

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

Факультет агротехнологій

Кафедра ґрунтознавства та агрономії

БІОХІМІЯ

методичні рекомендації
до виконання лабораторних занять
для здобувачів ступеня
вищої освіти «бакалавр»
напряму 6.051401
«Біотехнологія»

Миколаїв
2016

УДК 577.1

ББК 28.072

Б 63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету агротехнологій Миколаївського національного аграрного університету від 30.03.2016, протокол № 7

Укладач:

Н. М. Абрамова – старший викладач кафедри ґрунтознавства та агрохімії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

О. П. Мітрясова – д-р пед. наук, професор, професор кафедри екології та природокористування Чорноморського державного університету ім. П. Могили.

С. С. Крамаренко – д-р біологічних наук, професор кафедри генетики, годівлі та біотехнології тварин Миколаївського національного аграрного університету.

©Миколаївський національний аграрний університет, 2016

ПЕРЕДМОВА

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 відноситься і до 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, малюнками.

МОДУЛЬ 1

ОСНОВНІ КЛІТИННІ БІОМОЛЕКУЛИ

Лабораторна робота №1

ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКІВ ЗА ДОПОМОГОЮ КОЛЬОРОВИХ РЕАКЦІЙ.

Мета: якісно визначити наявність білків в розчині та амінокислоти, що входять у їх склад.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Наявність білків у розчині що досліджується можна виявити за допомогою кольорових реакцій. Ці реакції поділяються на 2 групи:

загальні, що зумовлені наявністю пептидного зв'язку і вільних аміногруп;

специфічні, зумовлені наявністю у білку окремих амінокислот, що здатні давати характерні кольорові реакції.

Дослід 1. Якісні реакції на білки

а) Біуретова реакція

У лужному розчині при додаванні купрум сульфату поліпептиди та білки утворюють комплексні солі, що забарвлені у фіолетовий колір. Крім цього біуретову реакцію дають амінокислота гистидин і амід аспарагінової кислоти.

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 2 мл розчину білка, 2 мл натрій гідроксиду (10%) та 2 краплі купрум сульфату (1%). При струшуванні з'являється фіолетово-бузкове забарвлення. Запишіть хімізм процесу.

ВИСНОВОК

б) Нінгідрінова реакція

Базується на взаємодії аміногрупи вільних амінокислот і амінних груп білкової молекули з нінгідрином

ХІД РОБОТИ

До 2 мл розчину білка додають 10-12 крапель розчину нінгідрину. Обережно підігрівають. Поступово з'являється фіолетове або фіолетово-рожеве забарвлення. Запишіть хімізм процесу.

ВИСНОВОК

Дослід 2. Якісні реакції на окремі амінокислоти (специфічні реакції)

а) Ксантопротеїнова реакція

Ця реакція дає змогу виявити присутність у молекулі білка циклічних амінокислот – фенілаланіну, тирозину, триптофану.

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 2 мл розчину білка і додають 6-10 крапель концентрованої нітратної кислоти. Під дією кислоти з'являється осад, який при обережному нагріванні над пальником забарвлюється у жовтий колір. Після охолодження додають надлишок 20%-ного натрій гідроксиду (або амоніаку). При цьому жовтий колір змінюється на помаранчевий.

Зробіть висновок про наявність зазначених амінокислот у білку.

ВИСНОВОК

б) Реакція Шульце-Распайля (реакція на триптофан)

Реакція заснована на здатності триптофану у кислому середовищі вступати у взаємодію з альдегідами, утворюючи забарвлені продукти конденсації.

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 1 мл розчину білка і додають 2 краплі 10%-ного розчину сахарози.

Потім піпеткою додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, слідкуючи за тим, щоб рідина не змішувалась. На межі розподілу рідин з'являється вишнево-червоне забарвлення у вигляді кільця.

Зробіть висновок про наявність зазначеної амінокислоти у складі білка.

ВИСНОВОК

в) Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти

До складу молекул більшості білків входять сірковмісні амінокислоти – цистеїн, цистін, метіонін. При нагріванні з лугами від цих амінокислот відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який можна визначити йонами плюмбуму.

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 1-2 мл 0,5%-ного розчину плюмбум ацетату і по краплям додають 20%-ний розчин натрій гідроксиду до розчинення білого осаду гідроксиду плюмбуму, що утворився в ході реакції. Додають 4-5 крапель білку і суміш обережно нагрівають. Спостерігають появу коричнево-чорного кольору.

Зробіть висновок про наявність у складі білку сірковмісних амінокислот.

ВИСНОВОК

Контрольні питання

1. Наведіть класифікацію протейногенних амінокислот.
2. Чим зумовлені амфотерні властивості амінокислот?
3. Які відомі якісні реакції на амінокислоти?
4. Наведіть приклади біологічно активних дипептидів і трипептидів.
5. Які відомі кольорові реакції на білки?

Лабораторна робота №2

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Мета: дослідити явища зворотної та незворотної коагуляції білків

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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, є гідрофільні, бо вони мають велику спорідненість з водою, а такі сполуки легко розчиняються в ній.

Білки, як колоїди, мають усі властивості останніх. Розчини білків опалесцирують, 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. 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 випадінню їх в осад. Зменшення гідратації колоїдних часток білка легко досягається додаванням до їх розчинів водовбирних засобів. До таких дегідратуючих 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 змулених 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.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

При таких реакціях білки не підлягають глибоким змінам і утворені ними осади (гелі) 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.

а) Зворотне осадження білків сульфатом амонію.

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.

ВИСНОВОК

б) Осадження білків хлоридом натрію та сульфатом магнію.

ХІД РОБОТИ

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. Додають воду і спостерігають розчинення осаду.

ВИСНОВОК

Дослід 2. Осадження білків іонами важких металів

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Під впливом іонів солей важких металів (свинцю, міді, срібла, ртуті, та ін.) білки зі стану золю незворотно 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 пробірках утворюється осад білків.

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

ВИСНОВОК

Дослід 3. Осадження білків мінеральними кислотам.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфатної) 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 нітратної) розчиняє осад білків, що випадає при їх додаванні.

ХІД РОБОТИ

У три пробірки обережно наливають по 1 мл кислот: у першу – соляну, в другу – сульфїтну, в третю – нітратну. В кожній пробірці 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 сульфїтної кислот, а в третій пробірці осад не зникає при збовтуванні, оскільки за надлишку нітратної кислоти він не розчиняється.

ВИСНОВОК

Дослід 4. Осадження білків кип'ятінням

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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. Йде 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. У випадку додавання до кислих розчинів білків нейтральних солей можлива коагуляція.

