

Лабораторна робота №4

ВИЗНАЧЕННЯ ПРОДУКТІВ ГЛІКОЛІЗУ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ.

Теоретична» ВСТУП.

Біологічна роль вуглеводів визначається, насамперед, тим, що вони є основним джерелом енергії, необхідної для забезпечення метаболічних реакцій організму та важливим резервним енергетичним фондом, який здатний досить-швидко мобілізуватись, за потреби певні потреби організму. Під час окислення 1 г вуглеводів до кінцевих продуктів виділяється 17,2 кДж енергії. Всього за рахунок вуглеводів забезпечується 60-73% сукупної енергетичної цінності харчового раціону людини. Особливо важлива роль вуглеводів в енергозабезпеченні клітин головного мозку, де глюкоза є основним енергетичним джерелом.

Вивчення енергетики м'язової діяльності показало, що при роботі м'язів відбувається розпад вуглеводів і утворення продуктів їх окислення. Особливо важлива роль вуглеводів як основного джерела енергії при недостатньому постачанні тканин киснем (гіпоксія), при інтенсивній м'язовій роботі, коли постачання киснем затруднене.

Окислення вуглеводів у клітинах організму відбувається у дві стадії.

Перша стадія - гліколіз. При гліколізі глюкоза розщеплюється до піровиноградної-або-молочної кислоти. При такому розщепленні глюкози утворюється 4 молекули АТФ. Коли глюкоза відсутня, тоді організм включає в розщеплення резервний вуглевод глікоген

Біохімічні перетворення глюкози і глікогену починаються з утворення гексозофосфорних ефірів. При послідовних реакціях за допомогою ферментів ці ефіри перетворюються до 2-х молекул фосфогліцеринової кислоти, а остання віддає багатий енергією фосфорильований радикал молекулі АДФ з утворенням АТФ.

$\text{ДФГлК} + \text{АДФ} \rightarrow \text{ФГлК} + \text{АТФ}$

Фосфогліцерінова кислота окислюється далі, утворюючи фосфоенолпіровиноградяку кислоту, яка багата енергією і може її передавати на АДФ.

$\text{ФЕПВК} + \text{АДФ} \rightarrow \text{ПВК} + \text{АТФ}$.

Піровиноградна кислота в анаеробних умовах перетворюється у молочну кислоту, якщо ж присутній кисень - декарбоксилюється, утворюючи ацетил-коензим-А, який вступає в окислювальні реакції трикарбокових кислот (цикл Кребса). У цьому циклі вона окислюється до двох продуктів ССБ і CO_2 , виділяючи енергію у вигляді АТФ та тепло.

Молочна кислота накопичується в організмі, спричинює зсув рН в кислотну сторону, впливає на проницабельність клітинних мембран, активність ферментів та інше.

Біохімічні перетворення глюкози і глікогену до стадії утворення молочної кислоти можна вивчити на дослідах із сапкоприготування м'язовими екстрактами. М'язові

екстракти багаті на всі ферменти гліколізу. Якщо їм створити відповідні умови, процеси гліколізу уюкна відтворити у пробірці.

Мета Вивчити анаеробні процеси розщеплення вуглеводів в різних клітинах організму. Навчитися визначати молочну кислоту і самостійно дати оцінку за результатами досліду.

Програмні питання

1. Ферментативний гідроліз вуглеводів у травному тракті.
2. Гліколітичний (анаеробний) розпад вуглеводів.
3. Глікогеноліз, біологічне значення глікогенолізу.
4. Енергетичний ефект гліколізу та глікогенолізу.
5. Аеробне окислення вуглеводів, енергетичний ефект біологічного окислення.
6. Біологічне значення анаеробних та аеробних процесів в організмі при виконанні фізичних навантажень.

Питання для самопідготовки

1. Які ферменти органів травлення беруть участь у гідролізі полісахаридів?
2. Гліколіз та глікогеноліз. Спільність, відмінність, біологічна роль.
3. На яких етапах гліколізу утворюються молекули АТФ? Скільки молекул АТФ утворюється з однієї молекули глюкози?
4. Охарактеризуйте окисне фосфорилування.
5. Які вітаміни беруть участь в окисному декарбоксилюванні піровиноградної кислоти⁰
6. В яких умовах відбувається перетворення молочної кислоти в піровиноградну?
7. Дайте характеристику циклу трикарбоксичних кислот (ЦТК).
8. Гліконеогенез. його біологічна роль.

ХІД РОБОТИ

1. Якісна реакція на молочну кислоту

У пробірку наливають 1 мл реактиву Уффельмана і додають водний розчин молочної кислоти.

Молочна кислота, взаємодіючи з хлорним залізом, яке міститься в реактиві Уффельмана, дає зелено-жовте забарвлення внаслідок утворення молочнокислого заліза.

2. Якісне визначення гліколізу.

У дві пробірки поміщають приблизно по 1 г свіжоприготованих дрібно нарізаних м'язових волокон і заливають їх 3-5 мл фосфатного буфера (рН 8,0). У першу пробірку (контрольну) доливають 1 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти для денатурації ферментів. Після цього в обидві пробірки доливають по 1 мл 1%-го розчину крохмалю і

добре збовтують. У колону пробірку додають по 10 крапель вазелінової олії для створення безкисневих (анаеробних) умов. Пробірки помішають в термостат з температурою 37° С на 1 годину. Після години інкубації виймають обидві пробірки. У дослідну доливають 1 мл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти для того, щоби денатурувати ферменти і припинити ферментативну реакцію.

Вміст обох пробірок відфільтровують у чисті пробірки (контроль і дослід): обидві пробірки (контрольну і дослідну) додають по 0,5 г оксиду кальцію і по 0,5 мл 20% розчину сірчаної кислоти для того, щоб осадити вільні вуглеводи, які ще містяться в фільтраті.

Пробірки збовтують 1-2 хв і знову піддають фільтрації

З фільтратами в контрольній і дослідній пробірках проробляють якісну реакцію на молочну кислоту (дослід описаний з роботи № 1).

У м'язовій тканині містяться всі ферменти, які супроводжують гліколітичний процес:

Тому, створивши відповідні умови: рН 8,0, температура 37 С, перекритий доступ кисню, отримаємо: у пробірці буде інтенсивно відбуватися гліколітична реакція з утворенням молочної кислоти.

При виконанні фізичних навантажень високої інтенсивності, коли доступ кисню обмежений, у м'язовій тканині буде інтенсивно відбуватися гліколітична реакція з утворенням молочної кислоти.