

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра химии

ХИМИЯ

Лабораторный практикум

**Лабораторная работа
Биологическое окисление.**

Лабораторная работа

Живая клетка и организм в целом поддерживают свое существование путем постоянного усвоения химических соединений из окружающей среды. Непрерывно совершающийся процесс превращения материи в живых организмах называют обменом веществ. Часть поступающих в клетку извне веществ используется на синтез собственных веществ (процессы ассимиляции), часть окисляется с выделением энергии, требуемой при синтезе собственных веществ клетки и выполнения физиологических функций (процессы диссимиляции).

Органические вещества в организме в процессе окисления превращаются в углекислый газ, воду и аммиак в случае азотсодержащих соединений. Окисление веществ протекает путем присоединения к ним кислорода (оксигеназы) или путем отнятия от них водорода (дегидрирование) в аэробных условиях. Дегидрирование может происходить в присутствии другого акцептора, без кислорода (анаэробно), окисление по третьему пути происходит без присоединения кислорода или отнятия водорода, освобождающиеся электроны переносятся на другие атомы или ионы. Реакции переноса электронов водорода (дегидрирование) более легко осуществимы и поэтому преобладают над другими реакциями окисления.

Биологическое окисление в отличие от горения происходит при сравнительно низких температурах, носит многоступенчатый характер и осуществляется ферментами класса оксидоредуктаз. Окисление белков, жиров и углеводов происходит в несколько этапов (фаз), на последнем этапе промежуточные продукты окисления этих веществ вступают в цепь реакций цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является связующим звеном между обменами различных веществ в нем путем аэробного дегидрирования субстратов, заканчивают окисление продукты обмена аминокислот, жирных кислот, моносахаридов и т.д. Атомы водорода в виде электронов и протонов передаются в специализированную цепь ферментов (дыхательную цепь ферментов) и, пройдя через нее, соединяются с кислородом с образованием воды (см. наглядные пособия). В результате реакций биоокисления, отщепляемые электроны и протоны водорода соединяются с атмосферным кислородом, поэтому этот процесс получил название тканевого дыхания. Перенос электронов и протонов по дыхательной цепи ферментов на кислород сопровождается высво-

бождением энергии, которая при необходимости аккумулируется в высокоэнергетических (макроэргических) связях АТФ.

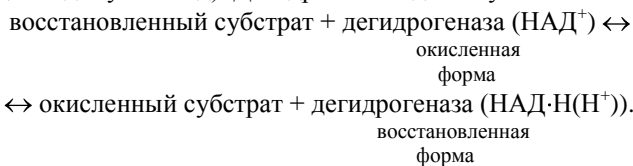
Процесс синтеза АТФ из АДФ и фосфорной кислоты за счет энергии окисления веществ при участии дыхательной цепи ферментов называется окислительным фосфорилированием.

Реакции биологического окисления в живой клетке являются не только поставщиками энергии, но и промежуточных веществ (метаболитов), используемых клеткой для построения необходимых собственных веществ.

Цель занятия. Изучить механизмы реакций биологического окисления и методы исследования активности некоторых оксидоредуктаз.

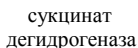
Материалы и оборудование. Янтарная кислота 3% раствор (нейтрализованный); метиленовая синь, 0,01% раствор; раствор формальдегида; пероксид водорода, 1% и 3% раствор; серная кислота, 10% раствор; перманганат калия (из фиксаля), 0,1 н. раствор; бикарбонат кальция; градуированный цилиндр и пипетка; колбочки на 50 мл; пробирки и подобранные к ним пробки; штативы; ступки с пестиком; стеклянная палочка; кварцевый песок; марля; мерные колбы на 100 мл; водяная баня; термостат; мышца; молоко свежее; кровь в разведении 1:1000.

