и добавляют в нее 6-8 мл этанола и перемешивают.

Пробирку ставят в центрифугу центрифугируют в течение 3-5 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок гликогена растворяют в 2 мл 15% гидроксида калия и снова добавляют 6-8 мл этанола. Гликоген отделяют повторным центрифугированием.

Надосадочную жидкость сливают, затем растворяют небольшую часть осадка гликогена в 5 мл воды и делят на две части. К одной порции прибавляют реактив Люголя, появляется красное окрашивание. Другую порцию нагревают с реактивом Фелинга – окраски не наступает.

Оставшуюся часть гликогена гидролизуют соляной кислотой и доказывают наличие глюкозы. Для этого добавляют к гликогену 3-4 мл 2,5 % соляной кислоты и кипятят 15-20 мин. Охлаждают и нейтрализуют 10% гидроксидом натрия, добавляют равный объем реактива Фелинга. Смесь нагревают, образуется красный осадок закиси меди  $Cu_2O$ .

#### **Оборудование**

1. Материал исследования: печень, мышечная ткань.
2. Реактивы: 15% и 60% гидроксид калия, 10% гидроксид натрия, 2,5% соляная кислота, этанол, реактив Фелинга, реактив Люголя, пробирки, пипетки, водяная баня, центрифуга.

### **РАБОТА 2. ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ**

**Принцип метода.** Метод основан на обнаружении продуктов гидролиза крахмала серной кислотой.

Крахмал – полисахарид растений, молекула которого построена из остатков  $\alpha$ -глюкоз, нерастворимый в воде, дающий синее окрашивание с йодом. Легко гидролизуется при действии различных животных и растительных амилаз, а также растворов кислот и щелочей.

### **Ход анализа.**

В пробирке к 3-4 мл 0,5 % крахмального клейстера прибавить 2 мл 2 н раствора серной кислоты и поместить ее в кипящую водяную баню.

Степень гидролиза крахмала отмечать через каждые 2-3 мин нагревания. Для этого отмеривать около 0,5 мл гидролизата в пробирку и прodelьвать с ним пробу Люголя.

Отметить следующие промежуточные продукты гидролиза крахмала: амилодекстрин, эритродекстрин, ахродекстрин.

### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: 0,5% крахмальный клейстер.
- 2.Реактивы: 2 н серная кислота.
3. Пробирки, пипетки.
4. Водяная баня.

## **РАБОТА 3. ГИДРОЛИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ**

**Принцип метода.** Метод основан на обнаружении продуктов гидролиза **целлюлозы** серной кислотой.

Целлюлоза (клетчатка) – нерастворимый в воде полисахарид растений, молекула которого построена из остатков  $\beta$ -глюкоз. Отличается от крахмала и гликогена тем, что не дает окрашивания с йодом, не гидролизуется амилазами и значительно труднее гидролизуется растворами кислот и щелочей.

### **Ход анализа.**

Небольшой кусочек ваты залить 3 мл 2% серной кислоты и поставить на 10 мин в кипящую водяную баню. Нейтрализовать щелочью, добавить 3 мл реактива Фелинга и нагреть на пламени горелки до кипения. Проба дает отрицательный результат.

Взять еще кусочек ваты, растворить его в 3 мл 80% серной кислоты и кипятить 5 мин. Нейтрализовать жидкость щелочью, добавить 3 мл реактива Фелинга и нагреть до кипения. Появляется кирпично-красное окрашивание, что говорит об образовании при гидролизе моносахарида глюкозы.

### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: вата.
- 2.Реактивы: 2 и 80% растворы серной кислоты, реактив Фелинга, насыщенный раствор гидроксида натрия.
3. Универсальная индикаторная бумага
4. Пробирки, пипетки.
- 5.Водяная баня.

## РАБОТА 4. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ РЕАКТИВОМ УФФЕЛЬМАНА

**Принцип метода.** Метод основан на качественной реакции обнаружения молочной кислоты реактивом Уффельмана.

### Ход анализа.

1-2 г мышечной ткани, измельченной ножницами, растирают с 3-5 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Полученную мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли, фильтрат кипятят в течение 1 мин, охлаждают, фильтруют через марлевый фильтр.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% фенола и в каждую из них прибавляют по каплям 1% хлорид железа до появления интенсивного фиолетового окрашивания (реактив Уффельмана). Затем в одну пробирку приливают 1 мл 0,5% молочной кислоты, во вторую – вытяжку из мышечной ткани, а в третью – 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают. В первой и второй пробирках фиолетовый цвет переходит в зеленовато-желтый, указывающий на наличие молочной кислоты, в третьей пробирке цвет раствора не изменяется.

Молочная кислота является конечным продуктом анаэробного распада глюкозы.

### Оборудование

- 1.Материал исследования: мышечная ткань
- 2.Реактивы и оборудование: 1% хлорид железа ( III ), 1% фенол, 0,5% молочная кислота.
- 3.Пробирки, пипетки.
- 4.Ступка, воронка, марля.

## РАБОТА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ ПО МЕТОДУ ГЕССА

**Принцип метода.** Метод основан на цветной реакции, получаемой при нагревании сиаловой кислоты (ацетилнейраминовой) с реактивом Гесса.

Интенсивность буровато-розового окрашивания зависит от концентрации сиаловых кислот.

### Ход анализа.

К 1 мл сыворотки крови в центрифужной пробирке добавляют 1 мл 10% ТХУ и встряхивают. Затем пробирку помещают в кипящую водяную баню на 5 мин и охлаждают. Это приводит к освобождению связей N-ацетилнейраминовой кислоты с белковой частью молекулы гликопротеинов.

После центрифугирования к 0,4 мл надосадочной жидкости добавляют 5 мл реактива Гесса и повторно кипятят в водяной бане в течение 30 мин. При этом появляется буровато-розовое окрашивание.

После охлаждения проводят фотометрирование на ФЭКе в кюветах на 10 мм против воды при зеленом светофильтре (540 нм). Полученную величину экстинкции умножают на 1000. результат определения выражают в условных единицах. В норме величина колеблется

от 1000 до 195 условных единиц, что соответствует содержанию сиаловых кислот от 550 до 790 мг/л N-ацетилнейраминовой кислоты.

### **Оборудование**

1. Материал исследования: сыворотка крови.
2. Реактивы и оборудование: 10% ТХУ, реактив Гесса (94 части ледяной уксусной кислоты, 6 частей концентрированной серной кислоты)
3. Водяная баня.
4. Фотоэлектрокolorиметр

## **ЛИТЕРАТУРА**

### **Основная**

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 2012. - 704 с. ISBN 978-5-2251-0013-1.
2. *Данилова, Н. С.*, Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов : учебное пособие / Н. С. Данилова. - М. : Колос С, 2008. - 280 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0513-9
3. *Пустовалова, Л. М.*, Основы биохимии для медицинских колледжей [Текст] : учебное пособие / Л. М. Пустовалова. - Ростов н/Д. : Феникс, 2003. - 448 с. - (Серия "Медицина для вас"). - ISBN 5-222-03395-3

### **Дополнительная**

1. *Гидранович, В.И.* Биохимия. Минск: ТетраСистемс, – 2012. – 528 с. ISBN 978-985-536-244-0
2. *Ловцова, Л.Г.*, Биохимия. Методические указания./ Смутнев П.В., – Саратов, 2013. – 70с. ISBN 978-5-9999-1808-6
3. *Таганович, А.Д.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с. ISBN 978-985-528-710-1.

## ТЕМА 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ

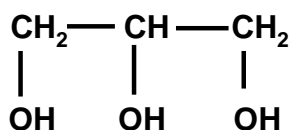
**Цель:** приобрести практические навыки по исследованию продуктов углеводного обмена.

**Актуальность темы:** Липиды представляют собой группу соединений, обладающих одинаковыми физико-химическими свойствами, в частности ограниченной растворимостью в воде и полярных растворителях и высокой растворимостью в неполярных растворителях.

Липиды – большой класс соединений, которые наряду с углеводами и белками, являются основными мажорными компонентами пищи.

Они могут быть классифицированы следующим образом: простые и сложные липиды. Простые липиды, в свою очередь, подразделяются на триацилглицерины (жиры) и воски. В состав сложных липидов входят: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Фосфолипиды разделяются на сфинголипиды и глицерофосфолипиды; последние состоят из 5 групп: фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и ацетальфосфатиды (плазмалогены). Гликолипиды делят на 3 группы: цереброзиды, сульфатиды и ганглиозиды. К стероидам относят холестерин, желчные кислоты, стероидные гормоны и др.

Триацилглицерины (триглицериды, ТГ) – это сложные эфиры глицерина и различных жирных кислот. Глицерин – постоянная составная часть жиров.



