

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет агротехнологій

Кафедра ґрунтознавства та агрохімії

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для
здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162
«Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання

**МИКОЛАЇВ
2017**

УДК 577.1
Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету агротехнологій Миколаївського національного аграрного університету від 27.04.2017 р., протокол № 8.

Укладач:

О. А. Бабич – асистент кафедри ґрунтознавства та агрохімії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

О. І. Юлевич – кандидат технічних наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнологій, Миколаївський національний аграрний університет.

Г. М. Ющишина – кандидат хімічних наук, доцент кафедри хімії та біохімії, Миколаївський національний університет ім. В. О. Сухомлинського.

ВСТУП

Біохімія може бути визначена як хімія живих об'єктів (клітин і організмів). Живі об'єкти відрізняються від неживих своєю здатністю до метаболізму і відтворення (з передачею генетичної інформації). При цьому живі істоти являють собою складову частину природи і підкоряються всім основним її законам, таким як закон збереження маси та енергії, основним законам термодинаміки.

Живі об'єкти є відкритими системами, а це означає, що вони приймають участь в обміні речовин і енергії з довкіллям. Цей обмін здійснюється за допомогою субстратів (джерел вільної енергії) і надходженням зовні інформації, що приводить до зниження ентропії і підвищення рівня організації живих істот.

Біохімічні реакції перебігають порівняно з іншими у вузьких інтервалах фізичних і хімічних параметрів. Крім обмеження температури і тиску це стосується і концентрації (активності) іонів, рН середовища.

Біохімічні реакції можуть проходити при дотриманні визначених енергетичних обмежень. Більшу частину енергії живі системи отримують за рахунок окисно-відновних реакцій. Відбуваючись в організмі, ці реакції є або екзергонічними (перебігають спонтанно) або ендергонічними (потребують для здійснення зовнішніх джерел енергії).

Біохімічні реакції відбуваються зі швидкостями, що залежать від концентрації реагуючих молекул і констант швидкостей, характерних для даного типу реакцій. Ці швидкості можуть суттєво змінюватися за наявності каталізаторів (ферментів). Таким чином, біохімічні реакції в живих об'єктах контролюються різними шляхами.

У методичних розробках подано основні підходи щодо визначення головних біохімічних реакцій, що відбуваються в організмі при зміні зовнішніх фізико-хімічних параметрів.

При підготовці до занять студентам рекомендовано відпрацювати відповідний матеріал з підручника та лекційних занять, а потім відповісти на контрольні питання.

Після закінчення лабораторної роботи студент робить висновки з відповідними підрахунками, хімічними рівняннями, рисунками.

Лабораторні заняття з дисципліни «Біохімія з основами фізичної та колоїдної хімії» проводяться відповідно до Європейської кредитно-

трансферної системи навчання студентів. Обсяг лабораторних занять з дисципліни – 32 години, кредитів – 0,88 кредита.

ОЦІНЮВАННЯ ЗНАТЬ ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ»

Оцінювання лабораторної роботи здобувача вищої освіти складається з наступних етапів:

1. Перевірка теоретичних знань з теми лабораторної роботи (усно або письмово);
2. Виконання студентом лабораторних дослідів із послідовним фіксуванням результатів роботи (фотозйомка, замальовування, записи отриманих результатів до таблиць). Оформлення лабораторної роботи із використанням результатів отриманих на занятті з формулюванням повного висновку з теми;
3. Захист лабораторної роботи.

Кожен етап оцінюється за 5 бальною шкалою, виводиться середнє арифметичне із 3-х оцінок, яка і буде кінцевою для оцінювання знань з лабораторної роботи.

Модуль	Кількість ЛР в модулі	Загальна оцінка за ЛР	Кількість ЛР в модулі	Загальна оцінка за ЛР	Загальна сума балів	Дільник	15	МКР	Повна оцінка за модуль
I	7	35/21	6	30/18	75/39	4,33	15/9	5/3	20/12
II	5	25/15	6	30/18	55/33	3,66	15/9	5/3	20/12
III	3(1)	15/9	4	20/12	35/21	2,33	15/9	5/3	20/12
Сума	16	75/45	16	80/48	165/93		45/27	15/9	60/36
Іспит									40/24
Оцінка									100/60

Курс складається з 3-х модулів із лабораторних і практичних робіт, за які здобувач може отримати максимум 5 і мінімум 3 бали (див. таблицю). Наприклад, здобувач вищої освіти за модуль 1 отримав 20 балів в сумі за лабораторні і 28 балів за практичні роботи. Загальна сума – 48 балів. Далі ця сума ділиться на спільний ДІЛЬНИК щоб перевести це значення в 15 бальну шкалу, в нашому випадку – $48 / 4,33(\text{I модуль}) = 11$ балів. Потім до цього значення додається результат модульної контрольної роботи №1, наприклад – 3 бали. Отже здобувач, в результаті отримує $11+3 = 14$ балів за I модуль. При завершенні курсу, якщо студент отримує не нижче 36 балів, здобувач складає іспит, за які отримує від 24 до 40 балів. Результат іспиту складається із набраними балами за практичний і лабораторний курс і переходить в 100 бальну шкалу. Якщо здобувач вищої освіти отримує

за лабораторний і практичний курс нижче 36 балів – він до іспиту не допускається і йде на повторний курс вивчення дисципліни. Якщо на іспиті здобувач отримує загальну оцінку нижче 60 балів – студент також йде на повторний курс вивчення дисципліни.

МОДУЛЬ I. ОСНОВИ ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Білки – це високомолекулярні речовини, що побудовані з залишків амінокислот.

Білки мають велику молекулярну масу, чим особливо відрізняються серед інших органічних сполук. Велика молекулярна маса білків пояснює виражений колоїдний характер їх водних розчинів. Водні розчини білків дають навіть у молекулярно-дисперсному стані колоїдні розчини. Це означає, що діаметр білкових часток у розчині більше 0,001 мк.

Білки, як високомолекулярні колоїдні сполуки, мають гідрофільні властивості, бо вони мають велику спорідненість з водою, а такі сполуки легко розчиняються в ній.

Білки, як колоїди, мають усі властивості останніх. Розчини білків опалесциують, у них спостерігаються явище Фарадея - Тиндаля, броунівський рух, вони не проходять через ультрафільтри, мають низький осмотичний тиск та ін.

Важливою властивістю білків є їх розчинність у воді, водно-сольових розчинах і в водних розчинах полярних розчинників (спирт).

Процес розчинення білків щільно пов'язаний з гідратацією їх макромолекул, і будь-який фактор, що порушує цю гідратацію, буде в той же час знижувати розчинність білків у воді та сприяти випаданню їх в осад.

Зменшення гідратації колоїдних часток білка легко досягається додаванням до їх розчинів водозабірних засобів. До таких дегідратуєчих речовин відносять спирт, ацетон, розчини нейтральних солей лужних металів та ін. Ці речовини осаджують білки без явища денатурації, а солі важких металів, навпаки, осаджують білки з денатурацією, сутність якої зводиться до втрати білками гідрофільних та набуття гідрофобних властивостей.

Як відомо, при певних умовах гідрофобний денатурований колоїд може стійко зберігатися у вигляді золю. Причиною такої стійкості є великий заряд, що перешкоджає зближенню і зіткненню колоїдних часток, усуваючи тим самим можливість утворення більш крупних агрегатів, які можуть випадати в осад. Зняття заряду з частки або

зменшення його до критичної величини неминуче призводить до зниження стійкості золю та створює передумови для коагуляції та осадження замулених часток.

Реакції осадження білків можна поділити на дві групи: 1 - без явища денатурації (солями нейтральних лужних металів), 2 - з денатурацією (солями важких металів, підвищеною температурою, сильними мінеральними та органічними кислотами, алкалоїдами).

ДОСЛІД 1

Реакції осадження білків без денатурації

При цих реакціях білки не підлягають глибоким змінам і утворені ними осад (гель) знову можуть бути розчинені у висхідному розчиннику (переведені в золь). Макромолекули білків при цьому зберігають свої первинні властивості та не підлягають істотним змінам (денатурації).

Зворотне осадження білків досягається додаванням до водних розчинів нейтральних солей лужних металів. До цих солей відносять такі сполуки: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , Na_2SO_4 , NaCl , KCl . Механізм дії цих солей на колоїдну частку веде до адсорбції на останній іонів з протилежним зарядом і, таким чином, білкова частка стає електронейтральною (йде знімання заряду), внаслідок чого знижується її стійкість у розчині. Крім цього, солі лужних металів, розчиняючись, зв'язують велику кількість води, що при достатньо великих концентраціях веде до дегідратації колоїдних часток і позбавляє останні другого фактора стійкості – гідратаційної оболонки. Білки при цьому випадають в осад. Цей метод осадження білків (або осадження іонами солей лужних металів) має назву висолювання. Осади білків (гель), що утворені висолюванням, можуть бути знову розчинені, якщо зменшити концентрацію солей діалізом або розведенням водою. Висолювання білків, таким чином, є зворотним процесом.

ХІД РОБОТИ:

У пробірку наливають 2 – 3 мл сироватки крові або розведеного яєчного білка. Додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію, збовтують. У осад випадають білки – глобуліни.

До розчину з осадом білків додають рівний об'єм дистильованої води, добре перемішують і спостерігають поступове зникнення осаду білків.

У дві пробірки наливають по 2 – 3 мл сироватки крові або розчиненого яєчного білка.

У першу пробірку додають до повного насичення кристали NaCl, а в другу - MgSO₄. За 2 хвилини в обох пробірках з'являється осад глобулінів.