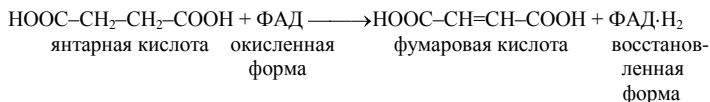
Опыт 1. Качественная реакция на дегидрогеназы мышц. Оксидоредуктазы, осуществляющие дегидрирование субстратов, называют дегидрогеназами. Все дегидрогеназы являются двухкомпонентными ферминами. В качестве активной группы дегидрогеназ чаще выступают нуклеотиды НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или ФАД (флавинадениндинуклеотид). Дегидрогеназы действуют по схеме:



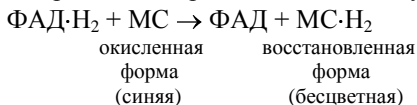
Соответственно эти дегидрогеназы называют пиридинзависимые и флавинзависимые.

Все ткани, и мышечная в том числе, содержат дегидрогеназы, катализирующие окисление субстратов в цепи реакций цикла трикарбоновых кислот. Одним из субстратов окисления этого цикла является янтарная кислота (сукцинат), окисляющаяся до фумаровой кислоты по схеме:





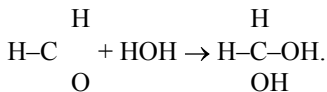
Водороды, отщепляемые дегидрогеназами у субстратов, передаются другому акцептору. В качестве акцептора можно использовать метиленовую синь (МС), которая будет восстанавливаться в бесцветную лейкоформу и позволит проследить процесс окисления субстрата.



5-7 г мышцы растирают в ступке с кварцевым песком, затем помещают образовавшуюся массу в марлю и промывают дистиллированной водой до исчезновения розовой окраски отмываемой жидкости. Хорошо отмывтую мышцу делят пополам и помещают в две пробирки. В одну пробирку добавляют 0,5 мл воды, в другую – 0,5 мл янтарной кислоты. В обе пробирки вносят по 3-5 капель метиленовой сини, тщательно перемешивают и слегка уплотняют мышечную ткань стеклянной палочкой. Пробирки закрывают плотно пробками и помещают в термостат при 37-40°C на 20-25 минут. По окончании термостатирования наблюдают исчезновение синей окраски в пробирке, где была янтарная кислота.

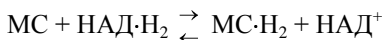
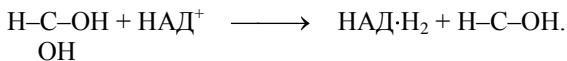
Опыт 2. Качественная реакция на дегидрогеназы молока. Дегидрогеназы молока могут окислять многие субстраты (альдегиды, ксантин и др.). Эти ферменты относительно устойчивы к действию повышенных температур (оптимум 70°). Если в качестве субстрата взять формальдегид, а акцептором водорода от восстановленной дегидрогеназы – метиленовую синь и оба эти вещества прибавить к молоку, то под действием дегидрогеназы, содержащейся в молоке, произойдет окисление альдегида путем дегидрирования, т. е. отнятия водорода и восстановление метиленовой сини.

Муравьиный альдегид при этом сначала гидратируется (присоединяет воду):

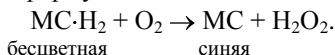


Затем гидратная форма муравьиного альдегида взаимодействует с активной группой дегидрогеназы молока, передавая ей два атома водорода:





Переход окрашенной формы метиленовой сини в бесцветную (восстановленную) указывает на происходящее окисление альдегида в кислоту. Лейкоформа метиленовой сини, взаимодействуя с молекулярным кислородом воздуха, может, обратимо окисляясь, превращаться в исходную окисленную форму:



В две пробирки наливают по 5-6 мл молока (в одну – кипяченое, в другую – некипяченое). В обе пробирки прибавляют по 8-10 капель раствора формальдегида и по 1-2 капли раствора метиленовой сини. Закрывают пробирки пробками, перемешивают их содержимое и помещают в водяную баню при 70°C.

