

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ ХІМІЇ ТА ФАРМАЦІЇ

О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

**Робочий зошит
для виконання лабораторних робіт
ЧАСТИНА І:
ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ**

(Прізвище, ім'я та по-батькові студента)

ОДЕСА
ОНУ
2022

Укладачі:

О. В. Устянська, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

А. М. І. Шкодовська, аспірант кафедри органічної та фармацевтичної хімії ОНУ імені І. І. Мечникова.

Рекомендовано вченою радою
факультету хімії та фармації ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 12.04.2022 р.

Рецензенти:

А. О. Цісак, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова;

І. М. Радаєва, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фармакології та технології ліків ОНУ імені І. І. Мечникова.

О. В. Устянська

Біологічна хімія. Частина І. Загальні закономірності метаболізму : робочий зошит. / О. В. Устянська, А. М. І. Шкодовська. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 48 с.

Робочий зошит для лабораторних робіт з курсу «Біологічна хімія» призначений для опанування методами якісного і кількісного аналізу. Лабораторні роботи містять класичні біохімічні методи і нові методики, також є контрольні питання і завдання за програмою «Біологічна хімія» (для здобувачів вищої освіти спеціальності 226 «Фармація. Промислова фармація.»), що дозволяє студентам глибоко засвоїти теоретичний матеріал.

УДК 573.7:612.603

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Заходи безпеки під час виконання лабораторної роботи	6
Лабораторне заняття 1. «Амінокислоти та білки»	9
Лабораторне заняття 2. «Ферменти»	15
Лабораторне заняття 3. «Ензимологія»	20
Лабораторне заняття 4. «Основні закономірності обміну речовин. ЦТК». Узагальнення по темам «Амінокислоти та білки», «Ферменти»	28
Лабораторне заняття 5. «Обмін вуглеводів»	34
Лабораторне заняття 6. «Ліпіди»	40
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	45

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Біохімія» вивчає метаболічні процеси у цілому організмі на основі системних знань про хімічну будову живих організмів і фізико-хімічні процеси, що забезпечують їх життєдіяльність; загальні закономірності ферментативного каталізу, біохімічної динаміки перетворення основних класів біомолекул, молекулярних механізмів спадковості та реалізації генетичної інформації, гормональної регуляції метаболізму та біологічних функцій клітин, біохімії спеціальних фізіологічних функцій.

Мета: оволодіння знаннями про біохімічні властивості та обмін основних біомолекул в організмі людини в нормі та за умов патології. Проведення біохімічних досліджень в біологічних рідинах та оцінювання результатів з інтерпретацією клініко-діагностичного значення.

Завдання:

- вивчення теоретичних основ біохімії;
- вивчення основних хімічних перетворень, які полягають у основі життєдіяльності;
- розуміння логіки процесів, які відбуваються в організмі та їх регуляції;
- оволодіння знаннями та навичками проводити біохімічні дослідження на виявлення нормальних та патологічних компонентів в біологічних рідинах;
- аналізувати результати біохімічних досліджень для діагностики найпоширеніших захворювань людини;
- аналізувати біохімічні процеси обміну речовин та його регуляції в забезпеченні функціонування органів та систем організму людини.

В результаті вивчення навчальної дисципліни студент повинен знати теоретичний матеріал: аналізувати реакційну здатність вуглеводів, ліпідів, амінокислот, що забезпечує їх функціональні властивості та метаболічні перетворення в організмі; пояснювати

основні механізми біохімічної дії та принципи спрямованого застосування різних класів фармакологічних засобів; біохімічні та молекулярні основи фізіологічних функцій клітин, органів і систем організму людини; знати та розуміти основні терміни, концепції, теорії і закони біохімії і на межі предметних галузей, будову, процеси життєдіяльності та функцій живих організмів. А також застосовувати у навчальній та практичній діяльності методи визначення структурних та функціональних характеристик біологічних систем; застосовувати біохімічні методи дослідження.

Згідно з цими вимогами і було розроблено робочий зошит для проведення лабораторних робіт з курсу «Біологічна хімія» (І частина) для студентів спеціальності 226 «Фармація. Промислова фармація».

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Хімічні речовини при невмілому і неправильному використанні можуть стати причиною отруєння осіб, які працюють, викликати пожежу, вибух чи хімічний опік.

З метою виключення випадків травматизму при роботах у хімічних лабораторіях необхідно виконувати наступні вимоги:

1. Кожен студент до початку досліду повинен добре ознайомитися з властивостями речовин, з якими прийдеться стикатися і необхідними умовами безпечного проведення роботи з урахуванням можливих побічних реакцій.

2. При роботі у витяжній шафі, з метою більш ефективної дії вентиляції, слід підняти дверцята витяжної шафи на 1/3-1/4 її підйому. Після закінчення роботи необхідно щільно прикрити дверцята шафи.

3. У випадку перерви дії вентиляції всі роботи у витяжних шафах, які пов'язані з виділенням шкідливих газів, парів, треба негайно припинити.

4. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток. Не робити ніяких дослідів у нечистому посуді. Посуд мити одразу ж після дослідів.

5. Не залишати включених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відкритих газових і водопровідних кранів.

Запобіжні заходи при роботі з їдкими речовинами

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користатися тільки тонкостінним хімічним чи порцеляновим посудом.

2. Щоб уникнути розбризкування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – приливати кислоту у воду, а не навпаки.

3. При попаданні кислот чи лугів на поверхню шкіри їх необхідно негайно змити сильним струменем води.

4. Їдкі луги дають опіки всіх ступенів. Тому при роботі з зазначеними розчинами необхідно застосовувати міри проти розбризкування і використовувати захисний спецодяг і запобіжні окуляри.

5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами чи спеціальними піпетками з гумовою грушею.

Заходи безпеки при роботі з горючими і легкозаймистими речовинами

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, етер, бензол тощо) необхідно виконувати такі правила:

- а) не користуватися відкритим полум'ям для нагрівання;
- б) не тримати ці сполуки на столах у великих кількостях;
- в) переливати у далині від вогню, а при переливанні великих кількостей усі нагрівачі (газові й інші пальники) у приміщенні згасити;
- г) не виливати ці речовини в раковину;
- д) не гріти на відкритому вогні, а тільки на водяній бані.