ДОСЛІД 2

Осадження білків іонами важких металів

Під впливом іонів солей важких металів (свинцю, міді, срібла, ртуті, та ін.) білки зі стану золю безповоротно коагулюють у гель. Іони солей важких металів з білками утворюють міцні комплексні сполуки. Крім цього, важкі метали знімають електричний заряд і глибоко змінюють вторинну та третинну будову макромолекул білка.

При осадженні білків солями важких металів потрібні слабкі концентрації та невелика кількість їх порівняно до солей нейтральних і лужних металів.

При надлишку оцтовокислого свинцю, сірчаноокислої міді спостерігається розчинність утвореного ними осаду. Таке явище можна пояснити адсорбцією надлишку іонів металу та перезарядженням білкового комплексу, внаслідок чого в розчин переходить комплекс зміненого білка з металом. Таке явище спостерігається й при додаванні достатньої кількості хлориду натрію, який спричиняє розчинення осаду ртутної сполуки білка.

Осади білків, утворені при дії солей важких металів не розчиняються в первинному розчиннику (воді) або в слабких розчинах солей навіть після вилучення солей діалізом або розведення водою.

ХІД РОБОТИ:

У три пробірки наливають по 1 – 2 мл розчину білка. Додають краплями у першу розчин ацетату свинцю, а в другу – сульфату міді, в третю – нітрату срібла. В пробірках утворюється осад білків.

У пробірки з осадами від оцтовокислого свинцю та сірчаноокислої міді додають надлишок цих солей. Спостерігають при цьому розчинення осадів.

ДОСЛІД 3

Осадження білків мінеральними кислотам

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфорної) спричиняють зворотне осадження білків із розчину. Це осадження пояснюється явищем дегідратації колоїдних часток білка, зняттям

заряду, утворенням солей з білка та кислот. Надлишок мінеральних кислот (за винятком азотної) розчиняє осад білків, що випадає при їх додаванні.

ХІД РОБОТИ:

У три пробірки обережно наливають по 1 мл кислот: у першу – соляну, в другу – сірчану, в третю – азотну. В ці пробірки обережно нашаровують на кислоту приблизно по 1 мл розчину білка. На межі двох рідин спостерігається поява осаду білків у вигляді невеликого білого кола.

Кожну пробірку обережно збовтують. Спостерігають розчинення осаду в першій та другій пробірках, де є надлишок соляної та сірчаної кислот, а в третій пробірці осад не зникає при збовтуванні, оскільки за надлишку азотної кислоти він не розчиняється.

ДОСЛІД 4

Осадження білків кип'ятінням

Більшість білків при нагріванні зсідуються, перетворюючись безповоротно на гель. Для різних білків температура їх коагуляції неоднакова. Деякі білки коагулюють при температурі 50 – 55⁰С, а інші можуть витримувати нетривале кип'ятіння.

Механізм температурної коагуляції та денатурації білків пов'язаний з перебудовою структури макромолекул білка, зокрема колоїдної частки білка під впливом підвищеної температури, вони з гідрофільних робляться гідрофобними. Іде глибока та незворотна зміна третинної та вторинної будови молекул білка – вони вивертаються "навиворіт".

Температурна денатурація білків проходить повільно і прискорюється з підвищенням температури. Швидкість коагуляції залежить від присутності в розчині іонів солей та іонів водню. Особливо швидко і повно осаджуються білки при нагріванні в ізоелектричній точці, при такому рН, коли колоїдні частки залишають свій електричний заряд і робляться нестійкими в розчині.

У дуже кислих розчинах білкові частки перезаряджаються внаслідок їх амфотерних властивостей та несуть позитивний заряд, що збільшує їх стійкість.

Аналогічно поведуть себе білкові міцели в дуже сильних лугах. У лужних розчинах стабільність білкового колоїду зумовлена негативним зарядом колоїдних часток.

Таким чином, у дуже кислих та лужних розчинах білки не випадають в осад при нагріванні. За додавання до кислих розчинів білків нейтральних солей можлива коагуляція.

ХІД РОБОТИ:

Наливають у п'ять пробірок по 2мл розчину білка. Нагрівають в першій пробірці та спостерігають поступове випадіння білку в осад.

В другу пробірку додають одну краплю 1% ацетатної кислоти та нагрівають. Осад білка випадає швидше і повніше, оскільки білок в цьому випадку знаходиться в ізоелектричній точці.

В третю пробірку додають 0,5 мл 10% оцтової кислоти та нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні.

В четверту пробірку додають 0,5 мл 10% оцтової кислоти та три чотири краплі насиченого розчину хлориду натрію та нагрівають. Осад білка утворюється швидше. В п'яту пробірку додають 0,5 мл 10% розчину гідроксиду натрію та нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні.

Поясніть причину у висновку.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ.

1. Що таке білки? Склад білків.
2. Сучасні уявлення про структуру білків.
3. Фізико-хімічні властивості білків.
4. Чим денатурація білків відрізняється від висолювання?
5. Механізм коагуляції білка.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2 КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ

Білки –це біологічні полімери, мономерами яких є амінокислоти. Амінокислоти сполучаються одним із одним за рахунок пептидних звязків, які утворюються в результаті реакції поліконденсації між карбоксильною групою однієї амінокислоти і аміногрупою іншої. Поліпептидний ланцюг, в залежності від складу амінокислот, набуває різних типів конформацій – первинна, вторинна, третинна і четвертинна. Кількість амінокислот, які формують білки, дорівнює 20 і додаткові 2, які є похідними основних амінокислот. Амінокислоти класифікують на ароматичні, кислі, основні, аліфатичні в залежності від типу вуглеводневого радикалу і відношення кількості аміногруп і карбоксильних груп у молекулі амінокислоти. Хімічні властивості білків також буде залежити від амінокислотного складу, вступаючи в певні якісні реакції.

Біуретова реакція (взаємодія білку із гідроксидом міді в лужному середовищі) вказує на наявність пептидних звязків у сполуці. За рахунок таутомерних перетворень, пептидний звязок ізомеризується, утворюючи вільну –ОН групу, і білок проявляє себе як багатоатомний спирт, взаємодіючи із нерозчинним $\text{Cu}(\text{OH})_2$, утворюючи біуретовий комплекс темно-синього кольору.

Ксантопротеїнова реакція (взаємодія білку із концентрованою азотною кислотою) є якісною на ароматичні амінокислоти (тирозину, фенілаланіну) у складі білка. Реакція базується на заміщенні атомів Н у бензольному циклі ароматичних амінокислот, що утворює осад білку жовтого кольору.

Реакція Фоля – якісна реакція на вміст у білку залишків сірковмісних амінокислот (метіоніну, цистеїну, цистину). Баується на взаємодії солей свинцю із атомами сірки сірковмісних амінокислот. В результаті утворюється чорний осад сульфїду свинцю.

ХІД РОБОТИ:

ДОСЛІД 1

Біуретова реакція на білок

До пробірки додають 1 мл 5-10% розчину гідроксиду натрію і декілька краплин насиченого розчину сульфату міді. Утворюється осад блакитно-синього кольору (реакція 1). До утвореного осаду додають 3

мл 10% розчину яєчного білку. Відбувається розчинення осаду і утворення темно-синього комплексу – біурету (реакція 2.).

Написати хімічні реакції даного досліду. Зробити висновок про умови проходження реакції.

ДОСЛІД 2

Ксантопротейнова реакція на білок

До 2 мл 10% розчину яєчного білку додаємо 1 – 2 мл концентрованої нітратної кислоти. Йде утворення жовтого осаду білку (реакція 3). До утвореного жовтого осаду додаємо концентрований розчин аміаку. Жовтий колір осаду повинен змінитись на оранжевий (реакція 4).

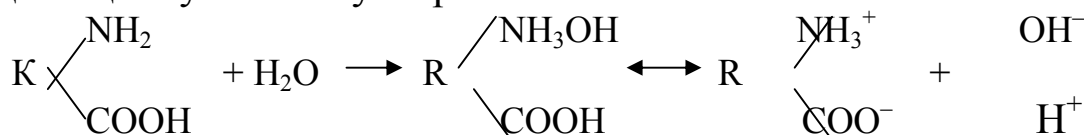
Написати хімічні реакції даного досліду. Зробити висновок про умови проходження реакції.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3 ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ БІЛКІВ

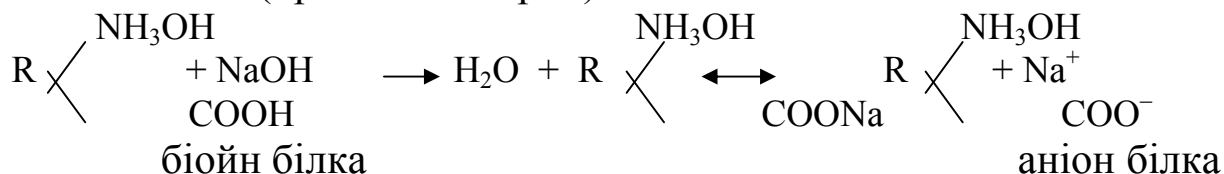
Білки – за хімічними властивостями є амфотерними сполуками, бо їх молекули мають вільні карбоксильні та амінні групи. Кислотні властивості білків зумовлені за рахунок кінцевих карбоксильних груп та дикарбонових амінокислот. Кисле середовище допомагає утворювати фенольні гідроксили в складі тирозину та сульфгідрильні групи сірковмісних амінокислот.

Лужні властивості білків пов'язані з амінними, імінними та гуаніновими групами діамінокислот.