Через 10-15 мин можно заметить, что в пробирке с некипяченым молоком смесь обесцвечивается, а в контрольной пробирке остается окрашенной. Пробирку с молоком, в которой окрашивание смеси исчезло, открывая пробку, несколько раз встряхивают для обеспечения лучшего контакта содержимого пробы с воздухом. Вскоре вновь появляется синее окрашивание вследствие окисления лейкоформы метиленовой сини кислородом воздуха.

Если эту пробирку опять поместить в водяную баню, то ее содержимое вновь обесцветится. Иногда обратимое окисление-восстановление метиленовой сини можно в одной пробе наблюдать неоднократно.

Опыт 3. Определение каталазной активности крови. Каталаза – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление и восстановление пероксида водорода путем переноса двух атомов водорода с одной молекулы пероксида водорода на другую, превращая, токсичный для клетки пероксид водорода в безвредные воду и кислород.

каталаза



У млекопитающих каталаза наиболее активна в клетках крови, печени, почек. Активность каталазы крови у коров в норме находится в среднем в пределах 4,76-5,47 мгН₂О₂/0,001 мл крови или соответственно составляет 131,8-151,5 мкатал. Коэффициент пересчета составляет 27,7(1,7·10⁶:(34·1800)). Снижение активности каталазы происходит при некоторых инфекционных заболеваниях (туберкулез, ро-

жа свиней и т. д.). Повышение активности фермента наблюдается при отравлениях, кетозах. Определение каталазной активности крови основано на определении количества пероксида водорода, расщепляемого каталазой, содержащейся в определенном объеме крови, в единицу времени. Это количество H_2O_2 определяется титриметрически с помощью перманганата калия.

Готовят две колбочки и нумеруют их. В первую вносят точно 1 мл крови (разведение 1:1000), 7 мл дистиллированной воды и 2 мл 1% раствора H_2O_2 . Во вторую – 2 мл раствора H_2O_2 и 8 мл воды. Обе колбочки оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем в обе колбочки вносят по 10 мл 10% раствора серной кислоты. Серная кислота изменяет реакцию среды и тем самым прекращает действие фермента (каталаза активна в слабо щелочной среде крови) и создает необходимые условия для титрования. Титруют жидкости обеих колбочек 0,1 н раствором перманганата калия до бледно-розовой окраски.

Результаты титрования записывают в тетрадь.

Расчет активности крови производят по формуле:

$$X = \frac{(k \cdot O) \cdot 1,7 \cdot 10^6}{34 \cdot 1800} \text{ (мкатал/л)},$$

где k – количество мл 0,1 н KMnO_4 , пошедшее на титрование пробы, не содержащей кровь;

O – количество мл 0,1 н KMnO_4 , пошедшее на титрование пробы, содержащей кровь;

1,7 – масса H_2O_2 в мг, соответствующая 1 мл 0,1 н раствора KMnO_4 ;

10^6 – коэффициент пересчета на 1 л цельной крови;

34 – молярная масса H_2O_2 в мг;

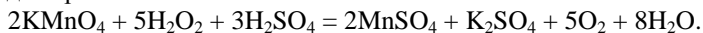
1800 – число секунд в 30 минутах;

X – каталазная активность крови, выраженная в мкатал/л.

Вывод: Биохимический анализ крови исследуемого животного показал, что каталазная активность крови составляетмкатал/л.

Опыт 4. Определение активности каталазы по Баху и Опарину.

Активность каталазы в испытуемом материале оценивается по количеству распавшегося под воздействием фермента пероксида водорода, причем количество его, разложенного каталазой, можно определить путем оттитровывания оставшегося неразложенного пероксида водорода перманганатом:



Навеску (3 г мышцы) растирают в ступке с кварцевым песком,

добавляя около 0,3 г (на кончике шпателя) бикарбоната кальция и 20 мл дистиллированной воды. Тщательно растертую массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем болтушки до метки. Через 30-40 мин смесь фильтруют. Две порции фильтрата по 10 мл помещают в колбы на 100 мл. Содержимое первой колбы кипятят 2-3 мин для инактивации фермента и затем охлаждают.