2. При роботі з масляними банями користатися термометром і не перевищувати температуру займання горючих сполук.

3. Не нахилятися над судиною, у якій що-небудь кипить чи у яку наливається яка-небудь рідина (особливо їдка), тому що бризки можуть потрапити в очі.

4. Пробірку, у якій нагрівається рідина, тримати отвором убік, а не до себе чи до поруч працюючого, тому що рідина внаслідок нагрівання нерідко викидається з пробірки.

5. У випадку займання горючих рідин:

- а) негайно погасити всі пальники, виключити електронагрівальні прилади;
- б) відставити судини з вогненебезпечними речовинами;
- в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;

- г) виключити вентиляційні установки;
- д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;
- е) терміново повідомити пожежну охорону і керівництво факультету.

Правила роботи з електричними приладами

1. Перед початком роботи слід перевірити справність електроприладу.
2. Перед включенням прилади повинні бути заземлені, якщо цього вимагають їхні інструкції.
3. Працювати з електронагрівальними приладами, що мають відкриту спіраль, у хімічній лабораторії категорично заборонено.
4. Перед включенням приладу необхідно перевірити справність розетки і цілісність шнурів, особливо від електроплиток.
5. При роботі з приладами, що генерують високу напругу, необхідно ретельно перевірити їх заземлення, а також не торкатися електронесучих вузлів.
6. При роботі з центрифугами центрифужні пробірки попарно врівноважувати на центрифужних вагах і поміщати в гнізда ротора друг напроти друга. При розливі проб гнізда ретельно очистити і висушити.
7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади.

Увага! Після вивчення даної інструкції у спеціальному журналі робиться відповідна відмітка, де кожен студент ставить свій підпис.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 1

Тема: АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

Мета: вивчення властивостей і структури амінокислот та білків.

Основні поняття: амінокислоти, білки, пептидний зв'язок,

Матеріали та реактиви: розведений 1 % розчин яєчного білка, водний 1 % розчин гліцину, 0,1 % розчин нінгідрину (у хлороформі), 10 % й 0,1 % розчини гідроксиду натрію, 1 % розчин сульфату міді, 1 % розчин α -аланіну (водний), 0,1 % розчин сульфатної кислоти, метиловий оранжевий, фенолфталеїн.

Обладнання: скляні палички, крапельниці, пробірки, штатив для пробірок, піпетки, пробірки градувальні, водяна баня, термометр лабораторний, годинник.

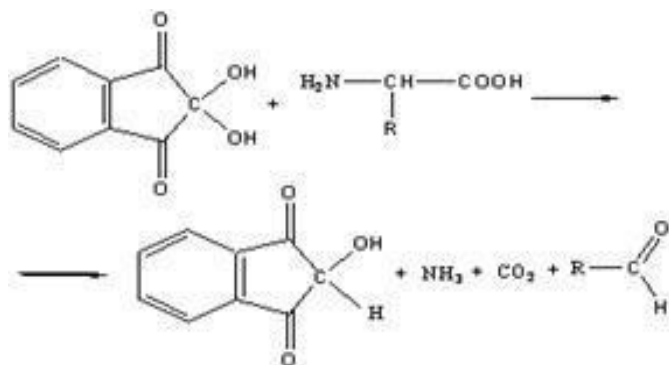
Навчальний час: 4 години

Практична частина

1. Нінгідринова реакція

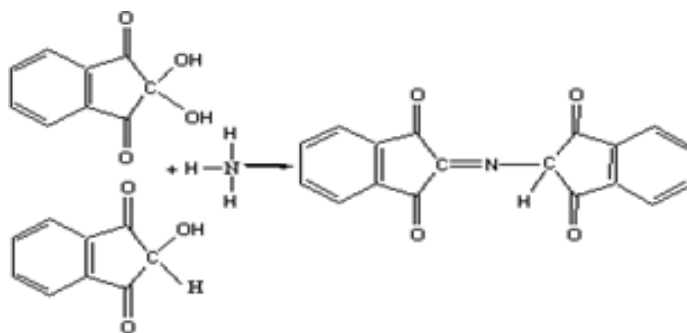
Принцип реакції. В результаті взаємодії α -амінокислоти з нінгідрином утворюється забарвлена комплексна сполука.

При нагріванні (до 70 °C) α -амінокислоти окислюються нінгідрином і зазнають окислювального дезамінування з утворенням аміаку і декарбоксилювання з утворенням альдегіду і CO_2 , а нінгідрин відновлюється.



Відновлений нінгідрин, конденсуючись з аміаком і окисленим нінгідрином, утворює сполуку, яка, енолізуючись, переходить в

забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір.



Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, що містять α -аміногрупу, і характерна як для деяких карбонових, так і циклічних амінокислот.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл розчин гліцину, 0,1 % розчин нінгідрину. Вміст пробірки ретельно перемішують на водяній бані при 70 °С протягом 5 хв.

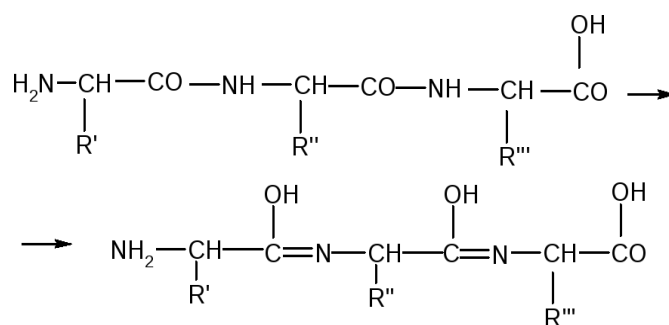
Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

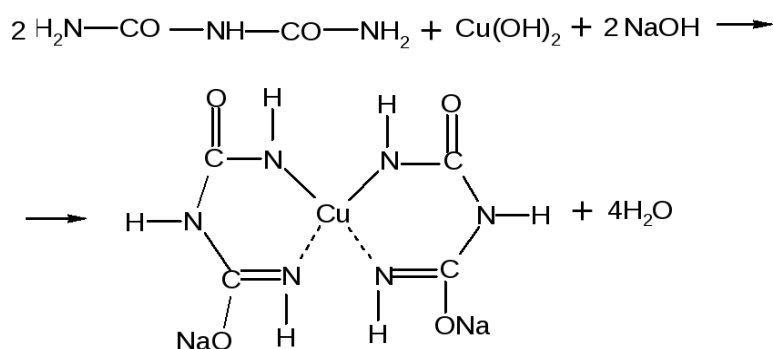
2. Біуретова реакція на виявлення пептидних зв'язків в білках

Принцип реакції. Білки (поліпептиди) в лужному розчині в присутності сульфату міді(II) утворюють комплексні сполуки міді, забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків в молекулі білка.

