

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Кафедра фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

**Методичні вказівки до практичних занять
для студентів ОС «Магістр»
спеціальності G21 «Біотехнології та біоінженерія»**



Київ-2025

УДК 577.23:606:62](072)

Наведено методичні вказівки до практичних занять студентів з дисципліни «Біоенергетичні основи біотехнологічних процесів» за ОС «Магістр» спеціальності G21 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання.

Рекомендовано вченою радою факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України протокол № 11 від 19 червня 2025 р.

Укладачі:

Прилуцька С.В., доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики НУБіП України

Ткаченко Т.А., кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики НУБіП України

Рецензенти:

Ліханов А.Ф., доктор біологічних наук, доцент, професор кафедри ботаніки, дендрології та лісової селекції НУБіП України

Кваско О.Ю., кандидат біологічних наук, доцент, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України

Навчальне видання

БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Методичні вказівки до практичних занять
студентів ОС «Магістр» денної форми навчання
спеціальності G21 «Біотехнологія та біоінженерія»

Укладачі: ТКАЧЕНКО Тетяна Анатоліївна, ПРИЛУЦЬКА Світлана Володимирівна

ЗМІСТ

Передмова	4
Структура курсу	5
Практичне заняття 1. Вивчення стаціонарного стану термодинамічної системи та критеріїв його досягнення у біологічних системах	6
Практичне заняття 2. Ентальпія. Тепловий ефект біохімічної реакції	10
Практичне заняття 3. Вивчення принципів зв'язування лігандів з макромолекулами в біополімерах	13
Практичне заняття 4. Вивчення механізмів формування потенціалу спокою і потенціалу дії на клітинній мембрані	18
Практичне заняття 5. Маркерні ензими плазматичної мембрани та ендомембран	21
Практичне заняття 6. Макроергічні сполуки	23
Практичне заняття 7. Вивчення шляхів активування та інгібування ферментів	27
Практичне заняття 8. Глюкоза як ключовий метаболіт обміну вуглеводів	32
Практичне заняття 9. Вивчення механізмів регуляції циклу трикарбонових кислот	36
Практичне заняття 10. Енергетичний обмін. Окисне фосфорилування	43
Практичне заняття 11. Кількісне визначення пігментів листка	48
Практичне заняття 12. Дослідження ферментів дихання рослин	50
Практичне заняття 13. Дослідження основних компонентів антиоксидантної системи рослин	53
Практичне заняття 14. Застосування іммобілізованих ферментів та клітин у біотехнологічних процесах	58
Практичне заняття 15. Вивчення хімізму м'язового скорочення	60
Список використаної літератури	64
Відповіді до питань та задач	65

ПЕРЕДМОВА

Дисципліна «Біоенергетичні основи біотехнологічних процесів» вивчає молекулярні основи утворення, акумуляції та використання енергії, закономірності протікання різних метаболічних шляхів та їх взаємозв'язків на різних рівнях організації живої матерії, теоретичні засади визначення ефективності енерготрансформації у клітині і біотехнологічних системах.

Біоенергетика описує поняття потоку енергії через живі системи, зокрема клітини. Клітинні процеси, такі як синтез і розщеплення складних біомолекул, відбуваються за допомогою багатоступеневих хімічних реакцій. Деякі з цих хімічних реакцій є спонтанними і вивільняють енергію, тоді як інші вимагають енергії для перебігу. Подібно до того, як живі істоти повинні постійно споживати їжу для поповнення своїх енергетичних запасів, клітини повинні постійно виробляти більше енергії для забезпечення потреб багатьох енергозатратних хімічних реакцій, які постійно відбуваються. Разом всі хімічні реакції, що відбуваються всередині клітин, включаючи ті, що споживають або виробляють енергію, називаються метаболізмом клітини.

В процесі вивчення дисципліни «Біоенергетичні основи біотехнологічних процесів» студенти ознайомлюються з методологією і практичними підходами щодо вивчення біоенергетичних процесів в живих клітинах, фундаментальними основами та принципами біоенергетики клітини, формами енергії, молекулярною і субклітинною організацією трансформаційно-акумуляційних систем рослин, принципами перетворення енергії хімічного зв'язку в корисну біологічну роботу в окремій клітині або організмі в цілому.

У студентів сформується розуміння основних біоенергетичних процесів у живих системах, загальних закономірностей обміну речовин та енергії у організмі, ролі ферментів у забезпеченні метаболізму клітин, впливу фітогормонів на процеси асиміляції та дисиміляції, процесів трансформації енергії й дисиміляції органічних сполук в теплову енергію, що дозволяє застосовувати набуті знання при виборі сучасних біохімічних і біотехнологічних методів дослідження метаболічних процесів в клітині й використовувати знання основ біоенергетичних процесів у клітині в умовах конкретного біотехнологічного виробництва.

СТРУКТУРА КУРСУ

Практичне заняття 1. Вивчення стаціонарного стану термодинамічної системи та критеріїв його досягнення у біологічних системах.

Практичне заняття 2. Ентальпія. Тепловий ефект біохімічної реакції.

Практичне заняття 3. Вивчення принципів зв'язування лігандів з макромолекулами в біополімерах.

Практичне заняття 4. Вивчення механізмів формування потенціалу спокою і потенціалу дії на клітинній мембрані.

Практичне заняття 5. Маркерні ензими плазматичної мембрани та ендомембран.

Практичне заняття 6. Макроергічні сполуки.

Практичне заняття 7. Вивчення шляхів активування та інгібування ферментів.

Практичне заняття 8. Глюкоза як ключовий метаболіт обміну вуглеводів.

Практичне заняття 9. Вивчення механізмів регуляції циклу трикарбонових кислот.

Практичне заняття 10. Енергетичний обмін. Окисне фосфорилування.

Практичне заняття 11. Кількісне визначення пігментів листка.

Практичне заняття 12. Дослідження ферментів дихання рослин.

Практичне заняття 13. Дослідження основних компонентів антиоксидантної системи рослин.

Практичне заняття 14. Застосування іммобілізованих ферментів та клітин у біотехнологічних процесах.

Практичне заняття 15. Вивчення хімізму м'язового скорочення.

Практичне заняття № 1.

Вивчення стаціонарного стану термодинамічної системи та критеріїв його досягнення у біологічних системах

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, опрацювання завдань самостійної роботи та виконання практичної частини в робочому зошиті.

Всі хімічні реакції в живих клітинах підпорядковуються законам термодинамики.

- Перший закон: енергія не створюється з нічого та не зникає, вона лише перетворюється в еквівалентних кількостях з одного виду в інший, тобто внутрішня енергія системи залишається постійною. Самовільно хімічні процеси можуть проходити лише в одному напрямку – досягнення рівноваги, тобто максимальної ентропії.
- Другий закон: ентропія при самовільних процесах зростає. Самовільно неупорядкована система ніколи не перетвориться в упорядковану. Для цього перетворення треба витратити додаткову енергію

Стаціонарним називається такий стан відкритої системи, при якому основні макроскопічні параметри системи залишаються постійними. Між рівноважним і стаціонарним станом існує принципова різниця (табл.1).

Таблиця 1.

Відмінні характеристики стаціонарного і рівноважного станів

<i>Рівноважний стан</i>	<i>Стаціонарний стан</i>
Вільна енергія і працездатність системи мінімальні. Ентропія в системі максимальна. Відсутність градієнтів у системі.	Вільна енергія і працездатність системи постійні, але не мінімальні. Ентропія в системі постійна за рахунок рівності продукції та потоку ентропії. Наявність постійних градієнтів у системі.

У стані рівноваги в системі припиняються всі процеси, крім теплового руху молекул; відповідно, вирівнюються всі градієнти.

У стаціонарному стані відбуваються хімічні реакції, дифузія, перенос іонів та інші процеси, але вони так збалансовані, що стан системи в цілому не змінюється. При цьому існують градієнти між окремими частинами системи, але вони зберігають постійні значення. Це можливо тільки за умови, що система з навколишнього середовища отримує речовину і вільну енергію, а також віддає продукти реакцій і тепло, що виділяється. Термодинамічним критерієм (умовою) стаціонарного стану є рівність між утворенням ентропії організмом і потоком ентропії з нього в навколишнє середовище:

$$\frac{d_i s}{dt} = \frac{d_e s}{dt}$$

а повна зміна ентропії рівна нулю

$$\frac{ds}{dt} = 0$$

Зрозуміло, що термодинамічній рівновазі притаманна відсутність потоку речовин між системою і середовищем, тоді як стаціонарний стан відкритої системи підтримується завдяки обміну речовиною та енергією з середовищем. Саме з навколишнього середовища відкрита система черпає вільну енергію, необхідну для підтримання стаціонарного стану. Для збереження термодинамічної рівноваги витратити вільну енергію не потрібно. У біологічній системі термодинамічна рівновага встановлюється тільки в разі настання смерті. У звичайних умовах життя організм підтримує стаціонарний стан, який характеризується не відсутністю процесів, а таким їх перебігом (зазвичай вельми активним і напруженим), за якого вони збалансовані настільки, що основні параметри системи зберігаються незмінними, створюючи зовнішнє враження «спокою».

Біологічні системи, особливо високоорганізовані організми, підтримують основні показники життєдіяльності на постійному рівні протягом усього життя. У середині минулого століття видатний фізіолог К. Бернар створив уявлення про сталість «внутрішнього середовища організму», під яким розуміють кров, лімфу і міжклітинну (інтерстиційну) рідину. У неї «занурені» клітини всіх тканин і органів. Внутрішнє середовище вищих тварин характеризується відносною постійністю фізико-хімічних і фізіологічних властивостей: температури, рН, вмісту кисню, вуглекислого газу, води, іонів, цукру та інших речовин, відносною стабільністю кров'яного тиску, клітинного складу крові та інших так званих фізіологічних констант.

Клод Бернар відводив внутрішньому середовищу значення своєрідної «оранжереї» для клітин. Він стверджував, що «сталість внутрішнього середовища є необхідною умовою вільного життя вищих тварин». Наявність внутрішнього середовища, властивості якого є постійними навіть за значних змін навколишніх умов, дає змогу людині зберігати життя за значних коливань фізико-хімічних параметрів зовнішнього світу.

З 1939 р. у науці вкоренився термін «гомеостаз», який забезпечується взаємодією внутрішнього середовища організму із зовнішнім світом. Із зовнішнього середовища людина отримує все, що їй необхідно для життєдіяльності. Йому організм віддає свої «шлаки». Основними споживачами всього, що бере біологічна система з навколишнього середовища, і виробниками «шлаків» є клітини. Водночас в організмі вищих тварин переважна частина клітин не вступає в безпосередній контакт із зовнішнім середовищем. Клітини контактують із внутрішнім середовищем організму, а те, своєю чергою, пов'язане із зовнішнім середовищем за допомогою систем

кровообігу, дихання, травлення, виділення. Отже, в обміні клітин із зовнішнім світом існує посередник - внутрішнє середовище організму. Воно служить своєрідним «буфером», що не дає зовнішньому середовищу згубити живі клітини, коли фізіологічні фізико-хімічні властивості зовнішнього світу різко змінюються. У несприятливих умовах внутрішнє середовище організму здатне зберегти свої «оранжерейні» властивості за рахунок регуляції кровообігу, дихання, виділення, травлення. Наприклад, у разі зменшення вмісту кисню у вдихуваному повітрі в людини посилюються дихання і кровообіг, що дає змогу зберегти нормальний вміст кисню у внутрішньому середовищі й забезпечити оптимальний перебіг окислювальних процесів у клітинах.

Таким чином, саме гомеостаз є стаціонарний станом організму вищих тварин.

Термодинаміка біологічних процесів. Біологічні системи загалом поділяються на ізольовані, замкнені або відкриті.

Відкрита система здійснює обмін енергією і речовиною з довкіллям.

Замкнена система не здійснює обмін речовиною з довкіллям, проте здатна здійснювати обмін енергією.

Ізольована система виключає обмін з довкіллям як енергією, так і речовиною.

Кожна клітина і весь живий організм в цілому належать переважно до відкритих біосистем, за виключенням окремих випадків функціонування закритих та ізольованих систем. До енергетичних процесів у біологічних системах належать: дихання, скорочення м'язів, фотосинтез, активний транспорт речовин тощо. Незважаючи на різноманітність цих процесів всі вони класифікуються на два типи: оборотні і необоротні.

Оборотний процес – це такий процес, при якому система в кожен певний момент часу знаходиться у стані, нескінченно близькому до термодинамічної рівноваги, і досить лише трохи змінити умови, щоб процес був обернений. При цьому під термодинамічною рівновагою розуміють такий стан системи, коли градієнти різних видів енергії (хімічної, електричної) вирівняні і здатність системи здійснювати роботу дорівнює нулю. Повертання оборотного процесу не викликає залишкових змін в довкіллі.

На відміну від цього при *необоротному процесі* система змінюється в напрямку кінцевого стану (при мимовільному протіканні процесу – до стану рівноваги) з певною швидкістю.

Термодинамічний потенціал

Стан кожної термодинамічної системи може повністю визначатися за допомогою термодинамічних потенціалів. Кожному з них приписується певний набір незалежних параметрів стану. Крім згаданої вище внутрішньої енергії U , до термодинамічних потенціалів відносять: ентальпію H , вільну енергію Гельмгольца F , вільну енергію Гіббса G . Вони можуть бути визначені за допомогою формул, де P - тиск, V - об'єм, S - ентропія і T - температура.

$$H = U + PV$$

$$F = U - ST$$

$$G = U + PV - ST$$

Вільна енергія Гіббса відповідає стану системи, за якого тиск і температура є постійними. Тому цей термодинамічний потенціал вживають для опису біологічних систем. Корисна робота в таких системах виконується за рахунок зменшення потенціалу Гіббса.

Величина вільної енергії Гіббса, що припадає на один іон речовини, називається електрохімічним потенціалом, який включає хімічну, осмотичну та електричну складові енергії:

$$\mu \sim = \mu^0 + RT \ln C + zF\phi$$

тут μ^0 - стандартний електрохімічний потенціал, що залежить від хімічної природи речовини; C - концентрація речовини, R - універсальна газова стала, T - термодинамічна температура, z - електричний заряд частинки, F - константа Фарадея, ϕ - електричний потенціал.

Електрохімічний потенціал натрію, калію та деяких інших речовин відіграє вирішальну роль у такому важливому процесі, як перенесення речовин у мембранах клітин.

Практична частина:

1. Запишіть закони термодинаміки що описують живі системи.
2. Розв'яжіть задачу:

У клітині концентрація Na^+ становить 0,020 моль/л, в позаклітинному середовищі – 0,20 моль/л. Температура в клітині рівна 37 °С, а потенціал внутрішньої сторони становить $(-60 \times 10^3 \text{ В})$. Яка величина осмотичної та електричної роботи, а також зміна електрохімічного потенціалу за умов перенесення іонів натрію через плазматичну мембрану клітини назовні.

Розрахувати осмотичну роботу за формулою:

$$RT \ln \frac{c_2}{c_1}$$

де R – універсальна газова стала 8,31;

T – абсолютна температура;

c_2 – концентрація зовні клітини;

c_1 – концентрація всередині клітини;

$\ln 10 = 2,3027$.

Обчисліть електричну роботу за формулою (коли $\phi_2 = 0$; $\phi_2 = 15$; $\phi_2 = 20$).

$$zF(\phi_2 - \phi_1)$$

z - електричний заряд частинки (для $\text{Na} = 1$);

F - константа Фарадея ($9,6485309 \times 10^4 \text{ С моль}^{-1}$);

ϕ_2 - електричний потенціал зовні клітини;

ϕ_1 - електричний потенціал всередині клітини;

Обчисліть зміну електрохімічного потенціалу за формулою:

$$\Delta \bar{\mu} = \Delta \mu_0 + RT \ln(c_2/c_1) + zF(\varphi_2 - \varphi_1)$$

Na^+ не зазнає при перенесенні через мембрану хімічних змін, тому $\Delta \mu_0 = 0$.

Завдання для самостійної роботи: знайти у мережі інтернет та літературі матеріал щодо досягнення стаціонарного стану біологічними системами.

Ознайомитися з теоретичним матеріалом у посібнику та рекомендованих джерелах літератури та дати відповіді на питання:

1. Навіщо потрібний стаціонарний стан біосистемам?
2. Які зміни ентропії в живому організмі призводять до патологічних змін його функціонування, а які спрямовані на підтримку його життєдіяльності?
3. Ознайомтесь з теоремою Пригожина. Якими критеріями стійкості системи характеризується термодинамічна рівновага і стаціонарний стан.

Практичне заняття №2.

Ентальпія. Тепловий ефект біохімічної реакції

Біохімічні перетворення обумовлюють зміну внутрішньої енергії системи, оскільки внутрішня енергія продуктів реакції не еквівалентна внутрішній енергії речовин, які вступили у реакцію.

Таким чином, *тепловий ефект біохімічної реакції* - це теплота, яка виділяється або поглинається в результаті реакції, тобто величина хімічної енергії або *ентальпія*, і позначається буквою H (від грецького слова «нагріваю»).

Ентальпія має залежність від наступних параметрів стану системи: внутрішньої енергії U , а також від тиску P та об'єму V .

Ентальпія всієї системи дорівнює сумі ентальпій її складових частин. Із внутрішньою енергією U системи ентальпія зв'язана співвідношенням:

де U - внутрішня енергія, P - тиск, V - об'єм.

Таким чином ентальпія дорівнює сумі внутрішньої енергії і добутку тиску на об'єм.

При сталому тиску $P = \text{const}$ $dQ = dH$, (dQ – кількість тепла) тобто ентальпія – це функція, що визначає перетворення хімічної енергії на тепло і вказує кількість енергії, яку можна перетворити на теплоту.

Ентальпія H – це функція стану, що за умов постійного тиску характеризує внутрішню енергію системи та її здатність до виконання роботи. Ентальпія залежить від кількості речовини, тому її зміну ΔH відносять до одного моля і вимірюють у кДж/моль. В ізобаричному процесі (за умови $P = \text{const}$) утворене тепло дорівнює зміні ентальпії системи.

Зміна ентальпії ΔH системи внаслідок взаємодії речовин за умов постійного тиску називається тепловий ефект хімічної реакції.

Перший закон термодинаміки може застосовуватись до біологічних об'єктів, при цьому враховується кількість енергії, поглиненої з їжею, та кількість виділеної організмом теплової енергії. У цьому енергетичному балансі не розглядаються проміжні етапи перетворення енергії. Перший закон характеризує лише кількісні зміни та перетворення енергії в термодинамічних системах, але не показує ймовірності процесу та його спрямованості.

При біохімічних перетвореннях відбувається зміна внутрішньої енергії системи, обумовлена тим, що внутрішня енергія продуктів реакції відрізняється від внутрішньої енергії речовин, що прореагували. Тепловим ефектом біохімічної реакції називається теплота, що виділяється або поглинається в результаті реакції при дотриманні наступних умов:

- 1) об'єм або тиск постійні ($p = \text{const}$ або $V = \text{const}$);
- 2) не відбувається жодної роботи, крім роботи розширення;
- 3) температура вихідних речовин і продуктів однакова ($T_1 = T_2$).

Закон Гесса - тепловий ефект реакції, що протікає при постійному тиску або постійному об'ємі, не залежить від шляху реакції, а визначається лише станом вихідних речовин та продуктів реакції.

Термодинамічна основа закону Гесса - незалежність теплового ефекту хімічної реакції від способу її перебігу.

Тепловий ефект ізобарної реакції дорівнює приросту ентальпії системи $Q_p = \Delta H$. Відповідно до загального правила знаків (позитивною вважається теплота, що надходить до системи) *позитивним* буде тепловий ефект *ендотермічної реакції* (що протікає з поглинанням теплоти), а *негативним* буде тепловий ефект *екзотермічної реакції* (що протікає з виділенням теплоти).

Значення закону Гесса полягає в тому, що він дозволяє теоретично, не вдаючись до експерименту, розраховувати значення теплових ефектів біохімічних реакцій. Згідно з першим законом термодинаміки теплота реакції Q не є функцією стану, оскільки залежить від способу проведення процесу, тобто від шляху переходу системи із початкового у кінцевий стан.

Ентальпію хімічної реакції $\Delta H_{\text{хр.}}$ не слід ототожнювати з теплотою Q , незважаючи на те, що їх чисельні значення можуть співпадати. Величина Q вказує на кількість теплоти, що виділилася у навколишнє середовища ($+Q$) чи поглинулася з нього ($-Q$) під час реакції за будь-яких умов і при довільній кількості речовини.

На відміну від теплоти Q ентальпія ΔH віднесена чітко до 1 моль речовини за ізобаричних умов ($P = \text{const}$). Іншою суттєвою відмінністю є знак («+» чи «-») перед величинами Q і ΔH . Величина $\Delta H_{\text{х.р.}}$ характеризує тепловий стан реакційної системи, а Q – оточуючого середовища.

Екзотермічні реакції супроводжуються виділенням теплоти, отже тепловміст у системі зменшується ($\Delta H_{\text{продуктів}} < \Delta H_{\text{реагентів}}$, $\Delta H_{\text{х.р.}} < 0$), а в оточуючому середовищі, навпаки, зростає ($+Q$).