ХІД РОБОТИ

Наливають у 5 пробірок по 2 мл розчину білка, нагрівають першу пробірку та спостерігають поступове випадіння білку в осад. У 2 пробірку додають 1% - ну ацетатну кислоту та нагрівають. Осад випадає швидше і повніше оскільки білок в цьому випадку знаходиться в ізоелектричній точці. У третю пробірку додають 0,5мл 10%-ної ацетатної кислоти та нагрівають, осад не утворюється навіть при кип'ятінні.

В 4 пробірку додають 0,5 мл 10%-ної ацетатної кислоти та 2-4 краплі насиченого розчину натрій хлориду та нагрівають. Осад білка утворюється швидше. В 5 пробірку додають 0,5 мл 10% натрій гідроксид та нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні. Зробіть висновки.

ВИСНОВОК

Контрольні питання

1. Що таке білки? Склад білків.
2. Сучасні уявлення про структури білків. Зв'язки, які стабілізують структуру білків.
3. Фізико-хімічні властивості білків.
4. Чим денатурація білків відрізняється від висолювання?
5. Механізм коагуляції білка.
6. Що таке ізоелектрична точка білка?
7. Методи виділення, очищення та вивчення структури білків.

Лабораторна робота № 3
**ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ «СИРОЇ» КЛЕЙКОВИНИ В
ЗЕРНІ.**

Мета: Визначити вміст сирої клейковини в зерні, зазначити якість зерна.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

«Сира» клейковина - це гумоподібна білкова високогідратована маса, що залишається після відмивання тіста. З водою відокремлюються розчинні цукри, висівки, крохмаль тощо. У складі клейковини близько 75% води і 25% сухої речовини. Суха речовина на 82-88% складається з білків - гліадинів та глутелінів, зв'язаного крохмалю (6,7%), цукрів (1,2%), жирів (2,1%) і золи (0,9%).

Вміст сирої клейковини в борошні пшениці 12-52 %. За вмістом клейковини зерно пшениці відносять до відповідної категорії. Якщо в ньому 28 % і більше сирої клейковини, то пшениця «сильна», якщо 25-28 % - таке зерно відносять до категорії «цінних» пшениць, якщо менше 25 % - до найнижчої категорії - «слабких» пшениць. Кількість та якість клейковини обумовлюють хлібопекарські якості: колір хліба, смак, запах, пористість, поживність тощо. Вміст клейковини в зерні залежить від сортових особливостей, погодно-кліматичних умов, удобрення.

Принцип методу. Метод кількісного визначення сирої клейковини ґрунтується на властивості деяких білків зерна (гліадину та глутеліну) утворювати в'язку масу при набуханні з водою. Згусток, що утворився, промивають водою доти, поки не відмиють його від крохмалю, клітковини та розчинних домішок, після чого гумоподібну клейковину віджимають і зважують.

ХІД РОБОТИ

Наважку зерна 30-50 г, відібраного із загального середнього зразка, очищають від домішок, за винятком пошкоджених зерен культури. Подрібнюють на лабораторному млинку до такого стану, щоб залишок розмеленого зерна не перевищував 2 % після просіювання крізь сито з діаметром отворів 0,5 мм.

Розмелене зерно ретельно перемішують і від нього на технохімічних терезах беруть наважку 25 г, переносять у порцелянову чашку або ступку, доливають 14 мл водопровідної води при температурі $18 \pm 2^\circ\text{C}$, замішують скляною паличкою чи шпателем тісто до однорідної маси. Часточки, що прилипли до шпателя, зчищають ножом і приєднують до тіста, з якого руками роблять кульку, кладуть у фарфорову чашку або чашку Петрі, накривають склом і залишають на 30 хв., щоб усі часточки розмеленого зерна рівномірно просочилися водою.

Далі тісто виймають і обережно переминаючи пальцями, відмивають під струменем води, температура якої $18 \pm 2^\circ\text{C}$, над чистим шовковим або капроновим решетом, щоб запобігти можливим втратам клейковини. Коли більша частина крохмалю

буде відмита і клейковина, спочатку м'яка і рвучка, стане в'язкою, перемирати і промивати починають енергійніше. Це роблять доти, поки вода, що стікає, не стане зовсім прозорою. Час, коли можна закінчити відмивання, встановлюють за допомогою розчину йоду, який з крохмалем дає сине забарвлення.

Білковий згусток, що утворився, з силою віджимають, переносять у тарований бюкс і зважують. Після першого зважування клейковину промивають ще 5-10 хв., потім знову зважують. Якщо різниця між двома зважуваннями не перевищує 0,1 г, відмивання припиняють.

Вміст клейковини (К) в процентах обчислюють за формулою:

$$K = \frac{a \cdot 100}{m}$$

Де a – маса сирої клейковини, г; m – маса сирої клейковини, г; 100 – для перерахунку в проценти. Допустима розбіжність результатів $\pm 2\%$.

Якість «сирої» клейковини характеризується її кольором, еластичністю та розтяжністю.

Колір визначають візуально перед зважуванням і характеризують термінами «світла», «сіра» або «темна».

Для визначення розтяжності з відмитої клейковини відокремлюють і зважують на технохімічних терезах 4 г клейковини, розминають пальцями, роблять з неї кульку, яку вміщують у чашку з водою ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) на 15 хв. Потім клейковину беруть трьома пальцями правої і лівої рук і над лінійкою з

міліметровими поділками рівномірно розтягують протягом 10 сек. до розривання.

У момент розривання клейковини визначають на яку довжину вона розтягується. Коротка клейковина розтягується до 10 см, середня - від 10 до 20 і довга - понад 20 см.

Еластичність - це здатність клейковини відновлювати свою початкову форму після того, як припиняється дія розтягувального зусилля. Для визначення еластичності шматочок клейковини пальцями обох рук розтягують над лінійкою приблизно на 2 см і відпускають (або стискають великим і вказівним пальцями). За тим, як швидко оновлюється початкова довжина або форма кульки, визначають еластичність клейковини.

Розрізняють еластичність добру, коли довжина і форма кульки після зняття зусилля майже повністю відновлюється, незадовільну, коли кулька зовсім не відновлює своєї початкової форми, і задовільну - коли клейковина займає проміжне положення.

Залежно від еластичності і розтяжності клейковину поділяють на три групи.