Спочатку пептидні групи поліпептиду зазнають в лужному середовищі енолізацію.



Енольна форма поліпептиду взаємодіє з гідроксидом міді(II) і утворюють забарвлений в синьо-фіолетовий колір комплекс, в якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту іменних груп. Утворення комплексу біурету з міддю відбувається за такою схемою:



Продукти неповного гідролізу білка (пептиди) дають червоне або рожеве забарвлення в біуретовій реакції.

Хід роботи. До 3 мл розчину яєчного білка додають 1 мл розчину NaOH , 0,5 мл розчину сульфату міді, перемішують.

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

3. Кольорова реакція з білками на виявлення карбонових амінокислот

Принцип реакції. Для виявлення за допомогою кольорових

реакцій залишків α -амінокислот, що входять до складу білків, використовують нінгідринову реакцію.

Хід роботи. До 1 мл розчину яєчного білка додають 0,5 мл розчину нінгідрину. Вміст пробірки ретельно перемішують на водяній бані 70 °С протягом 5 хв.

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

4. Амфотерні властивості аланіну

Принцип реакції. Аланін у водному розчині існує в формі біполярного іона та володіє кислотними та основними властивостями.

Хід роботи. В 1 пробірку вносять по 1 мл розчину кислоти і 1 краплю метилоранжу, а в іншу – 1 мл розчину лугу й краплю фенолфталеїну. Потім в них додають, перемішуючи, по краплях розчин α -аланіну до появи помаранчевого забарвлення (лужне середовище) і знебарвлення розчину (кисле середовище).

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть α -амінокислоти, що входять до складу природних білків _____

2. Назвіть кольорову реакцію, характерну для всіх α -амінокислот_____

3. В чому проявляються амфотерні властивості аланіну?

4. Якою кольоровою реакцією можливо довести наявність пептидних зв'язків в молекулі білка?

5. Що таке гідроліз білків і які види гідролізу ви знаєте?

6. Назвіть типи зв'язків амінокислот в молекулі білка.

7. Що розуміють під первинною, вторинної, третинної структурами білка? Які зв'язки їх формують?

8. Що таке ізоелектрична точка білка?

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 2

Тема: ФЕРМЕНТИ

Мета: вивчення структури та властивостей ферментів.

Основні поняття: фермент, каталізатор, інгібітор, обмін речовин.

Матеріали та реактиви: 1 % р-н крохмалю, 0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію, 5 % р-н $CuSO_4$, 1 %-й розчин $NaCl$ розчин Люголю, розведена досліджувана слина.

Обладнання: газовий пальник, водяна баня, водяний термостат, термометр лабораторний, штатив з пробірками, піпетки на 1 мл і 2 мл, скляні палички.

Навчальний час: 4 години

Практична частина

1. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази слини

Принцип. Сполуками, що підвищують активність ферментів – активаторами – є іони багатьох металів, зокрема: Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , а також органічні сполуки – проміжні продукти обміну речовин в організмі.

Активатором амілази є натрію хлорид ($NaCl$), інгібітором – міді сульфат ($CuSO_4$). Показником впливу цих сполук на активність амілази є ступінь гідролізу крохмалю під дією ферменту в присутності $NaCl$ та $CuSO_4$.

Клініко-діагностичне значення. Інгібітори ферментів широко використовуються в медицині в якості лікарських засобів, зокрема ацетилсаліцилова кислота (аспірин) – інгібітор циклооксигенази (простагландинсинтази) використовується як протизапальний препарат, трасилол – інгібітор трипсину та контрикал – інгібітор протеїназ (зокрема калікреїнів) – використовуються при панкреатиті, алопуринол – інгібітор ксантиноксидази – застосовується при подагрі

тощо.

Хід роботи. Рот обполіскують 2-3 рази водою для видалення залишків їжі. Відміряють циліндром 50 мл дистильованої води і обполіскують нею рот протягом 3-5 хвилин в декілька прийомів. Зібрану рідину (приблизно 50-60 мл) фільтрують через вату і фільтрат використовують для роботи. Слину розводять в 2 рази. Беруть 3 пробірки. В пробірку № 1 наливають 1 мл води, в пробірку № 2 – 0,8 мл води та 0,2 мл 1 %-го розчину $NaCl$, в пробірку № 3 – 0,8 мл води та 0,2 мл 1 %-го розчину $CuSO_4$. У всі три пробірки додають по 1 мл слини. Вміст перемішують і додають по 2 мл 1 %-го розчину крохмалю, знову перемішують і ставлять в термостат чи на водяну баню при $t = 37\text{ }^{\circ}C$ на 15 хв.

Далі у всіх пробірках проводять реакцію з йодом (0,1 %-й розчин йоду в 0,2 %-му розчині йодиду калію). Спостерігають зміну забарвлення. Результати роботи заносять у таблицю:

Вміст пробірок	1пробірка	2пробірка	3пробірка
Вода, мл	1,0	0,8	0,8
$NaCl$, 1 %-й розчин, мл	—	0,2	—
$CuSO_4$, 5 %-й розчин, мл	—	—	0,2
Слина (розведення 1:2), мл			
Крохмаль, 1 %-й розчин, мл			
Забарвлення після додавання йоду			

Висновок _____

2. Кількісне визначення амілази слини за Вольгемутом

Принцип. Метод заснований на здатності амілази розщеплювати (гідролізувати) крохмаль. Знаходять таке розведення слини, яке розщеплює 2 мг крохмалю (в 2 мл 0,1 % розчину крохмалю) за 30 хвилин при $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Потім розраховують кількість крохмалю, що розщеплюється 1 мл нерозведеної слини.

В нормі активність амілази слини – 160-320 ум. од.