Ендотермічні реакції мають зворотну залежність: за рахунок поглинання

теплоти з оточуючого середовища ентальпія системи зростає ($\Delta H_{\text{продуктів}} > \Delta H_{\text{реагентів}}$, $\Delta H < 0$), а теплота у середовищі, навпроти, зменшується ($-Q$). Очевидно, що для обох випадків кількість теплоти і ентальпія реакції мають протилежні знаки, тому можна вивести залежність.

На тепловий ефект реакції впливає декілька чинників, у тому числі:

- Агрегатний (чи фазовий) стан вихідних речовин і продуктів реакції;
- Температура. Для хімічних реакцій зміна теплового ефекту в межах температур і тисків, що мають практичне значення, відносно невелике, тому для не дуже точних розрахунків можна знехтувати залежністю ΔH від температури і вважати тепловий ефект реакції постійним.
- Умови перебігу реакції – при сталому тиску чи при сталому об'ємі.

Практична частина:

1. Розв'яжіть задачі:

Задача 1

Визначити зміну ентропії при плавленні 250 г свинцю, якщо $T_{\text{пл}} = 327,4$ °С, а питома теплота плавлення свинцю 23040 Дж/кг.

Розв'язок:

Ентропія для оборотного процесу $\Delta S = \Delta H/T$,

де ΔH – теплота плавлення в перерахунку на кілограм;

T – температура плавлення ($T = t + 273,15$ °С)

Відповідь: $\Delta S = 9,59$ Дж/К.

Задача 2

Визначити питомий тепловий потік через шкіру, якщо людина стоїть на льоду за наступних умов: температура поверхні льоду 0 °С, температура стоп 34 °С, товщина шкіри 5 мм, коефіцієнт теплопровідності шкіри 0,3 Вт/м²·град.

Відповідь: 2040 кДж/год

Задача 3

Визначити кількість тепла, що втрачається людиною за одиницю часу з одиниці поверхні тіла за рахунок зовнішньої конвекції, за наступних умов: середня температура поверхні тіла 33°С; температура довкілля 20°С; коефіцієнт тепловіддачі 50 Вт/м² ·град.

Відповідь: 650 Вт/м²

Приклад розв'язування:

Визначити питомий тепловий потік через мембрану плоского діалізатора крові при наступних умовах: товщина мембрани $\delta = 1$ мм, коефіцієнт теплопровідності мембрани $\lambda = 0,2$ Вт/(м²), температура крові $T_{\text{КР}} = 37^\circ\text{C}$, а діалізату $T_{\text{Д}} = 24^\circ\text{C}$. Процес вважати стаціонарним.

Відповідно до закону Фур'є:

$$\bar{Q} = -\lambda \cdot \text{grad}(T) \cdot S$$

Питомий тепловий потік через мембрану :

$$q = \frac{\lambda}{\delta} (T_{кр} - T_d) = \frac{0,2}{10^{-3}} (37 - 24) = 2600 \left[\frac{Вт}{м^2} \right]$$

q – тепловий потік, виражається в Вт;

$d(T)$ – градієнт температурного поля (сукупності числових значень температури в різноманітних місцях системи в обраний момент часу), одиниці виміру К/м;

S – площа поверхні теплообміну, м²;

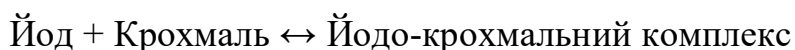
δ – товщина мембрани

λ – коефіцієнт теплопровідності, Вт/(м К).

Лабораторна робота №1.

Вплив температури на зсув хімічної рівноваги

Під час взаємодії йоду з крохмалем утворюється адсорбційна сполука складної будови, що має синє забарвлення. Реакція екзотермічна, її рівновагу можна умовно зобразити схемою:



Матеріали та реактиви. 1 % розчин крохмалю, 0,1 М розчин йоду.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, водяна баня.

Хід роботи:

У пробірку наливають 4–5 мл крохмалю та додають 1 краплину 0,1 М розчину йоду (до появи синього забарвлення). Потім нагрівають пробірку на водяній бані й фіксують забарвлення. Потім цю ж пробірку охолоджують водою з-під крану і знову спостерігають зміну забарвлення.

Пояснити, використовуючи принцип Ле-Шательє, причину зміни забарвлення розчину при зміні температури. Роблять висновок про вплив температури на хімічну рівновагу та про зворотність зміщення хімічної рівноваги.

Принцип Ле Шательє (принцип рухомої рівноваги) стверджує, якщо змінити одну з умов, за яких система перебуває у стані рівноваги, то відбувається таке зміщення рівноваги, яке зменшує (послаблює) цю зміну.

Практичне заняття №3.

Вивчення принципів зв'язування лігандів з макромолекулами в біополімерах

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, опрацювання завдань самостійної роботи та виконання практичної частини в робочому зошиті.

Біополімерами називаються біологічно важливі макромолекули, які побудовані в основному з азоту, вуглецю, водню, кисню, фосфору і сірки. Велику роль в функціонуванні біополімерів відіграють такі іони, як Na⁺, K⁺,

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} . Крім того, значний вплив на живі системи здійснюють малі кількості таких металів як Fe, Zn, Cu, Mg та інші.

Основна функція біомолекул – побудова клітин і забезпечення біоенергетичних процесів (у природі у всіх видів хребетних налічується близько 200 типів клітин).

Комплексні сполуки – це сполуки, до складу яких входять комплексні частинки (комплекси), що містять центральний атом (комплексоутворювач), оточений лігандами. Утворення комплексів можна представити як результат взаємодії за доноро-акцепторним механізмом стабільних при звичайних умовах часток: атомів, іонів або молекул.

Ліганди (від лат. *ligo* – прив'язую) – це молекули або іони в комплексних сполуках, які безпосередньо пов'язані з центральним атомом. Центральний атом та ліганди утворюють внутрішню сферу (комплекс), а молекули або йони, які оточують комплекс – зовнішню сферу. Центральним атомом можуть бути як метали, так і неметали. Утворення комплексів між малою молекулою лігандом (іоном, метаболітом, гормоном) і центрами кріплення ліганду на макромолекулі М-коду лежить в основі функціонування багатьох біополімерів (целюлоза, крохмаль, білки та пептиди, ДНК, РНК).

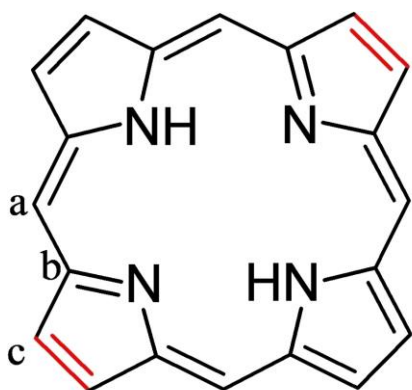
Більшість хімічних елементів містяться в органах і тканинах у вигляді комплексних сполук з білками та іншими біополімерами. Це білки, амінокислоти, нуклеїнові кислоти, пептиди, жирні кислоти, вуглеводи, вітаміни, гормони, ферменти.

Комплексоутворююча здатність біолігандів обумовлена наявністю в їх молекулах кількох функціональних груп – COOH , NH_2 , які здатні координувати іони металів.

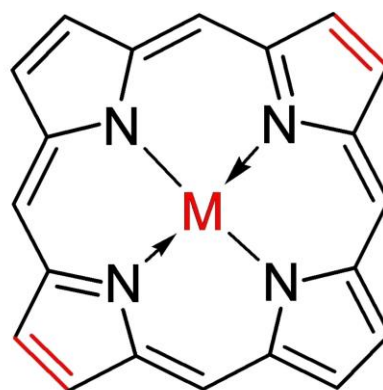
Прикладом є порфіринова система, що являє собою тетрадентатні макромолекули. В кутах квадрату знаходяться донорні атоми азоту, які мають жорстку координацію в просторі, де дуги є однотипними вуглецевими ланцюгами, що забезпечують сполучення донорних атомів азоту в замкнутий цикл. R є різними радикалами. Тому порфірини утворюють стійкі комплексні сполуки з металом. Порфіриновий ліганд дуже важливий в біологічних системах.

Центральним атомом порфіринового ліганду може бути Mg^{2+} (хлорофіл) чи Fe^{2+} (гемоглобін). Білкова молекула з 400 поліпептидних ланцюгів утворює глобін. До кожного приєднаний один гем. У атомах заліза 6 координаційних зв'язків: 4 утримують його в площині порфіринового ядра, а 2 направлені перпендикулярно цій площині. Одна з них зв'язана з киснем.

Гем (від дав.-гр. *αἷμα* - кров) - небілкова простетична група гемоглобіну та цитохромів, що містить йон Fe^{2+} , закріплений координаційними зв'язками в центрі великого гетероциклічного органічного кільця - порфірину. Не всі порфірини містять залізо, проте значна доля металопротейнів, що містять порфірин, мають гем як свою простетичну групу. Ця група білків називається гемопротейнами.



Порфірин



Металопорфірин

Рис.1. Структура порфіринового ліганду

<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202304817>

Хребетні тварини синтезують порфіринове кільце гему із гліцину та сукциніл-КоА. Йон Феруму походить із резервного залізобілкового комплексу - феритину, який міститься у клітинах селезінки, печінки та червоного кісткового мозку. Гем, виділений з крові різних хребетних тварин, має однаковий хімічний склад.

Хлорофіл - зелений пігмент, присутній в клітинах рослин, деяких водоростей і ціанобактерій, що надає їм відповідного кольору. Назва походить від грец. *chloros* - «зелений» і *phyllon* — «листок».

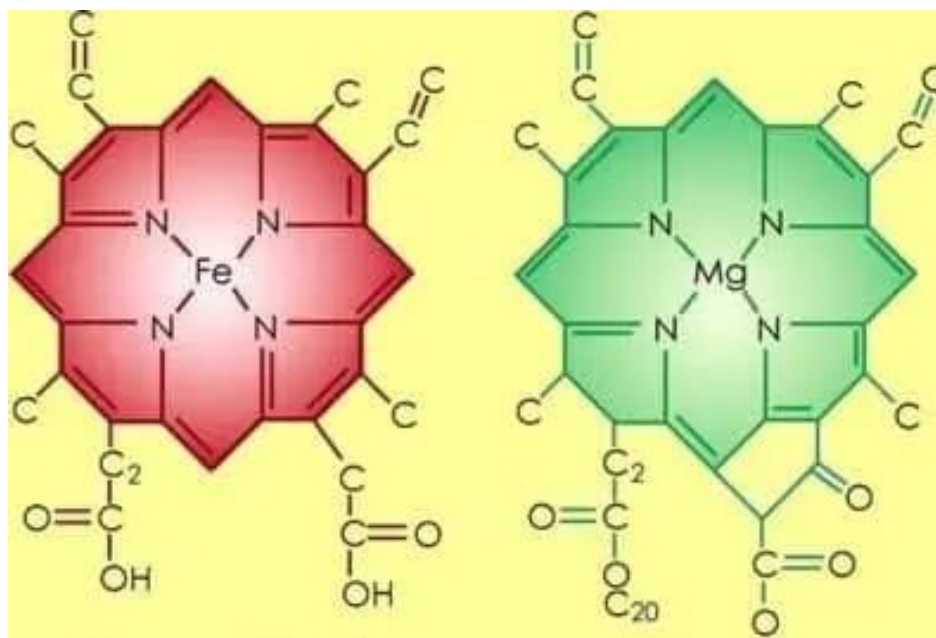


Рис.2. Будова гему і хлорофілу

<https://jain108academy.com/chlorophyll-137-atoms-in-the-molecule/>

Молекула хлорофілу складається з порфінової «головки» й фітольного «хвоста». При цьому порфінова частина молекули знаходиться на поверхні

мембрани тилакоїда й зв'язана із білками, а жиророзчинний фітольний ланцюг занурений у ліпідний шар. Вживання добавок хлорофілу впливає на кров подібно до гемоглобіну: підвищує рівень кисню, прискорює азотистий обмін, зміцнює клітинні мембрани, сприяє формуванню сполучних тканин.

Кобальтпорфіріновий комплекс складає частину вітаміну B₁₂, який відіграє важливу роль в розвитку і формуванні еритроцитів, а його дефіцит веде до злоякісної анемії.

Практична частина:

1. Виконати лабораторну роботу
2. Сформулювати висновки

Лабораторна робота №2.

Отримання екстракту пігментів із листків рослин

Дослід 1

Отримання спиртового екстракту пігментів з рослинного матеріалу

Матеріали і реактиви: листя рослин (кульбаба, пеларгонія, кропива тощо), 96% етанол, порошок CaCO₃, ступки фарфорові з товкачками, колби, пробірки, лійки, палички скляні, паперові фільтри.

Хід роботи:

Листя рослин (1 г) подрібнити ножицями, при цьому оминати ті частини листка, де є крупні жилки, а також черешки. Після зважування рослинний матеріал перенести в ступку, додати на кінчику ножа CaCO₃ (для нейтралізації кислот клітинного соку) та перетерти товкачком поступово додаючи 96% етиловий спирт до об'єму 5 мл. Злити отриману витяжку у лійку з паперовим фільтром. У ступку повторно додати 1 мл етилового спирту для того щоб змити з стінок залишки рослинного матеріалу і кількісно перенести на той самий паперовий фільтр. Повторити промивання 1-2 рази до повного вилучення пігментів (всього на пробу використати 10 мл спирту).

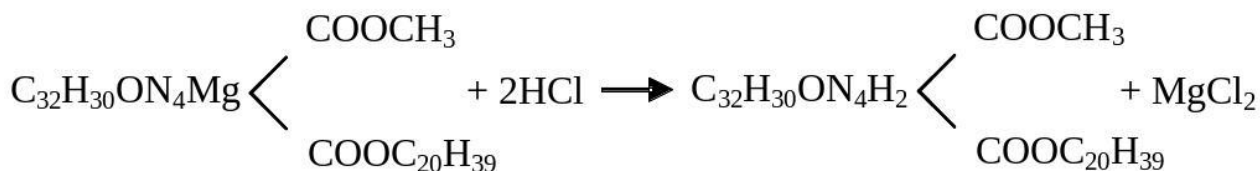
Дослід 2

Отримання феофітину і відновлення металоорганічного зв'язку

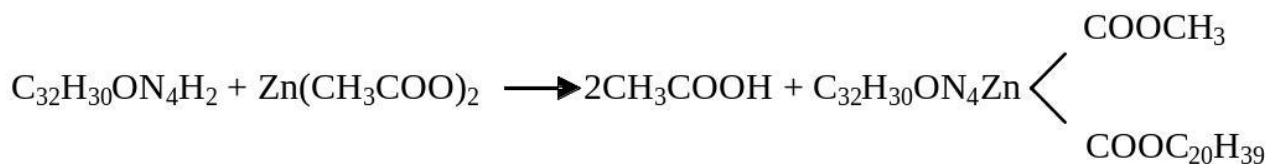
Молекула хлорофілу досить велика за розмірами, але основну роль під час фотосинтезу відіграє магній, оскільки саме його електрони під дією квантів світла переходять на вищі енергетичні рівні, запускаючи весь процес фотосинтезу.

Хлорофіл характеризується лабільністю і легко взаємодіє з іншими речовинами. За хімічною природою хлорофіл – складний естер дикарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів – метанолу CH₃OH і фітолу C₂₀H₃₉OH.

Якщо до розчину хлорофілу додати невелику кількість соляної кислоти, то можна одержати буро-оливковий феофітин - продукт заміщення магнію в молекулі хлорофілу двома атомами водню:



Для відновлення металоорганічного зв'язку отриманий феофітин нагрівають з оцтовою кислотою міддю або оцтовокислим цинком: атом двовалентного металу витісняє водень з феофітину; оцтова кислота, що утворюється при цьому, служить каталізатором.



Хід роботи:

У дві пробірки внести по 3-4 мл отриманої спиртового екстракту пігментів листка і додати в них по 2-3 краплі 10% соляної кислоти. Звернути увагу на колір отриманого продукту реакції. В одну з пробірок з феофітином внести декілька кристалів оцтової кислоти міді (цинку) і довести розчин до кипіння. Спостерігати за зміною кольору розчину. Якщо зміни не відмічається, додати ще оцтовокислу мідь чи цинк і продовжити нагрівання.

Завдання:

- замалуйте вміст пробірки;
- запишіть висновок (як змінилося забарвлення при заміщенні двох атомів водню у феофітині атомом міді або цинку);
- напишіть рівняння прямої та зворотної реакції.

Дослід 3

Флуоресценція хлорофілу

Для всіх пігментів, які належать до класу порфіринів, характерна інтенсивна флуоресценція в червоній ділянці спектра. Здатність хлорофілів інтенсивно флуоресціювати свідчить про їхню високу фотохімічну активність.

Флуоресценція є свідченням активності речовин при поглинанні ними світла. В темряві молекула хлорофілу в основному знаходиться у стані з найнижчим енергетичним рівнем валентних електронів. При поглинанні кванта світла один з π -електронів молекули хлорофілу переходить на більш високий енергетичний рівень, внаслідок чого виникає електронно збуджений стан молекули. При поверненні із збудженого стану в основний енергія електронів може витратитися на:

- 1) фотохімічну роботу;
- 2) збудження сусідніх молекул хлорофілу;
- 3) втрату у вигляді тепла;
- 4) флуоресцентне випромінювання.

Незалежно від довжини хвилі спектр флуоресценції хлорофілу *a* має максимум при 670 нм. Хлорофіл сильно флуоресціює в розчинах і слабо - в листі, що пояснюється щільною упаковкою молекул в тилакоїдах і використанням поглиненої енергії у фотохімічних процесах.

Хід роботи:

Витяжку пігментів в пробірці помістити на темному фоні у світлі настільної лампи або освітити пучком світла проекційного ліхтаря. Розглянути

втяжку з тієї сторони, звідки падає світло.

Завдання:

запишіть висновок;

напишіть рівняння прямої та зворотної реакції.

Завдання для самостійної роботи:

1. Чому гемоглобін є алостеричним білком?
2. В основі функціонування яких біополімерів лежить утворення комплексів між малою молекулою і центрами скріплення на макромолекулі?
2. Що таке модель максимальної кооперативності Хілла?
3. Яку роль відіграють ліганди при формуванні комплексних сполук?

Практичне заняття №4.

Вивчення механізмів формування потенціалу спокою і потенціалу дії на клітинній мембрані

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи та виконання практичної частини в робочому зошиті.

Біологічні мембрани є фундаментальними структурами, які формують будь-які клітини тканин і органів живого організму. Вони, виконуючи бар'єрну і матричну функцію, виявляють також певну електричну активність, що описується електричними потенціалами спокою та дії.

За фізичною природою, механізм виникнення мембранних потенціалів спокою і генерації мембранних потенціалів дії є іонним. Він ґрунтується на процесах перебігу пасивного і активного транспорту іонів, наприклад Na^+ , K^+ і Cl^- , через біологічні мембрани. У результаті розподілу цих іонів між зовнішньою і внутрішньою сторонами клітинних мембран виникає певна різниця електричних потенціалів, яка достатньо тонко відображає особливості функціонування як самих клітин, так і інших більш високоорганізованих структур організму (як мозок, м'язи, серце тощо).

Молекули ліпідів розташовані упорядковано - перпендикулярно до поверхні, у два шари, так, що полярні голівки, які мають гідрофільні властивості, спрямовані назовні, а неполярні вуглеводневі хвости, які мають гідрофобні властивості, спрямовані всередину мембрани. Ліпідний шар мембрани ефективно перешкоджає процесу вільного проходження іонів крізь мембрану. Гідрофобні хвости утворюють внутрішню структуру мембрани, яка поводить себе, як діелектрик. До функцій мембранних білків входить формування каналів, завдяки яким може відбуватися обмін іонами між внутрішньо- і позаклітинним середовищем. Частина білків занурена у ліпідний шар, а деякі з них пронизують мембрану наскрізь, як, наприклад, транспортні білки, що беруть участь у перенесенні іонів натрію і калію. Вважається, що білки не закріплені в мембрані нерухомо, а мають деяку свободу переміщення.