- 1 **група** - клейковина з доброю еластичністю і довга або середня за розтяжністю;
- 2 **група** - клейковина з доброю еластичністю, коротка за розтяжністю, а також із задовільною еластичністю, коротка, середня або довга за розтяжністю;
- 3 **група** - клейковина мало еластична, сильно тягнеться, провисає при розтягуванні, рветься під дією власної маси.

ВИСНОВОК

Контрольні питання

1. Зазначити класифікацію білків. Навести приклади.
2. Чим складні білки відрізняються від простих?
3. Навести приклади будови фібрилярних білків: кератину і колагену
- 4 Будова і значення гемоглобіну, міоглобіну.

Лабораторна робота № 4

НУКЛЕОПРОТЕЇДИ

Мета: провести вилучення та гідроліз нуклеопротеїдів, зробити аналіз продуктів гідролізу.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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 фосфатної 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:



пурины (аденін, гуанін) + пірамідини (цитозин, урацил, тимін) + пентози (рибоза, дезоксирибоза)

Дослід 1. Одержання нуклеопротейдів з дріжджів

ХІД РОБОТИ

5 г дріжджів поміщають у ступку, додають 10 краплин ефіру і 10 краплин води. Вносять щіпку скляного піску і ретельно розтирають. До гомогенату доливають 30 мл 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%-ної оцтової кислоти (12мл) до повного осадження нуклеопротейду. Осад нуклеопротейду збирають за допомогою другого центрифугування та використовують для реакції гідролізу.

ВИСНОВОК

Дослід 2. Гідроліз нуклеопротейду

ХІД РОБОТИ

Нуклеопротейд, одержаний з дріжджів, переносять у колбочку для гідролізу, додають 15 мл 5%-ного розчину сульфїтної кислоти. Колбочку закупорюють коркою зі зворотним холодильником і обережно кип'ятять протягом часу. Після охолодження гідролізат фільтрують у хїмічну склянку, і використовують для аналізу продуктів гідролізу.

ВИСНОВОК

АНАЛІЗ ПРОДУКТІВ ГІДРОЛІЗУ

Дослід 1. Виявлення простих білків

ХІД РОБОТИ

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

ВИСНОВОК

Дослід 2. Відкриття пентоз

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 0,5-1 мл гідролізату та нейтралізують за лакмусом 10%-ним розчином NaOH. До нейтралізованого гідролізату додають рівний об'єм реактиву Фелінга, пробірку збовтують та нагрівають. Спостерігають появу жовто-червоного кольору осаду закису та окису міді. Напишіть рівняння реакції.

ВИСНОВОК

ДОСЛІД 3. ВІДКРИТТЯ ПУРИНОВИХ ОСНОВ

ХІД РОБОТИ

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

ВИСНОВОК

ДОСЛІД 6. ВІДКРИТТЯ ФОСФОРНОЇ КИСЛОТИ

ХІД РОБОТИ

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

ВИСНОВОК

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 з нуклеїновими кислотами?
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
10. Катобалізм пуринових та піримідинових основ.
11. Нуклеозидмоно - , ди – та трифосфати.
12. Циклічні нуклеотиди, їхнє біологічне значення.

Лабораторна робота № 5

ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета: дослідити фактори, які впливають на активність ферментів.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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 умов порівняно низької температури. Біологічне значення цього явища дуже велике.

Дослід 1. Термолабільність та температурний оптимум ферментів.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

У всіх реакціях, що каталізуються ферментами, а також звичайних хімічних реакціях, за умов підвищення температури зростає швидкість. Але ферменти є білки, які за високої температури можуть незворотно денатуруватися. Для ферментативної дії характерно явище, 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°C – 40°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 1%-ного 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), а решту поставити на водяну баню. 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 виявляється зворотня гальмуюча дія низької температури на активність ферменту.

Дослід 2. Вплив рН на дію ферменту

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Активність ферменту змінюється залежно від величини рН. Для дії різних ферментів оптимум рН різний. Взагалі ферментативні властивості має не вся поверхня молекули, а її активний центр. Просторове розташування амінокислотного центру

є дуже важливим для дії ферменту. Зміна електричного заряду молекули ферменту, що відбувається під впливом рН та пов'язана зі зміною ступеня дисоціації та іонізації функціональних груп білка, призводить до зміни будови та просторового розташування поліпептидного ланцюга. При зміні ступеня дисоціації одні групи ланцюга наближаються один до одного, а інші – віддаляються. Ця зміна просторового розташування активних ділянок молекули ферменту під впливом рН і призведе до зміни швидкості ферментативної дії.

ХІД РОБОТИ

У шости 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 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% - ного розчину крохмалю. В кожную з пробірок додають по 1 л фосфатної буферної суміші з різним значенням рН. Потім у кожную пробірку доливають по 1 мл розбавленої слини, перемішують і ставлять у водяну баню при 38 – 40 °С. 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 данного розчину (приблизно 6,8) є найбільш сприятливим для дії амілази слини.

ВИСНОВОК

Дослід 3. Специфічність ферментів

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 сахарози, а в пробірки №3 і №4 – по 2 мл розведеної слини. Вміст кожної пробірки ретельно перемішують і ставлять у водяну баню при температурі 38 °С. 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 Фелінга	Проба з йодом
			позитивна або негативна	
1	крохмаль	сахараза		
2	сахароза	сахараза		
3	крохмаль	амілаза		
4	сахароза	амілаза		

ВИСНОВОК: _____

Дослід 4. Активатор та паралізатор амілази слини

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Великий вплив на активність ферментів здійснює наявність 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 натрій хлориду, 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.

ВИСНОВОК

Лабораторна робота №6

ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ФЕРМЕНТІВ.

Мета: визначити дію β -амілази в сечі.

Дослід 1. Визначення β -амілази в сечі за Вольгемутом

ХІД РОБОТИ

У десять пробірок наливають по 1 мл фізіологічного розчину (0,9 % - ний розчин натрій хлориду). В першу пробірку додають 1 мл сечі. З першої пробірки беруть 1 мл і переносять у другу, з другої беруть 1 мл і переносять у третю тощо. З 10-ї пробірки 1 мл рідини виливають. У кожен пробірку доливають по 2 мл 0,1% розчину крохмалю, ретельно збовтують та ставлять усі пробірки у водяну баню при 45⁰С на 15 хвилин. Після закінчення вказаного терміну пробірки негайно охолоджують. Потім у кожену, починаючи з останньої пробірки, додають по 1 краплині 0,02 н розчину йоду в йодистому калії до утворення стійкого кольору.