Хід роботи. В 10 пробірок наливають по 1 мл води. В 1-у пробірку додають 1 мл слини, розведеної в 10 раз, перемішують. Набирають в піпетку 1 мл суміші і переносять її в 2-у пробірку, із неї – таким же чином у 3-ю тощо до 10-ї пробірки. Із 10-ї пробірки 1 мл суміші виливають. У всі пробірки доливають по 1 мл води та по 2 мл крохмалю, перемішують і залишають у термостаті на 30 хвилин при $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Через 30 хвилин пробірки виймають і додають по 1 краплі розчину Люголю, перемішують. Рідина в пробірках забарвлюється в жовтуватий, рожевий та фіолетовий кольори. Відмічають останню пробірку з жовтим кольором, де гідроліз крохмалю пройшов повністю і проводять розрахунок.

Розрахунок. Відмічають пробірку, де гідроліз крохмалю пройшов повністю. Наприклад, жовтий колір з'явився у 4-й пробірці, де слина розведена в 160 разів. Відповідно, 1/160 мл слини розщеплює 2 мл 0,1 % розчину крохмалю, а 1 мл нерозведеної слини буде розщеплювати X мл 0,1 % розчину крохмалю:

$$\begin{array}{l} 1/160 \text{ мл} - 2 \text{ мл} \\ 1 \text{ мл} - X \text{ мл} \\ X = \frac{2 \times 1 \times 160}{1} = 320 \text{ мл } 0,1 \% \text{ розчину крохмалю.} \end{array}$$

Таким чином, амілазна активність слини дорівнює 320 ум. од.

Розрахунки:

Висновок _____

Питання для самоконтролю:

1. Що таке ферменти?

2. Яка хімічна природа ферментів?

3. Які ферменти називаються однокомпонентними, двокомпонентними?

4. Класифікація ферментів?

5. Як виявити амілазу в слині?

6. Від чого залежить активність ферментів?

7. Як залежить активність ферментів від температури?

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 3

Тема: ЕНЗИМОЛОГІЯ

Мета: закріпити знання про ферменти та їх роль у дослідженні та лікуванні різних патологій організму.

Основні поняття: ензимологія, ензимопатологія, ензимотерапія.

Матеріали та реактиви: свіжий рослинний матеріал (морква або картопля), перманганат калію (0,1 н), пероксид водню (0,1 н та 3 %), сірчана кислота (10 %), карбонат кальцію, шматочки сирих і варених картоплі і м'яса (печінки, легенів).

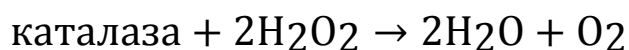
Обладнання: пробірки, бюретки для титрування на 50 мл, піпетки на 5, 20, 25 мл, мірні циліндри на 10 і 25 мл, колби мірні на 100 мл, колби конічні на 200 мл, порцелянові ступки, кварцовий пісок.

Навчальний час: 4 години

Практична частина

1. Визначення активності каталази

Принцип. Каталаза – це фермент, що каталізує розкладання пероксиду водню з утворенням молекулярного кисню, що виділяється у вигляді бульбашок газу:



Пероксид водню утворюється в деяких рослинних і тваринних клітинах в якості побічного продукту окисно-відновних реакцій. Сполука токсична для клітин, і каталаза забезпечує ефективне його видалення. Каталаза – один знайбільш швидко працюючих ферментів: одна молекула каталази розкладає в одну секунду до 200 000 молекул пероксиду водню. Локалізується каталаза в мембранних бульбашках клітин – мікротільцях і пероксисомах.

Хід роботи. Беруть 4 чисті пробірки і поміщають у першу з них невелику кількість дрібнонатертої свіжої картоплі, в другу – трохи відвареної картоплі, в третю – подрібнені шматочки м'яса (печінки, легенів), в четверту – трохи подрібненого відвареного м'яса. В кожну

пробірку додають по 3-4 мл 3 %-вого розчину перекису водню.

Розглянути ефект реакції. Результати спостереження занести в таблицю.

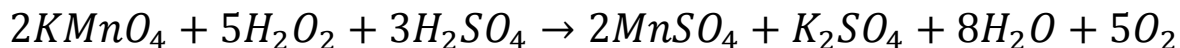
Ферментативна активність натуральних і пошкоджених клітин

Об'єкт	Явища у пробірці	Пояснення
Сира картопля		
Відварна картопля		
Сире м'ясо		
Відварне м'ясо		

Висновок _____

2. Кількісне визначення активності каталази

Принцип методу. Перекис водню розкладається каталазою. Надлишок перекису водню титрують перманганатом калію в кислому середовищі. Реакція йде за рівнянням:



Під час експерименту визначають кількість незруйнованого перекису водню, в контролі – загальну кількість взятого перекису водню (каталаза в контрольній пробі інактивована кип'ятінням).

Віднімаючи результати досліду з результатів контролю, дізнаються кількість зруйнованої в певний проміжок часу перекису водню, що дозволяє судити про активність каталази.

Хід роботи

1. Приготування препарату каталази. 2 г сирової картоплі (або моркви) розтирають з кварцовим піском в ступці, поступово додаючи 2-3 мл води. Для зменшення кислої реакції на кінчику шпателя додають карбонат кальцію до припинення виділення бульбашок вуглекислого газу. Розтерту масу кількісно переносять в мірну колбу і доводять водою до 100 мл. Суміш залишають на 30 хвилин, після чого фільтрують.

2. Приготування інактивованого ферментативного розчину. Витяжку, що містить каталазу, кип'ятять протягом 5 хвилин на водяній бані.

3. Ферментативний каталіз. У дві конічні колби поміщають по 25 мл 0,1 н розчину пероксиду водню, потім в першу додають 20 мл витяжки ферменту (дослід), в другу – 20 мл інактивованого ферментативного розчину (контроль). Обидві колби залишають на 30 хвилин при кімнатній температурі.

4. Титрування. Після закінчення часу інкубації доливають в обидві колби по 5 мл 10 % розчину сірчаної кислоти і титрують вміст колб 0,1 н розчином перманганату калію до утворення стійкого протягом 1 хвилини рожевого забарвлення. Відзначають кількість перманганату калію, який пішов на титрування пероксиду водню в дослідній і контрольній пробах.