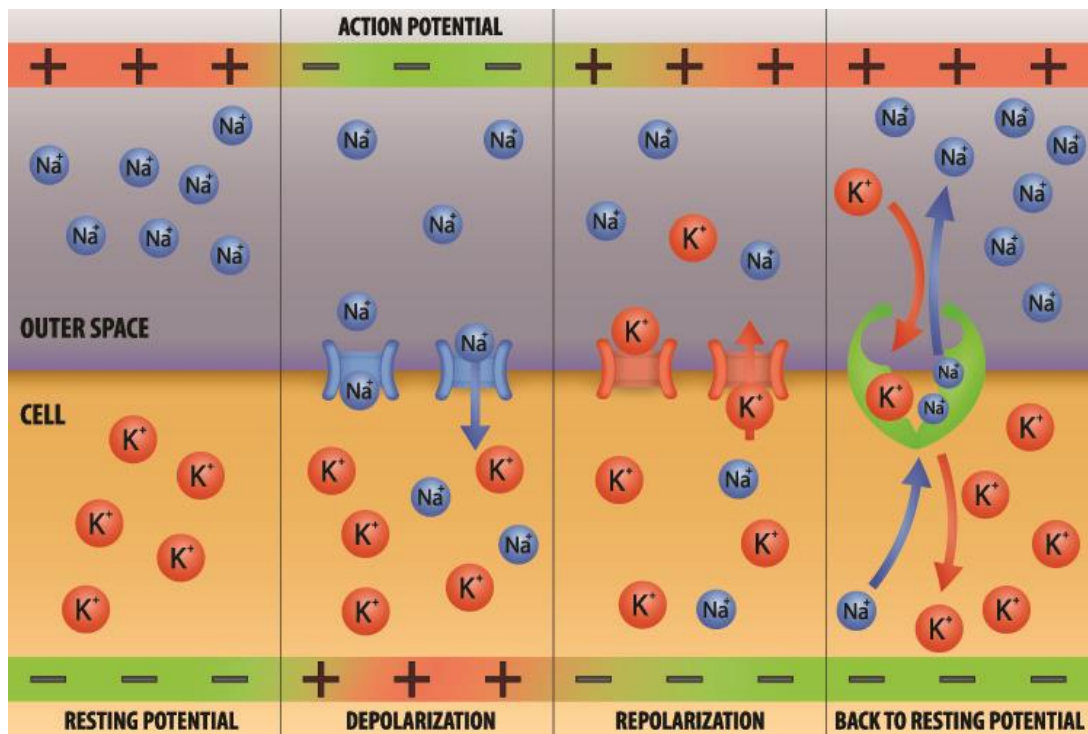


Рис.3. Формування потенціалу дії
<https://biologydictionary.net/action-potential/>

У нерві та м'язі електрична активація пов'язана з рухом іонів натрію та калію, а також інших іонів крізь іонні канали мембрани. Білки не лише полегшують проходження кожного з іонів, але й управляють його потоком, обумовлюючи вибірккову проникність мембрани.

Наявність *потенціалу спокою* мембрани обумовлена двома факторами:

- різною концентрацією іонів у внутрішньо- і позаклітинному середовищі;
- вибірковою проникністю мембрани для різних іонів.

У всіх збудливих клітинах концентрація внутрішньоклітинного калію набагато перевищує концентрацію калію поза клітиною, а позаклітинні концентрації натрію і хлору набагато більше їх внутрішньоклітинних концентрацій. Нерівність концентрацій іонів у внутрішньо- і позаклітинному просторі викликає дифузію іонів з області високої концентрації в область низької концентрації. Швидкість дифузії залежить від різниці концентрацій і проникності мембрани.

Оскільки іони несуть електричні заряди, а мембрана характеризується певною електричною ємністю, заряди накопичуються, що приводить до виникнення різниці потенціалів на мембрані. Ця різниця потенціалів створює в товщі мембрани електричне поле, яке породжує сили, що діють на всі заряджені частинки всередині мембрани.

Лабораторна робота
Вивчення залежності між в'язкістю цитоплазми та концентрацією
іонів калію

В'язкість - це переміщення одного шару рідини відносно іншого. В'язкість зумовлена зчепленням молекул рідини між собою й опором структурних компонентів клітини. Відомо, що зміна функціональної активності клітини корелює зі зміною в'язкості цитоплазми.

Одно- і двовалентні іони металів і різні аніони неоднаково впливають на в'язкість цитоплазми. Одновалентні іони металів підвищують ступінь гідратації колоїдів і тому зменшують в'язкість цитоплазми. Двовалентні катіони зумовлюють коагулюючу дію та дегідратацію білків і підвищення в'язкості цитоплазми.

Початковою формою плазмолізу є увігнутий плазмоліз. В подальшому ця форма або зберігається, або з відповідною швидкістю переходить в опуклу форму. Проміжок часу, який проходить з часу занурення об'єкта в розчин плазмолітика до досягнення опуклого плазмолізу, значною мірою залежить від в'язкості цитоплазми. Чим менша в'язкість, тим швидше настає опуклий плазмоліз.

Про зміну в'язкості цитоплазми свідчить форма і час плазмолізу, що зумовлений гіпертонічними розчинами нітратів калію та кальцію.

Мета роботи. Визначити залежність між в'язкістю цитоплазми та концентрацією іонів калію в лусках цибулі. Встановити характер дії йонів K^+ та Ca^{2+} на в'язкість цитоплазми.

Матеріали та реактиви. Синя цибуля, елодея, валіснерія; 1 М розчин KNO_3 , 0,7 М розчин $Ca(NO_3)_2$, етиловий спирт;

Обладнання. Центрифуга, центрифужні пробірки, чашки Петрі, скляні пробірки, мікроскопи, предметні скельця, леза, пінцети, препарувальні голки, піпетки.

Хід роботи:

Об'єктом досліджу є епідерма зовнішньої сторони забарвленої луски цибулі, оброблена плазмолітиком – 1 М розчином KNO_3 та 0,7 М розчином $Ca(NO_3)_2$.

1. На предметному склі провести плазмоліз. З одного боку накривного скельця нанести краплину 1 М розчину сахарози або NaCl, а з протилежного боку смужкою фільтрувального паперу відтягнути з-під накривного скельця воду.

2. Визначити час, за який відбувається плазмоліз у клітинах епідерми цибулі, занурених у KNO_3 та $Ca(NO_3)_2$.

3. Зробити висновки про в'язкість цитоплазми та вплив на неї різних іонів.

Практичні завдання:

1. Що таке селективна проникність біомембран?
2. Запишіть закон Фіка, що описує пасивний транспорт речовин крізь біомембрану.
3. Рівняння Нернста-Планка. Що воно характеризує?

Завдання для самостійної роботи:

1. Який іонний склад характерний для внутрішньоклітинного та позаклітинного простору?
2. Що таке потенціал Нернста.
3. Чим обумовлений потенціал спокою та які фактори на нього впливають?
4. Як зміниться потенціал спокою мембрани клітини, якщо:
 - позаклітинна концентрація для іонів Na / K / Cl збільшиться / зменшиться;
 - внутрішньоклітинна концентрація для іонів Na / K / Cl збільшиться / зменшиться.

Практичне заняття №5.

Маркерні ферменти плазматичної мембрани та ендомембран

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Маркерний фермент або хімічний компонент - це той компонент, який присутній практично тільки в складі даного типу органел. Інакше кажучи, маркер слугує індикатором присутності або відсутності фракцій тих органел, у складі яких він перебуває.

Локалізацію даного ферменту в тканині або клітині часто вдається встановити *in situ* гісто-хімічними методами. Для цього тонкі (від 2 до 10 мкм) зрізи замороженої тканини обробляють розчином субстрату, до якого специфічний цей фермент. У тих місцях, де міститься фермент, утворюється відповідний продукт реакції.

Більшість ферментів мають внутрішньоклітинну локалізацію і нерівномірний розподіл в організмі. Ферменти певного метаболічного шляху, як правило, знаходяться в одному компартменті клітини (Табл. 2). Особливо важливим є поділ метаболічних шляхів на анаболічні та катаболічні процеси, які є протилежно спрямованими.

Таблиця 2.

Внутрішньоклітинна локалізація ферментів

Фермент	Субклітинні фракції
<i>ДНК-полімераза</i>	ядро
<i>Сукцинатдегідрогеназа</i>	мітохондрії
<i>Цитохромоксидаза</i>	мітохондрії
<i>Глюкозо-6-фосфатаза</i>	ЕПР
<i>Кисла фосфатаза</i>	лізосоми
<i>Рибонуклеаза</i>	лізосоми

<i>Каталаза</i>	пероксисоми
<i>Уратоксидаза</i>	пероксисоми
<i>5'-Нуклеотидаза</i>	плазматична мембрана
<i>Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа</i>	цитозоль
<i>Лактатдегідрогеназа</i>	цитозоль
<i>Фосфофруктокіназа</i>	цитозоль

Фермент може бути маркером, якщо він міцно зв'язаний з даною мембраною, при розділенні фракцій не підлягає активації чи інгібування та локалізований виключно в даному типі мембран. На практиці для більш чіткого контролю за чистотою отриманих фракцій визначають активність двох-трьох мембранних маркерів для кожного типу мембран. Застосування певних маркерів із цілого набору маркерних ферментів для мембрани певної органели варіює в залежності від типу клітин.

Лабораторна робота

Дослідження активності маркерних ензимів біомембран. Визначення неорганічного фосфору спектрофотометричним методом за Фіске-Суббароу

Активність окремих маркерних ензимів біологічних мембран (Na^+ , K^+ - АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази, 5'-нуклеотидази) визначають шляхом вимірювання неорганічного фосфору ($\text{P}_\text{н}$), який вони відщеплюють від відповідного субстрату (АТФ, АМФ) в процесі каталізу. Кількість неорганічного фосфору визначають спектрофотометричним шляхом методом Фіске-Суббароу. Неорганічний фосфор вступає в реакцію з молібденовою кислотою, при цьому відновлюється й утворюється сполука синього кольору. З використанням розчинів KN_2PO_4 відомих концентрацій будують калібрувальний графік, за яким визначають концентрацію неорганічного фосфору у пробі.

Матеріали та реактиви. Висушений в ексікаторі KN_2PO_4 , реактив 1 (свіжоприготовлена 10% аскорбінова кислота), реактив 2 (0,42% молібденовокислий амоній у 1 н розчині H_2SO_4), реакційна суміш (джерело $\text{P}_\text{н}$);

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки градуйовані, водяна баня, ФЕК або СФ $\lambda = 680$ нм, кювети 5 чи 10 мм.

Хід роботи:

Спочатку потрібно побудувати калібрувальний графік. Для цього потрібно зважити 4 мг висушеного в ексікаторі KN_2PO_4 і розчинити у 100 мл дистильованої води, 1 мл такого розчину містить 40 мкг $\text{P}_\text{н}$. У пробірки рознести розчин KN_2PO_4 (концентрація 40 мкг/мл) таким чином, щоб 1 мл проби містив 5; 10; 15; 20; 25; 30 мкг солі. Об'єм проби довести дистильованою водою до 0,9 мл.

До проб внести 2,1 мл реактиву 3 (складається з 1 мл реактиву 1 і 6 мл

реативу 2) та інкубувати 30 хв за температури 37 °С на водяній бані до утворення забарвлення. Виміряти оптичну густину за $\lambda=820$ нм на СФ або ФЕК проти контрольної проби, яка містить замість розчину KH_2PO_4 воду та реактив 3.

Побудувати калібрувальний графік залежності E_{820} від концентрації Φ_n (мкг/мл).

Задля визначення активності окремих маркерних ферментів в формулі обрахунку їх активності використовують калібрувальний коефіцієнт K , який обчислюють з використанням калібрувального графіку наступним чином:

$$K = E_{820} / C_{\text{PH}}, \text{ де}$$

E_{820} - екстинкція розчину при $\lambda=820$ нм;

C_{PH} – концентрація фосфору за калібрувальним графіком, що відповідає отриманому значенню екстинкції.

Для вимірювання кількості неорганічного фосфору при визначенні активності маркерних ферментів у пробірку внести 0,9 мл *реакційної суміші* (джерело Φ_n) та 2,1 мл *реативу* 3. Інкубувати 30 хв за температури 37 °С і визначити оптичну густину за оптичного поглинання при $\lambda = 820$ нм.

Практичне завдання

1. Напишіть відповідність: тип мембрани – маркерний фермент

апикальна мембрана ентероцита -
внутрішня мембрана мітохондрії -
зовнішня мембрана мітохондрії -
лізосоми -
пероксисоми -
апарат Гольджі -
ендоплазматичний ретикулум -
саркоплазматичний ретикулум -
плазматична мембрана –

2. Опишіть, що таке метаболон, принципи його збирання.

3. Замалюйте будову біологічної мембрани та типи білків, які входять до її складу.

4. Якими критеріями послуговуються при віднесенні ферментів до маркерних

5. Чому активність маркерних ферментів використовують для встановлення чистоти мембранних препаратів

Завдання для самостійної роботи:

1. Які властивості притаманні біологічним мембранам?

2. Назвіть основні модельні мембранні системи.

3. Перелічіть види мембранного транспорту.

4. Які існують типи мембранних ферментів?

Практичне заняття №6.

Макроергічні сполуки

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

У живому організмі немає прямого переходу енергії від джерела (енергогенеруючого процесу) до споживача (біологічного перетворювача енергії). Безпосереднє використання потенційної хімічної енергії, що міститься в молекулах харчових речовин, неможливе тому, що при розриві внутрішньомолекулярних зв'язків виділяється така величезна кількість енергії, що вона не може бути акумульована внутрішньоклітинними ферментними системами і здатна викликати ушкодження цих систем. Для процесів, що відбуваються в живому організмі, характерне м ступінчасте звільнення вільної енергії з одночасним перетворенням її на хімічну енергію макроергічних сполук або електрохімічний потенціал на клітинних мембранах.

Макроергічні сполуки - це сполуки, що містять макроергічний зв'язок. Макроергічні називаються хімічні зв'язки, вільна енергія гідролізу яких становить не менше 21 кДж/моль. Ці зв'язки позначають знаком ~ (тильда). Говорячи про енергію макроергічних зв'язків, у біохімії мають на увазі не дійсну енергію ковалентного зв'язку між атомами, як це прийнято у фізичній хімії, а лише різницю між значеннями вільної енергії (ΔG) вихідних реагентів та продуктів реакцій гідролізу макроергічних сполук.

«Енергія зв'язку» в цьому сенсі, строго кажучи, не локалізована в цьому зв'язку, а характеризує реакцію в цілому. Тому правильніше говорити не про виникнення макроергічного зв'язку, а про утворення в процесі хімічного сполучення нової макроергічної сполуки. Універсальною формою запасання вільної енергії для всього живого світу є енергія макроергічних зв'язків АТФ: всі перетворення енергії в процесах життєдіяльності здійснюються через акумуляцію енергії в цих зв'язках та її використання за їх розриву.

Значення ΔG цих реакцій є якби «біологічний квант» енергії, так як всі перетворення енергії в організмах відбуваються порціями приблизно рівними ΔG . При ферментативному гідролізі АТФ в клітині фосфатна група, що відщеплюється, переноситься на субстрат, запас енергії в якому виявляється в результаті більшим, ніж у вихідній сполуці.

Величина зміни вільної енергії в реакціях переносу залежить як від природи групи, що переноситься, так і від природи молекули акцептора. При порівнянні потенціалу перенесення груп різних сполук необхідно скористатися єдиним стандартним акцептором. Як такий акцептор зазвичай приймають молекулу води і виражають потенціал перенесення у вигляді вільної енергії реакції гідролізу даної сполуки.

Потенціал перенесення вимірюється в кДж на 1 моль груп донора, які переносяться на стандартний акцептор при стандартних (одномолярних) концентраціях.

Молекулярна будова та хімічні властивості АТФ відповідають її функції проміжного акумулятора та переносника енергії. Молекула АТФ складається з

органічної основи аденіну, вуглеводу рибози та трьох залишків фосфорної кислоти, з яких пірофосфатні групи є макроергічними. Формулу АТФ можна записати так: аденін - рибоза - фосфат ~ фосфат ~ фосфат.

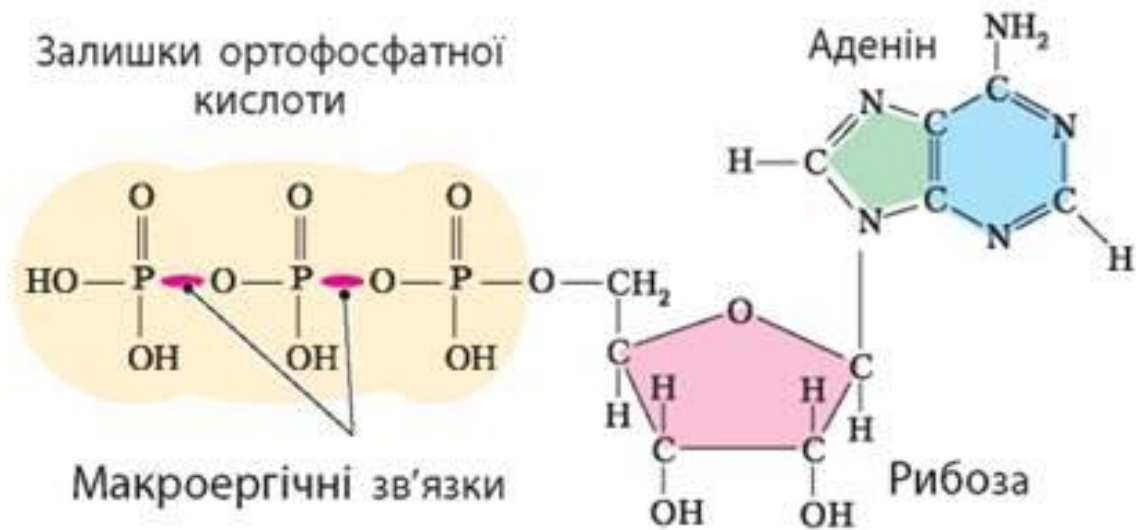


Рис. 4. Будова АТФ

(<https://uahistory.co/pidruchniki/zadorozhnij-biology-deep-level-9-class-2022/9.php>)

АТФ може функціонувати в клітинах не тільки як фосфорилуючий агент, що переносить фосфат на відповідний акцептор, але і як донор, що переносить на акцептор неорганічний пірофосфат, і як аденілюючий агент, що переносить на акцептор свою аденілатну групу.

При фосфорилуванні АДФ у процесах, пов'язаних з біологічним окисненням, має бути витрачена енергія, достатня для створення необхідного потенціалу перенесення груп. Величина енергії залежить не тільки від температури, тиску, а й від рН та від концентрації реагентів, яка може бути різною у різних відділах клітини.

Лабораторна робота

Кількісне визначення АТФ у тканинах

АТФ поставляє енергію для виконання наступних видів роботи: механічної – м'язове скорочення, передача нервових імпульсів, осмотичної – активний транспорт речовин, хімічної – біосинтез, передача генетичної інформації. АТФ легко доставляє енергію у будь-яку частину клітини, яка потребує її для біохімічних процесів. Ця молекула швидко вивільняє енергію, для чого потрібне протікання лише однієї реакції – гідролізу. Синтез АТФ з АДФ та неорганічного фосфату називають реакцією окисного фосфорилування (клітинне дихання), якщо для фосфорилування використовується світлова енергія, то процес називають фотофосфорилуванням (фотосинтез).

Мета роботи: визначити кількість АТФ у м'язовій тканині або печінці.

Принцип методу ґрунтується на гідролізі АТФ, внаслідок чого

звільняється залишок фосфорної кислоти.

Реактиви та матеріали: 2,5 % розчин молібденовокислого амонію у 5 м розчині сульфатної кислоти; стандартний розчин фосфору (в 1 мл 0,025 мг фосфору); 5% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО); 2 н розчин гідроксиду натрію; 0,15 % спиртовий розчин фенолфталеїну; 0,2 % розчин аскорбінової кислоти (20 мг на 10 мл води); 2 н розчин соляної кислоти (HCl);

Обладнання: фотоелектроколориметр (ФЕК, $\lambda = 570$ нм), водяна баня, ваги настільні, лійки, колби, піпетки, пробірки, фільтрувальний папір, кристалізатор, ножиці, штатив, скляні палички.

Хід роботи:

- 2 г охолодженої та подрібненої свіжої тканини вносять у колбу з 20 мл ТХО. Перемішують та залишають на 30 хв, після чого фільтрують у суху колбу.

- у дві пробірки на 10 мл із міткою додають по 1 мл безбілкового фільтрату. Одну пробірку залишають у штативі, в другу додають 1 мл 2н соляної кислоти і ставлять в кип'ячу водяну баню на 7 хв для гідролізу.

- пробірки охолоджують, додають по 1-2 краплі 0,1% розчину фенолфталеїну і нейтралізують 2н розчином гідроксиду натрію до слабо-рожевого забарвлення.

- в обидві пробірки додають по 1-2 мл 2,5% розчину амонію молібденовокислого і 1 мл 0,2% розчину аскорбінової кислоти та доводять до об'єму 10 мл дистильованою водою.

- готують стандартний розчин. Для цього в чисту пробірку на 10 мл додають 1 мл стандартного розчину фосфату, який містить 0,025 мг фосфору (кристалічний KH_2PO_4 масою 0,1099 г розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 1 дм^3 і доводять водою до мітки: в 1 см^3 цього розчину міститься 0,025 мг фосфору), після чого додають ті ж реактиви, що і в дослідну пробірку (молібденовокислий амоній, аскорбінова кислота) і доводять до 10 мл.

- у всіх пробірках з'являється синє забарвлення. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості фосфору.

За різницею між вмістом фосфору до та після гідролізу розраховують вміст фосфору, який входив до складу АТФ.

Отримані дані виражають мг на 1000 г тканини.

Розрахунок:

$$C_x = \frac{D_x \times C_{ст} \times 20 \times 100}{D_{ст} \times 2 \times 1}$$

$$D_x = D_y - D;$$

де C_x - досліджувана концентрація АТФ;

D_x – оптична щільність, що досліджується;

D_y – оптична щільність після гідролізу;

D – оптична густина до гідролізу;
D_{ст} – оптична щільність стандарту.
 $\lambda = 570$ нм
Запишіть висновок.

Завдання для самостійної роботи:

1. Напишіть структурну формулу молекули АТФ.
2. На яких особливостях будови АТФ базується опрацьована методика її кількісного визначення?
3. Запишіть реакцію гідролізу АТФ.
4. Механізми утворення АТФ в клітині (субстратне і окисне фосфорилування).