У тій пробірці, де рідина забарвлена в синій колір, крохмаль β -амілазою не розщеплюється. Ферментативна дія закінчилась у попередній пробірці. Якщо, наприклад, у пробірці №6 є нерозщеплений крохмаль то розраховують, яка кількість сечі утримується в п'ятій пробірці, де зовсім немає синього кольору. Для цього використовують таблицю, приведену нижче. У п'ятій пробірці активність ферменту, що виражається в одиницях діастази (β -амілази), дорівнює 64.

№ пробірки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Розведення	2	4	8	16	32	64	128	266	512
Одиниці діастази Д=45/15	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

ВИСНОВОК

Контрольні питання

1. Як класифікують ферменти? Назвати основні класи ферментів.
2. Яку будову мають ферменти?
3. Чим відрізняються складні ферменти від простих?
4. Що таке термолабільність та температурний оптимум ферменту?
5. Що таке рН-оптимум ферменту?
6. Що таке специфічність ферментів? Якою вона буває?
7. Що таке активатори та інгібітори ферментів?
8. У чому полягає молекулярний механізм активації та інгібування ферментів?
9. Що таке ізоферменти?
10. У чому полягає теорія ферментативного каталізу та субстрат - ензимної взаємодії?
11. Де і як застосовують ферменти у біологічних процесах?

МОДУЛЬ 2

ВУГЛЕВОДИ І ЛІПІДИ. ЇХ ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ.

Лабораторна робота №7

ЦІАНІДНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ МОНОСАХАРИДІВ У РОСЛИНАХ.

Мета: кількісно визначити вміст цукрів у рослинній сировині.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Метод заснований на здатності $K_3[Fe(CN)_6]$ (червона кров'яна сіль) у лужному середовищі окислювати цукри. Реакцію здійснюють шляхом титрування розчином цукру, що досліджується, киплячим лужним розчином $K_3[Fe(CN)_6]$ у присутності метиленової сині у якості індикатору.

Вміст моноцукри дів обчислюється за кількістю титрованого розчину калію гексаціаноферату (II) (червона кров'яна сіль) і за об'ємом витраченого на його титрування розчину цукру невідомої концентрації.

ХІД РОБОТИ

Свіжі овочі або фрукти подрібнюють на тертці, а потім розтирають у ступці. На терезах зважують 12 - 25 г матеріалу, що досліджується і кількісно переносять у широкогорлу мірну колбу

ємністю 250 мл, багатократно змиваючи матеріал дистильованою водою у колбу. Дистильованою водою доводять об'єм у колбі з наважкою до 150 мл і перемішують. Сильно кислі розчини нейтралізують за лакмусовим папірцем NaOH (8%).

Колбу поміщують на 30 хв на водяну баню при температурі 80°C. Протягом екстракції вуглеводів вміст колби багатократно помішують. Потім у колбу вливають 10 см³ 10 % – ного плюмбум ацетату для осадження білків. Вміст колби перемішують і надлишок ацетату плюмбуму, що заважє подальшому аналізу, осаджують насиченим розчином натрій сульфату, доливаючи його невеликими порціями до припинення утворення каламуті. Потім об'єм у колбі доводять до 250мл дистильованою водою, ретельно перемішують і фільтрують через складчастий фільтр у колбу.

Фільтратом заповнюють бюретку, а у порцелянову чашку наливають 20 мл 1%-ного розчину $K_3[Fe(CN)_6]$ вливають туди ж 5мл 2,5 н розчину NaOH.

Порцелянову чашку встановлюють на кільце і підігрівають пальником, а коли її вміст закипить, додають одну краплю метиленвої сині. Не припиняючи нагрівання, вміст порцелянної чашки титрують розчином цукру з бюретки до знебарвлення індикатору.

Розчин цукру вливають маленькими порціями постійно перемішуючи вміст чашечки.

Вміст цукру, що пішов на титрування, має бути не більше 8 мл. При більшому витрачанні розчину цукру на титрування, зменшують вміст удвічі 1% -ного $K_3[Fe(CN)_6]$ і лугу.

Після охолодження відтитрованого розчину може з'явитися фіолетове забарвлення, яке вказує на окислення метиленової сині киснем повітря.

Вміст цукрів знаходять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 1,006 + 0,00175 \cdot b \cdot 100}{H \cdot b}$$

a- кількість 1% -ного $K_3[Fe(CN)_6]$, який було взято у порцелянову чашку для титрування, мл;

б – кількість цукру, що пішло на титрування, мл;

H – наважка аналізованої речовини, що відповідає 1 см³ розчину цукру, яким титрували $K_3[Fe(CN)_6]$ у мл;

Наприклад: для аналізу взято 20 г рослинного матеріалу.

Отже, 20000 мг рослинної сировини міститься у 250 мл,

а у 1 мл = $20000 \cdot 1 : 250 = 80$ мг. Цю величину і підставляємо у формулу.

ВИСНОВОК _____

Контрольні питання

1. Класифікація вуглеводів. Навести приклади.
2. Ізомерія моносахаридів. Значення моносахаридів.
3. Похідні моносахаридів та їх значення в організмі.
4. Дисахариди, будова, біохімічне значення.
5. Гомополісахариди. Основні представники. Будова. Біологічне значення.
6. Гетерополісахариди. Основні представники. Будова. біохімічне значення.

Лабораторна робота № 8

ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ТА КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖИРІВ

Мета: визначити йодне та кислотне число жиру.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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 грам-еквіваленту 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 прореагував, титрують 0,1 н розчином тіосульфату спочатку до слабо жовтого кольору, потім додають 0,5 - 1% - ний розчину крохмалю до знебарвлення розчину.

РОЗРАХУНОК, 1 мл 0,1 н розчину тіосульфату еквівалентний 1 мл 0,1н розчину йоду (0,01270 г йоду). Знаючи скільки мілілітрів розчину йоду (а) – налито 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 тягарцем (с) жиру. Звідси йодне число:

$$X = (a-b) \cdot 0,0127 \cdot 100 : c \cdot 2.$$

ВИСНОВОК: _____

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. У прогірклих жирів кислотне число збільшується.

ВИСНОВОК: _____

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. Механізм окислення жирів.
6. Складні ліпіди, їх значення.
7. Стерини і стероїди. Воски.

Лабораторна робота № 9

ВПЛИВ РІЗНИХ ЧИННИКІВ НА СТУПІНЬ ПОШКОДЖЕННЯ КЛІТИННИХ МЕМБРАН

Мета: дослідити різні чинники, які викликають пошкодження біомембран, порівняти їх здатність до пошкодження.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Завдяки білкам, біомембранам характерні каталітичні властивості (цю функцію виконують периферичні білки, що частково занурені в ліпідний матрикс) і напівпроникненість. Функцію напівпроникненості виконують інтегральні білки, за рахунок яких утворюється пори. Завдяки мембранам клітина зберігає свої властивості і сталість внутрішнього середовища.