Розрахунок. За різницею між контрольним (V_k , мл) і дослідним (V_d , мл) титруванням знаходять кількість перманганату калію, еквівалентну кількості розкладеного ферментом пероксиду водню. Відповідно до рівняння реакції між $KMnO_4$ і H_2O_2 , 1 мл 0,1 н розчину перманганату калію відповідає 1,7 мг перекису водню.

$$C_{H_2O_2} = (V_k - V_d) \times 1,7$$

У 1 г рослинного матеріалу міститься кількість каталази, що здатна за 30 хвилин розкласти таку кількість перекису водню:

$$Q_{H_2O_2} = \frac{C_{H_2O_2} \times 100}{20 \times m}$$

де 100 – об'єм приготовленої витяжки ферменту, мл;

20 – об'єм витяжки ферменту, взятої для реакції, мл;

m – маса взятого рослинного матеріалу, г.

Потім отриману цифру ділять на 30 і знаходять кількість пероксиду водню, що розкладається за 1 хвилину (мг/хв). Оскільки активність ферменту визначають, як правило, в мкмоль, то отриману величину ділять на 0,034 мг і отримують активність каталази в мкмоль/хв.

Приклад розрахунку. З 1,25 г моркви приготовлена витяжка каталази об'ємом 100 мл. На титрування дослідної проби витрачено 15,5 мл, контрольної – 30,2 мл 0,1 н розчину перманганату калію. Кількість розкладеного перекису водню в пробі еквівалентно $30,2 - 15,5 = 14,7$ мл 0,1 н розчину перманганату калію і, отже, так само $14,7 \times 1,7 = 24,99$ мг.

В 1 г сирій моркви міститься кількість каталази, здатна за 30 хв розкласти $(24,99 \times 100) / (20 \times 1,25) = 99,96$ мг перекису водню, а за 1 хв – $99,96 / 30 = 3,33$ мг. Так як 1 мкмоль перекису водню становить 0,034 мг, то в 1 г моркви присутнє $3,33 / 0,034 = 100$ Е каталази.

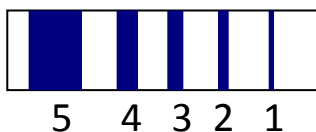
Розрахунки:

3. Оцінка ензимограм крові здорових та при захворюваннях серцево-судинної системи, печінки

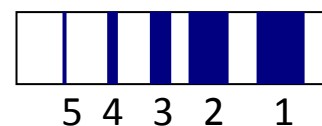
Принцип методу. Внаслідок розбіжностей у первинній структурі апоферменту, ізоферменти мають різну спорідненість до субстрату і різні фізико-хімічні властивості, зокрема, рухливість в електричному полі. Тому методом електрофорезу в агаровому або поліакриламідному гелі їх розділяють, інкубують у субстратно-коферментній суміші, а потім фарбують, використовуючи спеціальні барвники.

Хід роботи. На стрічку поліактиламідного гелю наносять 0,01 мл біологічної рідини (сироватки крові, гомогенату). Поміщають гель у електричне поле на 2 години, а потім інкубують у суміші, що містить буфер, субстрат, кофермент, феназин метасульфат та нітросиній тетразолій. Після інкубації електрофореграму піддають денситометрії.

Ізоферментний спектр ЛДГ
скелетних м'язів



Ізоферментний спектр ЛДГ
міокарда



Ізоферментний спектр ЛДГ сироватки крові при ураженнях печінки



Ізоферментний спектр ЛДГ сироватки крові при інфаркті міокарда



Медико-біологічна оцінка отриманих результатів

Ізоферментний спектр ЛДГ скелетних м'язів і міокарду суттєво відрізняється: у міокарді превалюють ЛДГ₁ і ЛДГ₂, що функціонують в аеробних умовах, у скелетних м'язах ЛДГ₅ і ЛДГ₄, що функціонують в анаеробних умовах. При ураженнях різних органів у кров виходять ізоферменти ЛДГ, які превалюють в ураженій тканині, внаслідок порушення проникності плазматичних мембран.

Висновок _____

Питання для самоконтролю:

1. Класифікація ферментів.

2. Ензиматичний гідроліз полісахаридів у шлунково-кишковому тракті.

3. Як виділяють і очищають ферменти?

4. Які методи класичного визначення ферментів ви знаєте?

5. Які основні положення теорії Баха і теорії Палладіна?

6. Який зв'язок між ферментами і вітамінами?

7. Які ферменти відносяться до групи окислювально-відновлювальних ферментів?

8. Використання ізоферментів в ензимодіагностиці.

9. Ензиматичні показники, за допомогою яких можна виявити ураження міокарду.

10. Ензиматичні показники, за допомогою яких можна виявити ураження печінки.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 4

Тема: ОСНОВНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ОБМІНУ РЕЧОВИН. ЦТК

Узагальнення по темам

«Амінокислоти та білки», «Ферменти»

Мета: вивчення основних закономірностей метаболізму, закріплення знань з пройдених тем.

Основні поняття: фермент, каталізатор, інгібітор, обмін речовин.

Навчальний час: 4 години

Практична частина

Завдання 1. Назвіть незамінні амінокислоти. Чому їх називають незамінними? Назвіть джерела незамінних амінокислот.

Завдання 2. Як за допомогою ензимодіагностики визначити у людини інфаркт міокарда?

Завдання 3

Наведіть механізм біуретової, нінгідринової та ксантопротеїнової реакцій. Які необхідно використовувати реактиви для кількісного визначення білку в клінічній лабораторії?

Механізми:

Завдання 4. Ізоелектрична точка гемоглобіну дорівнює 6,8. Назвіть переважні амінокислоти в складі білка, згідно з даними ізоелектричної точки.

Завдання 5. Напишіть симптоми прояву недоліку вітаміну Н в організмі.

Завдання 6. Опишіть головні характеристики протейногенних амінокислот.

Завдання 7. Наведіть схему первинної, вторинної, третинної і четвертинної структури білка.

Завдання 8. Поясніть, в чому полягає механізм дії антиоксидантів на організм. Поміркуйте, які патологічні стани можна скоректувати прийомом ліків з антиоксидантною активністю.

Завдання 9. За даними кількісного амінокислотного аналізу в сироватковому альбуміні міститься 0,58 % триптофану, молекулярна маса якого дорівнює 204. Розрахуйте мінімальну молекулярну масу альбуміну.