Глицерин

В настоящее время из различных клеток и тканей выделено свыше 70 жирных кислот, большинство из них содержит четное число атомов углерода и неразветвленную углеродную цепь. Жирные кислоты могут быть насыщены водородом (предельные) или содержать двойные связи, т.е. быть ненасыщенными (непредельными). Из насыщенных жирных кислот в организме человека и высших животных особенно широко встречаются пальмитиновая и стеариновая кислоты. В организме содержание ненасыщенных жирных кислот обычно выше, к ним, в частности, относятся: олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты, содержащие соответственно 1,2,3 и 4 двойные связи. В общем виде строение некоторых из этих жирных кислот следующее:

пальмитиновая кислота –  $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$ , 16 : 0

стеариновая кислота –  $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$ , 18 : 0

олеиновая кислота –  $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$ , 18 : 1 (9)

линолевая кислота –  $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$ , 18 : 2 (9, 12)

$\alpha$ -линоленовая кислота –  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$ , 18 : 3 (9, 12, 15)

арахидоновая кислота –  $C_{19}H_{31}COOH$ , 20: 4 (5, 8, 11, 14),

где цифры до двоеточия показывают число углеродных атомов, после двоеточия – число двойных связей. Цифры в скобках – положение двойной связи, считая от карбоксила.

Жир, имеющий в своем составе насыщенные жирные кислоты, представляет собой твердое вещество, тогда как растительные жиры (масла), содержащие большое количество ненасыщенных кислот, имеют жидкую консистенцию. К примеру, **температура плавления** бараньего жира равна 44...50°, говяжьего – 42...49°, свиного – 36...46°, хлопкового масла – 34°, подсолнечного –21°C. Температура плавления жира человека в среднем равна 17,5°C.

Три ненасыщенные жирные кислоты: линолевая, линоленовая и арахидоновая по своим биологическим свойствам близки к витаминам. Смесь этих кислот, поэтому называется витамином F. Они не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Причем, чем сильнее не насыщена жирная кислота, тем больше в ней потребность. Ненасыщенные жирные кислоты участвуют в нормализации эластичности кожи, а также проницаемости кровеносных сосудов, сберегают холин, препятствуют развитию атеросклероза, повышают сопротивляемость организма к инфекции и радиации.

Жиры и сложные липиды имеют следующие общие свойства. Все они легче воды, например, удельный вес жира равен 0,910-0,996. Жиры и жироподобные вещества нерастворимы в воде, но растворимы в органических растворителях: бензоле, толуоле, хлороформе, эфире, этаноле и др. Важным общим свойством липидов является гидрофобность всей или значительной части молекулы. Именно это свойство определяет особенности метаболизма и функций липидов.

Любые растения и животные организмы содержат липиды. В растениях содержание жира колеблется от 0,3 до 45%, в зернах ореха его до 65%, тогда как в картофеле, фруктах, листьях и стеблях жира всего 0,1-0,7%. Организм людей способен синтезировать жиры из углеводов и белков. В среднем в организме человека находится 4-10% жира. Причем, в печени его количество составляет 1,5-3%, мышцах – 1%, крови – 0,3-0,5%, женском молоке – 3,5%. Вместе с тем, в тканях яичников, сперме, клетках мозга количество жира может достигать 7,5-30%. Жир содержится во всех клетках, тканях и органах, однако в некоторых местах он может откладываться в особенно больших количествах, образуя жировые депо: сальник, околопочечная жировая клетчатка, подкожная жировая клетчатка. Большинство нейтральных жиров содержат в различных соотношениях эфиры пальмитиновой, стеариновой, пальмитоолеиновой, олеиновой и линолевой кислот. Жирные кислоты, содержащие 10 или меньше углеродных атомов, редко встречаются в животных липидах.

В организме **жир** существует в **3 формах**. Это **протоплазматический** или структурный жир. Он входит во все внутриклеточные структуры, имеет вполне определенный состав и количество его не изменяется при ожирении или голодании. Его примерно 25% от общего количества жира, находящегося в организме. Вторая форма – **резервный жир**. Он полностью исчезает при недоедании и голодании. В норме это форма консервирования энергии. Так, если при сгорании 1г белков и углеводов выделяется 4,1 ккал (17 кДж), то при окислении 1г жира выделяется 9,3 ккал (39 кДж). Наконец, в организме большое количество **жира связано с углеводами и белками**.

Значение триглицеридов в организме состоит в том, что они являются структурными компонентами клеток и субклеточных структур. Обладая высокой энергетической эффективностью, ТГ служат депо энергии. Показано, что сердечная мышца, в отличие от мозга, утилизирует для своих энергетических нужд не только глюкозу, но и жирные кислоты. Триглицериды способствуют

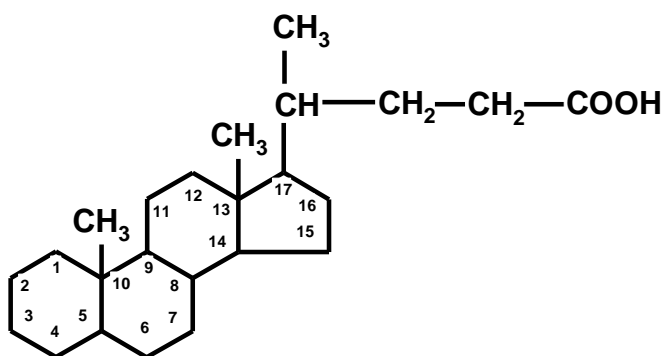
всасыванию жирорастворимых витаминов. Жиры выполняют защитную роль, покрывая ряд органов (почки) и образуя подкожножировую прослойку, которая предохраняет тело от толчков, ударов и охлаждения.

**Фосфатидами (фосфолипидами)** называются диацилглицерины, связанные эфирной связью с фосфорной кислотой по третьей гидроксильной группе. **Сфинголипидами** называются эфиры аминок спирта – сфингозина. Они содержат жирную кислоту, связанную с аминогруппой сфингозина (церамид). Одна гидроксильная группа сфингозина остается обычно свободной; сахара (в гликолипидах) или фосфорилхолина (в сфингомиелинах) связаны с первичным гидроксилом.

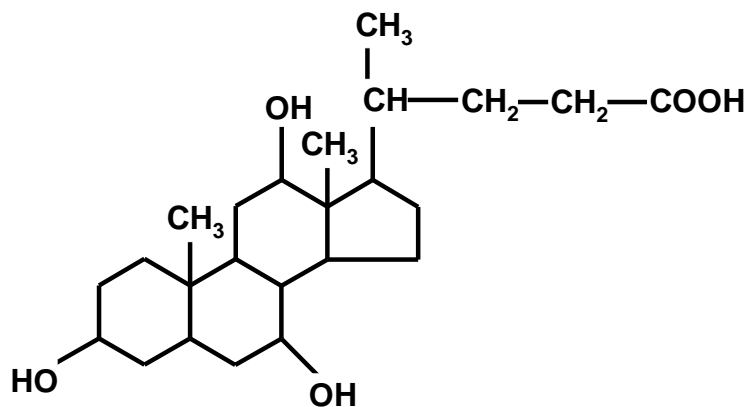
Соединения, сходные с липидами по физико-химическим свойствам, но отличающиеся от липидов по структуре, обычно называют **липоидами**. Стероиды, в основе которых лежит циклопентапергидрофенантрен, относятся к группе липоидов. К ним же принадлежат холестерин и важные биологически активные гормоны и желчные кислоты.

**Переваривание липидов и всасывание продуктов переваривания.** У человека расщепление жиров начинается в желудке, хотя интенсивность его очень мала, причем, отщепляются главным образом жирные кислоты с короткой цепью. Это связано с сильно кислой средой желудочного сока, тогда как липазы действуют в нейтральной или слабокислой среде. Несмотря на незначительный удельный вес этого процесса, расщепление жиров в желудке имеет большое значение, т.к. отщепившиеся жирные кислоты ускоряют эмульгирование жиров в кишечнике. Наконец, в желудке распадаются белково-липидные комплексы и разрушаются мембраны некоторых клеток, поэтому жиры становятся более доступными для ферментов кишечника.