Практичне заняття №7.

Вивчення шляхів активування та інгібування ферментів

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Швидкість ферментативної реакції, як і активність ферменту, значною мірою визначається також присутністю в середовищі *активаторів* та *інгібіторів*: перші підвищують швидкість реакції, а другі гальмують цю реакцію.

Активувальний вплив на швидкість ферментативної реакції чинять різноманітні речовини органічної та неорганічної природи. Так, соляна кислота активує дію пепсину шлункового соку; жовчні кислоти підвищують активність панкреатичної ліпази; деякі тканинні ферменти (оксидоредуктази, катепсини, аргіназа), рослинна протеїназа значною мірою активуються сполуками, які містять вільні SH-групи (глутатіон, цистеїн), а низка ферментів - також вітаміном С. Особливо часто активаторами виступають іони двовалентних і, рідше, одновалентних металів. Отримано докази, що близько чверті всіх відомих ферментів для прояву повної каталітичної активності потребують присутності металів. Багато ферментів взагалі не активні за відсутності металів. Так, при видаленні цинку карбоангідраза, що каталізує біосинтез і розпад H_2CO_3 , практично втрачає свою ферментативну активність; більше того, цинк при цьому не може бути замінений ніяким іншим металом. Відомі ферменти, дія яких активується іонами кількох металів; зокрема, енолаза активується Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ .

У складі багатьох ферментів крім активних центрів є регуляторні центри.

- а) алостеричний центр
- б) центр ковалентної модифікації
- в) центр зв'язування з білками і регуляторами

Алостеричний центр - центр, що локалізується в іншому місці, ніж активний центр - ділянка на поверхні ферменту, утворена певним чином

орієнтованими амінокислотними радикалами. Його тримірна структура комплементарна низькомолекулярним лігандам, які виступають регуляторами - цАМФ, АТФ. Приєднання алостеричних модулаторів до алостеричного центру призводить до зміни конформації білка, що супроводжується зміною просторової структури ферменту і каталітичної активності. Якщо приєднання модулятора підвищує активність – це *алостеричний активатор*, якщо знижує - *алостеричний інгібітор*. Зв'язування модулятора з активним центром оборотне. Ніколи не виникає ковалентний зв'язок.

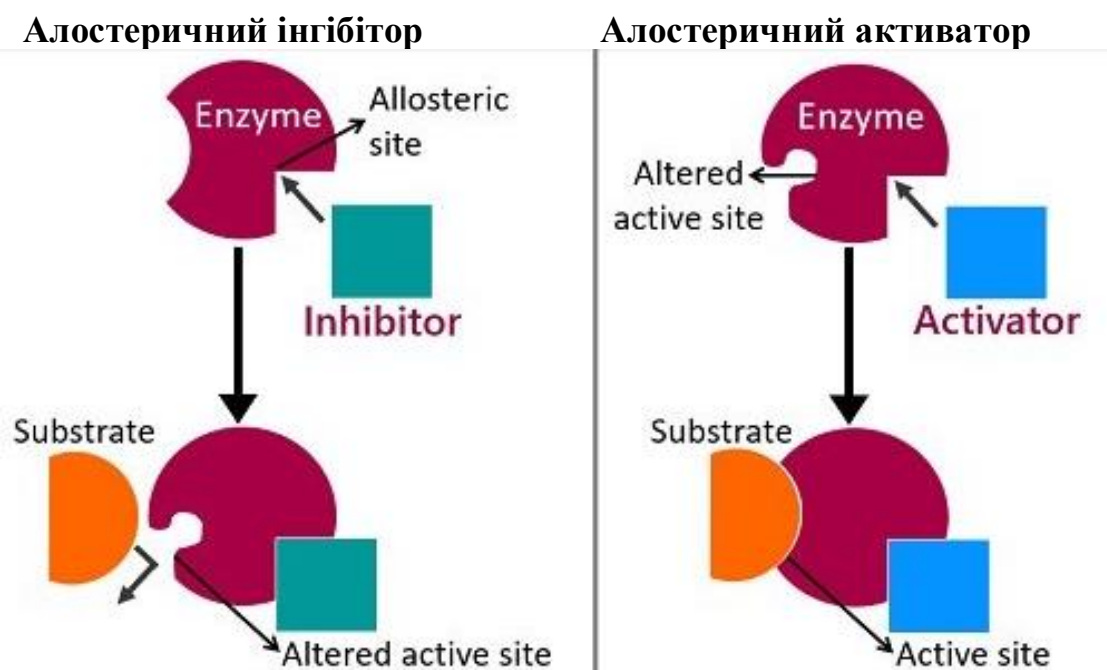
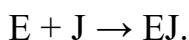


Рис. 5. Механізм дії алостеричних інгібіторів та активаторів
(<https://biologyreader.com/allosteric-site.html>)

Інгібітори - це речовини, що знижують (аж до повного припинення) каталітичну активність ферментів. В ролі інгібіторів можуть виступати найрізноманітніші речовини: від найпростіших (іони металів) до високомолекулярних сполук (білки).

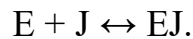
Інгібування буває *оборотне* і *необоротне*.

Необоротне інгібування зазвичай супроводжується руйнуванням просторової структури ферменту, у зв'язку з цим фермент не може відновити первісну активність. Незворотними інгібіторами є концентровані кислоти, луги, оскільки вони спричиняють серйозні денатурації. Найчастішою причиною є утворення недисоціюючого ензим-інгібіторного комплексу:



Зворотне відновлення ензиму неможливе.

При *оборотному інгібуванні* ензим-інгібіторний комплекс, що утворився, *нестійкий* і тому здатний дисоціювати на вільний ензим та інгібітор.



Розрізняють 2 види оборотного інгібування:

1) Конкурентні інгібітори конкурують із субстратом за приєднання до активного центру ферменту. За структурою вони схожі на субстрат, приєднуються до адсорбційної ділянки активного центру ферменту і діють на стадії I-го етапу ферментативного каталізу.

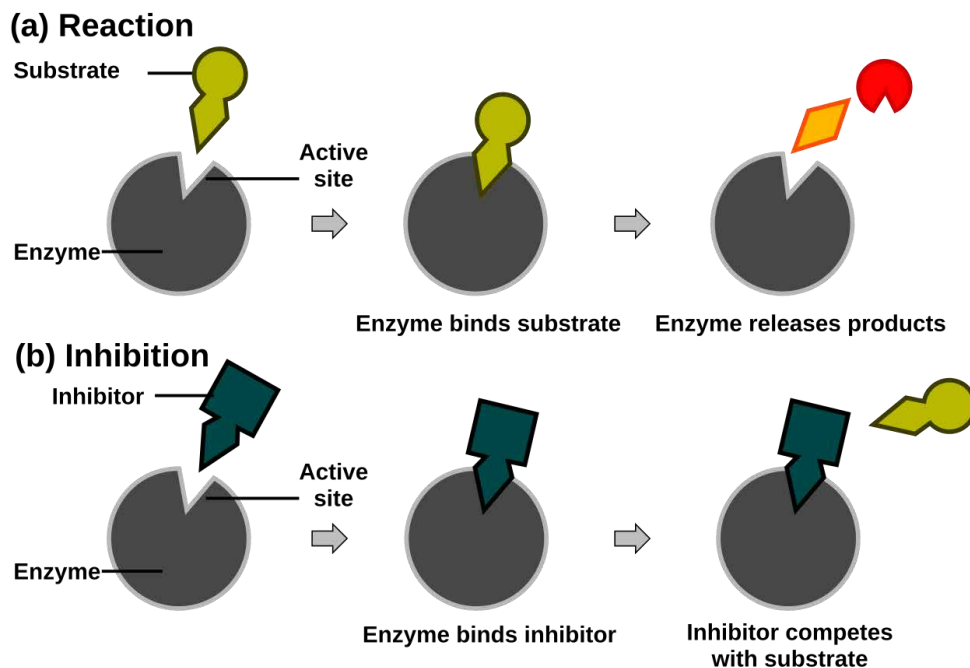


Рис. 6. Дія конкурентного інгібітора

https://ast.m.wikipedia.org/wiki/Ficheru:Competitive_inhibition_es.svg

Конкурентні інгібітори зменшують спорідненість ферменту до субстрату. Вони не змінюють V_{max} ферментативної реакції: у разі підвищення концентрації субстрату дію конкурентних інгібіторів можна подолати - молекули конкурентного інгібітора поступово витісняються субстратом з активного центру ферменту.

2) Неконкурентні інгібітори зв'язуються з алостеричним центром ферменту. Відбуваються зміни конформації алостеричного центру, а потім, через усю молекулу ці зміни передаються на каталітичний центр. Зміна конформації каталітичного центру спричиняє зниження активності ферменту. Тому неконкурентні інгібітори зменшують V_{max} - знижують швидкість протікання II-го етапу ферментативного каталізу і не змінюють спорідненість ферменту до субстрату.

Активація ферментів це один із механізмів, за допомогою якого клітини змінюють свій метаболізм. Існує 2 типи регуляції роботи ферментів:

1) Термінове регулювання. Зміна активності наявних у клітинах ферментів. Реалізується швидко.

2) Уповільнена регуляція. Реалізується за рахунок зміни концентрації самих ферментів у клітинах.

Зміна концентрації ферментів у клітинах досягається 2 шляхами:

- за рахунок посилення синтезу;
- за рахунок зміни інтенсивності їх деградації.

Механізми термінової регуляції.

У процесах термінового регулювання найважливіша роль належить таким 5 механізмам:

1. Утворення ферментів із попередників;
2. Оборотно інгібування конкурентного типу;
3. Аlostеричне інгібування або активація за участю механізму позитивного або негативного зворотного зв'язку;
4. Ковалентна модифікація ферментів;
5. Білок-білкова взаємодія.

Утворення ферментів із попередників (проферментів). У разі потреби під дією специфічних ферментів, а інколи інших агентів, шляхом обмеженого протеолізу від проферменту відщеплюється різної довжини поліпептидний ланцюг і формується активний фермент. У вигляді проферментів у крові циркулює ціла низка факторів згортання крові.

Оборотне інгібування конкурентного типу. Конкурентні інгібітори конкурують із субстратом за приєднання до активного центру ферменту.

Аlostеричне інгібування або активація за участю механізму позитивного або негативного зворотного зв'язку. Найчастіший механізм регуляції. Причому в клітинах зустрічаються механізми і активації, і інгібування.

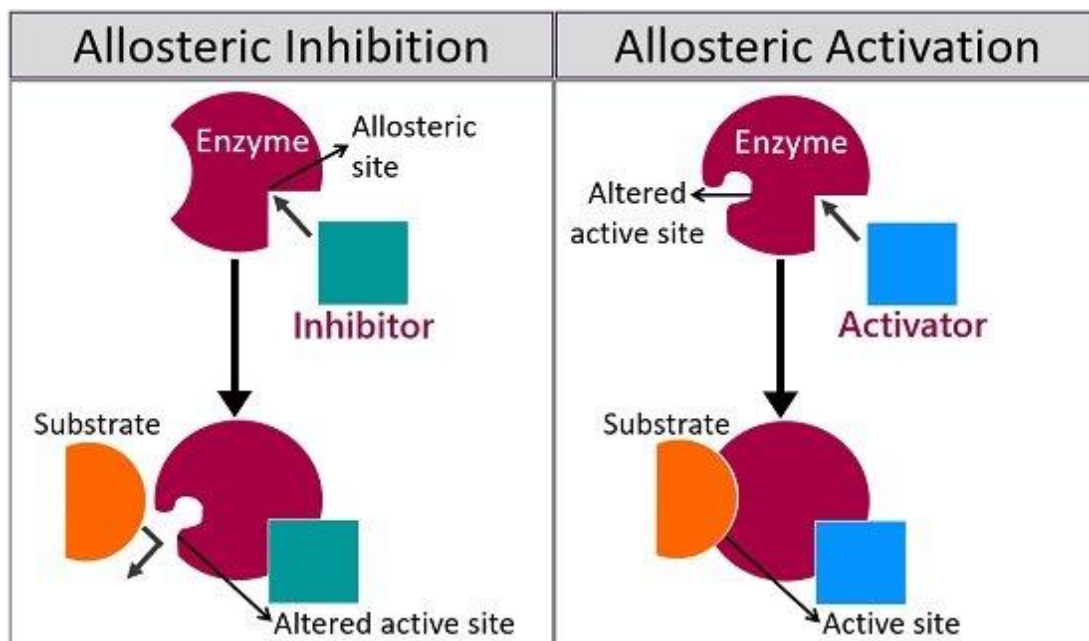


Рис.7. Аlostеричне інгібування та активація
<https://biologyreader.com/allosteric-site.html>

Це механізм, за допомогою якого клітина дізнається, коли даної речовини вироблено достатньо. Перехрестя метаболічних шляхів досить збалансоване і одна й та сама сполука може використовуватися в багатьох ферментативних реакціях. Так регулюється синтез холестерину, пуринових і піримідинових метаболітів та інші метаболічні шляхи. Механізм алостеричної активації дуже часто зустрічається як активація попередниками. Типовим прикладом може бути ефект, який спостерігається у бактерій, що синтезують ізолейцин із треоніну. Алостерична активація широко використовується і при активуванні різних процесів, які забезпечують клітини енергією. Наприклад, АДФ, АМФ, фосфорна кислота і пірофосфат збільшують активність цілої низки ферментів, робота яких забезпечує клітини енергією АТФ.

Ковалентна модифікація ферментів - за допомогою ковалентного зв'язку приєднується модулятор. Приєднання супроводжується зміною конформації ферменту - зміна каталізу.

Білок-білкова взаємодія. Ділянка поверхні ферменту комплементарна поверхні білка модулятора. Зв'язування супроводжується зміною структури активного центру та зміною ефективності каталізу.

Лабораторна робота

Активність сукцинатдегідрогенази м'язів та її конкурентне інгібування маленовою кислотою

Принцип роботи. Про дію сукцинатдегідрогенази (СДГ), що каталізує окиснення бурштинової кислоти ($\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) до фумарової (HOOC-CH=CH-COOH), судять за знебарвленням введенного до реакційної суміші акцептора водню – метиленового синього, який, відновлюючись, переходить у лейкоформу. Знебарвлення реакційної суміші не відбувається в присутності маленової кислоти ($\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$), яка є конкурентним інгібітором СДГ.

Мета роботи. Вивчити активність сукцинатдегідрогенази м'язів та її конкурентне інгібування маленовою кислотою.

Матеріали та реактиви: м'язова тканина, 0,25 М розчин сахарози, 1% розчин маленової кислоти, 1 % розчин сукцинату, 1 % розчин метиленового синього, ножиці, ступки, марля, лійки, пробірки, скляні палички

Хід роботи:

Для отримання ферментного препарату 1-2 г свіжих м'язів подрібнюють ножицями і розтирають у ступці з невеликою кількістю розчину сахарози (3-4 мл) протягом 1 хв, потім м'язову кашку переносять на подвійний шар марлі у лійці, промивають 10 мл цього ж розчину. Промиту кашку віджимають, переносять у пробірку. Отриману суспензію розливають у три пробірки.

У першу пробірку додати 0,4 мл води, в другу 0,2 мл 1% розчину маленової кислоти та 0,2 мл води, в третю – 0,4 мл 1% розчину маленової кислоти. В усі пробірки додати по 1 мл сукцинату, 2-3 краплі метиленового синього і після перемішування по 3-4 краплі вазелінової олії. Помістити пробірки на водяну баню за температури 38 °С на 5-10 хв.

Після інкубації провести спостереження за зміною забарвлення і зробити відповідні висновки. Результати внести в таблицю.

Таблиця

№ пробірки	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Метиленовий синій	Забарвлення
1	1	0,4	-	2-3 краплі	
2	1	0,2	0,2	2-3 краплі	
3	1	-	0,4	2-3 краплі	

Запишіть висновки: _____

Практичні завдання:

Завдання 1

Якщо інгібітор знижує активність ферменту до 40 %, порівняно з початковим рівнем, а збільшення концентрації субстрату цієї реакції сприяє відновленню 90 % активності ферменту, вкажіть інгібітор якого типу в даному випадку задіяний?

Завдання 2

Накопичення субстрату і зростання його концентрації призводить до прискорення власної утилізації. За рахунок чого це відбувається? (Які основні принципи регуляції ферментативних реакцій).

Завдання 3

У медицині для лікування гнійних ран застосовують ферменти з протеолітичними властивостями. Які реакції каталізуються вказаними ферментами?

Завдання для самостійної роботи:

1. Класифікація та номенклатура ферментів, характеристика окремих класів ферментів.
2. Будова та механізми дії ферментів.
3. Кофактори та коферменти. Будова та властивості коферментів, вітаміни як попередники в біосинтезі коферментів.
4. Коферменти. Типи реакцій, які каталізують окремі класи коферментів.
5. Ізоферменти: особливості будови та функціонування, значення в діагностиці захворювань.
6. Механізм дії та кінетика ферментативних реакцій: залежність швидкості реакції від концентрації субстрату, рН і температури.
7. Загальне уявлення про ензимопатії та причини їх виникнення.

Практичне заняття №8.

Глюкоза як ключовий метаболіт обміну вуглеводів

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Катаболізм глюкози становить «магістральний шлях» утворення енергії в живій клітині. Метаболізм глюкози має особливості, пов'язані з умовами її використання в клітині - аеробними чи анаеробними.

Гліколіз - це серія реакцій, в результаті яких глюкоза розпадається на дві молекули пірувату (аеробний гліколіз) або дві молекули лактату (анаеробний гліколіз). Всі десять реакцій гліколізу відбуваються в цитозолі і характерні для всіх органів і тканин. Аеробний розпад глюкози включає реакції аеробного гліколізу та подальше окислення пірувату в реакції катаболізму.

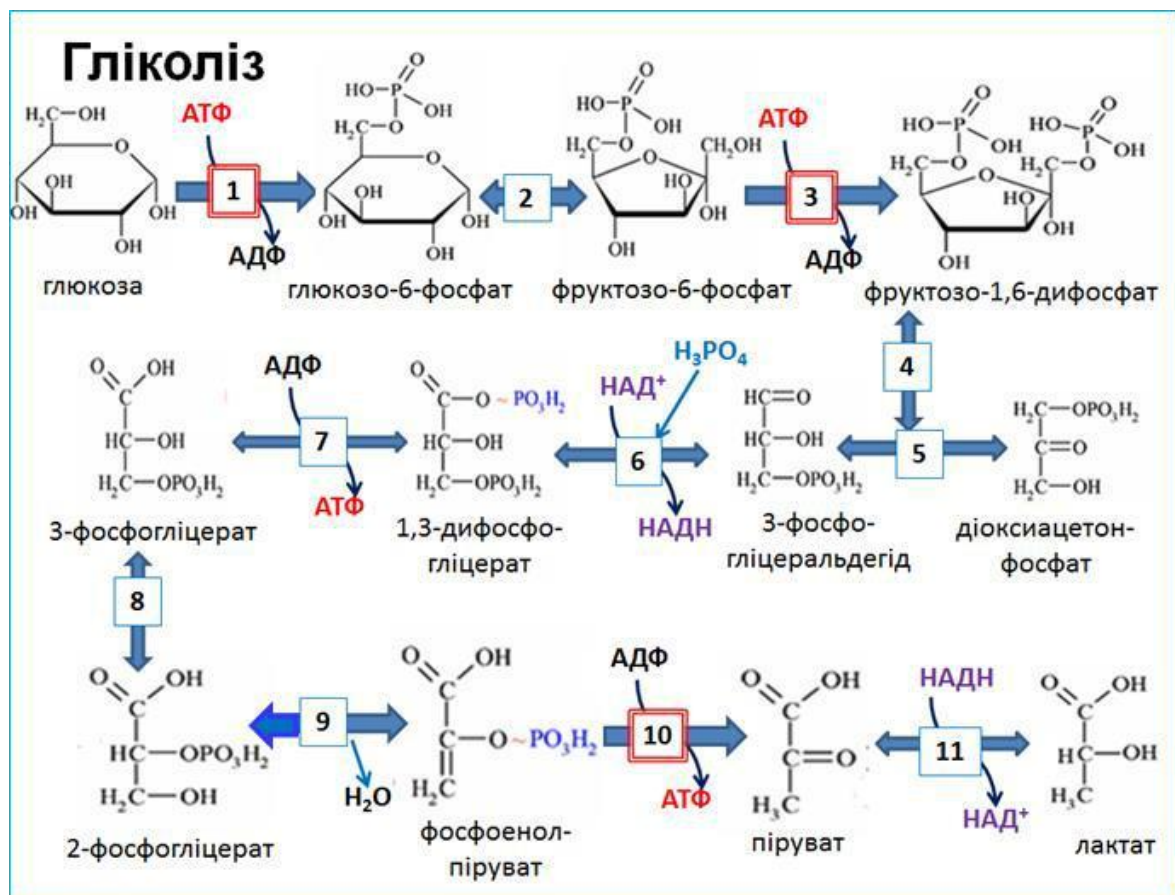


Рис. 8. Гліколіз

(<https://studfile.net/preview/3541724/page:5/>)

Таким чином, аеробний розпад глюкози - це особливе її окислення до CO₂ і H₂O, а анаеробний гліколіз - це специфічний шлях катаболізму, тобто є частиною аеробного розпаду глюкози. Анаеробний розпад включає такі ж реакції специфічного шляху розпаду глюкози до пірувату, але з подальшим перетворенням пірувату в лактат. Послідовність реакцій гліколізу наведена на рис. 8.