Пошкодження клітини відбувається, в першу чергу, за рахунок руйнування білкових структур. Через те, що напівпроникненість мембран забезпечують білки, при пошкодженні вони руйнуються і мембрана втрачає цю найважливішу функцію. Розпочинається вільний вихід речовини з клітини. Чим більше пошкодження, тим активніше виходять речовини. Ця ознака може бути використана, як індикатор або показник ступеня пошкодження клітини.

Дослід 1. Вплив різних факторів на пошкодження клітинної мембрани

ХІД РОБОТИ

З коренеплоду столового буряка вирізають шматочки циліндричної форми заввишки 4 см, їх ретельно промивають у воді і поміщають по одному в п'ять пробірок, наповнених 10 мл різних розчинів за схемою досліду (табл.1). Варіант досліду з кип'ятінням виконують таким чином. У колбу з киплячою водою опускають шматочок буряка, через 2 хв його виймають і опускають у пробірку з холодною водою. Через 20 хв після початку досліду всі пробірки інтенсивно збовтують, шматочки буряка виймають і порівнюють кількість пігменту, що вийшов з клітин у різних варіантах досліду за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК). Результати записують у таблицю.

Таблиця 1.

Вплив різних факторів на ступінь пошкодження клітини

Номер пробірки	Варіант досліду	Інтенсивність забарвлення розчину
1	Вода (контроль)	
2	Вода (кип'ячена)	
3	30% розчин оцтової кислоти	
4	50% розчин етилового спирту	
5	Вода + 3 краплі хлороформу	

За матеріалами спостережень роблять висновки про ступінь пошкодження мембрани дією різних факторів.

ВИСНОВОК: _____

Контрольні питання:

1. Які функції виконують біологічні мембрани?
2. Які білки входять до складу біомембран?
3. Що таке асиметрія біомембран?
4. Які є види транспорту речовин через мембрану?
5. Як працює калій-натрієва «помпа»?
6. Що таке ендо- і екзоцитоз? Які механізми цих процесів?
7. Як працює Шатл-система переносів у мембранах?
8. Рецепторні системи і механізм передачі сигналів у клітині.

Лабораторна робота № 10

ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРМЕНТІВ КАТАЛАЗИ І ПЕРОКСИДАЗИ

Мета: дослідити ферменти – оксидоредуктази.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Залежно від білкової частини та специфічності субстрату розрізняють більше ніж 150 ферментів цієї групи. До таких ферментів наприклад, відносяться алкогольдегідрогеназа, лактатдегідрогеназа, малатдегідрогеназа, 6-фосфоглюконатдегідрогеназа.

Аеробні або флавінові дегідрогенази.

Вони каталізують відщеплення двох протонів від субстратів і передають електрони від анаеробних дегідрогеназ різним акцепторам (хінони, цитохроми), в тому числі й кисню. Простетичною групою є похідні вітаміну В₂ – флавінаденіндинуклеотид флавінмононуклеотид.

Оксидази. Ферменти передають електрони від субстрату лише на кисень. При цьому утворюється вода (переноситься на O₂ 4 електрони), пероксид гідрогену (H₂O₂) або супероксидний аніон оксигену (O²⁻).

H₂O₂ і O²⁻ дуже токсичні, тому швидко перетворюються на воду і кисень під дією каталази та супероксиддисмутази. Група ферментів, активаторів кисню досить чисельна. Однак основну

роль у цій групі відіграють ферменти, до складу яких входять атоми Феруму. Це двокомпонентні системи простетичними групами яких є ферум-порфірини. Особливу функцію в процесі дихання виконують ферменти, які розкладають пероксид гідрогену, що утворюється під час дихання як результат дії деяких оксидаз. Найбільш важливими ферментами цієї групи є каталаза та пероксидаза.

Каталаза – фермент, який розкладає пероксид гідрогену, що утворюється в процесі біологічного окиснення на воду та молекулярний кисень ($2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), а також окиснює в присутності H_2O_2 низькомолекулярні спирти і нітроти. Відноситься до хромопротеїдів, які мають як простетичну (небілкову) групу окиснений гем, що містить іон феруму. Специфічність каталази у ставленні до субстрату-відновника є невелика, тому вона може каталізуватися не тільки розкладання H_2O_2 , а й окиснення нижчих спиртів. У клітинах фермент локалізується в спеціальних органелах – пероксисомах.

Пероксидаза – найпоширеніший фермент рослинних тканин. Фермент входить до складу антиоксидантної системи рослин, здатний каталізувати реакції оксидазного, пероксидазного і оксигеназного окиснення. Каталізує окиснення різних полі фенолів, амінів, жирних кислот та інших сполук за допомогою пероксиду гідрогену або органічних перексидів.

Пероксидаза, як і каталаза відноситься до двокомпонентних ферментів, простетична група має у складі ферум, що з'єднується із залишками чотирьох пірольних кілець.

Дослід 1. Визначення пероксидази

ХІД РОБОТИ

Натирають на тертушці очищену бульбу картоплі, із одержаної маси віджимають сік і збирають у колбу. У чотири пробірки вносять за схемою отриманий сік.

Схема досліджень:

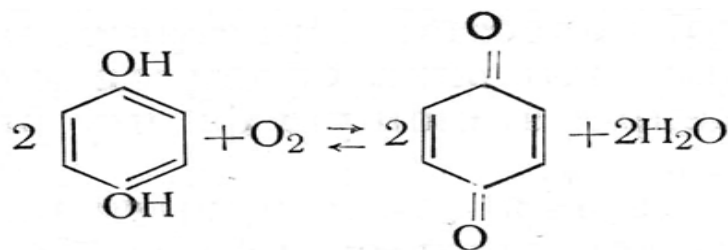
1 пробірка – вносять: 5 мл 1% розчину гідрохінону, 1 мл 3% розчину пероксиду гідрогену, 1 мл картопляного соку;

2 пробірка – вносять: 5 мл 1% розчину гідрохінону, 1 мл 3% розчину пероксиду гідрогену;

3 пробірка - вносять: 5 мл 1% розчину гідрохінону, 1 мл картопляного соку;

4 пробірка – вносять: 5 мл 1% розчину гідрохінону, 1 мл попередньо прокип'яченого картопляного соку (1хв) і 1 мл пероксиду гідрогену.