В обе колбы приливают по 10 мл воды и по 1,5 мл 1% раствора пероксида водорода. Пробы оставляют на 20-30 мин. По истечении указанного срока к содержимому обеих колб добавляют 2,5 мл 10% раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором перманганата калия до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение минуты.

Активность каталазы вычисляют по разности (в мл) 0,1 н перманганата калия, пошедшего на титрование в контрольном и основном опытах. Ее можно выразить также в весовых частях (мг) пероксида водорода в расчете на 1 г исходного материала, исходя из того, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата отвечает 1,7 мг пероксида водорода. Вычисления производят по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 1,7}{H},$$

где X – активность каталазы (в мг) пероксида водорода на 1 г материала;

a – мл 0,1 н. раствора перманганата, пошедшего на титрование кипяченой пробы;

b – мл 0,1 н. раствора перманганата, пошедшего на титрование опытной пробы;

T – поправка к титру раствора перманганата;

1,7 – количество миллилитров пероксида водорода, соответствующее 1 мл перманганата;

H – навеска вещества, г.

Методику опыта и вывод оформить в тетради.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Барковский, Е. В. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: учеб. пособие / Е. В. Барковский, С. В. Ткачев, Г. Э. Атрахимович и др. – М.: Высшая школа, 1997. – 126 с.
2. Биохимия животных: Учебник для студ. зооинженер. и ветеринарн. ф-тов с/х вузов / А.В. Четкин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский /Под ред. проф. А.В.Четкина. – М., Высш. школа, 1982. – 511 с.
3. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов обучающихся по агрономическим специальностям 6-ое изд, стереотипное. – Дрофа:– 2004. – 672 с.
4. Князев Д. А. Неорганическая химия/ Д. А. Князев, С. Н. Смарицын. – М.: Высш. шк., 1990. - 425 с.
5. Кононский, А.И. Биохимия животных: учебник пособие для вузов/ А. И. Кононский. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. – 432 с.
6. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие/А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная, И. В. Ковалева, Т. В. Булак.–Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
7. Химия. Общая химия с основами аналитической : учебно-методическое пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Горки : БГСХА, 2012. – 204 с. ISBN 978-985-467-393-6.
8. Цыганов, А.Р. Биохимия практикум: учебное пособие / А.Р. Цыганов, И.В. Сучкова, И.В. Ковалева. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
9. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии : учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск : ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

Дополнительная

1. Алешин, В.А. и др. Практикум по неорганической химии - М.: Издат. Центр "академия", 2004. – 384 с.
2. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. - 704 с.
3. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
4. Введение в лабораторный практикум по неорганической химии: Учеб. пособие / В.В. Свиридов, Г.А.Попкович и др. – Мн: Выш. шк., 2003. – 96с.
5. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 382с.
6. Кудряшов Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 160 с.
7. Ленский, А. С. Введение в бионеорганическую и биофизическую химию / А. С. Ленский. – М.: Высшая школа, 1989.
8. Метревели, Т.В. Биохимия животных. Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 295с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцепродуктов. /Под ред. Дж. К.Мида; пер. с англ. И.С.Горожанкиной.- М.: Профессия, 2009. - 384с.
10. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. - 566 с.
11. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов: учебник для вузов/ Ю.А. Ершов, В.А. Попков и др. 6-е изд.,стер. М.: Высш. шк., 2007. – 560с.
12. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб: Химиздат, 2001.
13. Угай, Я. А. Общая и неорганическая химия: учеб. для вузов. 4-е изд. - М.: Высш. шк., 2004. – 440 с.

14. Хазипов, Н.З. Биохимия животных: учебник / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.

Справочники

1. Кольман, Я., Рем, К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. - 469 с.

2. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ/ Под ред. Р.А. Лидина. – 5-е изд., стер. – М.: КолосС, 2008, - 480 с.: ил.

Составители

Поддубная Ольга Владимировна

Ковалева Ирина Владимировна

Мохова Елена Владимировна