У гліколізі можна виділити три основні етапи. На першому етапі перетворенню піддаються гексози, на другому - тріози, на третьому - карбонові кислоти. Характеристика гліколізу:

- більшість реакцій оборотні, окрім трьох (реакцій 1, 3, 10);
- всі метаболіти знаходяться у фосфорильованій формі;
- джерелом фосфатної групи в реакціях фосфорилування є АТФ (реакції 1, 3) або неорганічний фосфат (реакція 6);
- регенерація НАД⁺, яка є необхідною умовою протікання гліколізу, відбувається за аеробного гліколізу через дихальний ланцюг. В цьому випадку водень транспортується в мітохондрії за допомогою човникового механізму за участі переносників. Це відбувається тому, що мембрана мітохондрії непроникна для протонів. При анаеробному гліколізі регенерація НАД⁺ здійснюється незалежно від дихального ланцюга. В цьому випадку акцептором водню від НАДН є піруват, який відновлюється в лактат;
- утворення АТФ при гліколізі може відбуватися двома шляхами: субстратним фосфорилуванням, коли для фосфорилування АДФ використовується енергія макроергічного зв'язку субстрату (реакції 7, 9), або шляхом окиснювального фосфорилування АДФ, спряженого з дихальним ланцюгом (реакція 6).

Енергетичне значення аеробного розпаду глюкози

В аеробному гліколізі утворюється 10 моль АТФ на 1 моль глюкози. Так, в реакції 7, 10 утворюється 4 моль АТФ шляхом субстратного фосфорилування, а в реакції 6 синтезується 6 моль АТФ (на 2 молі гліцеральдегід-3-фосфату) шляхом окиснювального фосфорилування:

Сумарний ефект аеробного гліколізу становить 8 моль АТФ, так як в реакціях 1 і 3 використовується 2 моль АТФ. Подальше окислення двох моль пірувату в загальних шляхах катаболізму супроводжується синтезом 30 моль АТФ (по 15 моль на кожен молекулу пірувату). Отже, сумарний енергетичний ефект аеробного розпаду глюкози до кінцевих продуктів становить 38 моль АТФ.

Лабораторна робота

Визначення вмісту вуглеводів з фериціанідом калію

Визначення вуглеводів у рослинному матеріалі проводять фотоколориметричним мікрометодом.

Принцип методу. Гексаціаноферат (III) калію $K_3[Fe(CN)_6]$ (червона кров'яна сіль) відновлюється редукуючими цукрами в лужному середовищі при нагріванні до фероціаніду (жовта кров'яна сіль) $K_4[Fe(CN)_6]$. В якості індикатора використовується метиленовий синій. При відновленні фериціаніду калію відбувається зміна забарвлення від синього до безбарвного або світло-жовтого.

Реактиви, прилади, матеріали: 1М HCl і 1М NaOH; розчин фериціаніду $K_3Fe(CN)_6$ (г/л: $K_3[Fe(CN)_6]$ – 1,65; Na_2CO_3 – 10); розчин сірчаноокислого окисного заліза (г/л: $Fe_2(SO_4)_3$ – 1, H_2SO_4 (концентрована) – 10 мл); 10 %-ний розчин желатину; робочий розчин, що готується перед використанням, шляхом змішування розчинів сірчаноокислого окисного заліза та 10 % розчину

желатину у співвідношенні 20:1; осаджувач: 1 М ZnSO_4 і 1М NaOH , ступки, пробірки центрифужні, водяна баня, центрифуга, фотоколориметр.

Хід роботи:

Екстракція цукрів: підготовлений рослинний матеріал розтерти у керамічній ступці з додаванням піску та 5 мл 80 % етилового спирту, після чого інкубувати у водяній бані за температури 70 °С 30 хв та центрифугувати за 3000 об/хв впродовж 10 хвилин. Надосадову рідину відокремити, а до осаду додати 5 мл етилового спирту, після чого знов інкубувати та відцентрифугувати. Відібрати надосадову рідину та довести її об'єм до 10 мл. Отриманий екстракт використовувати у подальшій роботі для визначення вмісту редукуючих цукрів (моносахаридів) та суми цукрів.

Для визначення вмісту редукуючих цукрів (моносахаридів) у мірні пробірки об'ємом 10 мл внести 200 мкл отриманого рослинного екстракту, 1 мл розчину фериціаніду калію і 1,8 мл дистильованої води. Вміст пробірки перемішати та нагріти на киплячій водяній бані впродовж 15 хвилин. Після нагрівання пробірки охолодити та додати 2 мл сірчаноокислого заліза, перемішати, довести об'єм до 10 мл дистильованою водою. В отриманому розчині виміряти оптичну щільність ($\lambda = 690$ нм). Вміст редукуючих цукрів визначити за калібрувальним графіком, побудованим з використанням різних відомих концентрацій глюкози.

Визначення суми цукрів: провести гідроліз екстракту, додавши до 100 мкл екстракту 0,9 мл води і 1 мл 1М HCl , після чого нагріти суміш впродовж 5 хв за температури 70 °С. Охолодити і нейтралізувати 1М лугом до рН 7,0. Визначення суми цукрів провести так само як в попередній роботі з визначення вмісту моноцукрів. Оптичну щільність визначити за допомогою фотоелектроколориметра за $\lambda = 670$ нм та скористатись калібрувальним графіком, побудованим за глюкозою.

Вміст цукрів у дослідному рослинному матеріалі визначити за наступною формулою:

$$B = (c \times k) / m,$$

де В – вміст цукрів

с – концентрація цукрів у досліджуваному зразку, визначена за калібрувальним графіком, мг/мл

k – коефіцієнт розведення

m – маса наважки, г

За різницею вмісту суми цукрів та моноцукрів визначити кількість олігоцукрів.

Практичні завдання:

1. Після інтенсивного тренування у крові відмічається підвищена концентрація лактату (молочної кислоти). Поясніть, за рахунок чого відбувається таке підвищення та зазначте ті органи, в яких лактат утворюється?

2) Лактат, який утворюється в скелетній мускулатурі і потрапляє в кров, окиснюється в серцевому м'язі до CO_2 і H_2O . Чому лактат не окиснюється в

скелетних м'язях?

Завдання для самостійної роботи:

1. Встановіть загальну схему джерел і шляхів витрат глюкози в клітині.
2. Механізм внутрішньоклітинного окиснення глюкози та глікогену. Дихотомічне анаеробне окиснення вуглеводів (гліколіз, глікогеноліз).
3. Утилізація лактату в організмі. Цикл Корі.
4. Енергетичний ефект гліколізу. Механізм утворення АТФ (реакції гліколізу, пов'язані із синтезом АТФ).
5. Алостерична регуляція гліколізу.
6. Глікогеноліз. Загальна характеристика. Хімізм, енергетичний ефект.

Практичне заняття №9.

Вивчення механізмів регуляції циклу трикарбонових кислот

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Виходячи з експериментів із вивчення взаємоперетворення різних органічних кислот та їхнього впливу на процеси тканинного дихання в м'язях голуба, англійський біохімік Г.А. Кребс у 1937 р. запропонував схему послідовності окиснення ди- та трикарбонових кислот до CO_2 через «цикл лимонної кислоти» за рахунок відщеплення водню. Цей цикл і був названий його ім'ям.

Безпосередньо в циклі окиснюється не сам піруват, а його похідне - ацетил-КоА. Таким чином, першим етапом на шляху окиснювального розщеплення пірувату є процес утворення активного ацетилю під час окиснювального декарбоксилювання. Окиснювальне декарбоксилювання пірувату здійснюється за участю піруватдегідрогеназного мультиферментного комплексу. До його складу входять три ферменти та п'ять коферментів. Коферментами слугують тіамінпірофосфат (ТПФ) - фосфорильоване похідне вітаміну B_1 , ліпоєва кислота, коензим А, ФАД і НАД^+ . Піруват взаємодіє з тіамінпірофосфатом, при цьому відщеплюється CO_2 і утворюється гідроксиетильне похідне тіамінпірофосфату.

Останнє вступає в реакцію з окисненою формою ліпоєвої кислоти. Дисульфідний зв'язок ліпоєвої кислоти розривається і відбувається окисно-відновна реакція: гідроксиетильна група, приєднана до одного атома сірки, окиснюється до ацетильної (при цьому виникає високоенергетичний тіоефірний зв'язок), а інший атом сірки ліпоєвої кислоти відновлюється. Утворена ацетилліпоєва кислота взаємодіє з коензимом А, утворюються ацетил-КоА і відновлена форма ліпоєвої кислоти.

На початку циклу Кребса ацетил-кофермент А (ацетил-КоА) віддає свою ацетильну групу чотиривуглецевій сполуці - оксалоацетату (щавлевооцтовій кислоті), при цьому утворюється шестивуглецевий цитрат (лимонна кислота). Ацетил-КоА є продуктом окиснення таких сполук як глюкоза, амінокислоти та

жирні кислоти.

Цитрат потім ізомеризується в ізоцитрат (ізолимонну кислоту), який далі дегідрується та декарбоксилюється до п'ятивуглецевої кислоти - α -кетоглутарату. α -Кетоглутарат знову декарбоксилюється, перетворюючись на чотиривуглецевий сукцинат (бурштинова кислота).

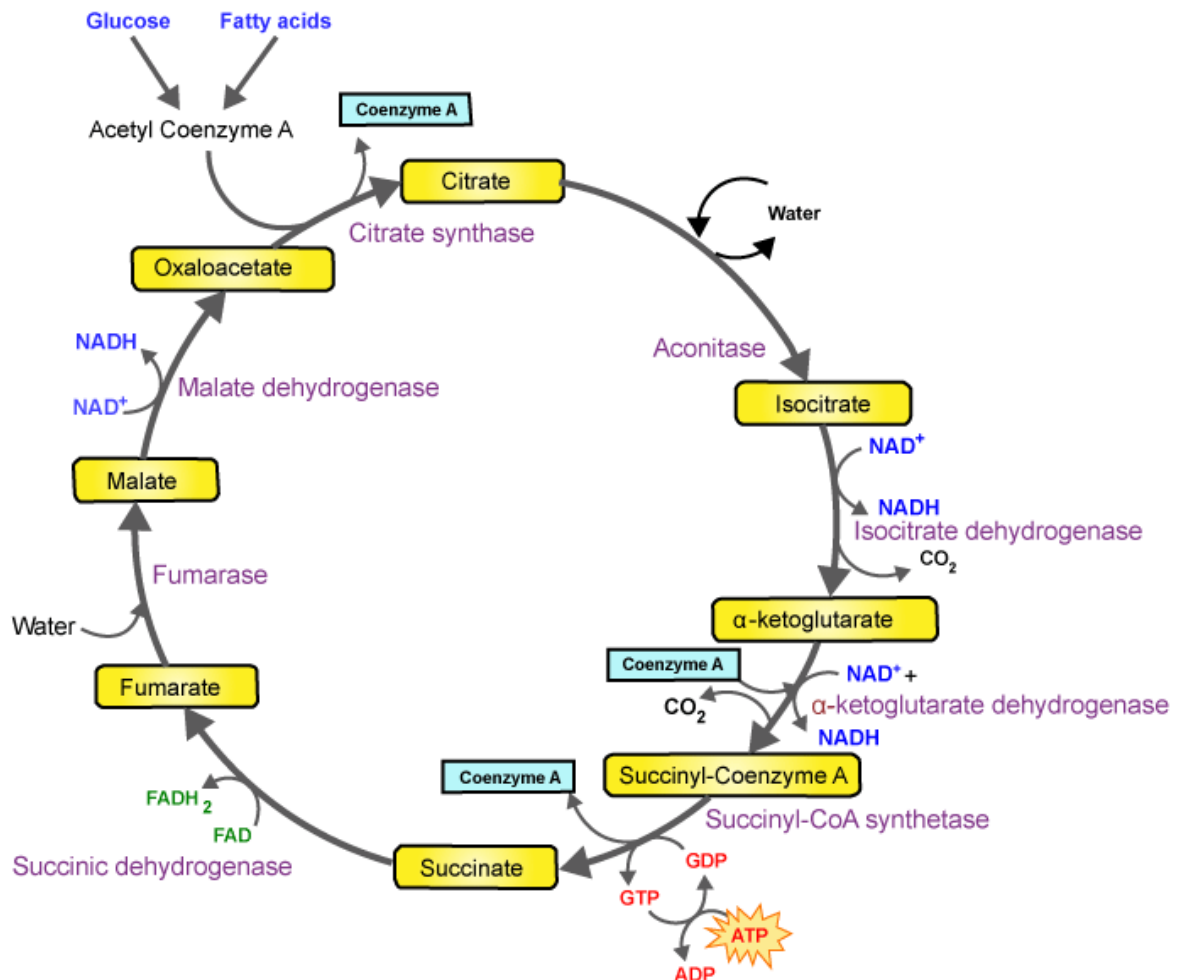


Рис.9. Цикл трикарбонових кислот

<https://byjus.com/neet/krebs-cycle/>

Сукцинат потім у три етапи ферментативно перетворюється на чотиривуглецевий оксалоацетат, який готовий прореагувати з новою молекулою ацетил-КоА. У кожен оберт циклу одна ацетильна група (тобто два атоми вуглецю) приходить у цикл у вигляді ацетил-КоА, і два атоми вуглецю залишають цикл у вигляді двох молекул CO_2 . Одна молекула оксалоацетату використовується для утворення цитрату і одна згодом регенерується. Чотири з восьми стадій циклу являють собою окиснювальні процеси. Енергія окиснення, що виділяється при цих процесах, ефективно запасється у вигляді відновлених коферментів $\text{НАД}\cdot\text{Н}_2$ і ФАДН_2 .

Регуляція циклу Кребса.

Подальше використання ацетил-КоА, що утворюється з пірувату, залежить від енергетичного стану клітини. За малої енергетичної потреби

клітини дихальним контролем гальмується робота дихального ланцюга, а відтак, реакції ЦТК та утворення інтермедіатів циклу, зокрема оксалоацетату, який залучає ацетил-КоА до циклу Кребса. Це призводить до більшого використання ацетил-КоА в синтетичних процесах, які також споживають енергію.

Особливістю регуляції ЦТК є залежність усіх чотирьох дегідрогеназ циклу від відношення $[\text{НАДН}]/[\text{НАД}^+]$:

- *ізоцитратдегідрогенази;*
- *α-кетоглутаратдегідрогенази;*
- *сукцинатдегідрогенази;*
- *малатдегідрогенази.*

Окрім того, активність *цитратсинтази* гальмується високою концентрацією АТФ і власним продуктом - цитратом.

Ізоцитратдегідрогеназа інгібується $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ та активується цитратом.

α-кетоглутаратдегідрогеназа пригнічується продуктом реакції - сукциніл-КоА та активується аденілатами.

Окиснення сукцинату *сукцинатдегідрогеназою* гальмується оксалоацетатом і прискорюється АТФ, АДФ і відновленим убіхіноном (QH_2).

Малатдегідрогеназа інгібується оксалоацетатом і, в низки біологічних об'єктів, високим рівнем АТФ.

Однак ступінь впливу величини енергетичного заряду або рівня аденінових нуклеотидів у регуляції активності циклу Кребса у рослин до кінця не з'ясовано.

Регулювальну роль може відігравати також альтернативний шлях транспорту електронів у рослинних мітохондріях. В умовах високого вмісту АТФ, коли активність основного дихального ланцюга знижена, окиснення субстратів через альтернативну оксидазу (без утворення АТФ) триває, що підтримує на низькому рівні відношення $\text{НАД} \cdot \text{H}_2/\text{НАД}^+$ та знижує рівень АТФ. Усе це дає змогу циклу Кребса функціонувати.

Лабораторна робота

1. Визначення активності дегідрогеназ циклу Кребса

Метод поширюється на продукти тваринного походження, а також м'ясорослинні продукти.

Принцип методу: під дією відповідної дегідрогенази субстрат активації відновлює $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, що має жовтувате забарвлення, до безколірного $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Активність дегідрогеназ прямопропорційна кількості відновленого фероціаніду.

Реактиви, матеріали:

- фосфатний буфер, $\text{pH}=7,4$: до $80,2 \text{ см}^3$ 1 М розчину Na_2HPO_4 додати $19,8 \text{ см}^3$ 1 М розчину KH_2PO_4 ;
- розчин Na_2HPO_4 , 1 М: $0,9467 \text{ г}$ Na_2HPO_4 або $1,90402 \text{ г}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см^3 ;
- розчин KH_2PO_4 , 1 М: $0,6849 \text{ г}$ KH_2PO_4 розчинити у дистильованій воді

та довести до 100 см³,

- розчин MgCl₂: 1,5 г MgCl₂ розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³,

- ЕДТА: 0,584 г розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³,

- α-оксоглутарова кислота: 2,92 г розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³,

- бурштинова кислота: 4,72 г кислоти розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³,

- розчин K₃[Fe(CN)₆]: 0,219 г розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³;

- трихлороцтова кислота, 35 % розчин: 35 г ТХО розчинити у дистильованій воді та довести до 100 см³.

Обладнання: пробірки лабораторні і центрифужні, піпетки, ваги лабораторні, керамічна ступка, колби мірні, центрифуга, ФЕК, водяна баня.

Хід роботи:

1. Приготування гомогенату: порцелянову ступку помістити на лід, наважку тканини (0,5 г) перенести до ступки, додати 4,5 см³ охолодженого фосфатного буферу (рН=7,4) та перетерти за допомогою товкачика впродовж 15 хв. Отриманий гомогенат відцентрифугувати 5 хв при 5000 об/хв, відібрати супернатант і використовувати його для дослідження.

2. Щоб провести вимірювання активності ферментів приготувати стандартне інкубаційне середовище (дослідний розчин), що містить 2,3 см³ фосфатного буфера (рН=7,4), 0,1 см³ розчину MgCl₂, 0,1 см³ ЕДТА, 0,7 см³ розчину K₃[Fe(CN)₆]. В залежності від досліджуваної дегідрогенази (сукцинатдегідрогеназа або 2-оксоглутаратдегідрогеназа), відповідно додати 0,1 см³ бурштинової кислоти або 0,1 см³ α- оксоглутарової кислоти (субстрат активації). Реакцію запускати додаванням 0,4 см³ суспензії тканинного гомогенату.

Для приготування контрольного розчину змішати 2,3 см³ фосфатного буферу (рН=7,4), 0,1 см³ розчину MgCl₂, 0,1 см³ ЕДТА, 0,7 см³ розчину K₃[Fe(CN)₆], 0,1 см³ дистильованої води, 0,4 см³ фосфатного буферу з рН=7,4.

Після додавання гомогенату дослідні та контрольні пробірки помістити у водяну баню, провести інкубацію при 37 °С впродовж 30 хв (при визначенні активності сукцинатдегідрогенази) та впродовж 60 хв (при визначенні активності 2-оксоглутаратдегідрогенази). Після інкубації до кожної пробірки додати по 0,3 см³ трихлороцтової кислоти (ТХО) для осадження білків та відцентрифугувати при 5000 об/хв впродовж 5 хв.

Провести вимірювання оптичної густини отриманої рідини на спектрофотометрі при λ=417 нм в кюветах напроти води.

Розрахунки:

Визначення ферментативної активності А провести за формулою:

$$A = ((D_k - D_d) \times t) / m,$$

де А – активність (мкМоль/хв/г);

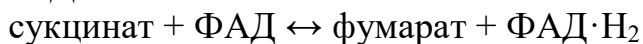
D_k – оптична густина контрольної проби;
 D_d – оптична густина дослідної проби;
 m – наважка тканини в інкубаційному середовищі (0,04 г);
 t – час інкубації, хв.

За остаточний результат випробувань взяти середнє арифметичне значення трьох паралельних вимірювань, підрахованих до четвертого десяткового знаку.

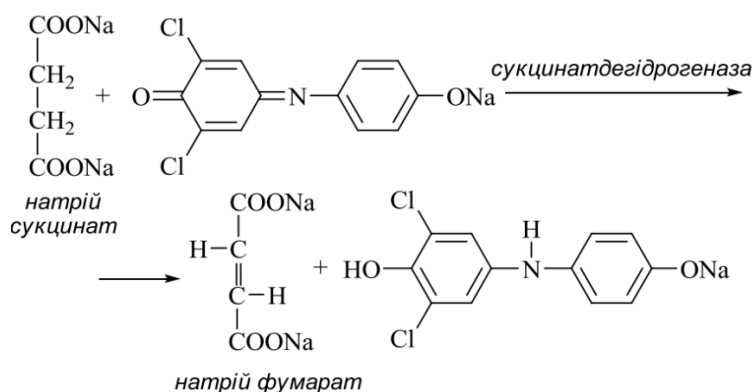
Визначення активності сукцинатдегідрогенази у м'язах

Принцип методу. Сукцинатдегідрогеназа каталізує окиснення сукцинату в фумарат.

Коферментом є ФАД:



Як акцептор водню може виступати 2,6-дихлорфеноліндофенол:



2,6-дихлорфеноліндофенол у відновленій формі безбарвний.