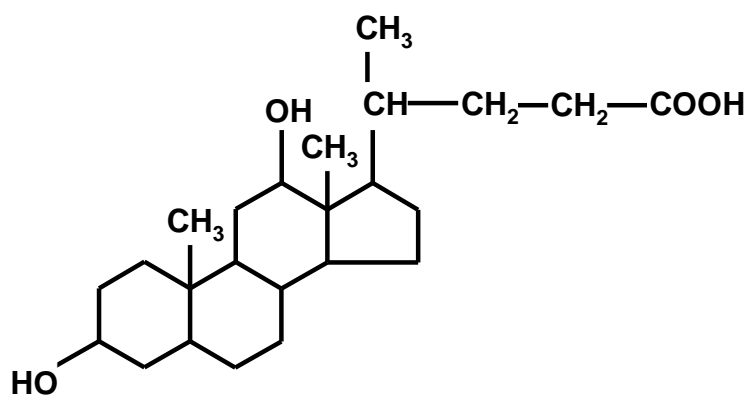
В верхних отделах кишечника расщепляется и всасывается основная часть жиров, которые сначала подвергаются эмульгированию. Для этого процесса характерно несколько механизмов. Сначала бикарбонаты кишечного и панкреатического соков нейтрализуют соляную кислоту химуса, а выделившиеся пузырьки газа хорошо перемешивают пищу. Определенная часть жира эмульгируется с помощью щелочных солей высших жирных кислот (мыла). Конечно, самым мощным эмульгатором являются соли желчных кислот. Всего в желчи найдено более 20 желчных кислот. Из них наиболее распространенными являются хенодезоксихолевая (45%), холевая (31%) и дезоксихолевая (24%) кислоты. Строение желчных кислот и их предшественника – холановой кислоты приведено ниже:



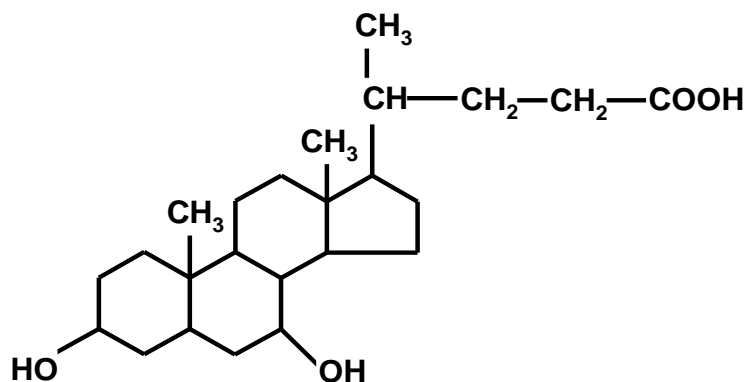
холановая кислота



холевая кислота



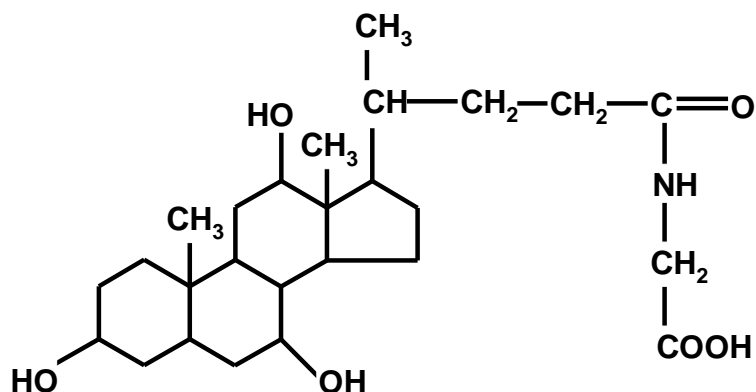
дезоксихолевая кислота



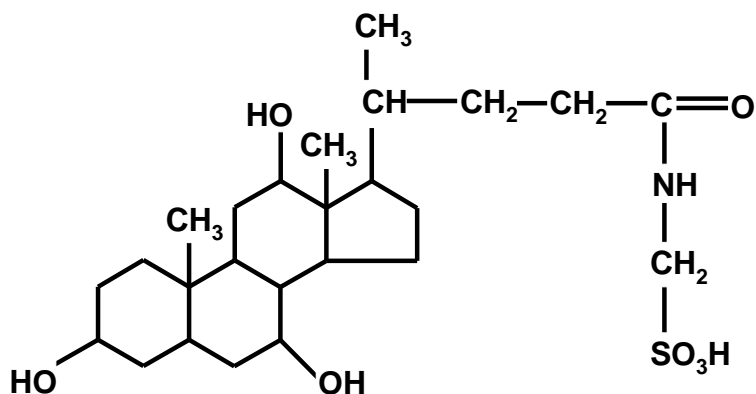
хенодезоксихолевая кислота

Поступление желчи в кишечник стимулируется гормоном холецистокинином, который синтезируется в тонком кишечнике и выделяется в кровоток в ответ на появление жира в двенадцатиперстной кишке. Признано, что желчные кислоты, адсорбируясь на каплях жира, образуют пленку, которая препятствует слиянию капель; они резко снижают поверхностное натяжение фаз вода-жир, что делает жировые капли неустойчивыми и способствует их распаду на более мелкие части; активируют липазу, гидролизующую сложноэфирную связь в

триацилглицеринах; способствуют всасыванию жирных кислот. В желчи желчные кислоты находятся в конъюгированной форме, т.е. они связаны с глицином или таурином (парные желчные кислоты):



гликохолевая кислота



таурохолевая кислота

Желчные кислоты образуют с жирными кислотами, моноацилглицеринами, реже с диацилглицеринами мицеллы (холеиновые комплексы), которые проникают в клетки слизистой кишечника. Холестерин, действуя по челночному механизму, также способствует проникновению жирных кислот через кишечную стенку. Отщепившиеся же желчные кислоты проникают в кровь, поступают в печень и снова участвуют в образовании желчи (энтерогепатическая циркуляция). Примерно 0,2-0,5г желчных кислот в сутки не всасывается и выводится с калом. Глицерин является водорастворимым соединением, поэтому он легко всасывается слизистой кишечника и либо участвует в ресинтезе триацилглицеринов, либо сгорает.

В кишечных ворсинках происходит ресинтез жира из жирных кислот и глицерина.

Азотистые основания, главным образом, холин и этаноламин, взаимодействуют и затем всасываются в связи с нуклеотидом цитидиндифосфатом. Фосфорная кислота проникает через стенку кишечника в виде натриевых или калиевых солей. Вновь образовавшиеся в слизистой кишечника триацилглицерины, фосфолипиды, всосавшийся холестерин связываются с небольшим

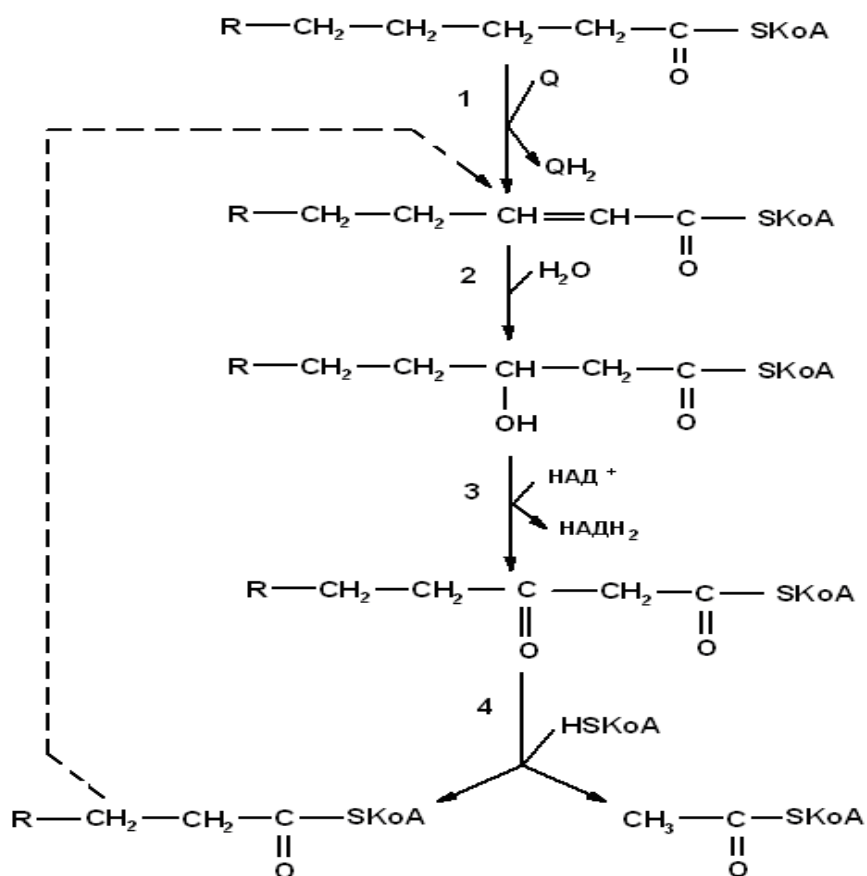
количеством белка и превращаются в достаточно стабильные комплексы – хиломикроны. Они из-за своих больших размеров не могут проникать в кровь и поступают в лимфатическую систему кишечника, а затем в грудной лимфатический проток. Лишь из этого протока хиломикроны попадают в кровеносное русло; в крови, а также в печени они трансформируются в различные липопротеины.

Распад нейтральных липидов происходит за счет гидролитического действия **липаз**, фосфолипиды расщепляются фосфолипазами. Распад приводит к образованию глицерина и жирных кислот, иногда фосфатов и аминокспиртов. Глицерин, получающийся в этой реакции, фосфорилируется до глицеро-1-фосфата, дегидрируется до диоксиацетон-фосфата и участвует далее в процессе гликолиза.