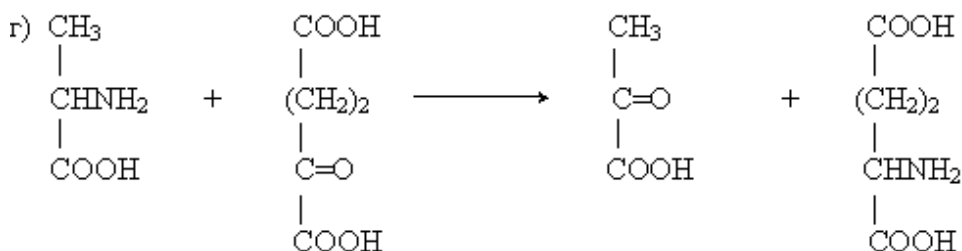
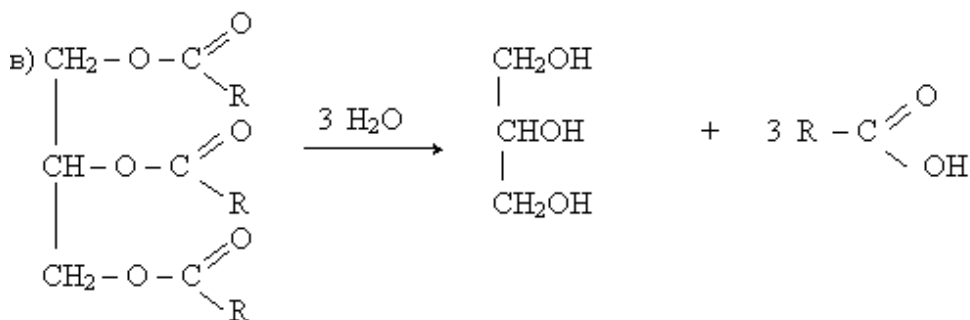
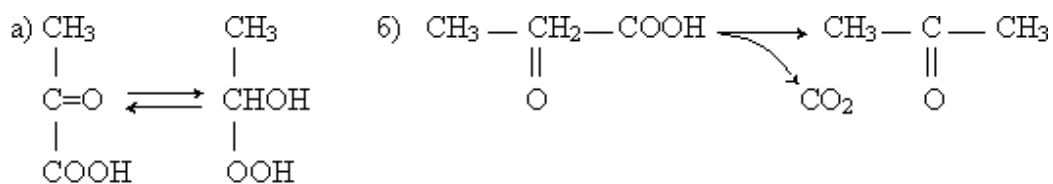
Завдання 10. Трипептид, виділений з токсину змій, складається з трьох незамінних амінокислот: сірковмісної, гетероциклічної та гідроксилвмісної. Напишіть цей трипептид.

Завдання 11. Розчин, що містить високомолекулярні речовини різної природи (полісахариди, білки, нуклеїнові кислоти), проявляє каталітичну активність. Природа каталізатора невідома. Встановлено, що він має такі властивості:

- а) знижує енергію активації;
- б) прискорює пряму і зворотну реакції;
- в) має високу специфічність;
- г) прискорює момент досягнення рівноваги, не зрушуючи його;
- д) припиняється каталітична дія після додавання в розчин речовини, що руйнує пептидні зв'язки.

Яке з перерахованих властивостей служить прямим доказом білкової природи каталізатора?

Завдання 12. Визначте клас ферментів, що каналізують наступні реакції:



Завдання 13. Виберіть і складіть послідовність подій, що відбуваються при алостеричному пригнічуванні ферменту:

- а) зменшується швидкість перетворення субстрату в активному центрі;
 - б) змінюється конформація ферменту;
 - в) ефектор приєднується в активному центрі;
 - г) змінюється конформація алостеричного центру;
 - д) порушується компліментарність активного центру субстрату;
 - е) ефектор приєднується в алостеричному центрі;
 - ж) змінюється конформація активного центру.
-
-
-
-
-
-
-
-

Завдання 14. Для лікування ран, що довго не загоюються використовують мазі, до складу яких входять трипсин (розщеплює білки), гіалуронідаза (руйнує гіалуронову кислоту). На чому заснований лікувальний ефект?

Завдання 15. Виберіть ферменти циклу Кребса, активність яких збільшиться при підвищенні концентрації НАД⁺ в мітохондріях. Напишіть в формулах реакції, які каталізуються цими ферментами.

Завдання 16. Як позначиться на роботі циклу Кребса недостатність вітамінів В₁, В₂, РР? Для відповіді вкажіть, який зв'язок існує між даними вітамінами і ферментами циклу Кребса.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 5

Тема: ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Мета: вивчення будови, класифікації та фізико-хімічних властивостей вуглеводів, засвоєння механізму травлення та всмоктування вуглеводів у шлунково-кишковому тракті, основних принципів внутрішньоклітинного анаеробного та аеробного окиснення глюкози та біохімічних шляхів їх регуляції.

Основні поняття: вуглеводи, моносахариди, дисахариди, полісахариди, біосинтез глікогену, пентозофосфатний шлях, глюконеогенез, ензимопатії вуглеводного обміну (глікогенози), цукровий діабет.

Матеріали та реактиви: 5 % розчин глюкози, 5 % розчин гідроксиду натрію, 5 % розчину сульфату міді, реактив Барфедда (13,3 г ацетату міді розчиняють в 200 мл гарячої води, $t = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Суміш фільтрують і до фільтрату додають 1,9 мл крижаної оцтової кислоти), кристалічний резорцин, 5 % розчин фруктози, 25 % розчин хлоридної кислоти.