Інтенсивність синього забарвлення розчину, яке утворюється окисленою формою 2,6-дихлорфеноліндофенолу, зменшується через відновлення частини молекул барвника атомами водню сукцинату і є наслідком активності сукцинатдегідрогенази. Активність ензиму обчислюють мкмоль субстрату, який окиснений ферментом впродовж 1 хв у 1 г тканини.

Зважаючи на те, що кількість сукцинату, який зазнав окиснення, і кількість барвника, що відновився є еквівалентними (моль на моль), то використовуючи калібрувальний графік, який показує залежність екстинкції досліджуваного розчину та концентрації у моль/дм³ 2,6-дихлорфеноліндофенолу, можна обрахувати кількість перетвореного субстрату.

Мета роботи. Встановити активність сукцинатдегідрогенази у м'язах та роль цього ензиму в тканинному диханні.

Матеріали та реактиви. М'язова тканина, вода дистильована, буфер фосфатний (рН 7,4), сукцинат натрію (5%), гідроксид натрію (0,1 моль/дм³), розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу ($c(1/2)=0,001$ моль/дм³).

Обладнання. Фотоелектроколориметр, ступка, ножиці, фільтрувальний папір, марля, лійка, пробірки, штатив.

Хід роботи:

Свіжий шматочок м'язової тканини масою 1 г подрібнити ножицями і розтерти у ступці з невеликою кількістю води 2-3 мл впродовж 1 хвилини. Одержаний гомогенат перенести на подвійний шар марлі, розміщеної на лійці, промити водою, перенести гомогенат на фільтрувальний папір і підсушити.

У дві пробірки внести по 3 мл фосфатного буфера (рН 7,4). В одну з них (дослідну) додати 0,5 мл 5% розчину сукцинату натрію і 0,5 мл розчину натрію гідроксиду (0,1 М).

В другу пробірку (контрольну) внести 1 мл дистильованої води. В обидві пробірки додати по 1 см³ розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,001 М) і внести по 100 мг гомогенату. Інкубувати впродовж 20 хв. Після інкубації вміст пробірок профільтрувати, довести об'єм фільтрату дистильованою водою до 5 мл і провести вимірювання оптичної густини на фотоелектроколориметрі у кюветах 10 мм при довжині хвилі 590 нм проти контролю на реактиви (3 мл фосфатного буфера, 1 мл розчину сукцинату натрію і 1 мл дистильованої води).

Для визначення ступеня перетворення сукцинату в ферментативній реакції будують калібрувальний графік. На осі ординат відкладають значення оптичної густини розчинів 2,6-дихлорфеноліндофенолу, а на осі абсцис – концентрації цих розчинів. Шляхом розведення вихідного розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (1 М) готують розчини барвника з концентраціями 0,75; 0,50; 0,25; 0,125 М. За калібрувальним графіком визначають кінцеву концентрацію розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після ферментативної реакції. Розрахунки активності ферменту проводять за формулою:

$$E = \frac{C_1 \cdot V_1 - C_2 \cdot V_2}{t \cdot a} \text{ мкмоль / 1хв / 1г}$$

Е – активність сукцинатдегідрогенази в мкмоль субстрату, що перетворився за 1 хв під дією ферменту, виділеного з 1 г тканини, мкмоль/хв/г;

С₁ – кінцева молярна концентрація розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після 20 хв інкубації контрольної проби, знайдена за калібрувальним графіком, мкмоль/дм³ ;

С₂ – кінцева молярна концентрація розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після 20 хв інкубації дослідної проби, знайдена за калібрувальним графіком, мкмоль/дм³ ;

V₁ – загальний об'єм контрольної проби, дм³;

V₂ – загальний об'єм дослідної проби, дм³ ;

а – маса досліджуваного м'язового гомогенату, взятого для аналізу, г;

t – час інкубації, хв.

Примітка: В залежності від очікуваної активності ферменту концентрацію 2,6-дихлорфеноліндофенолу (що вноситься до інкубаційного середовища) або час інкубації можна змінювати.

Практичні завдання:

Виберіть правильні відповіді.

1. Нефосфорилуюче окиснення в мітохондріях відбувається:

- тільки в присутності роз'єднувальних речовин
- у нормальних фізіологічних умовах для підтримання температури тіла
- з однаковою інтенсивністю в усіх органах і тканинах
- особливо активно в бурій жировій тканині

2. Виберіть речовини, які можуть зменшити коефіцієнт P/O

- малат
- 2,4- динітрофенол
- сукцинат
- цитрат
- жирні кислоти

3. У присутності роз'єднувальних речовин у мітохондріях продовжується:

- споживання кисню
- окиснення субстратів
- синтез АТФ
- утворення тепла

4. Розв'язати задачі:

Задача № 1

До препарату мітохондрій печінки щурів додали НАД⁺. Активність яких ферментів циклу Кребса при цьому збільшиться?

Для обґрунтування відповіді:

1. Напишіть схему реакцій циклу Кребса.
2. Яку функцію виконує НАД⁺?
3. З якими ферментами циклу Кребса він працює?

Задача № 2

До препарату мітохондрій додали піруват, мічений ¹⁴C за метильною групою. Яке положення займе ¹⁴C в оксалоацетаті після одного обороту циклу Кребса?

Для відповіді:

1. Напишіть реакції циклу Кребса.
2. Простежте положення мітки в кожному метаболіті.

Задача № 3

Скільки молекул АТФ синтезується під час окиснення

однієї молекули пірувату до 2-оксоглутарату;

однієї молекули ізоцитрату до сукцинату;

однієї молекули сукцинату до оксалоацетату

за умови, що дегідрогеназні реакції сполучені з дихальним ланцюгом?

Для розрахунків:

1. Напишіть перебіг реакцій на зазначених ділянках циклу Кребса.

2. Укажіть реакції, сполучені з дихальним ланцюгом.
3. Пригадайте, скільки АТФ утворюється під час окиснення НАД·Н₂ і ФАДН₂.

Завдання для самостійної роботи:

1. Безпосередньо в реакціях циклу Кребса кисень участі не бере. Проте цитратний цикл - аеробний процес. Поясніть, чому він інгібується за відсутності кисню.
2. Як впливає енергетичний потенціал клітини (АДФ/АТФ) на швидкість циклу трикарбонових кислот? Відповідь обґрунтуйте. Напишіть реакції циклу, чутливі до зміни енергетичного потенціалу.
3. Збільшення концентрації АТФ і НАД·Н₂ призводить до зменшення швидкості циклу трикарбонових кислот. Активність яких ферментів знижується при збільшенні концентрації АТФ і НАД·Н₂ у клітині? Який механізм інгібуючого ефекту надлишку АТФ і НАД·Н₂?

Практичне заняття №10.

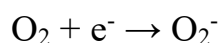
Енергетичний обмін. Окисне фосфорилювання

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання практичних завдань, опрацювання завдань самостійної роботи.

Енергетичний обмін (катаболізм, дисиміляція) - сукупність реакцій розщеплення органічних речовин, що супроводжуються виділенням енергії. Енергія, що звільняється під час розпаду органічних речовин, не відразу використовується клітиною, а запасається у формі АТФ та інших високоенергетичних сполук. Синтез АТФ відбувається в клітинах усіх організмів у процесі фосфорилювання - приєднання неорганічного фосфату до АДФ.

В аеробних організмів (які живуть у кисневому середовищі) виокремлюють *три етапи енергетичного обміну*: підготовчий, безкисневе окиснення та кисневе окиснення; в анаеробних організмів (які живуть у безкисневому середовищі) та аеробних за нестачі кисню - *два етапи*: підготовчий, безкисневе окиснення.

Кисневе окиснення - окиснення пар атомів водню за участю кисню до води з одночасним фосфорилюванням АДФ до АТФ. Водень передається трьома великим ферментним комплексам (флавопротеїни, коферменти Q, цитохроми) дихального ланцюга, розташованим у внутрішній мембрані мітохондрій. У водню відбираються електрони, які в матриксі мітохондрій зрештою з'єднуються з киснем:



Протони закачуються в міжмембранний простір мітохондрій, у «протонний резервуар». Внутрішня мембрана непроникна для іонів водню, з

одного боку вона заряджається негативно (за рахунок O_2^-), з іншого - позитивно (за рахунок H^+). Коли різниця потенціалів на внутрішній мембрані досягає 200 мВ, протони проходять через канал ферменту АТФ-синтети, утворюється АТФ, а цитохромоксидаза каталізує відновлення кисню до води. Так у результаті окиснення дванадцяти пар атомів водню утворюється 34 молекули АТФ.

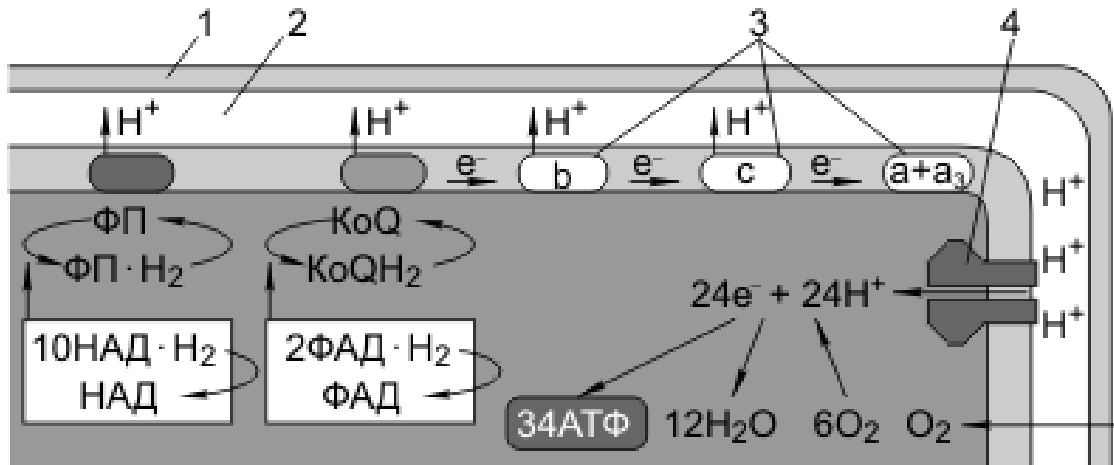


Рис.10. Електронно-транспортний ланцюг мітохондрій

1 - зовнішня мембрана; 2 - міжмембранний простір; протонний резервуар; 3 - цитохроми; 4 - АТФ-синтаза.

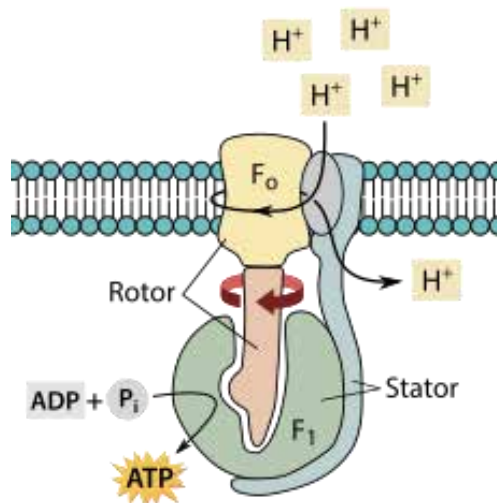
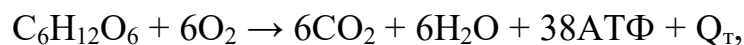


Рис.11. АТФ-синтаза

<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%A2%D0%A4-%D1%81%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B0>

У разі перфорації внутрішніх мітохондріальних мембран, окиснення НАД·Н₂ триває, але АТФ-синтаза не працює й утворення АТФ у дихальному ланцюзі не відбувається, енергія розсіюється у формі тепла.

Сумарна реакція розщеплення глюкози до вуглекислого газу та води має такий вигляд:



де Q_T - теплова енергія.

Практичні завдання

1. Замалюйте будову мітохондрії та схематично зобразіть локалізацію піруватдегідрогеназного комплексу, ферментів ЦТК, електронтранспортного ланцюга мітохондрій.
2. Зазначте ферментативні реакції, що протікають у матриксі мітохондрій.
3. Схематично зобразіть переміщення атомів водню (2H^+ і 2e^-), які були від'єднанні від окиснених субстратів в складі НАД- і ФАД-залежних дегідрогеназ.
4. Запишіть компоненти дихальних ланцюгів, їх особливості будови та біологічну роль.

Дайте відповідь на запитання тестових завдань

1. Метаболізм являє собою сукупність хімічних реакцій, у результаті яких відбувається:

1. розпад органічних речовин у клітинах до вуглекислого газу та води;
2. трансформація енергії органічних речовин в енергію макроергічних зв'язків;
3. синтез структурно-функціональних компонентів клітини;
4. перетворення харчових компонентів на сполуки, позбавлені видової специфічності;
5. використання енергії катаболічних процесів для забезпечення функціональної активності організму.

2. Кінцеві продукти метаболізму

1. амінокислоти;
2. вода;
3. глюкоза;
4. сечовина;
5. вуглекислий газ.

3. Ферменти тканинного дихання різняться за:

1. хімічною будовою кофакторів;
2. величиною редокс-потенціалу;
3. механізмом дії;
4. приналежністю до різних класів ферментів.

4. Виберіть ферменти, що каталізують реакцію, безпосередньо пов'язану із синтезом АТФ у мітохондріях:

1. АТФ-синтаза;
2. НАДН· H^+ - дегідрогеназа;
3. QH_2 – дегідрогеназа;
4. НАД-залежна – дегідрогеназа;
5. цитохромоксидаза.

5. Установіть правильну послідовність розташування ферментів у дихальному ланцюзі під час окиснення ізоцитрату:

1. цитохром В;
2. CoQ (убіхінон);
3. первинна НАД-залежна дегідрогеназа;
4. цитохром с;
5. цитохром *c1*;
6. цитохромоксидаза *aa3*;
7. НАДН·Н-ДГ (ФМН-залежна).

6. У процесі тканинного дихання відбувається:

1. окиснення відновлених кофакторів;
2. транспорт водню (електронів і протонів) від окиснюваних субстратів на кисень повітря;
3. утворення кінцевого продукту біологічного окиснення CO₂;
4. відновлення кисню (повне);
5. утворення кінцевого продукту біологічного окиснення – ендогенної води;
6. максимальне вилучення енергії з субстратів, що окиснюються;
7. використання газоподібного водню.

7. Установіть правильну послідовність розташування ферментів у дихальному ланцюзі під час окиснення сукцинату:

1. CoQ (убіхінон);
2. цитохром *b*;
3. первинна анаеробна ФАД-залежна дегідрогеназа;
4. цитохром с;
5. цитохром *c1*;
6. цитохромоксидаза *aa3*;

8. Скільки молей АТФ може синтезуватися під час окиснення 1 моль пірувату до ацетил-КоА:

1. 3 моль;
2. 5 моль;
3. 12 моль;
4. 15 моль.

Виконайте наведені завдання та обґрунтуйте відповіді:

Завдання № 1

Ротенон (токсична речовина, що виробляється одним із видів рослин) різко пригнічує активність мітохондріальної НАДН-дегідрогенази. Токсичний антибіотик антиміцин сильно інгібує окиснення убіхінолу. Припустимо, що обидві ці речовини блокують відповідні ділянки дихального ланцюга з рівною ефективністю. Яка з них буде при цьому більш потужною отрутою? Дайте аргументовану відповідь.

Для обґрунтування відповіді пригадайте:

1. Що таке блокатори дихального ланцюга?
2. На яких ділянках дихального ланцюга надходить водень від НАДН і ФАДН₂?

Завдання № 2

Деякі бактерії, дріжджі, паразитичні черви не потребують кисню. Який із двох способів утворення АТФ використовується в цих організмах для акумуляції енергії?

Для відповіді пригадайте:

1. Що таке фосфорилування?
2. Що таке субстратне й окисне фосфорилування?
- 3) Чим ці види фосфорилування відрізняються один від одного?

Завдання № 3

Додавання до мітохондрій олігоміцину спричиняє зниження як перенесення електронів від НАД·Н₂ до О₂, так і швидкості утворення АТФ. Подальше додавання 2,4-динітрофенолу призводить до збільшення швидкості переносу електронів без супутньої зміни швидкості синтезу АТФ. Яку реакцію інгібує олігоміцин?

Для відповіді пригадайте:

1. Чим є 2,4-ДНФ для дихального ланцюга?
2. Чим дія блокаторів відрізняється від дії роз'єднувачів?

Завдання № 4

В інкубаційне середовище з ізольованими мітохондріями додали АДФ. Як це вплине на здатність мітохондрій поглинати кисень?

Для обґрунтування відповіді:

1. Напишіть схему циклу Кребса та дихального ланцюга.
2. Пригадайте, що таке дихальний контроль?

Завдання № 5

В інкубаційну суміш внесено мітохондрії, надлишок субстрату й обмежену кількість АДФ. Як змінюватиметься з часом швидкість поглинання кисню і чому?

Для обґрунтування відповіді:

1. Напишіть схему циклу Кребса та дихального ланцюга.
2. Пригадайте, що таке дихальний контроль?

Завдання № 6

При додаванні до суспензії мітохондрій ізоцитрату швидкість поглинання кисню збільшується. При додаванні малонату - знижується. Чому припиняється споживання кисню?

Для відповіді:

1. Напишіть реакцію, яка активується ізоцитратом.

1. Укажіть, який проміжний метаболіт циклу Кребса накопичується під час додавання малонату і чому?
2. Яким чином можна відновити швидкість дихання?

Завдання для самостійної роботи:

1. Механізми утворення АТФ у клітині (субстратне та окисне фосфорилування).
2. Хеміосмотична теорія спряження окиснення і фосфорилування Мітчелла.
3. Коефіцієнт спряження окиснення і фосфорилування (P/O).

Практичне заняття №11.

Кількісне визначення пігментів у листку

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, опрацювання завдань самостійної роботи та виконання практичної частини в робочому зошиті.

Хлорофіл – зелений пігмент рослин, за допомогою якого відбувається фотосинтез. Він розміщується в особливих клітинних структурах, що називаються хлоропластами.

Хлорофіл - сполука, яка за своєю природою є порфіриновим комплексом магнію.

Хлорофіли мають кілька форм.

Хлорофіли *a* і *b* універсальні практично для більшості фотосинтезуючих організмів. Хлорофіл *a* є навіть в ціанобактеріях, прохлорофітних бактеріях, бурих, діатомових, криптонадних, червоних, жовто-зелених, золотавих, динофітових та евгленових водоростях.

Хлорофіл *c* (*c*₁, *c*₂) властивий різноманітним водоростям (хлорофіл *c*₁ - діатомовим та динофітовим, *c*₂ – бурим, криптонадним, жовто-зеленим, золотавим).

Хлорофіл *d* виявляють в ціанобактеріях та червоних водоростях, хлорофіл *f* – тільки в ціанобактеріях.

Вміст хлорофілу специфічний для листя кожного виду і сорту рослин та істотно змінюється залежно від освітлення, мінерального живлення, віку листя та інших умов. Середній вміст хлорофілу в листках становить близько 1 % сухої маси, а вміст хлорофілу в хлоропластах - близько 5...6 %. Між вмістом хлорофілу та інтенсивністю фотосинтезу виявлено залежність.

Більша частина молекул хлорофілів поглинає енергію світла (що супроводжується збудженням молекул хлорофілів, тобто запасанням енергії всередині молекул) і передає її реакційним центрам фотосинтезу (міграція енергії), менша ж частина входить до складу реакційних центрів фотосинтезу та безпосередньо бере участь у фотохімічних реакціях. За рахунок енергії поглиненого кванта хлорофіл реакційного центру здійснює міжмолекулярне перенесення електрона - так званий елементарний окисно-відновний акт. У результаті первинних процесів фотосинтезу утворюються відновлені продукти

(НАДН, НАДФН), а також АТФ. Енергія цих сполук використовується потім для біохімічних перетворень вуглецю, що входять у цикл Кальвіна. Таким чином, світло, поглинуте хлорофілом, перетворюється на потенційну хімічну енергію органічних продуктів фотосинтезу. У фототрофних бактерій у фотосинтезі беруть участь аналоги хлорофілів - бактеріохлорофіли.