Распад жирных кислот осуществляется в результате  **$\beta$ -окисления**. Окисление жирных кислот происходит в митохондриях и складывается из 5 этапов. Сначала жирная кислота в присутствии кофермента А и АТФ активируется и связывается со специальным переносчиком – карнитином:

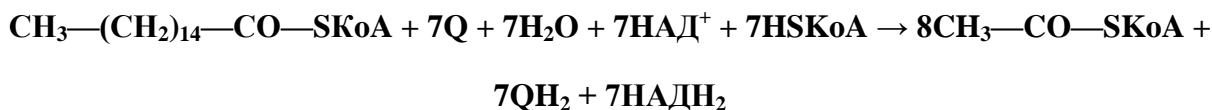


После этого наступают: первая стадия дегидрирования, стадия гидратации и вторая стадия дегидрирования. В результате этих стадий активированная жирная кислота оказывается подготовленной для действия фермента тиолазы. Под влиянием этого фермента образуется укороченный на два углеродных атома ацил-КоА и двухуглеродный остаток – ацетил-КоА (рис. 16).



**Рис. 16. Схема окисления жирных кислот**

В качестве примера приведем суммарный результат окисления пальмитил-КоА:



При сгорании пальмитиновой кислоты, содержащей 16 атомов углерода, образуется 130 молекул АТФ.

**Синтез** жирных кислот катализируется полиферментным комплексом, образованным шестью субъединицами, причем каждая соответствует индивидуальному ферменту, входящему в стабильную структуру, трудно разделяемую на компоненты. Пространственная структура комплекса такова, что каждый компонент может перенести промежуточные соединения от активного центра одного к активному центру другого фермента.

В результате такой организации конечный продукт, для биосинтеза которого требуется целый ряд отдельных реакций, образуется быстро и эффективно. Промежуточные соединения переносятся молекулой ацилпереносящего белка (АПБ), связывающего их с остатком 4-фосфопантотеновой кислоты. В данном случае биосинтез отличается от  $\beta$ -окисления жирных кислот, где ацильная группа связана с коферментом А.

Последовательность биосинтетических реакций начинается от ацетил-СоА, который в результате карбоксилирования на биотинсодержащем ферменте превращается в малонил-СоА. Малонил-СоА и ацетил-СоА переносятся к концевой сульфгидрильной группе простетической группы АПБ. Ацетоацетил-S-АПБ образуется конденсацией малонил-S-АПБ и ацетил-S-АПБ (с одновременным выделением  $\text{CO}_2$ ) и постепенно гидрируется, дегидратируется и восстанавливается опять в бутирил-СоА. Повторение этого процесса приводит к образованию пальмитиновой кислоты.

Процесс наращивания углеродной цепи жирных кислот протекает либо внутри митохондрий присоединением ацетил-СоА к ацил-СоА, либо в эндоплазматическом ретикулуме, где цепь удлиняется при помощи малонил-СоА.

Главные различия между биосинтезом жирных кислот и их  $\beta$ -окислением: а) синтез происходит в цитоплазме, а окисление - в митохондриях; б) функции переносчика в синтезе выполняет АПБ, при  $\beta$ -окислении - HS-СоА; в) синтез происходит через промежуточное образование малонил-СоА; г) в биосинтезе только NADPH играет роль кофермента, в  $\beta$ -окислении участвуют как NAD, так и FAD.

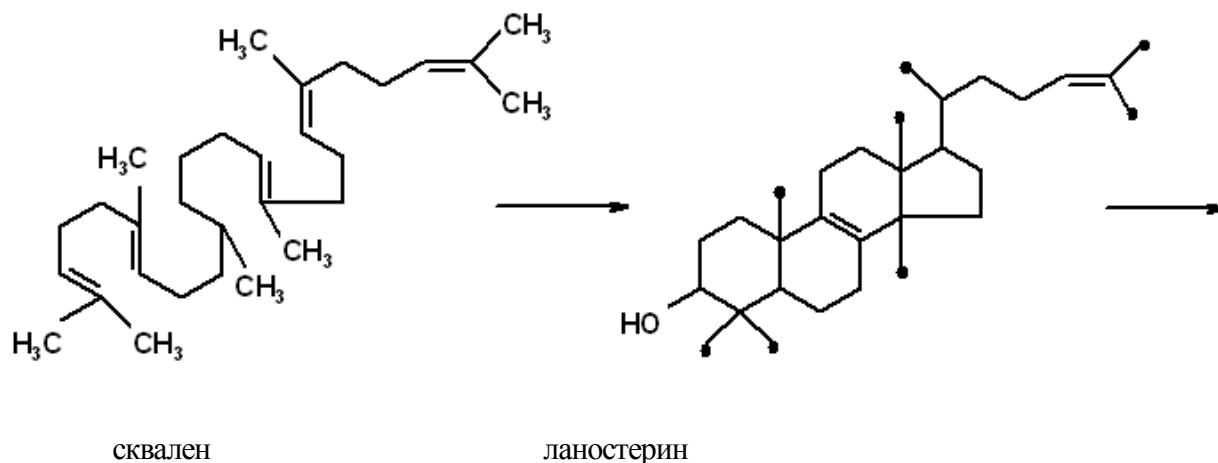
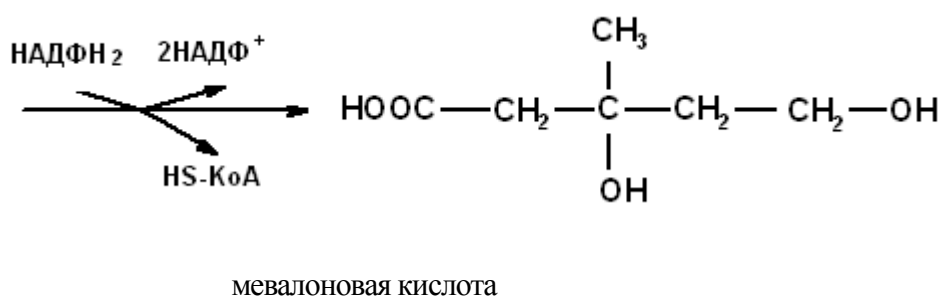
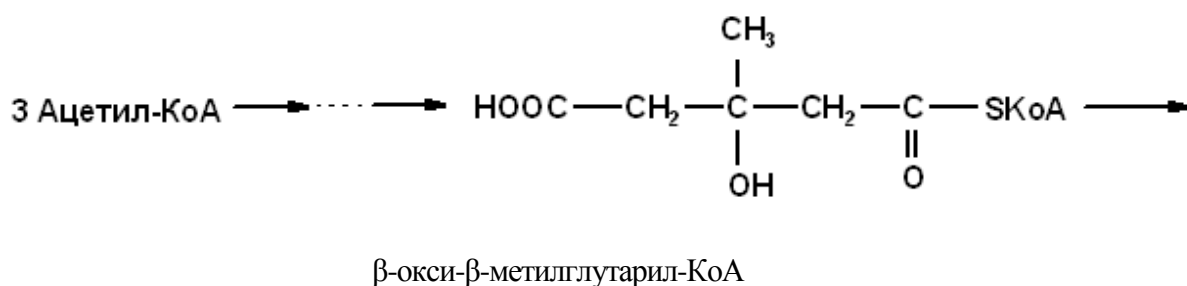
Схематически биосинтез насыщенной жирной кислоты представлен на рисунке.

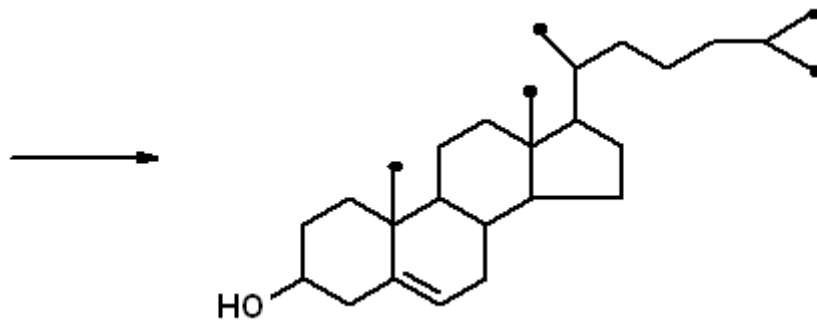


выражается с помощью плотности (плотность повышается с повышением содержания белка).

Синтез **фосфолипидов**, как и синтез нейтральных жиров, происходит через образование общего промежуточного соединения, L-фосфатидной кислоты, которая реагирует с цитинтрифосфатом с образованием цидинфосфатдиацилглицерина. Данное соединение является исходным для синтеза фосфатидилинозита, фосфатидилглицерина и дифосфатидилглицерина. 1,2-Диацилглицерин, реагирующий с холином или этаноламином в виде производных цитинфосфат, является также предшественником фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina. Главной функцией фосфолипидов является их участие в образовании мембран и механизме мембранной проницаемости, а также транспорт жиров в организме.