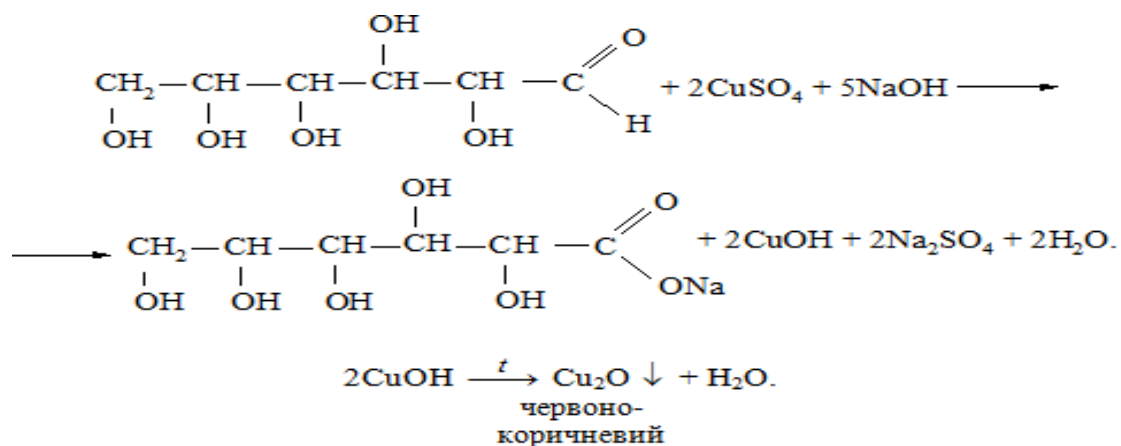
Обладнання: скляні палички, пробірки, штатив для пробірок, піпетки градуйовані, водяна баня, термометр лабораторний, годинник.

Навчальний час: 4 години

Практична частина

1. Реакція Тромера

Принцип реакції. Розчини гексоз, наприклад, глюкози і фруктози, в лужному середовищі відновлюють при нагріванні оксид міді(II) в геміоксид міді, а самі окислюються до альдонових кислот. Цю реакцію для глюкози в загальному вигляді можна представити рівняннями:



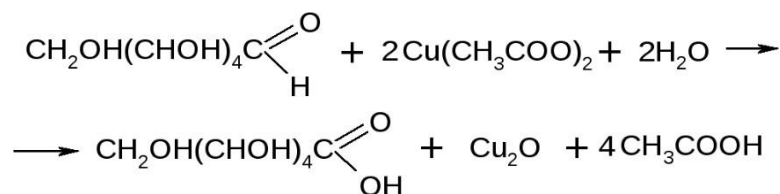
Хід роботи. У пробірку до 3 мл глюкози додають кілька крапель 10% розчину сульфату міді та 2 мл 10% розчину гідроксиду натрію. Пробірку з осадом струшують, а потім обережно нагрівають на водяній бані.

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

2. Реакція з оцтовокислої міддю (Реакція Барфеді)

Принцип реакції. Гексози в реакції з ацетатом міді призводять до утворення геміоксиду міді. Сумарне рівняння реакції для глюкози має вигляд:



Ця реакція протікає в середовищі зі значенням pH , близьким до нейтрального ($pH = 7,0$). У цих умовах редукуючі дисахариди не окислюються, що дає можливість відрізнити їх від моносахаридів.

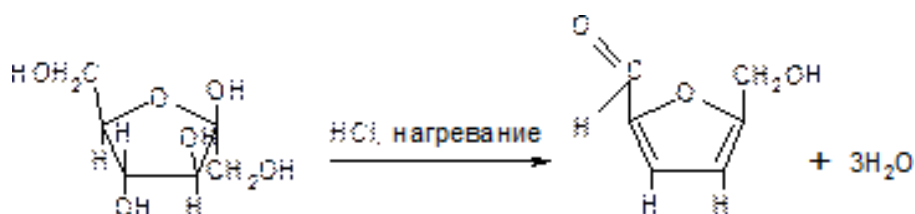
Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл глюкози і 1 мл реактиву Барфедда. Суміш перемішують і обережно нагрівають на водяній бані до кипіння.

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

3. Реакція Селіванова на кетози

Принцип реакції: при нагріванні фруктози або інших кетоз з хлоридною кислотою утворюється оксіметилфурфурол. Рівняння реакції для фруктози має вигляд:



Оксіметил з резорцином утворює сполуку (продукт конденсації), забарвлену в вишнево-червоний колір.

Хід роботи. У пробірку поміщають 5 мл розчину фруктози, 1 мл розчину хлоридної кислоти і кілька кристаликів резорцину. Суміш нагрівають на водяній бані протягом 5-10 хв при нагріванні до $t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до появи забарвлення.

Розглянути ефект реакції. Зробити висновки.

Висновок _____

Питання для самоконтролю:

1. Аеробне та анаеробне окислення глюкози, загальна

характеристика процесів.

2. Анаеробне окислення глюкози. Послідовність реакцій та ферменти гліколізу.

3. Окислювальне декарбоксилювання пірувату. Ферменти, коферменти та послідовність реакцій в мультиферментному комплексі.

4. Гліколітична оксидоредукція: субстратне фосфорилування та човникові механізми окислення гліколітичного НАДН.

5. Фосфоролітичний шлях розщеплення глікогену в печінці та м'язах. Регуляція активності глікогенфосфорилази.

6. Біосинтез глікогену: ферментативні реакції, фізіологічне

значення. Регуляція активності глікогенсинтази.

7. Генетичні порушення метаболізму глікогену (глікогенози, аглікогенози).

8. Глюконеогенез: субстрати, ферменти та фізіологічне значення процесу.

9. Глюкоза крові (глюкоземія): нормоглікемія, гіпо- та гіперглікемії, глюкозурія. Цукровий діабет – патологія обміну глюкози.

10. Гормональна регуляція концентрації та обміну глюкози крові.

11. Пентозофосфатний шлях окислення глюкози: схема процесу та біологічне значення.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ 6

Тема: ЛІПІДИ

Мета: сформувати уявлення про будову, класифікацію основних ліпідів, їх біологічну функцію, про молекулярні механізми перетравлення та всмоктування ліпідів у шлунково-кишковому тракті.

Основні поняття: прості та складні ліпіди, нейтральні жири, жироподібні речовини, стерини, стероли, воски, жовчні кислоти.

Матеріали та реактиви: рослинна олія, спирт, бензол, хлороформ, 1 % розчин карбонату натрію, свіжа жовч.

Обладнання: пробірки, піпетки, штатив для пробірок, лупа, предметне скло.

Навчальний час: 4 години

Практична частина

II. Лабораторні досліді

1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії

Принцип методу. Характерною властивістю жирів є їх добра розчинність в багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, діетиловий етер тощо) і нерозчинність у воді. При змішуванні жирів з водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, в якому вона утворюється. Наявність у воді речовин емульгаторів (мила, жовчні кислоти, карбонати) робить емульсії більш стійкими. Освічені жирові крапельки, спрямовують поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонати, які обволікають крапельки жиру і запобігають їх злиттю.