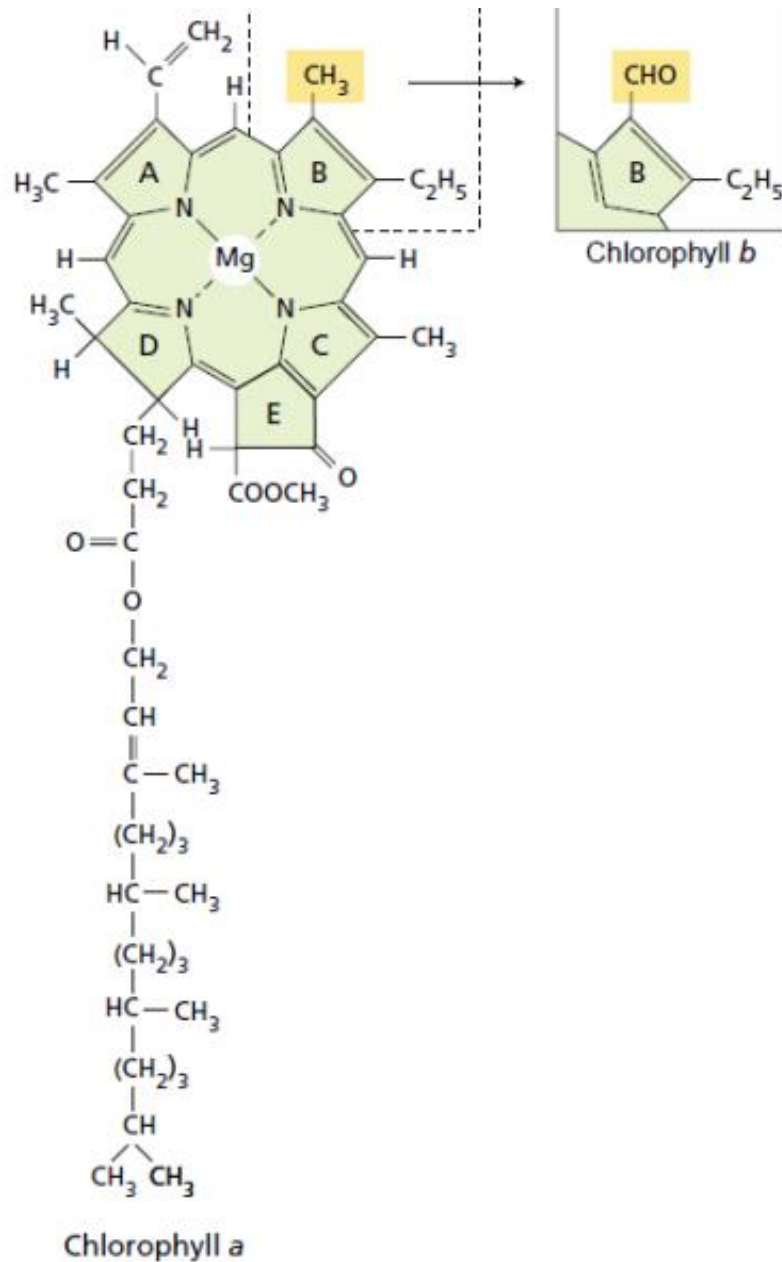


Рис.12. Будова хлорофілу *a* і хлорофілу *b*

<https://www2.hcmuaf.edu.vn/data/pvhiem/Chuong%204%20QUANG%20HOP.pdf>

Лабораторна робота
Визначення вмісту хлорофілу

Вміст суми хлорофілів у вищих рослин, а також окремих фракцій залежить від фази розвитку рослини, ступеня росту, впливу чинників навколишнього середовища.

Мета роботи: визначити вміст хлорофілу в рослинному матеріалі.

Об'єкт дослідження: рослинний матеріал.

Реактиви: 96 % етанол, дистильована вода.

Обладнання: мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, лійка, паперові фільтри, бюкси, бюретка, лід, спектрофотометр, водяна баня, термометр.

Хід роботи:

Задля дослідження вмісту суми хлорофілів *a* і *b* зважують рослинний матеріал (листя рослин) у кількості 2 г, подрібнюють та трикратно вносять 7 мл 96% етанолу. Фільтрують отримані об'єднані екстракти через паперовий фільтр, доводять об'єм до 30 мл та вимірюють оптичне поглинання спиртового екстракту на спектрофотометрі при довжинах хвиль 665 нм для хлорофілу *a*, 649 нм для хлорофілу *b*.

Розрахунок загальної кількості хлорофілу здійснюють за формулою

$$C_a + C_b = 25,1 \times E_{654},$$

де $C_a + C_b$ – концентрація хлорофілів *a* та *b*;

E_{654} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 654 нм.

*Для визначення концентрації хлорофілів *a* і *b* застосовують формули*

$$C_a = 13,7 E_{665} - 5,76 E_{649},$$

$$C_b = 25,8 E_{649} - 7,60 E_{665}.$$

де C_a – концентрація хлорофілу *a*;

C_b – концентрація хлорофілу *b*;

E_{665} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 665 нм;

E_{649} – оптична густина екстракту за довжини хвилі 649 нм.

Вміст хлорофілу у тканинах визначають в міліграмах на 1 г сирої маси за формулою

$$V_{ек} \times C_{хл} / 1000 \times m_{нав},$$

де $V_{ек}$ – об'єм екстракту (30 мл);

$C_{хл}$ – концентрація хлорофілу (г/л);

$m_{нав}$ – маса наважки (2 г).

Зробіть висновок про загальний вміст хлорофілу та хлорофілів *a* і *b* у рослинних зразках.

Самостійна робота

1. Замалювати будову хлорофілу, гемоглобіну, ціанкобаламіну

Практичне заняття №12.

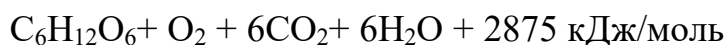
Дослідження ферментів дихання рослин

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Продукти, що синтезуються при фотосинтезі (цукор та інші органічні сполуки), можуть використовуватись клітинами рослини як поживні речовини. На рівні клітини цей процес називають диханням.

Клітинне дихання - це розпад органічних поживних речовин за участю O_2 , при якому відбувається утворення хімічно активних метаболітів і виділення енергії, яка використовується клітинами для процесів життєдіяльності.

Сумарне рівняння дихання:



Але дихання не є лише тим процесом, що забезпечує рослину енергією. Дихання є складним окисно-відновним процесом, що включає кілька етапів. Проміжні стадії дихання супроводжуються утворенням органічних сполук, до яких зокрема належать пентози, органічні кислоти, що в подальшому перетворюються в інших метаболічних реакціях. Такий продукт дихання як вода за екстремального зневоднення може використовуватись рослиною для виживання.

Якщо розглядати дихання з хімічної точки зору, воно є процесом повільного окиснення внаслідок від'єднання електронів та протонів від субстрату з приєднанням їх до кінцевого акцептора кисню, що і є ключовим моментом різниці між диханням і бродінням (останнє є анаеробним процесом).

Окиснення субстрату дихання відбувається за участю окисно-відновних ензимів оксидоредуктаз.

Існує 3 групи оксидоредуктаз:

Анаеробні дегідрогенази - переносять електрони на різні акцептори ($НАД^+$, $НАДФ^+$) але не кисень. Під дією цих ферментів один протон приєднується до коферменту, а інший виділяється в середовище. За рахунок цього коферменти відновлюються, а субстрати дихання руйнуються. Вирізняють близько 150 ферментів цієї групи, зокрема до анаеробних дегідрогеназ належить лактатдегідрогеназа, малатдегідрогеназа, алкогольдегідрогеназа.

Аеробні дегідрогенази (простетичною групою цих ензимів є рибофлавін) - переносять енергію на різні акцептори, в тому числі й кисень. Коферментами аеробних дегідрогеназ є ФМН (флавінмононуклеотид) і ФАД. До аеробних дегідрогеназ належить сукцинатдегідрогеназа. Донорами електронів для аеробних дегідрогеназ є анаеробні дегідрогенази, а в якості акцепторів виступають цитохроми, кисень, хінони.

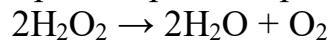
Оксидази (передають електрони тільки кисню). При цьому утворюються вода, перекис водню і супероксидний аніон кисню - O_2^- . До оксидаз належать

ферумвмісні ферменти та переносники системи цитохромів (цитохроми, цитохромоксидаза), що передають електрони з флавопротеїнів на кисень.

В усіх компонентах цитохромної системи присутня залізорфторина простаїчна група. За рахунок оборотного відновлення й окиснення заліза, що відбувається шляхом приєднання і віддачі електронів, воно також змінює свою валентність.

Особливими для процесу дихання рослин є ензими, що розкладають пероксид водню - продукт реакції окремих оксидаз. До найбільш важливих ферментів цієї групи належить пероксидаза і каталаза.

Каталаза розкладає пероксид гідрогену, який утворюється в процесі біологічного окиснення на воду та молекулярний кисень, а також окиснює в присутності H_2O_2 низькомолекулярні спирти і нітроти.



Специфічність каталази до субстрату невелика, тому вона може каталізувати не лише розкладання H_2O_2 , але й окиснення нижчих спиртів. У клітинах фермент локалізується у спеціальних органелах – пероксисомах.

Пероксидаза є найпоширенішим ферментом тканин рослини. Цей фермент належить до антиоксидантних і каталізує реакції оксидазного, пероксидазного та оксигеназного окиснення. Пероксидаза окиснює поліфеноли, аміни, жирні кислоти та інші сполуки за участю пероксиду гідрогену або органічних пероксидів.

Лабораторна робота

Дослід 1 Вивчення катаболічної активності ферментів дихання рослин

Мета роботи: дослідити активність дихальних ферментів (пероксидази та дегідрогенази) за різних умов.

Матеріали, реактиви і обладнання: бульба картоплі, терка, марля, 1% розчин гідрохінону, 3% розчин пероксиду гідрогену, пробірки, піпетки.

Хід роботи:

Визначення пероксидази. Очистити картоплю і натерти на терці, з допомогою марлі віджати сік і зібрати в колбу. Внести сік у 4 пробірки за наступною схемою.

Пробірка № 1: 1% розчин гідрохінону - 5 мл, 3% розчин пероксиду гідрогену - 1 мл, картопляний сік - 1 мл;

Пробірка № 2: 1% розчин гідрохінону - 5 мл, 3% розчин пероксиду гідрогену - 1 мл;

Пробірка № 3: 1% розчин гідрохінону - 5 мл, картопляний сік - 1 мл;

Пробірка № 4: 1% розчин гідрохінону - 5 мл, 3% розчин пероксиду гідрогену - 1 мл, попередньо прокип'ячений картопляний сік (1 хв) - 1 мл.

Окиснення гідрохінону до хінону викликає побуріння розчину. Спостерігається деяке побуріння самого картопляного соку без додавання гідрохінону і пероксиду гідрогену, що пов'язане з дією поліфенолоксидази, яка окиснює поліфеноли тканин картоплі за участю молекулярного кисню. Отримані результати та спостереження за зміною забарвлення у пробах зафіксувати у Таблиці.

Інтенсивність забарвлення розчину при різних умовах досліду

Варіант	Склад суміші в пробірці			Інтенсивність забарвлення розчину
	Картопляний сік	Пероксид гідрогену	Гідрохінон	
1	+	+	+	
2	-	+	+	
3	+	-	+	
4	+	+	+	

Дослід 2. Визначення активності дегідрогеназ.

Активність дегідрогеназ оцінюють за допомогою метиленового синього, який здатний акцептувати гідроген. Відновлення барвника приводить до його обезбарвлення (лейкоформа). Взаємодія з молекулярним киснем приводить до самовільного окиснення лейкоформи метиленового синього, що призводить до утворення синього забарвлення.

Мета роботи: дослідити активність дегідрогеназ за різних умов.

Матеріали, реактиви і обладнання: насіння бобових, 1% розчин метиленового синього, колби термостійкі, пробірки, піпетки, порцелянові чашки.

Хід роботи:

Для проведення досліду використати насіння бобових (горох, квасоля, соя). Насіння попередньо слід замочити до набрякання або наклювання. Насіння (10-15 шт.) звільнити від оболонки і розділити на сім'ядолі. Половину отриманого рослинного матеріалу помістити в колбу з дистильованою водою та кип'ятити 3 хвилини. Насіння після кип'ятіння та в нативному стані помістити у пробірки і залити розчином метиленового синього. Через 5-10 хвилин розчин злити, сім'ядолі добре промити водою. Після цього пробірки заповнити дистильованою водою, закрити пробками та помістити у водяну баню за температури 25-30 °С. Після 10-15 хв інкубації оцінити забарвлення сім'ядолей. Потім перемістити насіння з пробірок у порцелянові чашки для контакту з повітрям і спостерігати за зміною забарвлення.

Зробити висновок, чому насіння має різну здатність до забарвлення у вказаних варіантах досліду.

Завдання для самостійної роботи:

1. Яку роль відіграє процес дихання в функціонуванні організму рослин?
2. Дегідрогенази: хімічна природа та функції у процесі росту і розвитку рослин.
3. Оксидази: хімічна природа, функції в процесі дихання.
4. Гліколіз, основні етапи.
5. Аеробна фаза дихання.

Практичне заняття №13.

Дослідження основних компонентів антиоксидантної системи рослин

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання дослідної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

Згідно з класифікацією, що базується одночасно на механізмі дії та молекулярній масі, виділяють такі групи антиоксидантів:

1) ферменти, що знешкоджують активні форми кисню (АФК) – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, різні пероксидази;

2) ферменти детоксикації ліпідів (глутатіон-S-трансфераза, фосфоліпід-гідропероксид-глутатіонпероксидаза та ін.);

3) низькомолекулярні антиоксиданти - глутатіон, аскорбінова кислота, фенольні сполуки, токофероли;

4) регенератори активних форм антиоксидантів (монодегідроаскорбатредуктаза, дегідроаскорбатредуктаза, глутатіонредуктаза).

Останнім часом до антиоксидантів відносять деякі сполуки, для яких антиоксидантна функція не є основною, але які мають явно виражені антиоксидантні властивості, які посилюються у відповідь на дію стрес-факторів, зокрема посухи, у великих кількостях, насамперед пролін і деякі поліоли.

Ферментативні антиоксиданти каталізують переважно детоксикацію супероксиду та пероксидів.

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.11) є ключовим ферментом антиоксидантного захисту і виконує роль первинного рубежу проти АФК. Таку функцію СОД пов'язують із тим, що, елімінуючи супероксидні радикали, цей фермент опосередковано зменшує вірогідність утворення гідроксильних радикалів, синглетного кисню, пероксинітриду та інших АФК, які через високу реакційну здатність не можуть бути видалені білковими каталізаторами.

СОД каталізує реакцію диспропорціонування супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та пероксиду водню. Вона представлена значною кількістю молекулярних форм. У їхніх активних центрах можуть бути такі метали, як Cu, Zn, Mn, Fe.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) є гемвмісним ферментом із Mr близько 250 кД, що каталізує розкладання H_2O_2 на воду та молекулярний кисень. Каталаза локалізована переважно в пероксисомах і гліоксисомах, її специфічна форма виявлена також у мітохондріях.

Аскорбатпероксидаза (КФ 1.11.1.7) знешкоджує H_2O_2 за участю аскорбінової кислоти. Вона є гемвмісним ферментом. Аскорбатпероксидаза локалізована переважно в хлоропластах, проте міститься також у цитоплазмі, мітохондріях, пероксисомах та апопласті. Хлоропластні форми ферменту локалізовані в стромі, тилакоїдному люмені та тилакоїдах. Залежно від виду рослини форми аскорбатпероксидази можуть кодуватися або одним геном з подальшим альтернативним сплайсингом продукту, або кількома генами з

диференційною регуляцією.

Класичні низькомолекулярні антиоксиданти. Традиційно основними низькомолекулярними антиоксидантами вважаються водорозчинні сполуки - глутатіон, аскорбінова кислота, деякі фенольні речовини, а також група ліпофільних антиоксидантів, до якої входять токоферолі та каротиноїди.

Аскорбат є потужним антиоксидантом, що пов'язано з функціонуванням одноелектронних циклічних переходів між гідро- та дегідроаскорбатними формами. Відновлена форма аскорбату здатна безпосередньо взаємодіяти з АФК, а також брати участь у відновленні інших низькомолекулярних антиоксидантів (α -токоферолу, глутатіону) у ферментативних і неферментативних процесах.

Глутатіон - трипептид, молекула якого за фізіологічних значень рН має дві негативно заряджені карбоксильні групи та позитивно заряджену аміногрупу.

Глутатіон у вищих рослин синтезується за послідовної дії γ -глутамілцистеїнсинтетази та глутатіонсинтетази. На початковому етапі синтезу відбувається АТФ-залежне утворення дипептиду γ -глутамілцистеїну з глутаміну та цистеїну за участю γ -глутамілцистеїнсинтетази. Є відомості, що 60-70 % пулу цього ферменту локалізовано в хлоропластах. На другому етапі біосинтезу гліцин під дією глутатіонсинтетази, також локалізованої переважно в хлоропластах, приєднується до С-термінальної ділянки γ -глутамілцистеїну з утворенням глутатіону. Для цієї реакції також необхідний гідроліз макроергічного зв'язку АТФ.

Захисна дія глутатіону супроводжується окисненням його сульфгідрильної групи та перетворенням на дисульфід глутатіону (GSSG). Вважається, що детоксикація H_2O_2 за участю глутатіону може відбуватися двома шляхами. Перший полягає у відновленні H_2O_2 глутатіоном у реакції, що каталізується глутатіонпероксидазою.

Другий шлях відновлення пероксиду водню пов'язаний з окисненням аскорбінової кислоти до дегідроаскорбату під дією аскорбатпероксидази. Дегідроаскорбат, що утворився, може відновлюватися до аскорбінової кислоти за рахунок ферментативного і неферментативного окиснення глутатіону. Глутатіон також використовується при знешкодженні пероксидів ліпідів глутатіон-S-трансферазою. Високі співвідношення GSH/GSSG та активність ферментів, пов'язаних із метаболізмом глутатіону, входять до числа маркерів стійкості рослин до стресорів, у тому числі до посухи.

Усі флавоноїди тією чи іншою мірою беруть участь в антиоксидантному захисті клітин. Відповідно до загальноприйнятої точки зору антиоксидантні властивості флавоноїдів пояснюються їхньою здатністю слугувати пастками для вільних радикалів, а також хелатувати іони металів, що беруть участь у радикальних процесах.

Лабораторна робота

Дослід 1. Спектрофотометричне визначення активності пероксидази
Принцип методу. Окиснення барвника індигокарміну впродовж певного

проміжку часу призводить до зміни оптичної густини продуктів реакції.

Реактиви: *ацетатний буфер* $pH=4,9$ (3,5 частин 0,2 М оцтової кислоти додати 6,5 частин 0,2 М натрій ацетату); *0,2 М оцтова кислота* (11,2 мл чистої кислоти розвести дистильованою водою до 1000 мл); *0,2 М розчин натрій ацетату* (розвести 16,4 г безводного натрій ацетату або 27,2 г трьохводного кристалогідрату або 38 г шестиводного кристалогідрату в 1000 мл води); *0,0005 М розчин індигокарміну* (0,0233 г барвника довести дистильованою водою до 100 мл і зберігати в флаконах з темного скла); *20 % розчин сульфатної кислоти* (50 мл дистильованої води додати 65 мл 96 % кислоти); *0,03 М розчин гідроген пероксиду* (1,5 г H_2O_2 довести до 100 мл H_2O – отримаємо *0,44 М розчин*. В день проведення вимірювань до 1 мл 0,44 М розчину додати 14 мл дистильованої води – вийде *0,03 М розчин*).

Посуд, реактиви і матеріали: ваги лабораторні, центрифуга, керамічна ступка, товчачик, колби конічні на 100 cm^3 , подрібнене скло або кварцовий пісок, піпетки на 1, 2, 5, 10 cm^3 , спектрофотометр.

Хід роботи:

У ступці розтерти 1 г рослинного матеріалу, за необхідності використати чистий кварцовий пісок або подрібнене скло. У дві центрифужні пробірки додати наступні реактиви: ацетатний буфер – 1 мл; розчин індигокарміну – 1 мл; гомогенат – 0,5 мл. Перемішати вміст пробірок та центрифугувати 15 хв за 3000 об/хв.

У контрольну кювету додати: центрифугат 1 мл, дистильовану воду – 0,5 мл, сульфатну кислоту – 3 мл.

У дослідну кювету додати: центрифугат 1 мл, розчин гідроген пероксиду 0,5 мл. Інкубувати за кімнатної температури 2 хвилини, після чого додати розчин сульфатної кислоти 3 мл.

У контрольних і дослідних пробах провести визначення оптичної густини в кюветі (робоча довжина 10 мм) $\lambda=590$ нм проти дистильованої води.

Провести обчислення активності пероксидази у відносних одиницях на 1 г сирої маси (або на одиницю білка) за формулою:

$$A = ((D_2 - D_1) \cdot V \cdot V_2 \cdot 60) / t \cdot V_1 \cdot m$$

де D_1 – оптична густина контрольного розчину;

D_2 – оптична густина дослідного розчину;

t – час інкубації, сек., (120 сек.);

m – маса наважки, г;

V – загальний початковий об'єм витяжки, cm^3 ;

V_1 – об'єм, взятий для проведення реакції, cm^3 ;

V_2 – загальний об'єм рідини в кюветі, cm^3 ;

60 – коефіцієнт переведення в хвилини.

За остаточний результат випробувань беруть середнє арифметичне значення трьох паралельних вимірювань, підрахованих до четвертого десяткового знаку.

Дослід 2. Визначення вмісту аскорбінової кислоти та глутатіону

Рослини володіють потужною системою антиоксидантного захисту, що включає аскорбінову кислоту та глутатіон. Всі субклітинні компартменти клітин рослин містять аскорбінову кислоту в кількості достатній для регенерації аскорбату. Аскорбінова кислота вступає в хімічну взаємодію з активними формами кисню (вміст останніх суттєво зростає в умовах стресу), а також неферментативними і ферментативними механізмами забезпечує відновлення інших низькомолекулярних антиоксидантів. Дія стресових факторів (важкі метали, різні токсиканти, висока температура, посуха) порушує про- та антиоксидантний баланс.

Рівень інтенсивності окисно-відновних реакцій, проміжним продуктом яких і є аскорбінова кислота, прямо впливає на витривалість рослин до дії стрес-факторів.