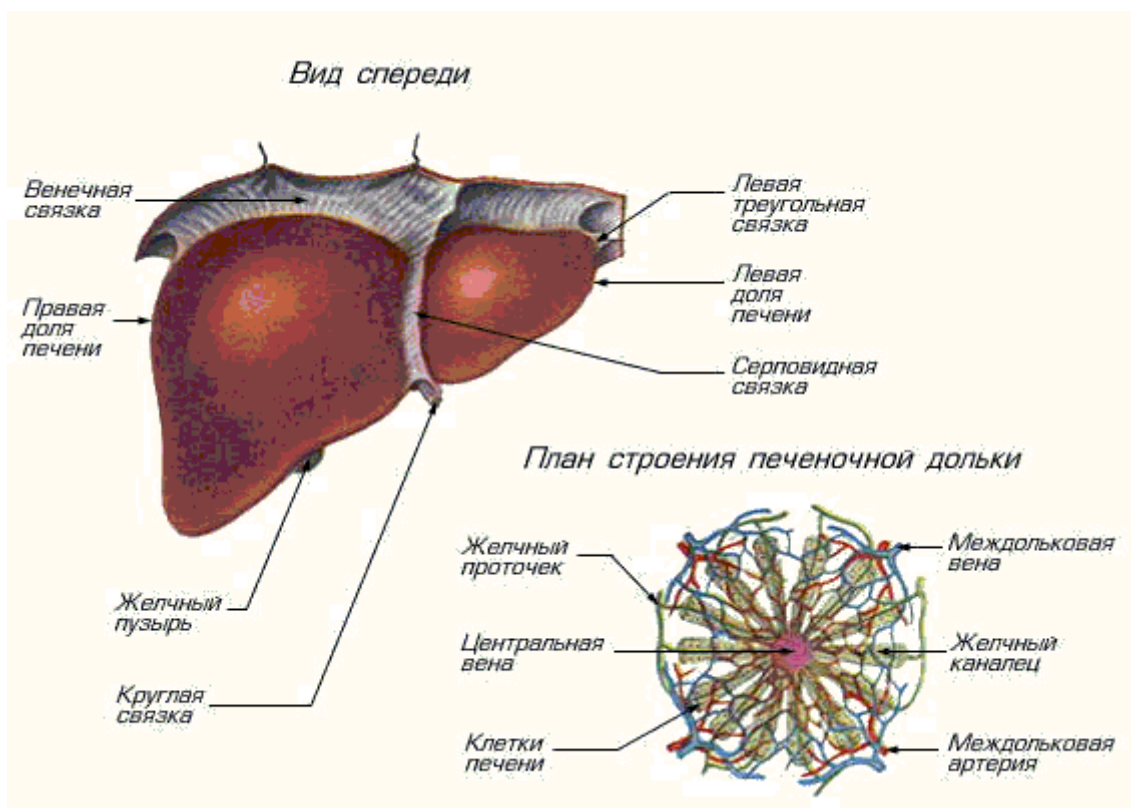
**Синтез холестерина.** На первом активный ацетат превращается в мевалоновую кислоту, на втором этапе из нее образуется сквален, который затем циклизуется в холестерин:





холестерин

Рис. 18 Синтез холестерина





## **ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: ОБМЕН ЛИПИДОВ**

### **РАБОТА 1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ**

**Принцип метода.** Метод основан на качественной реакции обнаружения желчных кислот в биологических системах.

#### **Ход анализа.**

*1. Влияние желчи на поверхностное натяжение воды.* В пробирку с 1-2 мл воды насыпать щепотку тонкого порошка серы (серный цвет) – порошок остается плавать на поверхности воды. В другую пробирку к 1-2 мл воды добавляют 5-10 капель желчи, смешивают и насыпают щепотку порошка серы – порошок тонет. Это обусловлено тем, что содержащиеся в желчи соли желчных кислот понижают поверхностное натяжение воды.

Способностью солей желчных кислот понижать поверхностное натяжение воды и растворять некоторые соединения, трудно растворимые в воде, обусловлено прохождение жира через бумажный фильтр, смоченный заранее раствором желчи, тогда как через фильтр, смоченный водой, жир не проходит.

*2. Реакции на желчные кислоты (реакция Петтенкофера).* В пробирку наливают 1-2 мл концентрированной серной кислоты и осторожно добавляют равный объем желчи, смешанной в отдельной пробирке с 1 каплей свежеприготовленного 10% раствора сахарозы. На границе раздела жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовое кольцо.

При осторожном смешивании обеих жидкостей, так, чтобы не происходило саморазогревание свыше  $70^{\circ}\text{C}$ , жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая при взбалтывании на воздухе быстро темнеет и приобретает пурпурный цвет. Окраска обусловлена взаимодействием хелевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты.

#### **Оборудование**

1. Материал исследования: желчь.
2. Реактивы: концентрированная серная кислота, 10% сахароза, порошок серы.
3. Пробирки, пипетки.

### **РАБОТА 2. ВЛИЯНИЕ ЖЕЛЧИ НА АКТИВНОСТЬ ЛИПАЗЫ.**

**Принцип метода.** Метод основан на титриметрическом определении активности липазы в присутствии желчи и без нее.

Жиры практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонком кишечнике происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами (липазами), вырабатываемыми поджелудочной железой. В процессе переваривания и всасывания липидов важная роль принадлежит желчным кислотам. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Для изучения действия липазы готовят смесь липазы с жиром (молоко или подсолнечное масло) и определяют количество жирных кислот, образовавшихся в результате

расщепления жира через различные (от начала опыта) промежутки времени. Количество жирных кислот определяют титрованием 0,01 н раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина.

### Ход анализа.

1. Готовят три колбы: две опытные и одну контрольную. В них смешивают экстракт липазы, желчь и субстрат как указано в таблице 6.

Таблица 6

### Состав проб

Компоненты инкубационной смеси	Опытная проба без желчи, мл	Опытная проба с желчью, мл	Контрольная проба, мл
1. Молоко (1:10)	10	10	10
2. Экстракт липазы	1	1	1(предварительно кипятить 10 мин)
3. Раствор желчи	---	1	1
4. Вода	1	---	1

2. Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. Добавляют в каждый стаканчик по 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,01 н раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы.

3. Оставшуюся смесь в колбах помещают в термостат, температура которого 38<sup>0</sup> – 40<sup>0</sup>С и через определенные интервалы времени (15, 30, 90 мин) отбирают из каждой колбы ( не вынимая их из термостата) по 2 мл смеси . и титруют 0,01 н гидроксидом натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице 6.

Результаты первого титрования, полученные до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

Таблица 7

### Результаты титрования

Время инкубации, мин	Объем 0.01 н гидроксида натрия, пошедшего на титрование, мл		
	опытная проба без желчи	опытная проба с желчью	контрольная проба
15			
30			
90			

5. На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в мин), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом 0,01 н раствора гидроксида натрия (в мл), пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени. Сравнивают активность липазы в присутствии желчи и без нее.

### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: экстракт липазы из поджелудочной железы или панкреатин.
- 2.Реактивы и оборудование: молоко, разбавленное 1:10, или подсолнечное масло, раствор желчи, 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 0,01 н гидроксид натрия.
- 3.Колбы, мерные цилиндры.
- 4.Бюретки, стаканчики для титрования, пипетки.
- 5.Термостат.

## **РАБОТА 3. ОБНАРУЖЕНИЕ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В МОЧЕ**

**Принцип метода.** Метод основан на качественной реакции обнаружения кетонových тел в биологических системах.

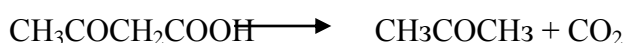
Кетонные тела ( $\beta$ -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон) появляются в моче и крови при нарушении углеводного и жирового обмена в частности при диабете, а также при голодании. В нормальной моче кетонные тела обычными реакциями не обнаруживаются. Определение кетонных тел в моче очень важно для диагностики заболевания, для контроля за ходом лечения и установлением диеты для больного диабетом.

### **Ход анализа**

*1. Проба Люголя на ацетон:* К 2 мл мочи добавляют 3-4 капли раствора нитропруссид натрия и 2-3 капли щёлочи. Появляется красно-бурое окрашивание. При подкислении КОН уксусной кислотой окрашивание становится ярко-красным. Если ацетон отсутствует в моче, при подкислении уксусной кислотой красное окрашивание переходит в желтое (реакция на креатинин в моче).

*2. Проба Либена на ацетон:* К 2 мл мочи добавляют 3-5 капель щёлочи и затем по каплям раствор Люголя до слабо-желтой окраски раствора. При наличии ацетона в моче жидкость мутнеет вследствие выделения бледно-жёлтого кристаллического осадка йодоформа, обладающего характерным запахом.

*3. Проба Рехарда на ацетоуксусную кислоту:* К 5 мл мочи прибавляют по каплям раствор хлорида железа, выпадает осадок фосфатов в форме  $\text{FePO}_4$  при наличии ацетоуксусной кислоты от прибавления лишней капли  $\text{FeCl}_3$ , появляется винно-красное окрашивание (реакция на енолы), постепенно бледнеющее при стоянии вследствие самопроизвольного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты.



### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: моча.

2. Реактивы и оборудование: свежеприготовленный 10% нитропруссид натрия, 10% гидроксида натрия, раствор Люголя, 5% раствор хлорида железа (III), концентрированная уксусная кислота.

## ЛИТЕРАТУРА

### Основная

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 2012. - 704 с. ISBN 978-5-2251-0013-1.
2. *Данилова, Н. С.*, Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов : учебное пособие / Н. С. Данилова. - М. : Колос С, 2008. - 280 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0513-9
3. *Пустовалова, Л. М.*, Основы биохимии для медицинских колледжей [Текст] : учебное пособие / Л. М. Пустовалова. - Ростов н/Д. : Феникс, 2003. - 448 с. - (Серия "Медицина для вас"). - ISBN 5-222-03395-3

### Дополнительная

1. *Гидранович, В.И.* Биохимия. Минск: ТетраСистемс, – 2012. – 528 с. ISBN 978-985-536-244-0
2. *Ловцова, Л.Г.*, Биохимия. Методические указания./ Смутнев П.В., – Саратов, 2013. – 70с. ISBN 978-5-9999-1808-6
3. *Таганович, А.Д.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с. ISBN 978-985-528-710-1.

## ТЕМА 5. СПЕЦИАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ

**Цель:** сформировать практические навыки биохимического анализа с основами физико-химических исследований мяса и молока.

**Актуальность цели:** Мясо – один из важнейших продуктов питания. Оно содержит полноценные белки, липиды, углеводы, витамины, минеральные вещества и другие соединения. Мясом обычно называют скелетную мускулатуру животных. В зависимости от вида животного мясо называют говядиной, телятиной, свининой, бараниной, олениной и т. д.

Кроме мяса от животных получают жиры. В зависимости от источника получения и качества животные жиры делят на пищевые и технические. Особое место среди животных жиров занимает молочный жир. Технические жиры получают восстановлением, экстрагированием или прессованием жиросодержащего сырья убойных животных. Он не пригоден для пищи и используется для других целей, например, для приготовления мыл, смазочных средств и др.

Химический состав мяса зависит от вида, породы, упитанности, рациона и функционального состояния животного в момент убоя. Содержание основных веществ в мясе различных животных следующее: вода 47,5 — 78,2%, белки 14,5 — 20,8%, жиры 3,5 — 37,3%, углеводы 3,5 — 4,0%, минеральные вещества 0,7 - 1,7%. Калорийность мяса 87 — 406 ккал/100 г.

Лабораторное исследование свежести мяса производится в случае невозможности органолептического определения.

### ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: СПЕЦИАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ

#### РАБОТА 1. ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА МЯСА ПО АНДРИЕВСКОМУ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕНТНОЙ ФИЛЬТРУЕМОСТИ И ПРОЗРАЧНОСТИ ФИЛЬТРАТА МЯСА

**Принцип метода.** Метод основан на физико-химическом определении показателей качества мяса.

##### **Ход анализа.**

Берут 10 грамм мяса, по возможности, освобожденного от соединительной ткани и жира, ножницами нарезают на 20—30 кусочков и помещают в коническую колбу вместимостью в 250 см<sup>3</sup>. Затем наливают в эту колбу 100 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и оставляют на 15 минут, все время потряхивая ее. Через 15 минут экстракт фильтруется через однослойный бумажный фильтр в измерительный цилиндр в 100 см<sup>3</sup>.

а) Отмечают сколько кубических см экстракта проходит через фильтр в каждые 5 минут (процент указывается измерительным цилиндром). Экстракт доброкачественного мяса фильтруется в первые 5 минут от 50 до 60 и больше процентов и в 10 минут профильтровывается весь. Недоброкачественное мясо в зависимости от степени испорченности в первые 5—10 минут дает 25—30% фильтрата и для фильтрации всего экстракта обычно требуется более 1 часа.

б) Фильтрат экстракта свежего мяса совершенно прозрачный, розоватого цвета. Фильтрат экстракта загнившего мяса, в зависимости от степени разложения, имеет опалесценцию той или иной степени, мутный цвет от бледно-розового с беловатым оттенком до серо-зеленого.

#### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: мясо.
- 2.Реактивы: бидистиллированная вода.
- 3.Ножницы, коническая колба на 250 мл.
- 4.Измерительный цилиндр на 100 мл, бумажный фильтр.

### **РАБОТА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ СРЕДЫ ФИЛЬТРАТА МЯСА ПОСРЕДСТВОМ ЛАКМУСОВОЙ БУМАЖКИ И pH-МЕТРОМ**

**Принцип метода.** Метод основан на измерении pH среды фильтрата мяса.

#### **Ход анализа**

В пробирку наливают 3—4 мл фильтрата мяса, помещают в него индикаторную универсальную бумагу и по изменившейся окраске индикаторной бумаги в сравнении со стандартной шкалой определяют pH.

В стеклянный стаканчик наливают 30—40 мл фильтрата мяса, помещают в него электроды pH-метра и по шкале определяют pH.

#### **Оборудование**

- 1.Материал исследования: мясной экстракт.
- 2.Реактивы: индикаторная универсальная бумага.
- 3.Пробирки, стеклянный стаканчик на 50 мл.
- 4.pH-метр.

### **РАБОТА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА МЯСА**

**Принцип метода.** Метод основан на качественных реакциях используемых для показателей качества мяса.

#### **Ход анализа**

*1. Реакция на аммиак.* В пробирку наливают 1 мл реактива Несслера и затем приливают 10 капель экстракта мяса. В экстракте испорченного мяса появляется желтоватый и желто-коричневый цвет с аналогичного цвета осадком. В пробирке с экстрактом доброкачественного мяса никаких изменений в цвете нет, имеется цвет реактива.

*2. Проба на глобулины (ставится только с мясом крупного рогатого скота).* В пробирку наливают 2 мл фильтрата мяса и прибавляют 2—3 капли 1 % водного раствора уксусной кислоты. Все пробирки с пробами ставятся на 2—3 минуты в водяную баню при 75 -80°C. В пробирке с экстрактом испорченного мяса выпадает хлопчатый осадок и муть становится интенсивнее. Экстракт доброкачественного мяса, наоборот, после подогрева становится еще прозрачнее.

3. *Бензидиновая проба на пероксидазу.* В пробирку наливают 2 мл экстракта мяса, затем прибавляют 5 капель 0,2% спиртового раствора бензидина и 2 капли 1 % перекиси водорода. Все это взбалтывают. Экстракт свежего мяса дает синий цвет спустя 1/3 - 1 минуту с последующим побурением среды.

Экстракт сомнительного мяса дает менее интенсивную окраску и притом значительно позже (2- 3 минуты) с последующим переходом в бурый цвет. Экстракт испорченного мяса не дает синей окраски и непосредственно переходит в бурый цвет.

4. *Проба с медным купоросом.* В пробирку наливают 2—3 мл экстракта мяса и к нему прибавляют 5-6 капель медного купороса. Экстракт недоброкачественного мяса дает муть и осадок. В экстракте доброкачественного мяса никакого изменения не наблюдается.

### **Оборудование**

1. Материал исследования: экстракт мяса.

2. Реактивы и оборудование: реактив Несслера, 1 % уксусная кислота, 1 % раствор перекиси водорода, 0,2 % спиртовой раствор бензидина, 10% раствор сульфата меди.

3. Пробирки, пипетки, водяная баня.

### ***Молоко и молочные продукты***

Казеиноген (белок молока) обладает свойствами кислоты и в молоке находится в виде анионов, растворимых в воде (кальцинат казеиногена). Недиссоциированные молекулы казеиногена малорастворимы в воде. Изoeлектрическая точка казеиногена находится при pH 4,7. Этим объясняется, что при подкислении молока до pH 4,7 молоко свёртывается в результате выпадения в осадок казеиногена. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению. Свёртывание молока возможно и в присутствии молочной кислоты, образовавшейся из лактозы под влиянием молочно-кислых бактерий. При ферментативном свёртывании молока (действие пепсина) казеиноген подвергается химическим изменениям с образованием из него казеина. Кальциевая соль казеина в противоположность кальциевой соли казеиногена нерастворима в воде. Превращением казеиногена в казеин объясняется ферментативное свёртывание молока.

## **РАБОТА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНОГЕНА ИЗ МОЛОКА И ЕГО ГИДРОЛИЗ**

**Принцип метода.** Метод основан на физико-химических свойствах казеиногена молока.

### **Ход анализа.**

1. *Выделение казеиногена.* К 4 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды. Осаждают казеиноген добавлением 2 капель концентрированной уксусной кислоты. Выпавший осадок казеиногена отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой два раза.