При окисненні гідрохінону в бензохінон розчин буріє. Відбувається реакція



Гідрохінон

пероксидаза

бензохінон

Спостерігається деяке побуріння самого картопляного соку без додавання гідрохінону і пероксиду гідрогену, що пов'язано з дією поліфенолоксидази, яка окислює полі феноли тканин картоплі за участю молекулярного кисню.

Таблиця 1

Інтенсивність забарвлення розчину при різних умовах дослідів

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

Беруть до уваги забарвлення в пробірках, на основі отриманих результатів роблять висновки, відмічають, які умови необхідні для оптимізації роботи ферментів.

ВИСНОВОК

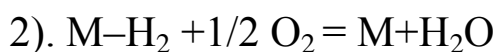
Дослід 2. Визначення активності дегідрогенази

ХІД РОБОТИ

Для визначення активності дегідрогенази використовують метиленовий синій. Цей барвник може бути акцептором гідрогену. При відновленні барвник переходить у безбарвну лейкоформу. При взаємодії з молекулярним киснем лейкоформа метиленового синього самовільно окислюється і знову набуває забарвлення. Схему реакції подано нижче:



C – субстрат, M - метиленовий синій, C - субстрат окиснений
H₂ -лейкоформа барвника



Дослід з вивчення особливостей дії дегідрогеназ проводять із насінням гороху або квасолі. Злегка проросле насіння (10-12 шт) очищують від шкірки та розділяють на сім'ядолі. Половину матеріалу поміщують у колбу з водою і кип'ятять протягом 3 хв. Потім обидві порції поміщають у пробірки і заливають розчином метиленового синього. Через 5-10 хв розчин зливають, сім'ядолі ретельно промивають водою. Після цього пробірки заповнюють дистильованою водою і закривають пробками. Пробки поміщують у водяну баню або термостат за температури 25-30° С. через 5-10 хв помічають забарвлення сім'ядолей у пробірках. Витрушують насіння в фарфорові чашки, залишають на повітрі й спостерігають за зміною забарвлення.

За отриманими даними роблять висновок про причини різної здатності до забарвлення в варіантах досліду і функції дегідрогеназ у даному експерименті.

ВИСНОВОК: _____

Дослід 3. Якісна реакція на каталазу в крові

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають 2-3 мл дистильованої води, додають 1-2 краплі свіжої крові і 1 мл 15% розчину перекисю водню. Негайно ж починається бурхливе виділення бульбашок кисню. Пояснити явище.

ВИСНОВОК: _____

Контрольні питання

1. Чим біологічне окиснення відрізняється від небіологічного?
2. Коферменти оксидоредуктаз.
3. Макрогічні сполуки та їх класифікація.
4. Типи окиснювального фосфорилування.
5. Інгібітори дихальних ферментів.
6. Енергетика анаеробного і аеробного гліколізу жирів.
7. β – окиснення жирних кислот. Енергетичний ефект.

МОДУЛЬ 3

РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ.

Лабораторна робота №11

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВІТАМІНИ

Мета: дослідити наявність у рослинному матеріалі..

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

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, С, Р та вітаміни, що у воді нерозчинні: А, D, Е, К, F.

Дослід 1. Якісні реакції на вітамін А

ХІД РОБОТИ

У пробірку наливають розчин , що досліджується і додають декілька краплин 1% - ного розчину хлориду заліза (III). За наявності вітаміну А з'являється яскраво-зелене забарвлення.

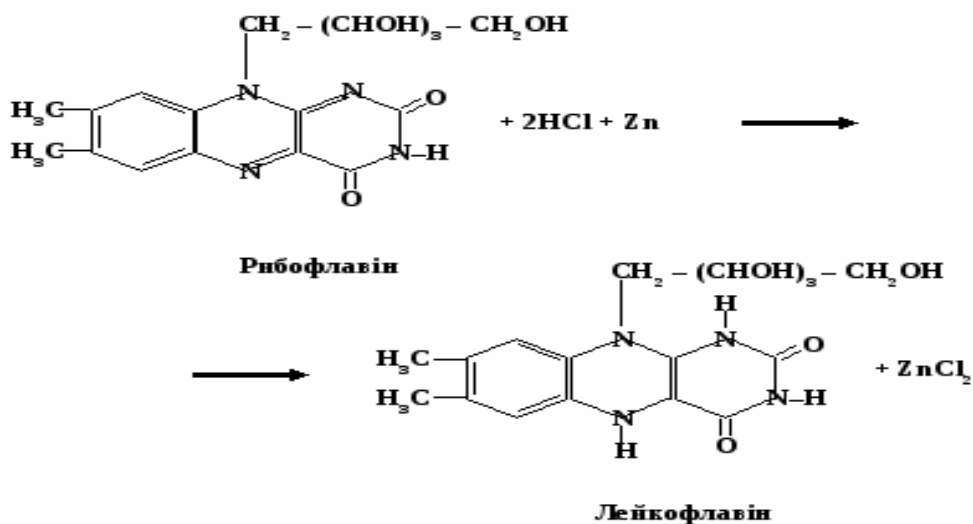
В пробірку наливають декілька мілілітрів розчину та по 1 – 2 мл концентрованої сульфідної кислоти. При наявності вітаміну А з'являється синій колір, що змінюється на фіолетовий, а потім на червоно-бурий.

ВИСНОВОК

Дослід 2. Якісна реакції на вітамін В₂

ХІД РОБОТИ

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



У пробірку вносять 10 крапель досліджуваного розчину, додають 5 крапель концентрованої HCl і занурюють шматочок металевого цинку.

Починається виділення пухирців водню і рідина поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. При збовтуванні знебарвленого розчину лейкоз'єднання знову окислюється киснем, що міститься в повітрі, у рибофлавін (розчин стає жовтим).

ВИСНОВОК

Дослід 3. Якісна реакції на вітамін С

ХІД РОБОТИ

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-синій осад берлінської блакиті. У другій пробірці забарвлення буде буре. Напишіть хімізм цієї реакції.

ВИСНОВОК

Контрольні питання

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

Лабораторна робота № 12

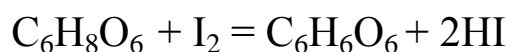
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ



Мета: кількісно визначити вміст вітаміну С у продажному препараті аскорбінової кислоти.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Кількісне визначення аскорбінової кислоти засновано на окислюванні її йодом; при цьому утвориться окислена форма, або дегидроформа вітаміну:



ХІД РОБОТИ

Відважують на аналітичних вагах 1 мг аскорбінової кислоти. Наважку кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл із притертим корком й розчиняють у дистильованій воді. Рідину в колбі доводять до риски й ретельно перемішують, перевертаючи колбу.