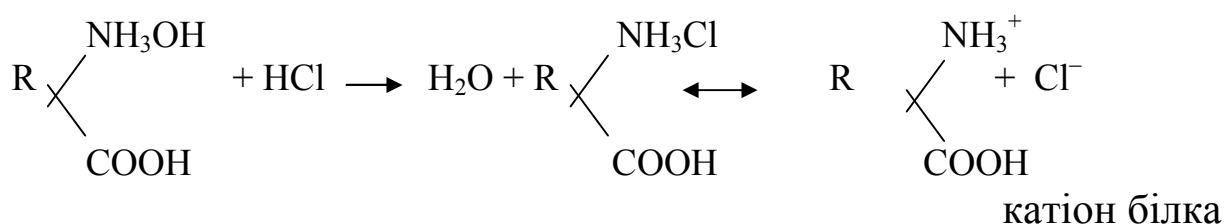
Належність одночасно кислих та лужних груп в білках у водному середовищі обумовлює утворення бііонів:



У лужному середовищі білки відіграють роль аніону. Втративши протон з групи – NH₃⁺, наприклад, при дії їдкого натру, утворюється натрова сіль білка (протеїнат натрію):



У кислому середовищі білок відіграє роль катіону: наприклад, з соляною кислотою утворюється хлоридна сіль (протеїн-хлорид):



Отже, головним фактором поведінки білка в розчині є концентрація іонів водню. В кислому середовищі зменшується дисоціація карбоксильних груп і білок переходить в аніон. При визначеному значенні рН (для кожного білка неоднакове) дисоціація карбоксильних груп білка стає рівною лужній: кількість позитивних зарядів білкової молекули зрівнюється з кількістю негативних і в цілому заряд білкової частки рівняється нулю. Білок, позбавлений електричного заряду, знаходиться в ізоелектричному стані і в електричному полі не буде переміщуватися ні до аноду, ні до катоду, а

pH розчину, за якого білок перебуває в ізоелектричному стані, називається ізоелектричною точкою білка, або ізопунктом білка (ІЕТ).

Розчини білка в ізопункті проявляють найменшу стійкість, оскільки як стабілізуючий фактор залишається тільки гідратаційна оболонка.

У більшості білків ізоелектрична точка близька до нейтральної реакції середовища, але дещо зміщена в кислий бік, що пояснюється перевагою кислих властивостей над лужними, тому в нейтральному розчині вони поводять себе як слабкі кислоти.

Невелика кількість білків (гістони, протаміни) мають більше амінних груп, вони багатші діамінокислотами. В нейтральному середовищі вони поводять себе як слабкі основи; їх ізоелектрична точка знаходиться у слабо лужному середовищі.

ХІД РОБОТИ:

Готують серію буферних розчинів:

Вміст пробірок збовтують.

У пробірку № 4 додають з піпетки повільно (при помішуванні) стільки спирту, щоб через деякий час залишилася ледве помітна каламуть. Для цього потрібно, як правило, 2 – 3 мл спирту.

До всіх останніх пробірок додають при помішуванні стільки спирту, скільки його додавали в пробірку № 4.

Спостерігають через 20 – 30 хвилин замулення, яке позначають за нижченаведеною схемою:

- + слабка коагуляція
- ++ більш сильна коагуляція
- +++ найбільш сильна коагуляція

Розчин	№ пробірки					
	1	2	3	4	5	6
	кількість в мл					
CH ₃ COONa 0,1 н	2	2	2	2	2	2
CH ₃ COOH 0,1 н	0,25	0,5	1	2	4	-
CH ₃ COOH 1,0 н	-	-	-	-	-	0,8
Дистильована вода	3,75	3,50	3	2	-	3,2
Желатин, 1 %	2	2	2	2	2	2
pH	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Коагуляція	-	-	++	+++	+-	-

Отже, ІЕТ желатину дорівнює рН – 4,7. Залежно від сорту желатину ІЕТ може змінюватися в невеликій межі.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке ізоелектричний стан білків? Його значення у формуванні структури білкових молекул.
2. Що таке ізоелектрична точка білків?
3. Від чого залежить заряд білків?
4. Ізоелектрична точка білка дорівнює 4,7. Який заряд має цей білок, якщо рН = 3, рН = 6,9?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

РОЗПОДІЛЬЧА ХРОМАТОГРАФІЯ АМІНОКИСЛОТ (НИЗХІДНА)

Адсорбція – поглинання однієї речовини на поверхні іншої (адсорбенту) за рахунок вільної поверхневої енергії. Найбільшу властивість адсорбції мають системи з великим запасом вільної поверхневої енергії – колоїдні системи. Адсорбція буває молекулярною та іонною.

Явище адсорбції знайшло застосування в розподільчій хроматографії суміші, що складається з декількох близьких за будовою і властивістю речовин. Розділення суміші речовин застосовано на неоднаковому коефіцієнті розподілену (коефіцієнт розподілу – це відношення швидкості руху речовини до швидкості руху розчинника). Володіючи характерними коефіцієнтами розподілу, кожна речовина, просочуючись разом з розчинником через шар адсорбенту, адсорбується на різній висоті цього шару – проходить хроматографічний розподіл суміші речовин. Як адсорбент при хроматографії застосовується спеціальний папір, по капілярах якого просочується розчинник, що тягне за собою розчинені речовини; оскільки коефіцієнт розподілу у різних речовин буде неоднаковий, то кожна речовина відкладається на різних ділянках паперу. У разі хроматографії кольорових речовин ділянки їх адсорбції будуть видимі, а у разі не кольорових речовин папір після хроматографії обробляють спеціальними реактивами, що дають з досліджуваними речовинами кольорові комплекси. За появою кольору знаходять ділянки відкладання досліджуваних речовин.

ХІД РОБОТИ:

1. Готують камеру для хроматографії. На дно камери наливають невелику кількість розчинника, який при випаровуванні насичує камеру парами, що запобігають висиханню фільтрувального паперу. До верхньої частини камери прикріплюють ванночку в точно горизонтальному положенні та наливають туди розчинник.

2. Беруть смужку хроматографічного паперу завширшки 5 см та, залишаючи від краю 8 – 10 см, наносять 0,005 – 0,01 мл суміші амінокислот за допомогою мікропіпетки. Утворену пляму швидко просушують над електроплиткою. Кінець смуги паперу, де ближче

нанесена крапля суміші, опускають у ванночку з розчинником, а другий кінець повинен вільно звисати через отвір у ванночці до камери. Слід запам'ятати, що смуга паперу повинна звисати точно вертикально і не торкатися своїм вільним кінцем ні стінок, ні дна камери, а також до розчинника на дні камери. В ванночці смужка паперу фіксується предметним склом або скляною паличкою.

Підготовлена таким чином камера герметично закривається скляною кришкою. В процесі хроматографії розчинник повинен пройти вздовж усієї смуги паперу, потягнувши за собою амінокислоти. Через різний коефіцієнт розподілу суміш амінокислот розділяється на окремі амінокислоти, які адсорбуються на різних ділянках смуги фільтрувального паперу.

Коли розчинник дійде до кінця смуги, папір витягують з камери та висушують на повітрі або у витяжній шафі. Для кращого розподілу суміші пропускання розчинника можна повторити. Висушену смугу паперу обприскують розчином нінгідрину і поміщають у сушильну шафу при температурі 60⁰С на 10 – 15 хвилин для проявлення кольору. На висушеній смугі знаходять окремі лілові плями, які відповідають розміщенню окремих адсорбованих амінокислот з узятої суміші.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Що таке протеолітичні амінокислоти? Їх класифікація.
2. Що таке незамінні й замінні амінокислоти? Навести приклади.
3. Як утворюється пептидний зв'язок між молекулами амінокислот?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5 АНАЛІЗ СКЛАДУ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ

Нуклеопротеїди – це складні білки, що складаються з простих білків і пов'язані з нуклеїновими кислотами.

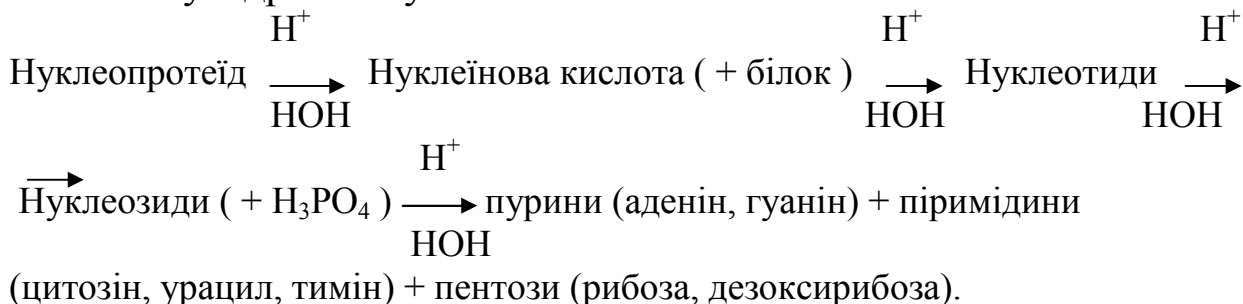
Розрізняють два типи нуклеїнових кислот – рибонуклеїнову та дезоксирибонуклеїнову.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) входить до складу хромосом ядра клітин, а рибонуклеїнова кислота (РНК) є, головним чином, у цитоплазмі клітини та її структурних утвореннях (мітохондрії, рибосоми). У хімічному відношенні нуклеїнові кислоти – це полінуклеотиди. Кожний мононуклеотид складається з пуринової або піримідинової основи, вуглеводу - пентози (рибоза, дезоксирибоза) та фосфорної кислоти.

До складу РНК як вуглевод входить рибоза, а як пуринові та піримідинові основи – аденін, гуанін, цитозин і урацил.

До складу ДНК замість рибози входить дезоксирибоза, а замість урацилу – тимін.