2. *Гидролиз казеиногена.* При щелочном гидролизе казеиногена, выделенного из молока или зёрен казеина, происходит его распад на фосфат и белок. После осаждения казеиногена из молока (или 100 мг казеина в виде порошка) всё содержимое с фильтра переносят в пробирку для гидролиза с обратным холодильником. Затем смывают осадок с фильтра 2 мл 0,1%-го раствора карбоната натрия в ту же пробирку и добавляют 4 мл 10%-го раствора едкого натра.

Кипятят на умеренном огне (на асбестовой сетке) 15 минут с момента закипания. После охлаждения к гидролизату добавляют равный объём 0,1%-го раствора карбоната натрия и проводят реакции на продукты гидролизата.

3. *Обнаружение белка.* Белок обнаруживают биуретовой реакцией (см. работу 1).

4. *Обнаружение фосфата (молибденовая проба.* К 1 мл разведённого гидролизата казеиногена добавляют 1 каплю фенолфталеина и 1 каплю концентрированной азотной кислоты и только после обесцвечивания вносят 2 мл молибденового реактива. Затем доводят раствор до кипения и сразу пробирку охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется жёлтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

### **Оборудование**

1. Материал исследования: молоко.

2. Реактивы и оборудование: концентрированная уксусная кислота 1% сульфат меди, 10% гидроксид натрия, 10% серная кислота, молибденовый реактив, 0,1% карбонат натрия, 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина, концентрированная азотная кислота.

3. Воронки, фильтры, пробирки.

4. Пипетки, стеклянная палочка, пробирка для гидролиза (с обратным холодильником).

## **РАБОТА 5. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСОК НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ МОЛОКА**

**Принцип метода.** Метод основан на биохимических и физико-химических свойствах заквасок для изменения составных частей молока

Молоко - естественная питательная среда для развития молочнокислых бактерий (*Lactobacillus*, *Streptococcus* и др.). Важнейшим биохимическим процессом, вызываемым микроорганизмами бактериальных заквасок, является брожение молочного сахара (лактозы). Его скорость и направление определяет консистенцию, вкус и запах готовых продуктов. По характеру брожения молочного сахара кисломолочные продукты можно разделить на две группы. К первой группе относят продукты, в основе которых лежит, главным образом, молочнокислое брожение (простокваша, йогурт, творог, сметана), ко второй группе – продукты со смешанным брожением, при изготовлении которых происходит молочнокислое и спиртовое брожение (кефир, кумыс, курунга). Накопление молочной кислоты при молочнокислом брожении лактозы имеет существенное значение для образования белкового сгустка, определяющего консистенцию кисломолочных продуктов. Скорость свертывания белков молока, качество сгустков, эффективность развития микроорганизмов бактериальных заквасок существенно зависят от состава и свойств исходного сырья.

### **Ход анализа**

1. *Определение вязкости молока и кефира.* Вязкость жидкости можно определить различными методами – по измерению времени истечения определенного объема жидкости через капилляр, скорости свободного падения в продукте шарика известной массы и т.д. Для определения вязкости жидкостей имеются специальные приборы – вискозиметры (капиллярные, с падающим шариком, ротационные и др.). Простейшим аналогом капиллярного вискозиметра может служить пипетка, имеющая определенный объем выходного отверстия.

Для определения вязкости молока пипеткой отмеривают 100 мл свежего молока, помещают конец пипетки в колбу или стакан, снимают с верхнего отверстия указательный палец, включают секундомер и дают продукту вытечь. Отмечают продолжительность истечения молока из пипетки.

Аналогичным образом измеряют вязкость кефира. Кефир хорошей консистенции вытекает из пипетки не менее чем за 30 сек., удовлетворительной консистенции за 20 сек.

2. *Определение буферной емкости молока и кефира.* Буферная емкость характеризует способность буферной системы противостоять изменению рН среды после добавления некоторого количества сильной кислоты или основания. Значение буферной емкости определяется количеством г-экв. сильной кислоты или щелочи, которое необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы изменить значение рН на единицу.

В пробирку отмеряют 1 мл свежего молока, добавляют 2 капли раствора фенолфталеина, тщательно встряхивают. Затем содержимое пробирки оттитровывают 0,1н раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания. Это соответствует рН 9,0. Предварительно с помощью универсальной индикаторной бумаги определяют рН молока.

*Пример.* На титрование 1 мл молока с рН 6,5 пошло 0,6 мл 0,1н раствора гидроксида натрия. Следовательно, буферная емкость будет равна:

$$X = \text{г-экв.} / \text{pH}_2 - \text{pH}_1 X = 0,6 \times 0,1 / 9,0 - 6,5 = 0,024 \text{ г-экв.}$$

Аналогичным образом измеряется буферная емкость кисломолочных продуктов (кефира).

3. *Определение титруемой и активной кислотности молока и кисломолочных продуктов.* Титруемую кислотность молока в нашей стране выражают в градусах Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ ). Градусы Тернера показывают количество мл 0,1н раствора гидроксида натрия, необходимое для нейтрализации 100 мл разбавленного в два раза водой молока. Определение кислотности заключается в нейтрализации (титровании) кислых солей, белков, свободных аминокислот, органических кислот и других кислых соединений молока раствором щелочи в присутствии индикатора фенолфталеина.

В коническую колбу вместимостью 150-200 мл отмеривают пипеткой 10 мл молока, прибавляют 20 мл дистиллированной воды и 3 капли фенолфталеина. Смесь тщательно перемешивают и титруют 0,1н раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1мин. Титруемую кислотность молока в градусах Тернера рассчитывают, умножая на 10 объем щелочи, пошедший на нейтрализацию 10 мл молока. Расхождение между параллельными определениями не должно быть выше  $1^{\circ}\text{T}$ . Свежее молоко коровы имеет  $16-18^{\circ}\text{T}$ , отстоявшееся –  $20-22^{\circ}\text{T}$ , не свернувшееся, но свертывающееся при кипячении –  $24-27^{\circ}\text{T}$ .

Ход анализа при определении титруемой кислотности кисломолочных продуктов в основном аналогичен предыдущему. Отличие заключается лишь в подготовке проб. Так, кефир предварительно выдерживают на кипящей водяной бане для удаления углекислого газа.

Для измерения активной кислотности применяют разные методы: приближенный – с помощью индикаторов, и более точный – потенциометрический метод с использованием специальных приборов (рН-метров, иономеров и др.). Определение рН молока на рН-метре заключается в измерении разности потенциалов между измерительным электродом и электродом сравнения, погруженным в пробу молока. В качестве измерительного или индикаторного электрода служит стеклянный электрод, в качестве электрода сравнения – хлорсеребряный. При погружении стеклянного электрода в исследуемую жидкость между поверхностью его чувствительной части и исследуемым раствором происходит обмен ионами натрия и водорода. В результате обмена возникает электродный потенциал, пропорциональный рН раствора (молока). Этот потенциал измеряют с помощью электрода сравнения, потенциал которого постоянен и не зависит от рН раствора.

рН-метр включают в сеть, прогревают в течение 10-15 мин и проверяют показания по стандартным буферным растворам. Затем стаканчик и электроды промывают дистиллированной водой. В стаканчик наливают 40 мл молока, простокваши или кефира и

погружают в него электроды прибора. Температурный компенсатор устанавливают на температуру молока. После того, как стрелка остановится, считывают показания по шкале прибора. Для перевода величины рН в градусы титруемой кислотности пользуются таблицами.

Таблица 8

**Соотношение между рН и титруемой кислотностью молока**

Титруемая кислотность, °Т	Колебания рН	Среднее значение рН
16	6,75 – 6,72	6,73
17	6,72 - 6,67	6,69
18	6,66 – 6,61	6,64
19	6,60 – 6,65	6,58
20	6,54 – 6,49	6,52
21	6,48 – 6,44	6,46
22	6,43 – 6,39	6,41

Таблица 9

**Усредненные соотношения между рН и титруемой кислотностью кисломолочных напитков**

Титруемая кислотность, °Т	Значение рН	
	кефира	простокваши
50	5,38	5,30
60	5,14	5,00
70	4,94	4,73
75	4,85	4,60
80	4,76	4,47
85	4,68	4,37
90	4,60	4,28
95	4,54	4,21
100	4,48	4,14
105	4,42	4,08
110	4,36	4,02
115	4,31	3,98
120	4,26	3,94

4. *Определение углеводов в свежем молоке и кисломолочных продуктах.* Метод основан на реакции углеводов с 10 М серной кислотой (569 мл концентрированной серной кислоты плотностью 1,832 смешивают с дистиллированной водой и доводят объем до 1000 мл) и

измерении оптической плотности окрашенного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 450 нм.

В пробирку отмеривают 0,5 мл дистиллированной воды и 7,5 мл 10 М раствора серной кислоты. Хорошо перемешивают, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают до температуры 20<sup>0</sup>С. Полученный раствор используют в качестве контрольной пробы.

В мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривают 10 мл свежего молока или кисломолочных продуктов (простокваша, кефир). Для осаждения белков в колбу приливают по 0,5 мл растворов 30% ацетата цинка или 15% гексацианоферрата (II) калия. После внесения каждого из растворов смесь перемешивают. Содержимое колбы доливают до метки водой, перемешивают и спустя 5 мин фильтруют через сухой складчатый фильтр в чистую колбу.

В стеклянную пробирку пипеткой отмеривают 0,5 мл фильтрата, 7,5 мл 10 М серной кислоты. Хорошо перемешивают, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают до температуры 20<sup>0</sup>С и фотометрируют, используя кювету 10 мм, относительно холостой пробы

Массовую долю углеводов X ( % ) вычисляют по формуле:

$$X = [ D / 0,094 ] \cdot 0,8$$

D - оптическая плотность

0,094 и 0,8 - расчетные коэффициенты

Расхождения между параллельными пробами не должны превышать 0,5%.

##### *5. Влияние бактериальных заквасок на массовую долю лактозы в сыворотке.*

Для определения содержания лактозы в молочной сыворотке используют ряд методов. Наиболее часто используют рефрактометрические и фотоколориметрические методы.

**Рефрактометрический метод.** Он основан на способности молочной сыворотки по-разному преломлять проходящий через нее свет в зависимости от концентрации лактозы. Показатель преломления молочной сыворотки устанавливают по углу отклонения светового луча сывороткой, заключенной между призмами рефрактометра.

Предварительно готовят молочную сыворотку. В пробирку отмеривают 5 мл свежего молока и добавляют 5 капель 4% раствора хлорида кальция. Пробирку плотно закрывают пробкой и для полного осаждения белков ставят ее на кипящую водяную баню. Через 10 мин пробирку вынимают из бани и охлаждают. Затем берут пипетку с ватным тампоном в нижней части и набирают сыворотку, фильтруя ее, таким образом, через вату. Сыворотку кисломолочных напитков (простокваша, кефир) получают после их центрифугирования.

Далее каплю прозрачной сыворотки наносят на поверхность нижней призмы рефрактометра. Производят отсчет и по таблице (табл. 6) находят процентное содержание лактозы в молочной сыворотке. Аналогичным образом находят содержание лактозы в сыворотке скисшего молока, простокваше и кефире, предварительно определяя их титруемую кислотность.

**Зависимость массовой доли лактозы от показателя преломления молочной сыворотки**

Показатель преломления	Содержание лактозы, %	Показатель преломления	Содержание лактозы, %	Показатель преломления	Содержание лактозы, %
1,3390	3,01	1,3405	3,77	1,3420	4,52
1,3391	3,06	1,3406	3,82	1,3421	4,57
1,3392	3,11	1,3407	3,87	1,3422	4,62
1,3393	3,16	1,3408	3,92	1,3423	4,67
1,3394	3,21	1,3409	3,97	1,3424	4,72
1,3395	3,26	1,3410	4,02	1,3425	4,77
1,3396	3,31	1,3411	4,07	1,3426	4,82
1,3397	3,36	1,3412	4,12	1,3427	4,87
1,3398	3,42	1,3413	4,17	1,3428	4,92
1,3399	3,47	1,3414	4,22	1,3429	4,97
1,3400	3,52	1,3415	4,27	1,3430	5,02
1,3401	3,57	1,3416	4,32	1,3431	5,07
1,3402	3,62	1,3417	4,37	1,3432	5,12
1,3403	3,67	1,3418	4,42	1,3433	5,17
1,3404	3,72	1,3419	4,47	1,3434	5,22

При повышенной кислотности молока в пределах 18–30<sup>0</sup>T вносят поправку – вычитают из содержания молочного сахара 0,011 на каждый градус сверх 17<sup>0</sup>T; в пределах 30–60<sup>0</sup>T поправка равна 0,008. Например, если при кислотности молока в 28<sup>0</sup>T по таблице найдено содержание лактозы 4,89%, то поправку на кислотность делают следующим образом:

$$28^{\circ}\text{T} - 18^{\circ}\text{T} = 10^{\circ}\text{T};$$

$$10 \cdot 0,011 = 0,11\%; \quad 4,89 - 0,11 = 4,78\%.$$

*Фотокolorиметрический метод.* 1 мл молока или кисломолочного продукта смешивают в колбе с 25 мл дистиллированной воды. Добавляют 2 мл 1н раствора гидроксида натрия и помещают в мерную колбу на 100 мл. Перемешивают до растворения белков и доводят объем дистиллированной водой до метки. Раствор фильтруют, 1 мл фильтрата смешивают с 1 мл 5%

раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты. Определяют оптическую плотность на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре

( $\lambda$  490 нм), используя для сравнения контрольную пробу. Контрольной пробой является смесь 1 мл воды, 1 мл 5% раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты.

Массовую долю лактозы в продукте рассчитывают по градуировочному графику, затем пересчитывают на 100 г продукта по формуле:

$$L = C / 100$$

L - массовая доля лактозы в исследуемом продукте, %

C - концентрация лактозы в растворе для анализа по градуировочному графику, мкг/мл

Для того, чтобы построить график, из 2% раствора лактозы готовят 0,2% раствор (реактив А). Из полученного раствора готовят следующие разведения: (табл. 7).

Таблица 11

### Концентрация лактозы и объем разведения

Объем, мл		Концентрация лактозы, мкг/мл
реактив А	дистиллированная вода	
1	99	20
2	98	40
3	97	60
4	96	80
5	95	100
10	90	200
15	85	300
20	80	400
25	75	500
30	70	600
35	65	700
40	60	800

Для фотометрирования берут 1 мл каждого разведения, смешивают с 1 мл 5% раствора фенола и с 5 мл концентрированной серной кислоты. Определяют оптическую плотность и строят градуировочный график.

### Оборудование

1. Материал исследования: свежее молоко, простокваша, кефир.
2. Реактивы: 0,1 н и 1 н растворы гидроксида натрия, 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 4% раствор хлорида кальция, 5% раствор фенола, 10 М раствор серной кислоты, концентрированная серная кислота, 2% раствор лактозы, 30% раствор ацетата цинка, 15% раствор гексацианоферрата (II) калия.
3. Универсальная индикаторная бумага.
4. Бюретки, пипетка емкостью 100 мл с диаметром выходного отверстия 5 мм.
5. Секундомер, колбы или стаканы.
6. Центрифуга, центрифужные пробирки.
7. Мерные пипетки или мензурки.
8. Рефрактометр.

9. Фотоэлектроколориметр.
10. Водяная баня.

## ЛИТЕРАТУРА

### Основная

1. *Березов, Т. Т.* Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : Медицина, 2012. - 704 с. ISBN 978-5-2251-0013-1.
2. *Данилова, Н. С.*, Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов : учебное пособие / Н. С. Данилова. - М. : Колос С, 2008. - 280 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0513-9
3. *Пустовалова, Л. М.*, Основы биохимии для медицинских колледжей [Текст] : учебное пособие / Л. М. Пустовалова. - Ростов н/Д. : Феникс, 2003. - 448 с. - (Серия "Медицина для вас"). - ISBN 5-222-03395-3

### Дополнительная

1. *Гидранович, В.И.* Биохимия. Минск: ТетраСистемс, – 2012. – 528 с. ISBN 978-985-536-244-0
2. *Ловцова, Л.Г.*, Биохимия. Методические указания./ Смутнев П.В., – Саратов, 2013. – 70с. ISBN 978-5-9999-1808-6
3. *Таганович, А.Д.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии для фармацевтического факультета : практикум / А. Д. Таганович [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 160 с. ISBN 978-985-528-710-1.

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ .....	4
ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ НЕСЧАТНЫХ СЛУЧАЯХ .....	5
ТЕМА 1. МЕТАБОЛИЗМ.....	6
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ_ПО ТЕМЕ: МЕТАБОЛИЗМ.....	16
ЛИТЕРАТУРА.....	18
ТЕМА 2. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВО <b>ОШИБКА! ЗАКЛАДКА НЕ ОПРЕДЕЛЕНА.</b> <b>ОШИБКА! ЗАКЛАДКА НЕ ОПРЕДЕЛЕНА.</b> ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ_ПО ТЕМЕ: ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ.....	35
ЛИТЕРАТУРА.....	37
ТЕМА 3. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ .....	38
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ_ПО ТЕМЕ: ОБМЕН УГЛЕВОДОВ.....	53
ЛИТЕРАТУРА.....	56
ТЕМА 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ.....	57
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ_ПО ТЕМЕ: ОБМЕН ЛИПИДОВО <b>ОШИБКА! ЗАКЛАДКА НЕ ОПРЕДЕЛЕНА.</b>	
ЛИТЕРАТУРА.....	71
ТЕМА 5. СПЕЦИАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ .....	72
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ: ГОРМОНЫ. СПЕЦИАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ ....	72
ЛИТЕРАТУРА.....	81
СОДЕРЖАНИЕ .....	82

Саратов 2015