Для титрування з отриманого розчину відбирають піпеткою 10 мл розчину і переносять у конічну колбу на 50-100 мл, доливають 2 мл розчину крохмалю й титрують 0,1н розчином йоду до появи стійкого слабо-синього забарвлення.

Розрахунки. Припустимо, на титрування 10 мл розчину аскорбінової кислоти пішло 11,4 мл 0,0973 н розчину йоду.

Виправлення на нормальність йоду:

$$K_{12} = \frac{N}{N_1} = \frac{0,0973}{0,1} = 0,973$$

Таким чином, точно 0,1 н розчину йоду пішло б:

$$11,4 * 0,973 = 11 \text{ мл.}$$

1 мл точно 0,1 н розчину йоду титрує 0,0088 мл аскорбінової кислоти, а 11 мл $0,0088 * 11 = 0,0968$ г.

Знайдена кількість аскорбінової кислоти міститься в 100 мл (або в 1 г наважки) утримує:

$$0,0968 * 10 = 0,968\text{г, або } 96,8\%$$

Залежно від призначення аскорбінова кислота підрозділяється на медичну й харчову. Медичний препарат повинен містити не менше 99%, харчовий не менш 97% кислоти.

ВИСНОВОК

Контрольні питання

1. Які вітаміни входять до складу коферментів?
2. Дихальний ланцюг ферментів.

Лабораторна робота № 13

ТЕРПЕНИ І АЛКАЛОЇДИ

Мета: виявлення терпенів і алкалоїдів у рослинному матеріалі.

ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Алкалоїди – нітрогеновмісні органічні сполуки основного характеру, переважно рослинного походження, здебільшого непростого хімічного складу, побудовані з гетероциклічних ядер. Відомо понад 1000 алкалоїдів (з них тваринного походження лише близько 50).

Алкалоїди дуже поширені в рослинному світі. На них багаті рослини родини макових, пасльонових, жовтецевих, бобових та ін.. алкалоїди концентруються в різних органах рослин. Наприклад, нікотин міститься переважно в листках тютюну й махорці, опій – у насінні маку, хінін – у корі хінного дерева, коніїн - у всіх органах цикути й боліголови, аконіти – у бульбах аконіту тощо.

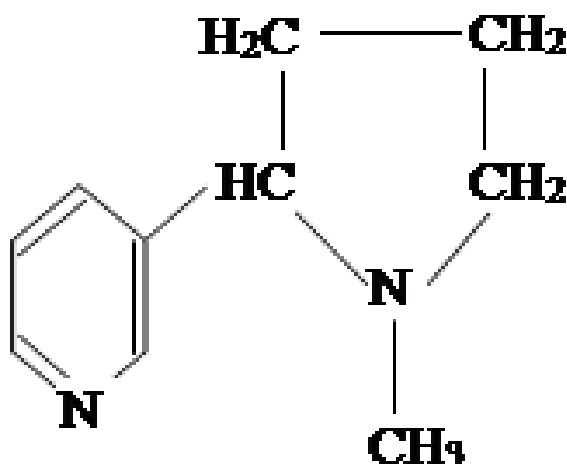
У рослинних тканинах алкалоїди містяться у вигляді солей з органічними кислотами (найчастіше з оксалатною, сукцинатною, тартратною, цитратною тощо). Їх поділяють на кисневі й безкисневі. Кисневі алкалоїди (атропін, хінін, кофеїн та ін..) здебільшого кристалічні речовини, безкисневі (коніїн, нікотин, анабазин) – є рідинами.

Дослід 1. Добування і властивості нікотину

ХІД РОБОТИ

В колбу місткістю 50-100 мл вносять 2-3 гр махорки або тютюну добавляють 20-30 мл води і 2-3 мл 10% розчину сульфатної кислоти. Кип'ятять упродовж 10-15 хвилин. Охолоджують і фільтрують. Суміш нейтралізують лугом до появи лужної реакції (контролюють лакмусовим папірцем). Фільтрат ділять на чотири однакові частини розливаючи у відповідні пробірки. В першу пробірку добавляють кілька крапель розчину Люголя. Випадає червоно бурій осад, в другу пробірку добавляють кілька крапель 10% розчину таніну - випадає білий осад, у третю пробірку добавляють кілька крапель насиченого розчину пікринової кислоти – випадає жовтий осад. У четверту пробірку добавляють кілька крапель хлориду меркурію (I) – утворюється жовтий осад.

Хімізм. Нікотин екстрагується з махорки або тютюну водою, підкисленою сульфатною кислотою. Кислота нейтралізується лугом, а алкалоїдні реактиви, які добавляють у кожному чотирьох пробірок утворюють з нікотинном нерозчинні прості солі, оскільки він, маючи два атоми нітрогену в складі своєї молекули, виявляє яскраво виражені основні властивості:

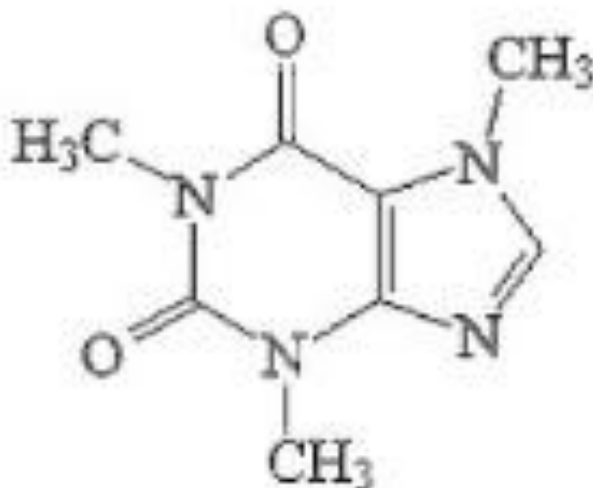


Примітка. Реакція з таніном має практичне застосування при отруєння алкалоїдами. Людині чи тваринам, що отруїлися дають випити розчин таніну або міцного чаю (ньому є танін та інші дубильні речовини). У травному каналі алкалоїд зв'язується в нерозчину і мало отруйну сполуку. Подальше промивання шлунка сприяє виведенню отрути з організму.