При кип'ятінні нуклеопротеїдів з розчиненими кислотами проходить їх гідролітичний розклад: спочатку відщеплюються білки, а нуклеїнові кислоти деполімеризуються, потім гідролізуються мононуклеотиди, відщеплюючи пуринові основи, вуглевод пентозу та фосфорну кислоту. Піримідинові основи відщеплюються лише при глибокому гідролізі нуклеїнових кислот:



ДОСЛІД 1

Одержання нуклеопротеїдів з дріжджів

5 г дріжджів поміщають у ступку, додають 10 краплин ефіру і 10 краплин води. Вносять щіпку скляного піску і ретельно розтирають. До гомогенату доливають 30мл розчину NaOH (0,4%) і продовжують розтирання протягом 15 хвилин.

Вміст ступки розливають у три центрифужні пробірки, доводячи об'єм до 10 мл центрифугують протягом 5 – 10 хвилин при 2500 обертах.

Центрифугат з усіх пробірок зливають в одну склянку, постійно перемішуючи паличкою, додають розчин 5% оцтової кислоти (12мл) до повного осадження нуклеопротейду.

Осад нуклеопротейду збирають за допомогою другого центрифугування та використовують для реакції гідролізу.

ДОСЛІД 2

Гідроліз нуклеопротейду

Нуклеопротейд, одержаний з дріжджів, переносять у колбочку для гідролізу, додають 15мл 5% розчину сірчаної кислоти. Колбочку закупорюють пробкою зі зворотним холодильником і обережно кип'ятять протягом часу.

Після охолодження гідролізат фільтрують у хімічну склянку, і використовують для аналізу продуктів гідролізу.

АНАЛІЗ ПРОДУКТІВ ГІДРОЛІЗУ НУКЛЕОПРОТЕЇДІВ

ДОСЛІД 1

Виявлення простих білків

У пробірку наливають 0,5мл профільтрованого гідролізату, нейтралізують за лакмусом NaOH (10%) і додають ще 0,5мл, потім 2-3 краплини сульфату міді. Пробірку збовтують і спостерігають позитивну біуретову реакцію (рожевий або фіолетовий колір).

Напишіть рівняння реакції.

ДОСЛІД 2

Відкриття пентоз

У пробірку наливають 0,5-1мл гідролізату та нейтралізують за лакмусом 10% розчином NaOH.

До нейтралізованого гідролізату додають рівний об'єм реактиву Фелінга, пробірку збовтують та нагрівають. Спостерігають появу жовто-червоного кольору осаду закисі та окисі міді.

Напишіть рівняння реакції.

ДОСЛІД 3

Відкриття пуринових основ

У пробірку наливають 2мл гідролізату нуклеопротеїду, додають 5-6 краплин концентрованого аміаку до лужної реакції на лакмус. Потім доливають 0,5мл аміачного розчину срібла. Утворюється хлоп'яний осад сріблястих пуринових основ, який поступово осідає на дно.

ДОСЛІД 4

Відкриття фосфорної кислоти

У пробірку наливають 2мл кислого гідролізату, додають 3мл молібденово кислого амонію та 0,4 мл ейконогену. Добре перемішують. Спостерігають появу синього забарвлення суміші.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Напишіть стадії повного гідролізу нуклеопротеїдів.
2. Напишіть формули піридинових та пуринових основ, що входять до складу РНК та ДНК.
3. Напишіть будь-який нуклеотид, що входить до складу ДНК.
4. Яким чином проходить з'єднання нуклеотидів в нуклеїнових кислотах?
5. В чому полягає правило Чаргафа?
6. Будова ДНК та її локалізація у клітині.
7. Будова та види РНК. Її локалізація у клітині.
8. Як проходить перетравлення нуклеїнових кислот у шлунково-кишковому тракті?
9. Особливості синтезу нуклеїнових кислот.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Ферменти – білки, що каталізують певні хімічні реакції в процесах обміну речовин і відзначаються надзвичайно високою ефективністю і специфічністю своєї дії.

Усі ферменти можна поділити на два великих класи: 1 - ферменти-протеїни, що складаються лише з білка; 2 – ферменти-протеїди, що містять білок і активну речовину небілкової природи.

У простих ферментах каталітична активність визначається тільки хімічною будовою і просторовим розташуванням поліпептидного ланцюга білкової молекули.

Білковий компонент складних ферментів називають апоферментом, а небілковий – простетичною групою, або коферментом. Міцність зв'язку між білком і простетичною групою в різних складних ферментах неоднакова.

Втративши простетичну групу, складні ферменти дезактивуються. Білковий компонент впливає на ефективність дії складних ферментів і зумовлює специфічність взаємодії між ферментом і субстратом.

І в простих, і в складних ферментах у каталітичному акті безпосередньо бере участь не вся білкова молекула, а лише певні її ділянки, що називаються активним центром ферменту.

Усі різноманітні хімічні перетворення, що складають основу життєдіяльності організму, відбуваються за участю біологічних каталізаторів – ферментів, які є специфічними білками.

Завдяки ферментам проявляється одна з особливостей живих клітин – здатність до здійснення складних реакцій у дуже короткий час за порівняно низької температури. Біологічне значення цього явища дуже велике.

ДОСЛІД 1

Термостабільність ферментів

При реакціях, що каталізуються ферментами, а також при хімічних реакціях, за підвищення температури збільшується реакційна здатність. Але ферменти є білки, які за високої температури можуть незворотно денатуруватися. Для ферментативної дії характерно, що підвищення температури спочатку приводить до збільшення швидкості реакції, а потім до швидкого її зниження. Температурний

оптимум більшості ферментів тваринного тіла близький до температури тіла і лежить у межах $(37 - 40)^{\circ}\text{C}$. Особлива чутливість ферментів до температури є однією з властивостей, що якісно відрізняє їх від неорганічних каталізаторів. При низькій температурі припиняється ферментативна діяльність. Цей процес є зворотним.

ХІД РОБОТИ:

У чотири пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. В пробірки № 1, №2, №3 додають по 2 – 3 мл розбавленої слини. У четверту пробірку додають 2 – 3 мл прокип'яченої слини. Перемішують вміст кожної пробірки. Першу пробірку ставлять у посуд з кригою (0°C), другу – залишають у штативі при кімнатній температурі, третю і четверту – поміщують у водяну баню при температурі $(38 - 40)^{\circ}\text{C}$.

Через 10 хвилин пробірки, які були в бані, охолоджують і до них додають розчин йоду в йодистому калії (0,02н) (із першої пробірки для реакції з йодом відлити трохи рідини). У першій пробірці рідина забарвлюється в синій колір, у другій – у фіолетовий або червоно-бурий, у третій пробірці – в жовтий, у четвертій – у синій. Якщо помістити пробірку № 1 у водяну баню при $(38 - 40)^{\circ}\text{C}$ на 10 хвилин, відбудеться гідроліз крохмалю, що і покаже реакція з йодом. Таким чином може бути показана зворотна гальмуюча дія низької температури на активність ферменту.

ДОСЛІД 2

Вплив рН на дію ферменту

Активність ферменту змінюється залежно від величини рН. Для дії різних ферментів оптимум рН різний. Взагалі ферментативні властивості має не вся поверхня молекули, а її точно обмежена ділянка. Просторове розташування цієї ділянки є дуже важливим для дії ферменту. Зміна електричного заряду молекули ферменту – білка, що відбувається під впливом рН та пов'язана зі зміною ступеня дисоціації дисоціюючих груп білка, призводить до зміни будови та просторового розташування поліпептидного ланцюга. При зміні ступеня дисоціації одні групи ланцюга наближаються один до одного, а другі – віддаляються. Ця зміна просторового розташування активних ділянок молекули ферменту під впливом рН і приводить до зміни швидкості ферментативної дії.

ХІД РОБОТИ:

У шести пронумерованих пробірках готують фосфатні буферні суміші з різними рН таким чином:

Реактиви	№ пробірки					
	1	2	3	4	5	6
0,15 М розчин KH_2PO_4	9,5	9,0	7,0	5,0	3,0	1,0
0,15 М розчин Na_2HPO_4	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
Спостереження
рН буферної суміші	5,59	5,91	6,47	6,81	7,17	8,1

Потім у шість інших пронумерованих пробірок наливають по 5 мл свіжоприготовленого 0,5% розчину крохмалю. В кожну з пробірок додають по 1 мл фосфатної буферної суміші з різним значенням рН. Потім у кожну пробірку доливають по 1 мл розбавленої слини, перемішують і ставлять у водяну баню при 38 – 40⁰С. Через 3 – 5 хвилин із пробірки № 3 беруть кілька крапель розчину і проводять реакцію з розчином йоду в йодистому калії, причому цю операцію повторюють кілька разів (через кожні 2 хвилини) до того часу, доки в пробірці № 3 не відбудеться повне розщеплення крохмалю (з'являється жовто-червоний колір). Після цього в інші пробірки додають по кілька крапель розчину йоду в йодистому калії.

Вміст пробірок забарвлюється в різні кольори відповідно до глибини ферментативного гідролізу крохмалю:

№ пробірки	рН	Колір з йодом
1	5,59	синій
2	5,91	фіолетовий
3	6,47	червоний
4	6,81	жовтий
5	7,17	червоний
6	8,1	фіолетовий

Найбільш повний розклад крохмалю відбувся а пробірці № 3. Це означає, що рН даного розчину (приблизно 6,8) є найбільш сприятливим для дії амілази слини.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Дати визначення поняттю «ферменти»
2. Класифікація ферментів, біохімічні реакції, які вони каталізують;
3. Механізм дії ферментів;
4. Вплив фізико-хімічних факторів на активність ферментів;
5. Особливості будови ферментів;

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

СПЕЦИФІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІЛАЗИ СЛИНИ

ДОСЛІД 1

Специфічність дії ферменту амілази

ХІД РОБОТИ:

Беруть чотири пробірки, в пробірки № 1 і № 3 наливають по 4 – 5 мл розчину крохмалю, а в пробірки № 2 і № 4 по 4 – 5 мл розчину сахарози. Потім у пробірки № 1 і № 2 доливають по 2 мл розчину ферменту сахарази, а в пробірки № 3 і № 4 – по 2 мл розведеної слини. Вміст кожної пробірки старанно перемішують і ставлять у водяну баню при температурі 38⁰С. Через 20 хвилин вміст кожної пробірки ділять на 2 частини: з однією із них проводять реакцію Фелінга, а з іншою – пробу з йодом. Добуті результати занести в таблицю:

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакція Фелінг	Проба з йодом
			Позитивна або негативна	
1	Крохмаль	амілаза		
2	Сахароза	амілаза		
3	Крохмаль	сахараза		
4	Сахароза	сахараза		
Висново				

ДОСЛІД 2

Активатор та паралізатор амілази слини

Великий вплив на активність ферментів здійснює наявність у тканинах ряду хімічних сполук. Одні з них підвищують активність ферментів (активатори), інші, навпаки, значно зменшують ферментативну реакцію (паралізатори або інгібітори). Активатори необхідні для проявлення максимальної активності ферменту. Активатори є необхідною умовою дії ферменту. Ізольований та очищений від домішок активатора фермент часто буває неактивним. Після додавання активатора активність ферменту відновлюється.

Інгібітори гальмують ферментативні реакції, викликаючи структурні зміни білкової молекули ферменту. Уповільнення каталітичної активності ферменту, що викликаються паралізаторами, можуть бути зворотними та незворотними.

ХІД РОБОТИ

У три пробірки наливають по 1 мл таких розчинів: у першу – дистильовану воду, в другу – розчин хлористого натрію, в третю – розчин сульфату міді (II). В усі пробірки додають по 2 мл розчину крохмалю і по 1 мл розбавленої слини. Одночасно поміщують всі пробірки у водяну баню за температури 38°C і через 10 – 15 хвилин усі пробірки разом переносять в склянку з кригою. В усі пробірки додають розчин йоду в йодистому калії. Найкраща дія амілази на крохмаль спостерігається за наявності хлористого натрію, який є активатором амілази слини. За наявності іонів міді розщеплення крохмалю дуже гальмується або повністю припиняється, оскільки CuSO_4 є паралізатором амілази слини.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Дати визначення амілази, класифікацію амілази за видом ферменту;
2. Механізм дії амілази;
3. Розкрити поняття активатору та паралізатору амілази. Які речовини можуть бути активаторами або паралізаторами амілази, відповідь пояснити;
4. Будова молекули амілази, активні центри амілази;

МОДУЛЬ 2. ВУГЛЕВОДИ І ЛІПІДИ, ЇХ ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8 ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГЛЮКОЗИ

Глюкоза – альдегідо-багатоатомний спирт, який відноситься до класу альдогексоз, є одним із найпоширеніших моносахаридів у живій природі. За рахунок наявності гідроксильних груп, глюкоза проявляє усі хімічні властивості багатоатомних спиртів (взаємодія із лужними металами, із нерозчинними гідроксидами, розчинами лугів і т.д.). За рахунок альдегідної групи, глюкоза здатна до реакцій нуклеофільного приєднання, нуклеофільного заміщення карбонільної групи $C=O$, реакцій окиснення, тощо). Молекула глюкози у водному розчині існує переважно в циклічній формі ($\alpha(\beta)$ -D-глюкопіраноза або $\alpha(\beta)$ -D-глюкофураноза).

Хімічні властивості глюкози забезпечують утворення біологічно важливих речовин в організмі людини і тварин, такі як глюкозо аміни, N-ацетилглюкозоамін тощо, які є мономерами важливих гетерополісахаридів, що формують основу твердої сполучної тканини кісток, сухожилів.

ХІД РОБОТИ:

ДОСЛІД 1

Взаємодія глюкози із гідроксидом міді (реакція Троммера)

В пробірку наливають 2 мл 1 – 5% розчину гідроксиду натрію, до пробірки додають декілька крапель 1 – 10 % розчину сульфату купрум(II). *(Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу)*. До пробірки додають 2 мл 5 – 10% розчин глюкози, ретельно перемішують *(Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу)*. Потім пробірку нагрівають на водяній бані або над полум'ям спиртівки *(Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу)*. Зробити висновки щодо проходження цієї реакції, визначити тип хімічної реакції.

ДОСЛІД 2

Взаємодія глюкози із аміачним розчином оксиду аргентуму(I) (реакція «срібного дзеркала»)

До 1 мл 1 – 5% розчину нітрату срібла додають декілька крапель 1 – 5% розчину гідроксиду натрію або калію (*Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу*). До пробірки з утвореним осадом додати розчин аміаку до повного його розчинення (*Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу*). Додати 1 – 2 мл 1 – 10% розчину глюкози і нагріти на водяній бані при температурі 60 – 100 С. (*Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу*). Зробити висновок щодо особливостей проходження цієї реакції, визначити тип хімічної реакції. На яку функціональну групу є якісною дана реакція?

ДОСЛІД 3

Взаємодія глюкози із реактивом Фелінга

Реактив Фелінга представляє собою тартрат міді в лужному середовищі. У пробірці змішують 2 мл розчину Фелінг 1 і 2 мл розчину Фелінг 2 (*Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу*). До розчину додають 1 – 2 мл 1 – 10% розчину глюкози і нагрівають на водяній бані при температурі 70 – 100 С (*Написати спостереження, хімічну реакцію даного процесу*).

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Циклічні і нециклічні структурні формули глюкози;
2. Основні біохімічно важливі сполуки глюкози;
3. Функція глюкози у живих організмах;
4. Реакції окиснення глюкози;
5. Реакції нуклеофільного приєднання глюкози;
6. Реакції нуклеофільного заміщення глюкози;
7. Якісні реакції на –ОН групи молекули глюкози;

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9 ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ОРТОТОЛУЇДИНОВИМ МЕТОДОМ

Принцип методу базується на властивості глюкози при нагріванні взаємодіяти із розчином ортотолуїдину в оцтовій кислоті дає зелений колір. Інтенсивність забарвлення вимірюють фотокolorиметрично за допомогою ФЕК (фотоелектроcolorиметр). Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна до концентрації глюкози в розчині. Даний метод використовують в лабораторії для визначення концентрації глюкози в крові та біологічних рідинах.

ХІД РОБОТИ

1. Приготування калібрувального графіку:

З розчину глюкози з концентрацією 200 мг/л методом поступового розбавлення готують розчини із концентрацією 150, 100, 75, 50 і 25 мг/л об'ємом 10 мл. З проби відбираємо 1 мл і додаємо 7 мл розчину ортотолуїдинового реактиву і ставимо на водяну баню на 10 хв. Потім охолоджуємо пробірки і визначаємо оптичну густину розчинів на ФЕК. За отриманими результатами будуємо калібрувальний графік залежності оптичної густини і концентрації глюкози.

2. Визначення рівня глюкози в біологічних рідинах

Для досліду беруть такі біологічні рідини – слина, кров, сеча. 1 мл досліджуваної рідини відбирають у пробірку, до неї додають 7 мл ортотолуїдинового реактиву, ставлять на водяну баню на 10 хв, потім охолоджують і визначають оптичну густину розчинів. За калібрувальним графіком визначають концентрацію глюкози в біологічних рідинах. Результати заносять до таблиці:

Біологічна рідина	Оптична густина, D	Концентрація глюкози, мг/л
Кров		
Сеча		
Слина		

За отриманими результатами зробити висновок щодо різниці рівня глюкози у біологічних рідинах, вказати основні причини різниці,

порівняти отримані результати із нормами і зробити висновок про наявність чи відсутність патологічних змін отриманих результатів.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Основні методи кількісного визначення глюкози в крові;
2. Дати характеристику процесу гліколізу, його основні функції;
3. Дати характеристику процесу глюконеогенезу, його основна функція;
4. Охарактеризувати аеробне окиснення глюкози, його зв'язок із процесом окислювального фосфорилування;
5. Пентозофосфатний шлях перетворення глюкози, особливості, основні функції;
6. Що таке калібрувальний графік? Принцип побудови калібрувального графіку та спосіб визначення концентрації речовини за калібрувальним графіком;

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10 ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ГЛЮКОЗИ В ПАТОЛОГІЧНІЙ СЕЧІ МЕТОДОМ АЛЬТГАУЗЕНА

Метод ґрунтується на тому, що сеча, яка містить цукор, при кип'ятінні з лугом набуває відтінків коричневого кольору (від жовтого до темно-бурого). Продуктами реакції є молочна кислота та гумінові речовини.

За нормальної функції нирок глюкозурія розвивається лише тоді, коли рівень цукру в крові перевищує так званий нирковий поріг глюкози (8-10ммоль/л). Це спостерігають при цукровому діабеті, гострих запальних процесах підшлункової залози, гіпертиреозі, акромегалії, тощо. Тимчасова глюкозурія може бути при вагітності, надмірному споживанні вуглеводів, стресових ситуаціях. У разі запальних процесів нирок глюкозурія виникає навіть при нормальному рівні глюкози в крові через зниження глюкозного ниркового порогу.

ХІД РОБОТИ

У пробірці змішують 4 мл сечі з 1 мл 10% розчину їдкого натру, кип'ятять на полум'ї пальника 1 хв і залишають на 10 хв у штативі. При наявності цукру в сечі у пробірці утворюється один із відтінків стандартної шкали Альтгаузена, порівнюючи із якою, визначають візуально відсоток глюкози в даній пробі.

Шкала Альтгаузена – це ряд пробірок із розчинами жовто-коричневих відтінків різної інтенсивності забарвлення (в порядку збільшення), отриманих шляхом кип'ятіння розчинів глюкози (4 мл) із концентраціями 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, з 1 мл 10% розчину гідроксиду натрію.

Для досліду узяти 4 зразки сечі. Проаналізувати вміст глюкози і зробити висновок щодо наявності патологічних змін в організмі. Результати записати до таблиці.

Зразок сечі	Концентрація глюкози, ммоль/л	Відповідність до норми
№1		
№2		
№3		

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ТА КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖИРІВ

Найбільш поширеними з усіх ліпідів і кількісно значимими в тваринному організмі є жири.

Терміном "жири" позначають суміш різних гліцеридів у тому вигляді, в якому вони трапляються в природі.

Жири або гліцериди – це складні ефіри триатомного спирту гліцерину ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) і різних вищих жирних кислот. Частіше за все до складу жирів входять насичені кислоти – пальмітинова ($\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$) та стеаринова ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$), а з ненасичених – олеїнова ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$), лінолева ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$) та ліноленова ($\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$).

Разом з простими гліцеридами, що мають у своїй молекулі три однакові кислоти, трапляються ще змішані гліцериди, до складу яких входять різні жирні кислоти. Природні жири (нейтральні) являються змішаними тригліцеридами. Жири, що стоять на повітрі та світлі, гіркнуть – окислюються та розщеплюються на летючі жирні кислоти, кетони та альдегіди, які мають неприємний запах та смак.

Жири, багаті ненасиченими кислотами, як і самі ненасичені кислоти, можуть приєднувати галогени, водень (гідрогенізуватися) та кисень (утворювати оксикислоти).

ДОСЛІД 1

Визначення йодного числа жирів

ХІД РОБОТИ

Йодне число жирів показує, скільки грамів іон-йоду може бути зв'язано в 100 г жиру. Для цього відважують в конічну колбу 0,1 г олії, розчиняють у 10 г хлороформу і доливають (точно) 25 мл 0,1н спиртового розчину йоду. Закривають пробкою, ретельно перемішують і залишають стояти у темному місці на 2 години.

Після цього йод, який не використали на реакцію, титрують 0,1 н розчином тіосульфату спочатку до слабо жовтого кольору, а потім за наявності 0,5- 1% розчину крохмалю до знебарвлення розчину.

РОЗРАХУНОК, 1 мл 0,1 н розчину тіосульфату еквівалентний 1 мл 0,1 н розчину йоду (0,01270 г йоду). Знаючи скільки мілілітрів

розчину йоду (а) – наливо у колбу і скільки 0,1 н розчину тіосульфату (б) – піде на титрування залишків йоду (зворотне титрування), визначають кількість мілілітрів 0,1 н розчину йоду (а–б), зв'язаних жиром. Перемножуючи різницю на 0,0127, отримують кількість йоду у грамах, зв'язаного тьгарцем (с) жиру. Звідси йодне число:

$$X = (a-b) \cdot 0,0127 \cdot 100 / c$$

ДОСЛІД 2

Визначення кислотного числа жирів

ХІД РОБОТИ:

Кислотне число жирів визначають за допомогою титрування лугом. 1 мл олії розчиняють у 10 мл суміші ефіру та спирту і за наявності фенолфталеїну титрують 0,1 н розчином КОН. На 1 мл олії йде деяка кількість лугу, що вказує на існування в ньому вільних жирних кислот.

Кількість міліграмів КОН, яке піде на нейтралізацію вільних жирних кислот в 1,0 г жиру, називається кислотним числом. При прогрікуванні жирів кислотне число збільшується.

Таку ж реакцію проводять з прогріклою олією.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

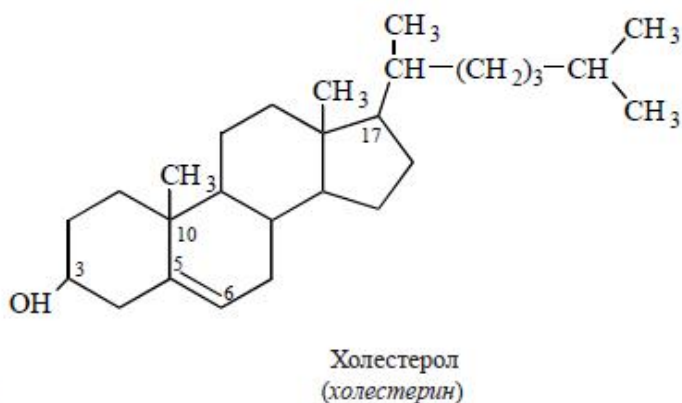
1. Дати класифікацію ліпідів, навести приклади.
2. Яку будову мають тригліцериди? Їх синтез та розщеплення.
3. Чому жири бувають тверді та рідкі?
4. Як проходить перетравлення ліпідів у шлунково-кишковому тракті?
5. Як проходить всмоктування та транспортування ліпідів?
6. Механізм окислення жирів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ХОЛЕСТЕРИН І ЛЕЦИТИН

Холестерин – ліпід, який відноситься до класу стероїдів, має важливе біологічне значення для організму людини і тварин. У значних кількостях міститься в нервовій та жировій тканинах, печінці

тощо. У хребетних тварин і людини — біохімічний попередник стероїдних гормонів, жовчних кислот, ліпопротеїнів (сполук, у формі яких ліпіди транспортуються по організму) та вітаміну D. Надлишок холестеролу в організмі людини призводить до утворення жовчних каменів, відкладенню



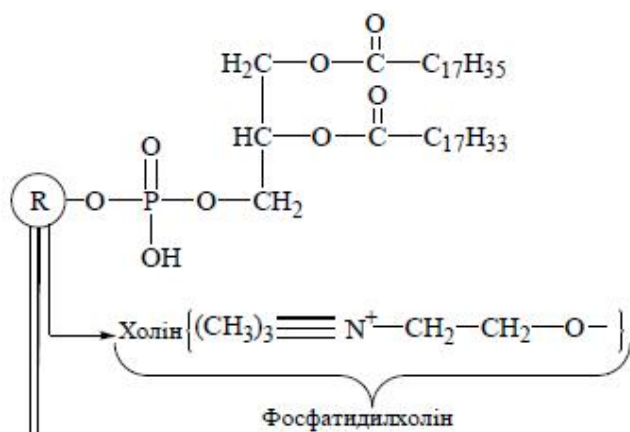
холестеролу в стінках судин, порушень обміну речовин.

Біосинтез холестеролу відбувається в цитозолі та мітохондріях клітин. Цей процес має важливе значення в організмі людини, оскільки холестерол виконує низку життєво необхідних функцій: холестерол є попередником в біосинтезі стероїдних гормонів, жовчних кислот, ліпопротеїнів та вітаміну D.

В організмі холестерол підлягає біотрансформації, численним метаболічним перетворенням. Цей процес забезпечує синтез стероїдних сполук та забезпечує умови для екскреції надлишків стеролу. Першим етапом біотрансформації холестеролу є утворення його етерів з вищими карбоновими кислотами.

Лецитини – клас ліпідів, який відноситься до класу фосфоліпідів.

Представляє собою собою похідні трьохатомного спирту гліцерину, дві гідроксильні групи яких естерифіковані із залишками ненасичених жирних кислот, третя – із залишком фосфорної кислоти, який сполучений із залишком холіну.



Лецитин є одним із представників основних

фосфоліпідів клітинних мембран. Фосфатидилхоліновий залишок

надає молекулі фосфоліпиду заряджену ділянку, яка проявляє гідрофільні властивості, залишки молекул ненасичених жирних кислот мають гідрофобні властивості завдяки високій неполярності. В результаті формується фосфоліпідний бішар, який є основою усіх біологічних мембран.

Лецитин широко поширений в продуктах тваринного походження, особливо у таких продуктах як яйця, молоко, тощо.

ХІД РОБОТИ

ДОСЛІД 1

Якісна реакція на холестерин

1 г досліджуваного матеріалу (будь який представник тваринного жиру або рослинної олії) розчиняють 3 мл хлороформу, ретельно перемішуючи до повного розчинення. При не повному розчиненні збільшують дозу хлороформу, або розчин профільтровують через паперовий фільтр. До 1 мл фільтрату додають обережно по стінкам пробірки 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. При наявності холестерину, утворюється сульфохолестерин червоного кольору. По інтенсивності червоного кольору можна зробити висновок про відносну кількість холестерину в досліджуваному зразку.

Завдання. Дослідити мінімум 3 представники жирів і зробити висновок про вміст у них холестерину

ДОСЛІД 2

Якісна реакція на лецитин

До 1 мл отриманого фільтрату отриманого в попередньому досліді, додаємо 1 мл насиченого розчину солі Кадмію(+2). При наявності лецитину утворюється червоний осад. По рівню отриманого осаду робимо висновок про кількість лецитину в досліджуваних жирах.

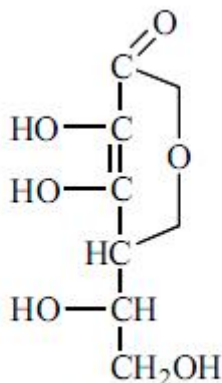
КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Функції холестерину в організмі людини і тварин;
2. Біосинтез холестерину;
3. Перетворення холестерину в організмі холестерину;
4. Формування в організмі ліпопротеїнів різної щільності, роль холестерину в даному процесі;
5. Якісні реакції на холестерин;

6. Фосфоліпіди, особливості їх будови та функції;
7. Лецитин, його будова та біологічні функції. Добова норма лецитину та основні продукти харчування;
8. Роль лецитину у формуванні біологічних мембран;

МОДУЛЬ 3. РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13 ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІТАМІНУ С ФРУКТІВ І ОВОЧІВ ЙОДОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ



L-Аскорбінова кислота

За хімічною будовою, вітамін С є γ -лактоном 2,3-дигідрокси-L-гулонової кислоти. Емпірична назва – аскорбінова кислота.

У водних розчинах L-аскорбінова кислота (L-АК) зворотно перетворюється на дегідроформу — L-дегідроаскорбінову кислоту (L-ДАК), яка повністю зберігає біологічні властивості вітаміну С; подальші окислювальні перетворення L-ДАК є незворотними і призводять до утворення похідних, що не мають вітамінних властивостей:

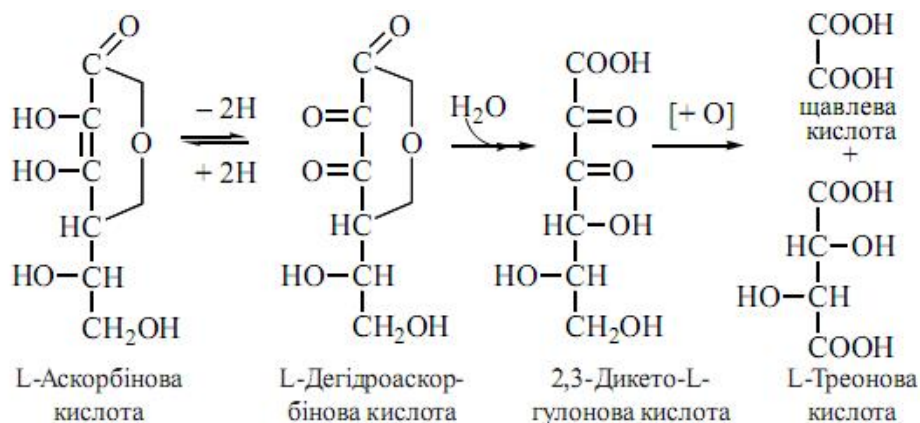


Схема перетворення L-аскорбінової кислоти.

Подібних перетворень L-АК зазнає і в організмі (*in vivo*).

Незважаючи на багаторічні дослідження, молекулярні механізми біологічних ефектів вітаміну С розшифровані ще в недостатній мірі. Реакціями, де участь L-АК є остаточно з'ясованою, є гідроксилування біомолекул в ході таких біохімічних перетворень:

– біосинтезу колагену, а саме в посттрансляційній модифікації білка з утворенням зрілого колагену шляхом гідроксилування залишків проліну та лізину до відповідних гідроксіамінокислот; в процесі гідроксилування проліну до 4-гідроксипроліну бере участь Fe^{2+} — аскорбатзалежний фермент пролілгідроксилаза — роль L-АК

полягає в регенерації відновленої форми іона заліза, необхідного для каталітичного циклу;

– біосинтезу дофаміну, норадреналіну та адреналіну (етапи гідроксилювання в циклі та бічному кільці катехоламінів);

– біосинтезу стероїдів (численні реакції гідроксилювання на етапах утворення холестерину та біологічно активних стероїдних гормонів);

– біосинтезу серотоніну (реакція гідроксилювання триптофану);

– катаболізму тирозину (через стадію утворення гомогентизинової кислоти).

Вітамін С міститься в більшості продуктів харчування, особливо рослинного походження, і недостатність у вітаміні розвивається, як правило, за умов нераціональної дієти (відсутність свіжих рослинних продуктів) або неправильної кулінарної підготовки харчових блюд. Особливо шкідливими для вмісту L-АК є термічна обробка продуктів в умовах високої температури, наявності кисню та металів (підігрівання продуктів у металевому посуді!).

Добова потреба в L-аскорбіновій кислоті становить 50-70 мг* [60 мг]**

<i>Продукт</i>	<i>L-АК (мг/100 г)</i>
Шипшина (ягоди)	1000-4500
Горіх грецький	1000-1800
Перець червоний	100-400
Смородина чорна	100-400
Смородина червона	8-16
Хрін (корінь)	100-200
Картопля	6-20
Капуста білокачанна	25-66
Морква	5
Цибуля ріпчаста	20
Яблука ("Антонівка")	20-40
Лимони	40-55
Кавун	5-10
Молоко коров'яче (мг/100 мл)	1
Кумис (мг/100 мл)	20

Кількісне визначення аскорбінової кислоти в рослинних органах проводять за допомогою йодометричного методу.

ХІД РОБОТИ:

1. Зважують 10 г зразків фруктів або овочів, які узяті для дослідів, за допомогою аналітичних ваг. Результат записують із точністю до 0,01.

2. Поміщують зразок у фарфорову ступку, додають 20-30 мл 10% розчину соляної кислоти і розтирають до гомогенного стану.
3. Гомогенат переливають до конічної колби, додають 1 мл 1 % розчину крохмалю.
4. Титрують гомогенат 0,125% розчином йоду до появи синього забарвлення. Записують до таблиці витрачений об'єм йоду.
5. Масу вітаміну С знаходять за формулою:

$$m(\text{vit C}) = 0,875 \cdot V$$

6. Масову частку вітаміну С знаходять за формулою:

$$w(\%) = V \cdot 0,875 \cdot 100 / m \cdot 1000 = V \cdot 0,875 / 10m, \text{ де}$$

V – об'єм розчину витраченого на титрування, m - маса зразку.

7. Записуємо отримані результати до таблиці, сформулювати висновок

Зразок	Маса зразку, г	Маса вітаміну С у зразку, г	Масова частка вітаміну С у зразку, %

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Написати структурну(ациклічну і циклічну), емпіричну формулу вітаміну С;
2. Написати хімічні реакції перетворення вітаміну С у водному розчині;
3. Функції вітаміну С в організмі людини і тварин;
4. Біосинтез вітаміну С в рослинних організмах;
5. Вміст вітаміну С у різних продуктах харчування;
6. Гіпо- і авітаміноз вітаміну С. Основні причини та симптоми;
7. Кількісний аналіз вітаміну С. Його особливості, хімізм;

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №14

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ В₂ і С

Вітаміни – це група низькомолекулярних органічних речовин, які потрібні для нормальної фізіологічної дії живого організму. Вони входять до складу простетичних груп багатьох ферментів і виконують каталітичні функції, маючи великий вплив на ріст, розвиток, продуктивність та здоров'я тварин.

Більшість вітамінів в організмі тварин не синтезується або утворюється в таких кількостях, які не забезпечують потреби організму.

Якщо у кормах тварин вітамінів немає, виникають глибокі порушення в процесах обміну речовин, які ведуть до захворювань, що називаються авітамінозами; якщо вітамінів не вистачає у раціоні – гіповітамінозами. Вони можуть привести до загибелі організму.

За фізико-хімічними властивостями вітаміни поділяють на дві групи: вітаміни, що розчиняються у воді – В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, Н, фолієва кислота, С, Р та вітаміни, що у воді нерозчинні: А₁, D₁, Е₁, К₁, F₁.

Вітамін В₂.

Хімічна будова

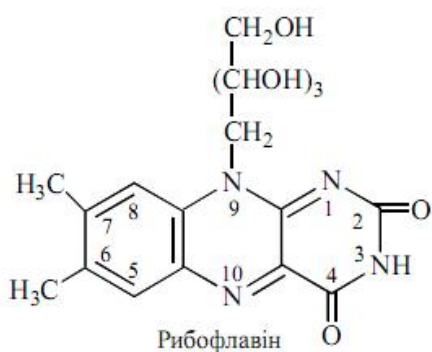
За хімічною будовою вітамін В₂ (рибофлавін) є похідним трициклічної сполуки ізоалоксазину та спирту рибітолу— 6,7-диметил-9-рибітилізоалоксазин.

Біологічні властивості та механізм дії

Біологічні функції вітаміну В₂ полягають у його участі в окислювально-відновлювальних реакціях. Коферментними формами рибофлавіну є ФАД (флавінаденіндинуклеотид) та ФМН (флавінмононуклеотид) — простетичні групи багатьох анаеробних та аеробних дегідрогеназ та оксидаз, що беруть участь в окисленні численних інтермедіатів вуглеводного, ліпідного та амінокислотного обміну.

Джерела та добова потреба

Рибофлавін міститься в багатьох продуктах рослинного та тваринного походження, тому в умовах звичайного мішаного



харчування людина отримує необхідну для нормальної життєдіяльності кількість вітаміну.

Добова потреба в рибофлавіні складає 2,0-2,5 мг* [1,7 мг].

ДОСЛІД 1

Якісна реакції на вітамін В₂

Виявлення засноване на відновленні жовтого рибофлавіну спочатку в родофлавін (проміжне з'єднання) червоного кольору, а потім у безбарвний лейкофлавін.

У пробірку вносять 10 крапель суспензії рибофлавіну у воді, додають 5 крапель концентрованої НСІ і занурюють шматочок металевого цинку. Починається виділення пузирів водню і рідина поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. При збовтуванні знебарвленого розчину лейкоз'єднання знову окислюється киснем, що міститься в повітрі, в рибофлавін (розчин стає жовтим).

ДОСЛІД 2

Якісна реакції на вітамін С

Беруть дві пробірки. В першу наливають трохи розчину, де є вітамін С (витяжка з силосу, сік капусти, яблука та ін.), у другу – дистильовану воду. В обидві пробірки додають декілька краплин розчину червоної кров'яної солі $K_3[Fe(CN)_6]$. (4,5%) і по декілька краплин 1% розчину хлориду заліза (III). За наявності вітаміну С з'являється синій або зелений колір, який потім дає темно-зелений осад берлінської блакиті. У другій пробірці забарвлення буде буре. Напишіть хімізм цієї реакції.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ:

1. Дати класифікацію вітамінам. Хімічна структура вітамінів.
2. У чому полягає біологічна дія жиророзчинних вітамінів?
У чому полягає біологічна дія водорозчинних вітамінів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 15

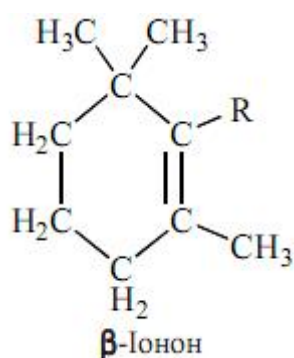
ЯКІСНА РЕАКЦІЯ НА ЖИРОРОЗЧИННИЙ ВІТАМІН А

Вітаміни – це група низькомолекулярних органічних речовин, які потрібні для нормальної фізіологічної дії живого організму. Вони входять до складу простетичних груп багатьох ферментів і виконують каталітичні функції, маючи великий вплив на ріст, розвиток, продуктивність та здоров'я тварин.

Більшість вітамінів в організмі тварин не синтезується або утворюється в таких кількостях, які не забезпечують потреби організму.

Якщо у кормах тварин вітамінів немає, виникають глибокі порушення в процесах обміну речовин, які ведуть до захворювань, що називаються авітамінозами; якщо вітамінів не вистачає у раціоні – гіповітамінозами. Вони можуть привести до загибелі організму.

За фізико-хімічними властивостями вітаміни поділяють на дві групи: вітаміни, що розчиняються у воді – В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, Н, фолієва кислота, С, Р та вітаміни, що у воді нерозчинні: А₁, D₁, Е₁, К₁, F₁.



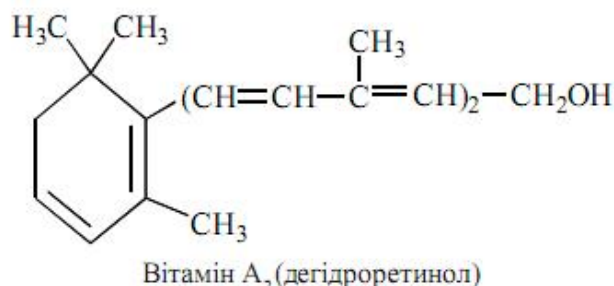
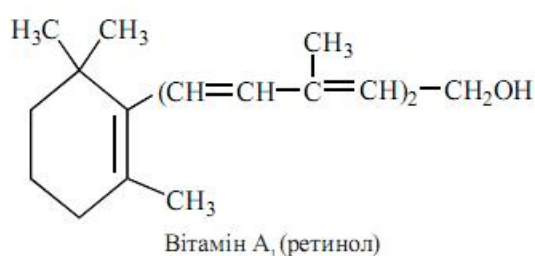
Вітамін А.

Сполуки, що мають біологічні властивості вітаміну А, є похідними β-іонону із загальною формулою:

Дві молекулярні форми вітаміну

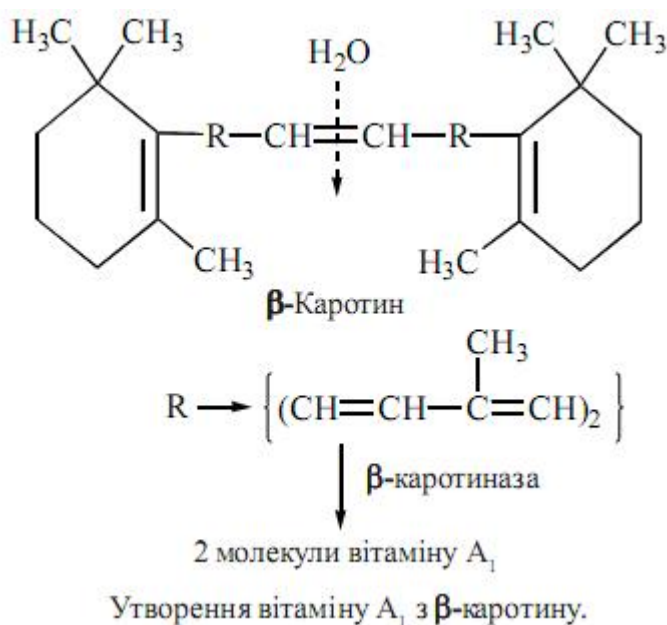
А (вітамери) — А₁ та А₂ є циклічними ненасиченими спиртами (транс-ізомери), що мають як бічний радикал гідрофобну діізопреноїдну групу,

завдяки якій ці сполуки розчиняються в ліпідному бішарі мембран:



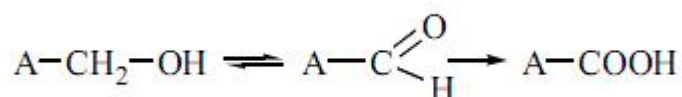
Обидві сполуки проявляють повний спектр біологічних ефектів вітаміну А, проте вітамін А₁ є дещо активнішим. У рослинних організмах містяться провітаміни (біологічні попередники) вітаміну А — жовті пігменти α, β та γ-каротини (вперше були виявлені в

моркві — carota; лат.). Найбільш активним провітаміном вітаміну А є β-каротин, при гідролізі якого за участю ферменту β-каротинази стінки тонкої кишки та печінки людини утворюються дві молекули вітаміну А₁:



Біологічні властивості

Після надходження в організм людини (з тваринною їжею або у вигляді рослинних каротинів) ретинол та дегідроретинол депонуються в тканинах (переважно в печінці) у вигляді складних жирнокислотних ефірів, які, у міру фізіологічної потреби, утворюють активні молекулярні форми вітаміну А: спирт (ретинол), альдегід (ретиналь) та ретиноєву кислоту:



Біологічна активність вітаміну А полягає, переважно, в регуляції таких функцій організму:

- процесів темного (нічного) зору — недостатність вітаміну А супроводжується порушенням темного зору і розвитком “курячої сліпоти” (гемералопії);
- процесів росту та диференціювання клітин;
- процесів утворення глікопротеїнів, що є компонентами біологічних слизів організму.

Добова потреба

Вітамін А надходить в організм людини з продуктами тваринного походження (особливо у складі вершкового масла, сметани, молока, печінки, риб’ячого жиру, яєчного жовтка) та у вигляді рослинних

каротинів. Добова потреба у вітаміні А складає 1,5-2,5 мг , або 3-5 мг каротинів* [1 мг ретинолу , або 6 мг каротинів]

ХІД РОБОТИ

Якісна реакція на вітамін А

1. У пробірку наливають розчин олії в хлороформі і додають декілька краплин розчину 1% хлориду заліза (III). За наявності вітаміну А розчин забарвлюється в яскраво-зелений колір.

2. В пробірку наливають декілька мілілітрів розчину олії та по 1 – 2 мл концентрованої сірчаної кислоти. При належності вітаміну А з'являється синій колір, що змінюється на фіолетовий, а потім на червоно-бурий.

Контрольні питання:

1. Назвати основні жиророзчинні вітаміни. Написати їх структурні формули;
2. Структурні формули вітаміну А;
3. Вміст вітаміну А у продуктах тваринного і рослинного походження;
4. Основні функції вітаміну А;
5. Гіпо- і авітаміноз вітаміну А;
6. Якісний та кількісний аналіз вітаміну А;

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Кононський О. І. Біохімія тварин / О. І. Кононський. – К. : Вища школа, 1998. – 426 с.
2. Кучеренко Е. К. Биохимия / Е. К. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А.Н. Васильев. – К. : Вища школа, 1990. – 432 с.
3. Губський Ю. І. Біологічна хімія / Ю. І. Губський. – К. : Укрмедкнига, 2000. – 663 с.
4. Строев Е. А. Биологическая химия / Е. А. Строев. – М . : Высшая школа, 1986. – 495 с.
5. Явоненко Л. В. Биохимия / Л. Ф. Явоненко, В. В. Яковенко. – Свердловск : Университетская книга, 2001. – 589 с.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ».....	4
МОДУЛЬ I. ОСНОВНІ КЛІТИННІ БІОМОЛЕКУЛИ	7
1. Лабораторна робота №1. Фізико-хімічні властивості білків.....	7
2. Лабораторна робота №2. Кольорові реакції на білки.....	12
3. Лабораторна робота №3. Визначення ізоелектричної точки білків.....	14
4. Лабораторна робота №4. Розподільча хроматографія амінокислот (низхідна).....	17
5. Лабораторна робота №5. Аналіз складу нуклеопротейдів.....	19
6. Лабораторна робота №6. Загальні властивості ферментів.....	22
7. Лабораторна робота №7. Специфічні властивості амілази слини.....	26
МОДУЛЬ II. ВУГЛЕВОДИ І ЛІПІДИ, ЇХ ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ	28
8. Лабораторна робота №8. Вивчення хімічних властивостей глюкози.....	28
9. Лабораторна робота №9. Визначення глюкози в біологічних рідинах ортотолуїдиновим методом	28
10. Лабораторна робота №10. Визначення кількості глюкози в патологічній сечі методом Альтгаузена.....	32
11. Лабораторна робота №11. Визначення йодного та кислотного числа жирів.....	33
12. Лабораторна робота №12. Якісні реакції на холестерин і лецитин.....	35
МОДУЛЬ III. РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ.....	38
13. Лабораторна робота №13. Визначення вмісту вітаміну С фруктів і овочів йодометричним методом	38
14. Лабораторна робота №14. Якісні реакції на водорозчинні вітаміни В ₂ і С	41

15. Лабораторна робота №15. Якісна реакція на жиророзчинний вітамін А	43
16. Список рекомендованої літератури	46

Навчальне видання

БІОЛОГІЧНА ХІМІЯ

методичні рекомендації

Укладач:

Бабич Олександр Анатолійович

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 5.

Тираж 15 прим. Зам. №

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Г. Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.