Рослини реагують на негативні чинники навколишнього середовища перебудовою окремих метаболічних процесів. Важливим компонентом низькомолекулярної антиоксидантної системи рослин є глутатіон. До складу відновленої форми глутатіону входить глутамінова кислота, цистеїн і глікокол. Сульфгідрильна група глутатіону забезпечує його здатність до окисно-відновних перетворень. Роль глутатіону в рослині наступна: захист організму від активних сполук кисню, відновлення та ізомеризація дисульфідних зв'язків, вплив на активність ензимів, підтримка функціонування біомембран, резерв цистеїну, вплив на трансляцію білка і синтез нуклеїнових кислот, підвищення резистентності рослинних клітин до дії різних факторів довкілля.

Мета роботи: дослідити вміст аскорбінової кислоти та глутатіону в рослинному матеріалі.

Реактиви: 5% розчин ортофосфорної кислоти, 0,001н розчин 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, 15% розчин КJ, 1% розчин крохмалю, 0,001н розчин йодату калію KJO_3 , аскорбінова кислота, 0,4 М трис-буфер (рН = 8,9), реактив Елмана, дистильована вода.

Обладнання: керамічна ступка, кварцовий пісок, лійка, мірні колби, хімічні склянки, пробірки, піпетки, паперові фільтри, бюкси, бюретка, лід, спектрофотометр, водяна баня, рН-метр.

Хід роботи:

Спершу потрібно виділити аскорбінову кислоту і глутатіон. Для цього зважте наявний свіжий рослинний матеріал в кількості 2 г та гомогенізуйте його в керамічній ступці на льоду з 15 мл 5 % розчину ортофосфорної кислоти до однорідності. Перенесіть отриману масу, використавши скляну лійку, в колбу об'ємом 50 мл, змиваючи ступку 5 мл ортофосфорної кислоти. Вміст колби доведіть до 50 мл дистильованою водою, перемішайте та залиште на 5 хвилин за кімнатної температури. Збовтайте колбу впродовж 2-3 хв і відфільтруйте матеріал через паперовий складчастий фільтр в суху колбу.

Для визначення вмісту аскорбінової кислоти у три хімічні стаканчики внесіть по 5 мл фільтрату і протитруйте з бюретки 0,001н розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію до стійкого блідо-рожевого кольору.

Для визначення вмісту глутатіону у три хімічні стаканчики внесіть по 5 мл фільтрату, додайте 3 краплі 15 % розчину KJ, 5 крапель 1 % розчину крохмалю та титруйте з бюретки 0,001н розчином KJO₃ до блідо-синього кольору, який не зникає протягом 1 хв.

Визначення співвідношення об'ємів. Для приготування розчину аскорбінової кислоти в мірну колбу на 50 мл налейте 20 мл 5 % розчину ортофосфорної кислоти, додайте кристалик аскорбінової кислоти та доведіть рідину в колбі до позначки дистильованою водою. Протитруйте 5 мл приготовленого розчину трьохкратно розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію та розчином йодату калію і визначте співвідношення їх об'ємів за формулою:

$$\frac{\text{йодат} \cdot \text{калію, мл}}{2,6 - \text{дихлорфеноліндофенол, мл}}$$

Вміст аскорбінової кислоти (А), глутатіону (Г) та розрахуйте за формулами:

$$A = \frac{a \cdot \kappa \cdot 0,088 \cdot M \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot n}, \text{ мкг/\%},$$

$$\Gamma = \frac{(b - a \cdot \kappa) \cdot 0,307 \cdot M \cdot 100 \cdot 1000}{m \cdot n}, \text{ мкг/\%}$$

а – кількість 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію, витраченого на титрування, мл;

б – кількість йодату калію, витраченого на титрування, мл;

κ – співвідношення об'ємів йодат калію/дихлорфеноліндофенол мл;

0,088 – кількість відновленої аскорбінової кислоти (мл), еквівалентна 1 мл 0,001н розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію;

0,307 – кількість відновленого глутатіону (мл), еквівалентна 1 мл 0,001н розчину йодату калію;

n – наважка матеріалу, мг;

M – загальний об'єм екстракту, мл;

m – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл.

Завдання для самостійної роботи:

1. Активні форми кисню і окиснювальний стрес.
2. Система антиоксидантного захисту рослин. Ферменти-антиоксиданти.
3. Низькомолекулярні компоненти антиоксидантного захисту рослин.

Практичне заняття №14.

Застосування іммобілізованих ферментів та клітин у біотехнологічних процесах

Освоєння теми передбачає ознайомлення з теоретичним матеріалом за темою, виконання практичної частини роботи, опрацювання завдань самостійної роботи.

В біотехнологічних процесах тривалий час використовувались ферментативні препарати у нативній формі, що суттєво скорочувало тривалість їх використання. Іммобілізовані ферментні препарати або ферменти пролонгованої дії знівелювали основні недоліки попередніх їх форм. Іммобілізованими називаються ферменти, рух яких у просторі повністю або незначно обмежено.

Іммобілізацією ферменту називають включення молекули біокатализатора у фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але при цьому зберігає здатність обміну з нею молекулами субстрату.

Перевагами іммобілізованих ферментів у порівнянні з природними попередниками, є:

- реакційне середовище легко відділити від гетерогенного катализатора, тому зупиняти реакцію можна одномоментно, а також можна легко очистити продукт від ензиму;
- іммобілізовані ферменти дозволяють забезпечувати безперервність ферментативного процесу, регуляцію швидкості реакції і виходу продукту;
- за рахунок модифікації ферментів можна змінювати їх специфічність, стабільність, чутливість до рН та іонного складу середовища культивування;
- іммобілізовані ферменти медичного призначення мають знижену імуногенність, алергенність і токсичність, але разом з тим підвищену стабільність та пролонговану дію порівняно з природними аналогами.

Іммобілізація ферментів забезпечується прикріпленням їх активної форми до нерозчинної основи чи включенням до напівпроникної мембранної системи. Цей процес здійснюється двома методами: фізичним та хімічним.

Іммобілізація ферментів може здійснюватися на різних носіях – неорганічних та органічних полімерних. Саме вибір носія надзвичайно важливий для ефективної іммобілізації ферментів.

Носії повинні відповідати наступним вимогам:

- нерозчинність у реакційному середовищі;
- заряд відмінний від заряду фермента;
- хімічна, біологічна стійкість та висока гідрофільність;
- механічна міцність;
- не допущення неспецифічної адсорбції та суттєвої зміни білкової молекули ферменту;
- легка грануляція і активація.

Використання окремих ферментів чи мультиферментних систем не забезпечує таких можливостей перетворення одних речовин в інші як комплексний клітинний метаболізм, який забезпечує більш складний синтез, трансформацію, деструкцію, багатостадійні процеси. Саме тому іммобілізовані

клітини на відміну від іммобілізованих ензимів та вільних клітин мають суттєві переваги:

- здешевлюють процес за рахунок підвищення продуктивності і автоматизації,
- збільшують вихід продукту;
- здешевлюють отримання біокатализатора, оскільки зникає потреба виділяти окремо кожен фермент;
- дозволяють здійснювати багатоступеневі процеси, навіть ті, що потребують регенерації кофакторів;
- у клітині зберігається природне мікросередовище, що забезпечує конформаційну стабільність ферментів а також високу активність ферментів;
- здатність здійснювати реактивацію іммобілізованих клітин за рахунок зміни певних умов, зокрема зміни складу поживного середовища;
- можливість підвищення активності біокатализатора вибором фази росту.

Практичні завдання

1. Які основні продуценти ферментів?
2. Наведіть приклади використання іммобілізованих ферментів у різних галузях промисловості.
3. Перерахуйте основні напрямки використання іммобілізованих ферментів у відновлювальній терапії.
4. Опишіть фізичні і хімічні методи іммобілізації ферментів.
5. Які існують способи підвищення стабільності іммобілізованих ферментів.
6. Використовуючи мережу інтернет, наведіть біотехнологічні процеси із використанням іммобілізованих ферментів у харчовій, фармацевтичній, текстильній промисловості, сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі.
7. Зазначте відмінності дії ферментів і небілкових катализаторів. Оформіть результати пошуку у вигляді таблиці.
8. Перечисліть гомоферментативні та гетероферментативні мікроорганізми молочнокислого бродіння.

Вирішіть задачу:

Задача 1

Розрахуйте, скільки потрібно витратити ферментного препарату, щоб гідролізувати 15,06 т крохмалю, за умови, що його активність становить 1600 од/мл, а рекомендована доза - 0,8 од. АС на 1 г крохмалю.

Задача 2

Розрахуйте, скільки потрібно витратити ферментного препарату, щоб гідролізувати 21,4 т крохмалю, за умови встановленої активності ферментного препарату (α -амілази) на рівні 2200 од/мл, а рекомендована доза внесення - 0,4 од АС на 1 г крохмалю.

Завдання для самостійної роботи:

Вкажіть функціональні групи ферментів, які беруть участь у процесі каталізу.

Які факторів впливають на швидкість ферментативних реакцій?

З яких джерел отримують ферменти, які використовують у біотехнологічних процесах?

Практичне заняття №15.

Вивчення хімізму м'язового скорочення

Обмін речовин у м'язах у стані спокою незначний, під час роботи він підвищується більш ніж у 100 разів. Для скорочення м'язів необхідні:

- 1) глікоген;
- 2) міозин;
- 3) актин;
- 4) АТФ;
- 5) креатинфосфат;
- 6) іони калію.

Хімізм м'язового скорочення в даний час розглядається як результат взаємодії між собою двох скорочувальних білків - актину і міозину за рахунок розщеплення АТФ АТФ-азою міозину. Енергія, що виділяється під час розщеплення АТФ, перетворюється з хімічної на механічну, нитки актину витягуються між нитками міозину, саркомер скорочується або напружується. В умовах спокою АТФ не розщеплюється, оскільки АТФ-азна активність міозину пригнічена присутністю іонів магнію. Роль магнію - гальмувати в умовах спокою гідроліз АТФ, при цьому голівки міозину отримують енергію, яка забезпечує зміщення тропоніну С і наступне зачеплення його за актинову нитку.

Стимулом для увімкнення складного механізму слугує нервовий імпульс. При його надходженні до синапсу (на закінчення рухового нерва), виділяється медіатор - ацетилхолін, що створює різницю потенціалів між зовнішньою та внутрішньою мембраною. Унаслідок цього кальцій виходить із саркоплазматичного ретикулуму, де він перебуває у зв'язку з білком кальсеквестрином, що забезпечує збільшення його вмісту в саркоплазмі. Кальцій діє як антагоніст магнію, створює умови для прояву АТФ-азної активності міозину. АТФ розщеплюється, скоротливі білки взаємодіють, м'яз (саркомер) скорочується.

Скорочення триває доти, доки не надходять нервові імпульси і є запаси АТФ. За рахунок енергії АТФ іони кальцію зв'язуються саркоплазматичним ретикулумом, видаляються із саркоплазми, їхня концентрація знижується. Відбувається розслаблення м'язів. Підтримку АТФ у належній концентрації забезпечує високий рівень вмісту дихальних ферментів. Збільшення кровопостачання м'язів під час роботи веде до збільшення припливу кисню і поживних речовин.

В м'язах, які активно працюють, за недостатнього постачання киснем, АТФ синтезується за рахунок процесу перетворення глюкози на лактат, тобто за рахунок процесу анаеробного гліколізу. Лактат переноситься кров'ю в печінку, де в процесі глюконеогенезу з витратами АТФ знову конвертується в

глюкозу (цикл Корі).

Під час інтенсивної роботи м'язів максимально активується гліколіз. Продукт гліколізу, піровиноградна кислота (піруват), накопичується в цитоплазмі та недостатньо швидко надходить у мітохондрії, якщо вони через нестачу кисню не готові до окиснення пірувату. В анаеробних умовах піруват у реакції, що каталізується лактатдегідрогеназою (заключний етап гліколізу) відновлюється до лактату. Одночасно НАДН, кофермент лактатдегідрогенази, окиснюється до НАД^+ , який знову використовується на окисному етапі гліколітичного шляху. Цій реакції сприяє відносно високе співвідношення $\text{НАДН}/\text{НАД}^+$ у м'язовій тканині. Лактат дифундує в кров і надходить у печінку, де конвертується в глюкозу. Таким чином, утворення лактату тимчасово замінює аеробний метаболізм глюкози і частково переносить цей процес із м'язів у печінку.

Слід нагадати, що під час анаеробного гліколізу утворюються кислоти, які, не беручи участі в подальшому обміні, існують у формі аніонів. Тому за інтенсивного анаеробного гліколізу рН м'язової клітини може знизитися настільки, що скорочення стане неможливим. Зазвичай цього не відбувається завдяки швидкому виходу кислих метаболітів (лактату та пірувату) у кров, яка також може виявитися закисленою (метаболічний ацидоз).

Лабораторна робота

Визначення вмісту лактату в м'язах

Вміст лактату збільшується за умов інтенсивної роботи м'язів (фізична праця, тетанія), гіпоксії (легенева та серцева недостатність), утворення та росту злоякісних пухлин, розвитку печінкових захворювань.

Принцип методу. Лактат за умови нагрівання з сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, який взаємодіє з гідрохіноном і утворює сполуку червонувато-коричневого кольору за вимірюванням інтенсивності забарвлення якої можна встановити кількісний вміст.

Матеріали та реактиви. Стандартний розчин молочної кислоти, гомогенат м'язів (наважку тканини 1 г розтирають і додають 5 мл фізіологічного розчину), 5 % розчин метафосфатної кислоти, концентрована сірчана кислота, 10 % розчин сульфату міді, 25 % розчин сульфату міді, сухий гідроксид кальцію, 20 % спиртовий розчин гідрохінону, дистильована вода.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, скляні палички, фільтрувальний папір або вата, лійки, водяна баня, кювети, ФЕК.

Хід роботи:

У три сухі пробірки налити по 6 мл дистильованої води. У пробірку №1 додати 1 мл стандартного розчину молочної кислоти, в пробірку № 2 – 1 мл гомогенату тканини або сироватки крові, у пробірку № 3 – 1 мл води. Для осадження білків у кожену пробірку внести по 1 мл метафосфатної кислоти, струсити та залишити на пару хвилин, а потім відфільтрувати. До фільтрату додати по 1 мл 25% розчину сульфату міді та 0,5 г гідроксиду кальцію. Проби перемішати скляною паличкою. Через 5 хв відфільтрувати. Відміряти в

пробірки по 1 мл фільтрату, додати по 0,1 мл 10% розчину купруму сульфату та 4 мл концентрованої сірчаної кислоти. Поставити на киплячу водяну баню на 1,5 хвилини. Після охолодження додати по 0,1 мл 20% спиртового розчину гідрохінону, добре перемішати і кип'ятити 15 хв. Охолодити та колориметрувати на ФЕК при $\lambda = 490$ нм.

Розрахунок концентрації лактату в гомогенаті (в ммоль/л), проводять за формулою:

$$C = \frac{C_{ст.} \times E_{досл.}}{E_{ст.}}$$

де $C_{д.}$ і $C_{ст.}$ – концентрація лактату в дослідній і стандартній пробах;
 $E_{д.}$ і $E_{ст.}$ – оптична густина дослідної і стандартної проби.

Розрахувавши вміст молочної кислоти у біологічному матеріалі, записати отримані результати, порівняти їх із нормальними величинами та зробити висновок.

Самостійна робота

1. Яку реакцію каталізує лактатдегідрогеназа?
2. Яке клініко-діагностичне значення визначення вмісту лактату?
3. Опишіть біохімічний механізм розслаблення м'язів.
4. Охарактеризуйте аеробний шлях ресинтезу АТФ в мітохондріях м'язових клітин.
5. Опишіть креатинфосфатний шлях ресинтезу АТФ в м'язових клітинах.
6. Опишіть міокіназний шлях ресинтезу АТФ в м'язових клітинах.

Список використаної літератури

1. Грегірчак Н.М., Антонюк М.М. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: Конспект лекцій для студ. спец. 8.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. К.: НУХТ, 2011. 59 с
2. Біохімія. Практикум: навч. посіб. / Остапченко Л.І., Компанець І.В., Скопенко О.В. та ін. К. : ВПЦ «Київський університет», 2018. 329 с
3. Біохімія: практикум / Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, Л.Г. Калачнюк, М.В. Шевряков, Г.І. Калачнюк. За заг. ред. акад. Д.О. Мельничука. К: НУБіП України, 2012. 528 с.
4. Григор'єва Л.І., Томілін Ю.А. Основи біофізики і біомеханіки: навчальний посібник. Миколаїв: Вид-во ЧДУ ім. Петра Могили, 2011. 297 с.
5. Суховія М.І., Шафраньош І.І. Молекулярна біофізика: навчальний посібник. Ужгород :[ДВНЗ "УжНУ"], 2022. 54 с.
6. Прилуцький Ю.І., Костерін С.О. Комп'ютерне моделювання в біології: підручник. Київ: Наукова думка, 2024. 196 с.
7. Біотехнологія: підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під заг. ред. В.Г. Герасименка. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
8. Промислова біотехнологія: курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. О. І. Юлевич. Миколаїв : МНАУ, 2024. 159 с.
9. Біохімія та біотехнологія рослин: навчальний посібник / [уклад. Шемедюк Н.П.]. Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 257 с.
10. Буцяк В.І., Швед О.В. Основи біотехнологічних процесів: навчальний посібник. Львів. 2021. 125 с.
11. Основи біотехнологій: навчально-методичний посібник / [уклад. Шемедюк Н.П.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2021. 111 с.
12. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник. К.: Ліра-К, 2020. 258 с.

ВІДПОВІДІ ДО ПИТАНЬ ТА ЗАДАЧ

Практичне заняття 2. Ентальпія. Тепловий ефект біохімічної реакції

Відповідь до задачі № 1: зміна ентропії для процесу плавлення свинцю складає 9,59 Дж/К.

Розв'язок:

Розрахувати зміну ентропії для оборотного процесу $\Delta S = \Delta H/T$, де ΔH – тепло- та плавлення; T – температура плавлення:

$$\Delta H = 23040 \text{ Дж/кг} \times 0,25 \text{ кг} = 5750 \text{ Дж};$$

$$T = 327,4 + 273 = 600,4 \text{ К};$$

$$\Delta S = 5760 : 600,4 = 9,59 \text{ Дж/К}.$$

Відповідь до задачі № 2: 2040 кДж/год

Відповідь до задачі № 3: 650 Вт/м²

Практичне заняття 9. Вивчення механізмів регуляції циклу трикарбонових кислот

1) *Відповідь 2, 4*

2) *Відповідь 2, 5*

3) *Відповідь 1, 2, 4*

Відповідь до задачі №1

Ізоцитратдегідрогеназа, 2-оксоглутаратдегідрогеназа, малатдегідрогеназа, оскільки вони є НАД⁺-залежними.

Відповідь до задачі №2

Мітка знаходиться в альфа-положенні (2) оксалоацетату.

Відповідь до задачі №3

У 1-му випадку синтезується 6 молекул АТФ; у 2-му - 7 молекул АТФ; у 3-му - 5 АТФ.

Практичне заняття 10. Енергетичний обмін. Окисне фосфорилування

1) *Відповідь: 1,2,3,5*

2) *Відповідь: 2,4,5*

3) *Відповідь: 1,2,3*

4) *Відповідь 1*

5) *Відповідь 3,7, 2, 1, 5, 4, 6*

6) *Відповідь 1, 2, 4, 5, 6*

7) *Відповідь 3, 1, 2, 5, 4, 6*

8) *Відповідь 1*

Відповідь до завдання № 1

Потужнішою отрутою буде антимицин, оскільки він блокує надходження водню на ділянці від убихінолу, а отже, водень не надходить не тільки від ФАД-залежних дегідрогеназ, а й від НАДН-дегідрогенази

Відповідь до завдання № 2

Для акумуляції енергії в цих організмів використовується субстратне фосфорилування.

Відповідь до завдання № 3

Олігоміцин блокує протонну АТФ-синтетазу, тому синтезу АТФ не відбувається.

Відповідь до завдання № 4

Швидкість поглинання кисню мітохондріями збільшиться, оскільки АДФ є активатором роботи дихального ланцюга

Відповідь до задачі № 5

Спочатку швидкість поглинання кисню збільшиться, а згодом знизиться, оскільки АДФ під час реакції перетворюється на АТФ.

Відповідь до завдання № 6

Малонат є конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази, тому робота циклу Кребса загальмується. Відновлені коферменти не надходять у дихальний ланцюг, і споживання кисню знижується.

Практичне заняття 14. Застосування іммобілізованих ферментів та клітин у біотехнологічних процесах

Розрахунок 1) Для гідролізу 1 г крохмалю необхідно 0,8 од. АС 15,06 т або $15,06 \times 10^6$ г крохмалю необхідно X од. АС $X = 0,8 \times 15,06 \times 10^6 = 12,05 \times 10^6$ од. АС. 2) У 1 мл ферментного препарату міститься 1600 од. АС. Для внесення $12,05 \times 10^6$ од. АС необхідно X мл ферментного препарату: $X = 12,05 \times 10^6 / 1600 = 0,0094 \times 10^6$ мл або 9,4 л ферментного препарату

Відповідь: 9,4 л ферментного препарату.