Дослід 2. Добування кофеїну та вивчення його властивостей

ХІД РОБОТИ

У невеличкий тігель вносять 0,5- 1 гр чайного листя і накривають годинниковим склом. Вмішують на азбестовую сітку і обережно нагрівають. Через кілька хвилин виділяється вода, після чого сублимується кофеїн у вигляді ніжних блискучих кристалів:



Кілька кристаликів кофеїну, добутого сублімацією, вміщують у суху чисту пробірку, додають 8-10 крапель води і 2-5 крапель 10%-ного розчину таніну. Утворюється білий нерозчинний у воді осад.

На годинникове скло до кристаликів кофеїну додають 3-4 краплі концентрованої нітратної кислоти і обережно (під тягою!) нагрівають до повного випаровування рідини. До сухого осаду додають кілька крапель концентрованого розчину аміаку. З'являється яскраво-червоне забарвлення: утворився мурексид.

Хімізм. На першому етапі роботи відбувається виділення кофеїну з листя чаю методом сублімації - явище суть фізичного. На другому кофеїн з таніном утворює просту нерозчинну сіль. На третьому етапі під дією нітратної кислоти і подальшої дії аміаку утворився мурексид.

ДОСЛІД 3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТЕРПЕНІВ

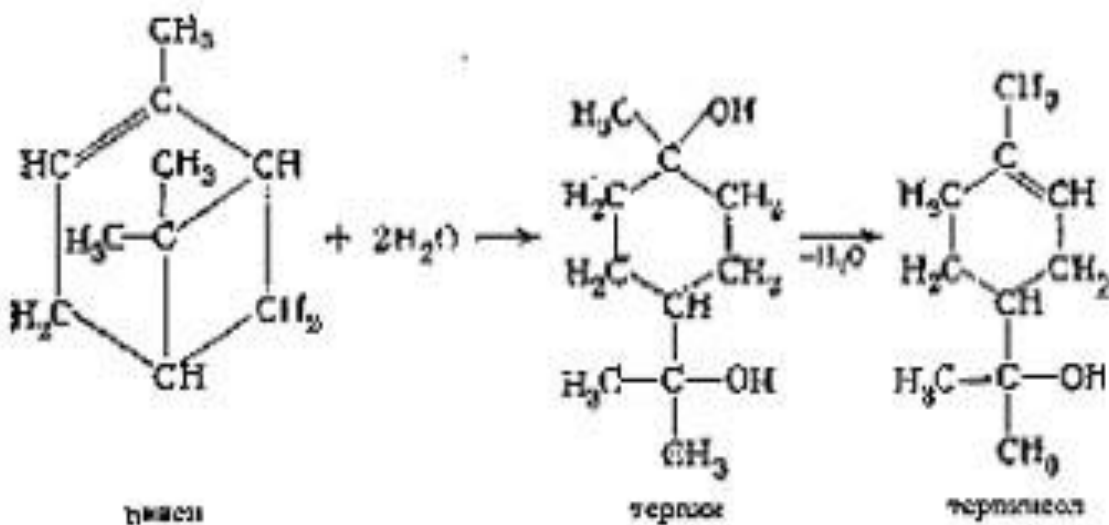
ТЕОРЕТИЧНА ОСНОВА

Пінеол міститься в невеликих кількостях у скипидарі, камфорній та геранієвій оліях. Це запашна речовина (запах бузку), використовується в парфумерії, як органічний розчинник, пластифікатор, флотоагент, сировина для добування терпінілацетату та інших запашних речовин.

ХІД РОБОТИ

В пробірку насипають 0,1 г терпінгідрату і 0,2 г сульфату калію, нагрівають на слабкому вогні. Утворюється терпінеол, що має запах бузку.

Хімізм. Під дією сульфату калію від молекули терпінгідрату відщеплюється молекула води, що призводить до утворення терпінеолу.



Контрольні запитання

1. Що таке терпени і терпеноїди? Наведіть основні з них і напишіть структурні формули
2. Дайте характеристику природних джерел, з яких добувають основні терпени.
3. Які способи добування терпенів вам відомі? Дайте коротку характеристику.
4. Наведіть приклади ациклічних терпенів. Напишіть їх структурні формули.
5. Напишіть структурні формули терпенів, які відповідають молекулярним формулам $C_{10}H_{16}$ і $C_{20}H_{32}$.
6. Напишіть структурні формули відомих вам моно- і біциклічних терпенів.
7. Навести класифікацію алколоїдів і дати коротку характеристику основним групам.
8. Практичне використання алкалоїдів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біологічна хімія з основами фізичної і колоїдної хімії: Методичні вказівки для ВНЗ аграрного профілю. – Київ: НАУ, 1998. – 147 с.
2. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. Проф. Я.І. Гонського – Тернопіль: Україна, 2001. – 288 с.

ЗМІСТ

1.	Передмова.....	3
2.	<u>МОДУЛЬ 1</u> Основні клітинні біомолекули.....	5
3.	Лабораторна робота № 1 Визначення білків за допомогою кольорових реакцій...	5
4.	Лабораторна робота № 2 Фізико хімічні властивості білків.....	10
5.	Лабораторна робота № 3 Визначення вмісту «сирої» клейковини в зерні	20
6.	Лабораторна робота № 4 Гідроліз нуклеопротеїдів	25
7.	Лабораторна робота № 5 Загальні властивості ферментів.....	33
8.	Лабораторна робота №6 Діагностичне значення ферментів	41
9.	<u>МОДУЛЬ 2</u> Вуглеводи і ліпіди. Їх енергетичне значення.....	44
10.	Лабораторна робота № 7 Ціанідний метод визначення вмісту моносахаридів в рослинах.....	44
11.	Лабораторна робота № 8 Визначення йодного та кислотного числа жирів.....	48
12.	Лабораторна робота № 9 Вплив різних чинників на ступінь пошкодження клітинних мембран.....	51
13.	Лабораторна робота № 10 Визначення різних ферментів каталази та пероксидази	54

14.	<u>МОДУЛЬ 3</u>	
	Речовини вторинного походження.....	61
15.	Лабораторна робота № 11	
	Якісні реакції на вітаміни.....	61
17.	Лабораторна робота № 12	
	Кількісне визначення аскорбінової кислоти.....	65
18.	Лабораторна робота № 13	
	Терпени і алкалоїди.....	67
19.	Список використаної літератури.....	73

ДЛЯ ПОДАТКІВ

Навчальне видання

БІОХІМІЯ

Методичні рекомендації

Укладач:

Абрамова Наталія Михайлівна

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 4,0

Тираж 30 прим. Зам. №

Н87 надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.02013