Емульгування жирів необхідне для прискорення перетравлення жирів їжі в порожнині кишечника ферментом ліпази, так як воно спричинює збільшення поверхні зіткнення жиру з водним розчином ліпази. Емульгаторами є поверхнево-активні речовини – білки, солі жовчних кислот, мила.

Хід роботи. У чотири пробірках поміщають по 0,2-0,3 мл

рослинної олії, потім в першу додають 5 мл води, в другу – 5 мл спирту, в третю – 5 мл бензолу, в четверту – 5 мл хлороформу, в п'яту – 5 мл розчину карбонату натрію. Вміст усіх пробірок енергійно струшують.

Результати спостереження заносять у таблицю.

№ пробірки	Розчинник	Ступінь розчинності
1		
2		
3		
4		
5		

Висновок _____

2. Вплив жовчі на емульгування жирів.

Принцип методу. Жовч виконує цілий комплекс різноманітних функцій, більшість із яких пов'язані з травленням, забезпечуючи зміну шлункового травлення на кишкове, ліквідуючи дію пепсину, небезпечного ферменту підшлункової залози, і створюючи їм сприятливі умови.

Жовчні кислоти, що містяться в жовчі, емульгують жири і беруть участь у міцелоутворенні, активізують моторику тонкої

кишки, стимулюють продукцію слизу і гастроінтенсиональних гормонів: холецистокініну і секретину, попереджають адгезію бактерій і білкових клітин.

Жовч також бере участь у виконанні функції виділення. Холестерин, білірубін та низка інших речовин не можуть фільтруватися нирками та їх виділення з організму відбувається через жовч. Екскретується з калом 70 % холестерину, що знаходиться в жовчі (30 % реабсорбується кишечником), білірубін, а також метали, стероїди, глутатіон.

Хід роботи. Вплив жовчі на жири можна спостерігати двома способами:

1. На предметне скло піпеткою наносять краплю води та краплю жовчі. До кожної краплі додають невелику кількість олії, перемішують і розглядають вміст обох крапель під лупою.

2. У пробірку наливають 5 мл жовчі, додають 1-2 мл олії, 1 мл води і збовтують до утворення стійкої емульсії.

Замалюйте у зошит, як розподіляється жир у краплі води та у краплі жовчі.

Визначте, у якій пробірці утворилась стійка емульсія.

У висновку на основі отриманих результатів оцініть роль жовчі у перетравленні жирів.

Висновок _____

Питання для самоконтролю:

1. Хімічна структура і фізико-хімічні властивості ліпідів.

2. Біологічні функції ліпідів в організмі людини і тварин.

3. Дайте характеристику ферментативних процесів перетворення ліпідів в травному тракті.

4. Порушення ліпідного обміну при атеросклерозі і цукровому діабеті.

Зробити загальний висновок за результатами лабораторної роботи:

Перевірив: _____

Оцінка _____

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Біологічна хімія. Навчально-методичний посібник для студентів фармацевтичного факультету (другий магістерський рівень): Білецька Л. П., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І. та ін. / За редакцією О. Я. Склярова. – ЛНМУ ім. Д. Галицького. – Львів. – 2019. – 126 с.

2. Біологічна і біоорганічна хімія: у 2 кн.: підручник. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю. І. Губський, І. В. Ніженковська, М. М. Корда та ін.; за ред. Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. – К.: ВСВ «Медицина», 2016. – с. 231 - 247.

3. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Вінниця: Нова книга, 2009. – с. 328 - 343.

4. Гонський Я. І., Максимчук Т. П. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – с. 448 - 462.

5. Скляров О. Я., Фартушок Н. В., Бондарчук Т. І. Біологічна хімія. – Тернопіль: ТДМУ, 2015. – с. 274 - 291.

6. Біологічна хімія. Тести та ситуаційні задачі. / За ред. О. Я. Склярова. – Львів: Вид-во ЛНМУ, 2015. – с. 197 - 204.

7. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. проф. Склярова О. Я. – Київ: Здоров'я, 2004. – 191 с.

8. Клінічна біохімія / За ред. Склярова О. Я. – Київ: Медицина, 2006. – с. 48 - 52, 92 - 96.

9. Практикум з біологічної хімії. / За ред. О. Я. Склярова. – К.: Здоров'я, 2002. – 180 - 189 с.

10. Скоробогатова З. М. Атлас метаболічних шляхів. – К.: Академперіодика, 2017. – С. 52 - 57.

11. Murray R., Bender D., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V., Weil A. «Harper's Biochemistry» 29th edition. – McGraw Hill Professional. – 2012. – 818 p.

12. Nelson D. L., Cox M. M. «Lehninger Principles of Biochemistry» fifth edition. – New York. – W.H. Freeman and Company. – 2005. – 1010 p.

13. Satyanarayana U. Biochemistry / U. Satyanarayana, U. Chakrapani. – 4d ed. – Kolkata : Books and Allied ltd, 2014. – P. 387 - 402.

14. Swanson T. A., Kim S. I., Glucksman M. J., Lieberman M. A. «Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics» 5-th edition. – Lippincott Williams & Wilkins. – 2010. – 380 p.

Додаткова

1. Кольман Я., Рем К.-Г. Наочна біохімія. – М.: Мир, 2000. – с. 188 - 193.

2. Маррі Р., Греннер Д., Мейєс П., Родуелл В. Біохімія людини. Т.2. – М.: Мир; Біном. Лабораторія знань, 2009. – с. 15 - 34.

3. Основи біохімії за Ленінджером / Девід Л. Нельсон, Майкл М. Кокс. – Львів.: вид-во «БаК», 2015. – с. 898 - 916.

Навчальне видання

Устянська Ольга Володимирівна
Шкодовська Анна Марія Ігорівна

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

РОБОЧИЙ ЗОШИТ
ДЛЯ ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
ЧАСТИНА I : ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ

В авторській редакції

Підп. до друку 02.12.2022. Формат 60x84/16.

Ум.-друк. арк. 2,66. Наклад 10.

Зам. № 2534.

Видавець і виготовлювач

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: +38 (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua