

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХІМІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА БІОХІМІЇ

Ю. О. Лесишина, О. І. Душенко, Г. М. Степаненко

БІОХІМІЯ

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів
напрямів підготовки «Хімія», «Біологія»
денної та заочної форм навчання

Вінниця
ДонНУ
2016

УДК 94:57(072)

ББК Г 1 + Е 1

Укладачі: *Ю. О. Лесишина*, канд. хім. наук, доцент
О. І. Душенко,
Г. М. Степаненко

Рецензенти: *Ю. М. Беспалько*, канд. хім. наук, доцент;
С. В. Жильцова, канд. хім. наук, доцент.

*Рекомендовано до друку вченою радою хімічного факультету Донецького
національного університету (м. Вінниця)
(протокол № 9 від 15.04.2016 р.)*

Біохімія: метод. вказівки до виконання лаб. робіт для студ. напрямів підготовки «Хімія», «Біологія» ден. та заочн. форм навчання / Ю. О. Лесишина, О. І. Душенко, Г. М. Степаненко; М-во освіти і науки України, Донец. нац. ун-т, каф. біохімії. – Вінниця: ДонНУ, 2016. – 44 с.

Навчальне видання рекомендоване студентам, що навчаються за напрямами підготовки «Хімія», «Біологія» денної та заочної форм навчання, для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія». Методичні вказівки включають назви лабораторних робіт, порядок виконання робіт, контрольні питання для закріплення матеріалу з теми, список рекомендованої літератури.

УДК 94:57 (072)

ББК Г 1 + Е 1

© Лесишина Ю. О., 2016
© Душенко О. І., 2016
© Степаненко Г. М., 2016
© ДонНУ, 2016

ЗМІСТ

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1. Кольорові реакції на білки	5
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2. Методи виділення білків. Реакції осадження білків.....	11
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3. Визначення ізоелектричної точки желатину	17
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4. Будова нуклеопротейнів дріжджів	18
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5. Кількісне визначення вмісту білка біуретовим методом	22
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6. Спектрофотометричне визначення вмісту білка у розчині	25
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7. Якісне визначення вуглеводів.....	27
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8. Кількісне визначення редуруючих цукрів (за методом шорля)	29
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9. Вивчення властивостей та складу ліпідів	31
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10. Властивості ферментів. Специфічність дії та термолабільність ферментів	33
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11. Властивості ферментів. Вплив активаторів та інгібіторів на дію ферментів	36
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12. Властивості ферментів. Вплив рН середовища на активність ферментів...	39
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13. Визначення активності ліпаз у насінні олійних або злакових культур	40
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14. Визначення активності оксидоредуктаз рослинного походження.....	42
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	45

Біуретову реакцію здатні давати сполуки, у складі яких міститься не менше двох пептидних зв'язків. Забарвлення біуретового комплексу залежить від кількості пептидних зв'язків, концентрації білка та іонів Купруму. Воно може змінюватися від синього до червоного з переважанням фіолетового.

Хід роботи

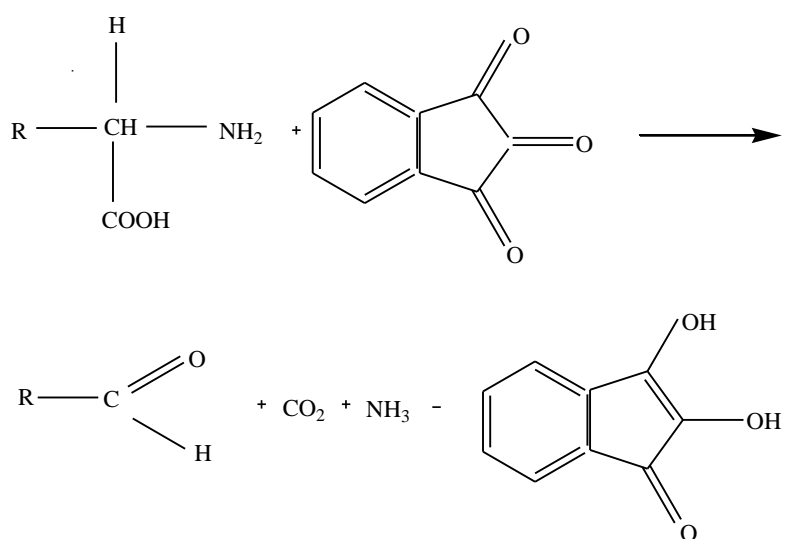
Беруть п'ять пробірок: в першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; в другу – 1 мл розчину желатини; в третю – 1 мл розчину альбуміну, в четверту – 1 мл розчину казеїну; в п'яту – 1 мл розчину будь-якої амінокислоти.

До кожної пробірки додають по 1 мл 10 %-го розчину натрій гідроксиду та 1–2 краплі 1 %-го розчину купрум (II) сульфату і ретельно перемішують. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, який з'явився у кожній з них.

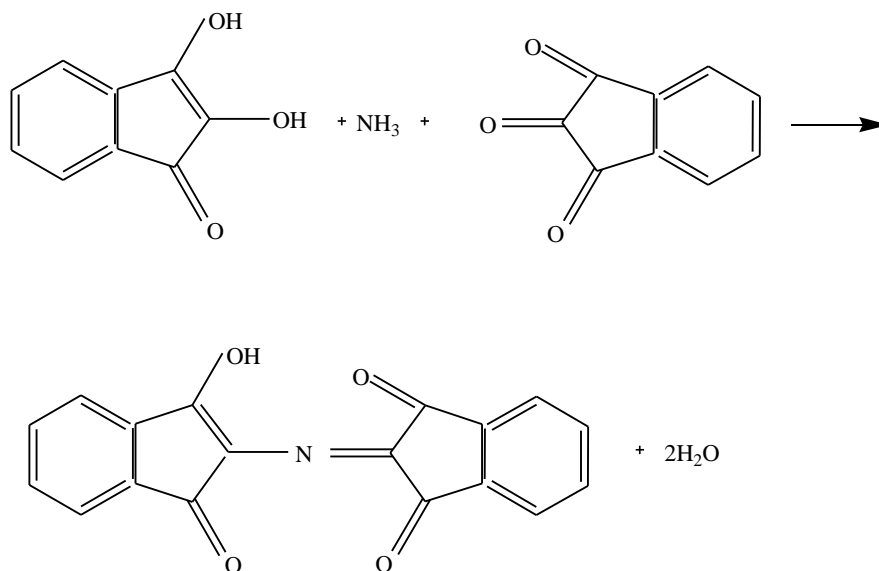
Дослід 2. Нінгідринова реакція

Нінгідринова реакція характерна для аміногруп, що знаходяться в α -положенні і входять до складу білка, а також для поліпептидів і вільних амінокислот.

При нагріванні до 70 °С α -амінокислоти і пептиди взаємодіють з нінгідрином (трикетогідринденгідратом), піддаючись окислювальному дезамінуванню з утворенням амоніаку і декарбоксілюванню з утворенням альдегіду і CO₂, нінгідрин при цьому відновлюється:



Відновлений нінгідрин, конденсуючись з амоніаком і молекулою окисленого нінгідрину, утворює забарвлену сполуку, яка, енолізуючись, переходить в забарвлену сполуку синьо-фіолетового кольору (пурпурний комплекс Руемана):



Хід роботи

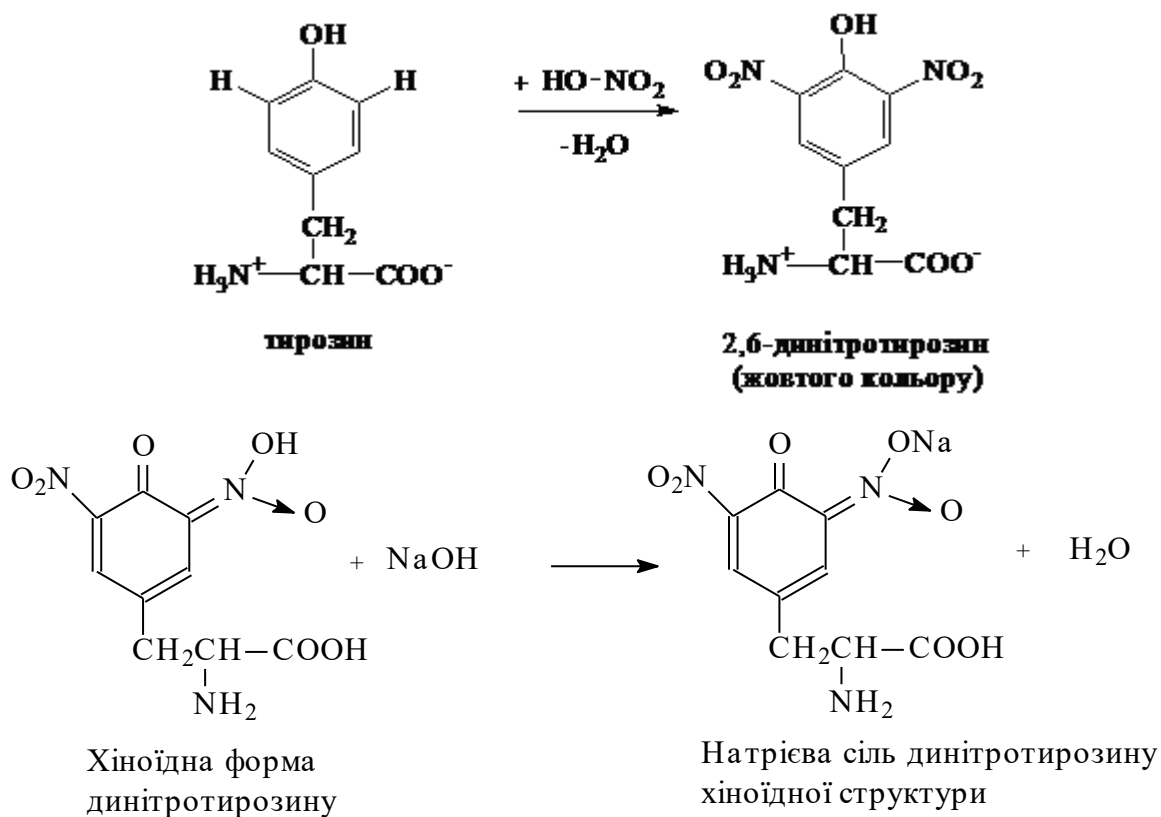
Як і в першому досліді, беруть п'ять пробірок: в першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; в другу – 1 мл розчину желатини; в третю – 1 мл розчину альбуміну, в четверту – 1 мл розчину казеїну; в п'яту – 1 мл розчину будь-якої амінокислоти.

До кожної пробірки додають по 5 крапель нінгідринового реактиву. Вміст пробірок перемішують і нагрівають на водяній бані за температури 70 °С протягом 5 хв. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, який з'явився у кожній з них.

Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція (реакція Мульдера)

Більшість білків під час нагрівання з концентрованою нітратною кислотою дають жовте забарвлення, яке при додаванні розчину лугу або амоніаку переходить в помаранчеве. Ця реакція (ксантопротеїнова або реакція Мульдера) характерна для ароматичного ядра циклічних амінокислот (фенілаланіну, тирозину і триптофану), які містяться майже в усіх білках. Під час дії концентрованою нітратною кислотою на ці амінокислоти відбувається нітрування їхнього ароматичного ядра з утворенням нітросполук

жовтого кольору, які під час додавання лугу перетворюються в солі хіноїдної структури, забарвлені в помаранчевий колір.



Аналогічно перебігає реакція нітрування фенілаланіну та триптофану.

Ксантопротеїнова реакція спостерігається на шкірі, нігтях, вовні, якщо на них потрапить концентрована нітратна кислота (жовте забарвлення), тому при роботі з цією кислотою обов'язково (!) надягають рукавички.

Білки, у складі яких циклічні амінокислоти відсутні, не дають ксантопротеїнової реакції. До таких білків відносяться желатин, сальмін тощо.

Хід роботи

Беруть п'ять пробірок: в першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; в другу – 1 мл розчину желатини; в третю – 1 мл розчину альбуміну, в четверту – 1 мл розчину казеїну; в п'яту – 1 мл розчину тирозину.

До кожної пробірки додають по 3 краплі концентрованої нітратної кислоти і обережно нагрівають. Спостерігають за зміною забарвлення в пробірках та відзначають колір, який з'явився у кожній з них. Після охолодження до пробірок додають по 15–20 крапель 20 %-го розчину NaOH.

По закінченні досліду роблять висновок про вміст у складі досліджуваних білків циклічних амінокислот.

Дослід 4. Реакція Лоурі на циклічні амінокислоти

Реакція Лоурі є однією з найчутливіших кольорових реакцій на білки, що вміщують циклічні амінокислоти. Реагуючи з реактивом Фоліна, вони утворюють забарвлені сполуки синього кольору. Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації циклічних амінокислот, тому цю реакцію також застосовують для кількісного визначення.

Для проведення реакції використовують наступні реактиви:

- *реактив А*: 2 %-вий розчин Na_2CO_3 в 0,1н NaOH ;
- *реактив В*: 0,5 %-вий розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-вому розчині калій тартрату $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- *реактив С*: до 50 мл реактиву А піпеткою додають 1 мл реактиву В;
- *реактив Фоліна*: водний розчин $\text{H}_7[\text{P}(\text{W}_2\text{O}_7)]$ або (іноді) $\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$.

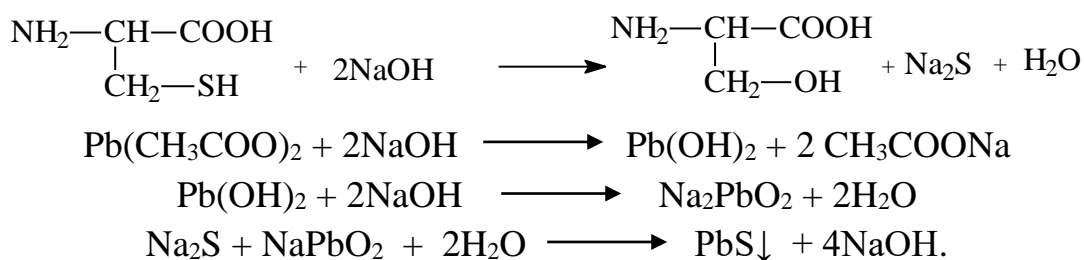
Хід роботи

Беруть п'ять пробірок: в першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; в другу – 1 мл розчину желатини; в третю – 1 мл розчину альбуміну, в четверту – 1 мл розчину казеїну; в п'яту – 1 мл розчину тирозину.

До кожної пробірки додають по 5 мл розчину реактиву С (готується попередньо лаборантами) і залишають на 10 хв; після того в пробірки доливають по 0,5 мл реактиву Фоліна. Через 30 хв у деяких пробірках спостерігають забарвлення рідини в інтенсивно-синій колір; в пробірках з желатином і гліцином колір реактиву не змінюється.

Дослід 5. Реакція Фоля на сульфурвмісні амінокислоти

Під час кип'ятіння амінокислот цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді гідроген сульфід, який у лужному середовищі утворює натрій сульфід. Для виявлення натрій сульфід до розчину додають іони важких металів, наприклад іони Плюмбуму, які з іонами Сульфуру утворюють нерозчинний осад плюмбум сульфід чорного кольору.



Інтенсивність забарвлення залежить від кількості сульфурвмісних амінокислот у складі білка та від концентрації білка у розчині. Метіонін, хоч і містить у своєму складі Сульфур, реакції Фоля не дає, через те, що сірка в ньому міцно зв'язана з метильною групою, а не з воднем.

Хід роботи

Беруть п'ять пробірок: у першу наливають 1 мл розведеного яєчного білка; у другу – 1 мл розчину желатини; в третю – 1 мл розчину альбуміну, у четверту – 1 мл розчину казеїну; у п'яту – 1 мл розчину тирозину.

У кожен пробірку додають по 5 крапель 10 %-го розчину NaOH і по 1 краплі 5 % $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ та нагрівають до появи чорного осаду. На підставі одержаних результатів роблять висновок щодо вмісту сульфурвмісних амінокислот у складі досліджуваних білків.

Результати лабораторної роботи слід записати у вигляді таблиці.

Таблиця 1

Кольорові реакції на білки

№	Назва реакції	Реактиви, що використовуються	Забарвлення, що спостерігається	Пояснення реакції

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Який тип зв'язку лежить в основі первинної структури молекули білка? За допомогою якої кольорової реакції його можна визначити? Наведіть схему цієї реакції.

2. Наведіть схему реакції взаємодії будь-якої незамінної амінокислоти з нінгідрином. Назвіть вихідні сполуки і продукти реакції.

3. Наведіть приклад дипептиду, що вміщує залишок фенілаланіну. Напишіть для цього дипептиду якісну реакцію, що підтверджує наявність цієї амінокислоти в складі дипептиду.

4. Які сульфурвмісні амінокислоти постійно зустрічаються у складі природних білків? Наведіть формули цих амінокислот. За допомогою якої кольорової реакції можна довести їхню наявність у складі білкової молекули?

5. Перерахуйте інші відомі кольорові реакції на білки та амінокислоти, що входять до їхнього складу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ БІЛКІВ. РЕАКЦІЇ ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Для того, щоб успішно виконати та зрозуміти наступну лабораторну роботу, необхідно згадати колоїдні та гідрофільні властивості білків.

Білки, розчиняючись у воді, утворюють колоїдні розчини. Це такі розчини, діаметр частинок яких не перевищує 10^{-7} см.

Білки виявляють гідрофільні властивості, тобто мають спорідненість до води. На поверхні білкової молекули розташовані різні гідрофільні групи, що притягують до себе дипольні молекули води. Гідрофільність різних функціональних груп різна, наприклад, пептидна група $-CO-NH-$ зв'язує одну молекулу води, карбоксильна група $-COO^-$ – зв'язує чотири молекули води, групи $-NH$ і $-SH$ – по одній молекулі води. Ті з молекул води, які розташовані ближче до поверхні білкової молекули, орієнтовані до неї певним чином. Чим далі від поверхні білка віддалені диполі води, тим безладніше їхнє розташування у розчині. Диполі води, що утворюють гідратну оболонку навколо білкової молекули, утримують білок у розчині.

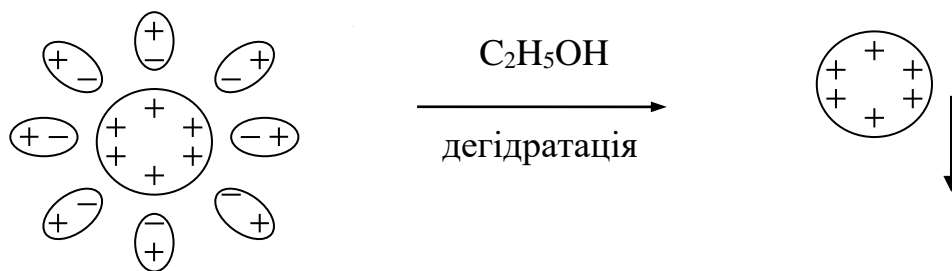
Таким чином, найбільше значення мають фактори, що утримують білок у розчині:

1. Сумарний заряд білка, який визначається співвідношенням катіонних і аніонних груп в радикалах амінокислотних залишків білка.

2. Наявність гідратної оболонки.

Якщо білок втрачає один з цих факторів, він випадає в осад. Наприклад, якщо відняти у білкових молекул диполі води, що пов'язані з ними, і змен-

шити таким чином їхню гідратацію, то вони почнуть злипатися, утворюючи більш крупні частинки білка, і будуть осідати в розчині у вигляді осаду. Наприклад:



білкова частинка, яка має сумарний (+)
заряд і оточена гідратною оболонкою

дегідратована
частинка білка (осад)

Виділення білка з розчину у вигляді осаду має назву його осадження.

1. РЕАКЦІЇ ОБОРотНОГО ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Дослід 1. Висолювання білків нейтральними солями і солями лужних і лужноземельних металів

Яечний білок складається із декількох фракцій білків, які відрізняються одна від одної за розчинністю. За допомогою методу висолювання з нього можна виділити альбуміни і глобуліни. Так, глобуліни, які мають відносну молекулярну масу більшу, ніж альбуміни, осаджуються напівнасиченим розчином амоній сульфату $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$, а альбуміни – його насиченим розчином.

Хід роботи

Для дослідження використовують розведений водою яечний білок, до якого додано трохи Натрій хлориду, оскільки в слабкому сольовому розчині альбуміни і глобуліни мають однакову розчинність.

У пробірку наливають 3 мл розчину білка, додаючи однаковий обсяг насиченого розчину амоній сульфату $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та перемішують. В результаті одержують напівнасичений розчин амоній сульфату, внаслідок чого випадає осад глобуліну. Через кілька хвилин вміст пробірки відфільтровують.

У фільтраті залишається інший білок – альбумін. Для висолювання альбуміну у фільтрат додають подрібнений кристалічний $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насичення, тобто до тієї миті, коли нова порція порошку буде залишатися

нерозчиненою. Випадає осад альбуміну, який відфільтровують. У фільтраті проводять біуретову реакцію, яка свідчить про відсутність білка.

Осад альбуміну розчиняють в невеликому обсязі дистильованої води, одержаний розчин відфільтровують і проводять з ним біуретову реакцію, додаючи такий самий обсяг 10 %-вого розчину NaOH та 1–2 краплі 1 %-го розчину CuSO₄. За наявності білка розчин набуває фіолетового забарвлення.

Метод висолювання також широко використовують в клінічних лабораторіях для розділення альбумінів і глобулінів сироватки крові та визначення їхнього співвідношення, яке може змінюватися при патології.

2. РЕАКЦІЇ НЕОБОРОТНОГО ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Дослід 2. Осадження білків солями важких металів

Білки з солями важких металів утворюють міцні солеподібні та комплексні сполуки, які випадають в осад, нерозчинні в первісному розчинникові.

Хід роботи

У три пробірки наливають по 2–3 мл розчину білка. Доливають по краплях (до випадіння осаду) у першу пробірку 5 %-вий розчин плюмбум ацетату Pb(CH₃COO)₂; у другу – 5 %-вий розчин купрум (II) сульфату CuSO₄; у третю – 2,5 %-вий розчин Аргентум нітрату.

Щоб переконатися у необоротності реакцій осадження білка, вміст всіх пробірок поділяють навпіл. До однієї половини доливають по 1–2 мл дистильованої води і переконуються у необоротності осадження білка. До другої половини додають надлишок відповідних осаджувачів. У двох пробірках спостерігають перерозчинення осаду білка. Таке розчинення пояснюється адсорбцією надлишку іонів металу і перезарядженням білкового комплексу, внаслідок чого в розчин переходить комплекс зміненого білка з металом.

Властивість білків зв'язувати іони важких металів використовують в медицині при наданні першої допомоги постраждалим від отруєння солями міді, свинцю, ртуті та ін.

Дослід 3. Осадження білків алкалоїдними реактивами

Алкалоїди – це нітрогенвмісні сполуки рослинного походження, що володіють сильною фізіологічною дією. У більшості це гетероциклічні сполуки основного характеру, похідні піридину, піролу, піролідину, індолу, пурину та ін. До алкалоїдів відносяться морфін, кофеїн, папаверин, атропін тощо. Багато з так званих загальних реактивів для визначення алкалоїдів (танін, фосфорно-вольфрамова і фосфорно-молібденова кислоти, пікринова кислота, розчин калій гексаціаноферату (II) тощо) викликають також необоротне осадження білків.

Осадження білків алкалоїдними реактивами зумовлене тим, що у складі амінокислот і алкалоїдів містяться схожі гетероциклічні угруповання (індольні, імідазольні, піролідинові). При дії алкалоїдних реактивів на білок утворюються нерозчинні у воді солеподібні сполуки, в яких білок є катіоном, а алкалоїдний реактив – аніоном. Тому осадження білків алкалоїдними реактивами необхідно проводити у кислому середовищі. При цьому молекули білка перезаряджаються і переходять у стан катіонів.

Хід роботи

У пробірку наливають 1–2 мл розчину білка, підкислюють 2–3 краплями 10 %-го розчину оцтової кислоти і додають 2–3 краплі 1 %-го розчину пікринової кислоти, вміст пробірки збовтують після додавання кожної краплі. Спостерігають випадіння осаду білка.

Дослід 4. Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфатної) викликають необоротне осадження білків з розчину. Це осадження пояснюється як явищем дегідратації білкових молекул, так і утворенням солей із білка та кислоти. Надлишок мінеральних кислот, за винятком нітратної, розчиняє осад білка, що утворився.

Хід роботи

У три пробірки наливають по 1 мл концентрованої хлороводневої, сульфатної і нітратної кислоти. Пробірки нахиляють під кутом 45° і обережно (за допомогою піпетки) нашаровують по стінці розчин яєчного білка.

На межі двох рідин спостерігається поява осаду білка у вигляді невеликого білого кільця. При струшуванні вмісту пробірок з концентрованими хлорводневою і сульфатною кислотами осад білка розчиняється.

Реакція знаходить використання для швидкого орієнтовного визначення наявності білка у біологічних рідинах (наприклад, у сечі).

Дослід 5. Осадження білків органічними кислотами

Найчастіше для необоротного осадження білків використовують три хлороцтову і сульфосаліцилову кислоти.

Під дією трихлороцтової кислоти з розчину осаджуються лише білки, сульфосаліцилова кислота, окрім білків, викликає осадження також високомолекулярних продуктів їхнього розпаду – пептонів і поліпептидів.

Хід роботи

У дві пробірки наливають по 2 мл білка, в першу додають 5–8 крапель розчину три хлороцтової кислоти, в другу – таку ж кількість сульфосаліцилової. В обох пробірках спостерігають випадання осаду.

Дослід 6. Осадження білків нагріванням у різному середовищі

Згортання більшості білків починається вже за температури 50–55 °С. Дія високої температури приводить до теплової денатурації білків, внаслідок чого відбуваються необоротні зміни фізико-хімічних і біологічних властивостей білків.

Значний вплив на швидкість та інтенсивність процесу теплової денатурації білків мають рН розчину та додавання електролітів. В сильно кислих або в сильно лужних розчинах осадження білків при кип'ятінні практично не відбувається. Додавання електролітів (наприклад, NaCl) прискорює коагуляцію навіть у кислому середовищі.

Хід роботи

У п'ять пробірок наливають по 1–2 мл розчину яєчного білка.

У першу пробірку додають 1 краплю 1 %-го розчину оцтової кислоти CH_3COOH . У другу – 8 крапель 10 %-го розчину CH_3COOH . У третю – 5–8 крапель 10 %-го розчину NaOH. У четверту – 4–5 крапель 10 %-го роз-

чину CH_3COOH і 5–6 крапель насиченого розчину NaCl . П'ять пробірок залишають без змін. Усі п'ять пробірок нагрівають на водяній бані, визначаючи, в яких пробірках і в якій послідовності відбувається помутніння розчинів.

Результати лабораторної роботи оформлюються у вигляді таблиці.

Таблиця 2

Реакції осадження білків

Тип осадження	Номер і назва дослідів	Реактиви, що використовували	Пояснення реакції
оборотне	1		
	2		
необоротне	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Від чого залежить розчинність білка у воді? Які фактори утримують білок у розчиненому стані?
2. Які реакції осадження білків називаються оборотними і необоротними?
3. Поясніть, у чому полягає практичне значення методу висолювання білків.
4. Які реагенти викликають необоротне осадження білка? Наведіть приклади, поясніть механізм дії цих реагентів.
5. Дайте визначення поняттям «денатурація», «ренатурація». Які фактори здатні викликати денатурацію білків?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ ЖЕЛАТИНУ

В ізоелектричній точці підсумковий заряд білків, що володіють амфотерними властивостями, дорівнює нулю і білки не переміщуються в електричному полі. Знаючи амінокислотний склад білка, можна приблизно визначити його ізоелектричну точку (pI); pI є характерною константою білків. Ізоелектрична точка більшості білків тваринних тканин лежить у межах від 5.5 до 7.0, що свідчить про часткове переважання кислих амінокислот. Однак, в природі зустрічаються білки, у яких значення pI знаходяться в крайніх значеннях рН середовища. А саме: величина pI пепсину (ферменту шлункового соку) дорівнює 1, сальміну (основний білок з молок сьомги) – майже 12.

В ізоелектричній точці білки найменш стійкі в розчині і легко випадають в осад. Значення ізоелектричної точки білка у великому ступені залежить від присутності в розчині іонів солей. В той же час на її величину не впливає концентрація білків.

Визначення ізоелектричної точки білків засновано на їхній здатності під дією осаджувачів, що викликають дегідратацію макромолекул білків, при значенні рН середовища їхньої ізоелектричної точки, легко осаджуватися.

Дослід 1. Визначення ізоелектричної точки желатину

Хід роботи

У шість пробірок додають відповідну кількість (мл) розчинів оцтової кислоти, Натрій ацетату, дистильовану воду і розчину желатину (дивись таблицю). Вміст кожної пробірки перемішують. Потім до усіх пробірок повільно по стінці доливають по 2 мл етилового спирту. Не перемішувати! Через 30 хв визначають ізоелектричну точку желатину за максимальним ступенем помутніння рідини в пробірці.

Порівняйте одержаний результат з літературними даними.

Визначення ізоелектричної точки желатину

Вода	CH ₃ COOH (0,1 моль/л)	CH ₃ COOH (1 моль/л)	CH ₃ COONa (0,1 моль/л)	Розчин желатину (1%-вий)	pH середовища
3,8	0,8	–	2,0	2,0	5,6
3,5	0,5	–	2,0	2,0	5,3
3,0	1,0	–	2,0	2,0	5,0
2,0	2,0	–	2,0	2,0	4,7
–	4,0	–	2,0	2,0	4,4
3,2	–	0,8	2,0	2,0	4,1

Результати роботи оформлюють у вигляді висновку.

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Дайте визначення поняттю «ізоелектрична точка білків».
2. Чим обумовлений заряд білкової молекули? Чому дорівнює підсумковий заряд тетрапептиду валіл–серил–триптофаніл–глутамінова кислота у нейтральному середовищі?
3. У якому середовищі знаходиться ізоелектрична точка амінокислот валіну, лізину, аспарагінової кислоти?
4. Як залежить значення ізоелектричної точки білків від співвідношення кислих і основних амінокислот у складі білкової молекули?
5. На чому засновано метод визначення ізоелектричної точки білків?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

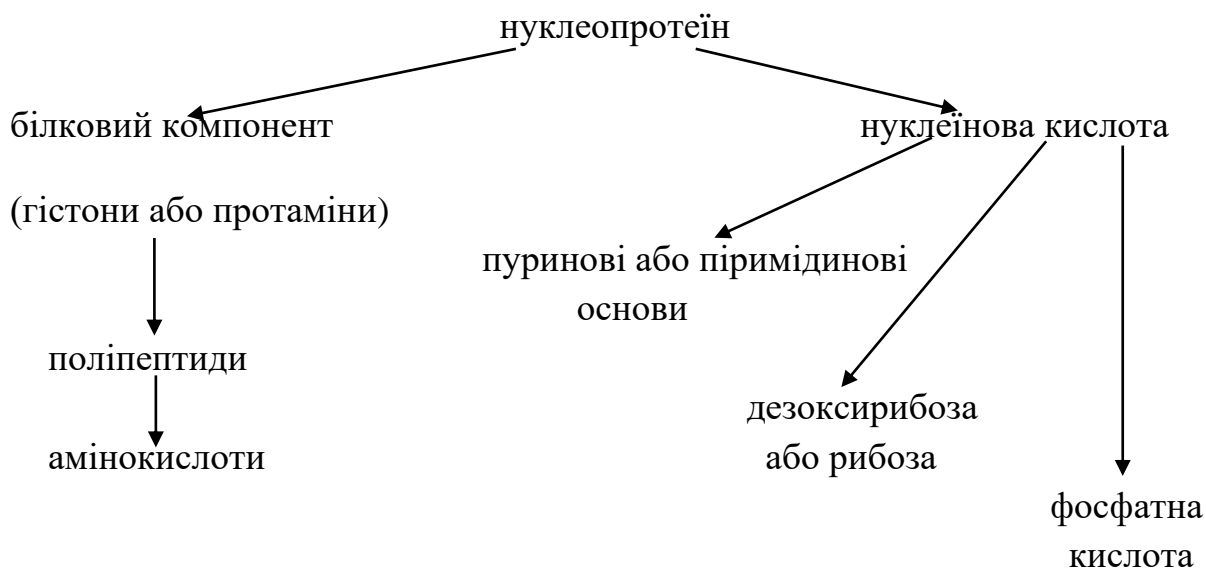
БУДОВА НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ ДРІЖДЖІВ

Нуклеопротеїни – це складні білки, небілковим компонентом яких є нуклеїнові кислоти.

Білковим компонентом у складі нуклеопротеїнів найчастіше є білки гістони та протаміни. Вони містять багато основних амінокислот – лізину та аргініну, – тому виявляють основні властивості.

У складі живих організмів зустрічаються два типи нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнові (ДНК) та рибонуклеїнові (РНК). Нуклеїнові кислоти є складними біополімерами, структурною одиницею яких є нуклеотид. До складу нуклеотиду входять пуринова (аденін, гуанін) або піримідинова (урацил, цитозин) основа, вуглевод пентоза (рибоза або дезоксирибоза) та залишок фосфатної кислоти.

Усі нуклеопротеїни підлягають гідролітичному розпаду, загальну схему якого можна відобразити наступним чином:



Для вивчення хімічного складу нуклеопротеїнів зручно користуватися клітинами дріжджів. При нетривалому гідролізі дріжджевої маси нуклеопротеїни розпадаються на поліпептиди, пуринові або піримідинові основи, рибозу або дезоксирибозу та фосфатну кислоту. Продукти гідролізу можна виявити у гідролізаті за допомогою специфічних кольорових реакцій.

Виділення нуклеопротеїнів з дріжджів та їхній гідроліз попередньо проводять лаборанти. Для цього 1 г дріжджів кип'ятять протягом 1 год в колбі зі зворотнім холодильником в присутності 20 мл 10 %-го розчину сульфатної кислоти і 20 мл дистильованої води. Після охолодження одержаний гідролізат дріжджів фільтрують і використовують для подальших досліджень.

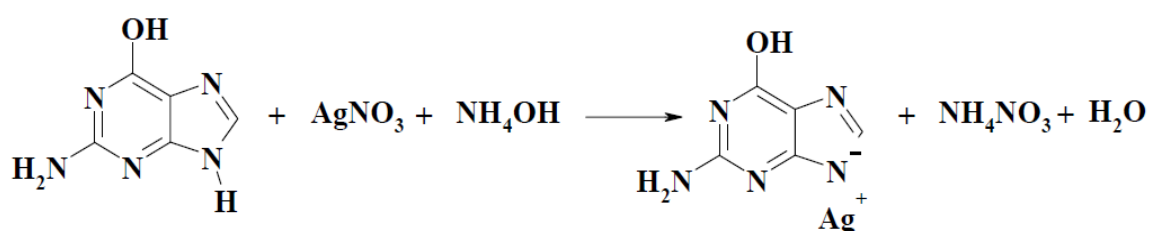
Дослід 1. Біуретова проба на білки і пептиди

При проведенні гідролізу в м'яких умовах білки розщеплюються з утворенням пептидів, наявність яких у складі гідролізату дріжджів можна

визначити за допомогою біуретової реакції. Для цього до 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 10 %-го розчину натрій гідроксиду і 1 краплю 1 %-го розчину купрум (II) сульфату. Рідина в пробірці забарвлюється в фіолетово-рожевий колір.

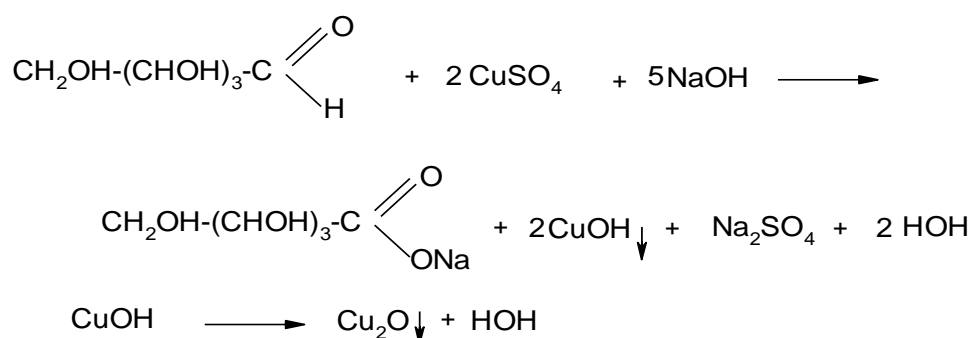
Дослід 2. Срібна проба на пуринові основи

10 крапель гідролізату нейтралізують 1 краплею розчину концентрованого амоніаку та додають 5 крапель 1 %-го розчину аргентум нітрату. Через 3–5 хв випадає світло-коричневий пластівчастий осад солей пуринових основ (аденіну і гуаніну).



Дослід 3. Проба Троммера на рибозу та дезоксирибозу

До 5 крапель гідролізату додають 10 крапель 30 %-го розчину натрій гідроксиду і 5–10 крапель 7 %-го розчину купрум (II) сульфату до появи каламуті купрум (II) гідроксиду, що не зникає. Рідину перемішують, пробірку занурюють у киплячу воду. Випадає жовтий осад купрум (I) гідроксиду або червоний осад купрум (I) оксиду внаслідок окиснення рибози або дезоксирибози та відновлення купрум (II) гідроксиду.



Дослід 4. Молібденова проба на фосфатну кислоту

До 10 крапель молібденового реактиву (розчин амоній молібдату в нітратній кислоті) додають 5 крапель гідролізату і кип'ятять кілька хвилин на водяній бані. В присутності фосфатної кислоти рідина забарвлюється у лимонно-жовтий колір. При охолодженні вмісту пробірки випадає осад комплексної сполуки фосфорномолібденовокислого амонію у вигляді жовтих кристалів.



Реакції на компоненти нуклеїнових кислот використовують для їхньої ідентифікації і кількісного аналізу при проведенні біохімічних досліджень. У фармації – для контролю якості препаратів нуклеотидної природи.

Результати лабораторної роботи оформлюються у вигляді таблиці.

Таблиця 4

Будова нуклеопротейнів дріжджів

Номер і назва дослідів	Реактиви, що використовували	Спостереження	Пояснення реакції

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. За якою ознакою білки поділяються на прості та складні?
2. Перелічте основні групи простих білків.
3. Перелічте основні групи складних білків.
4. Які речовини небілкової природи входять до складу нуклеопротейнів? За допомогою яких реакцій можна підтвердити їхню наявність?
5. Які білки входять до складу нуклеопротейнів? За допомогою якої реакції можна підтвердити їхню наявність?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА БІУРЕТОВИМ МЕТОДОМ

Біуретовий метод кількісного визначення білка у біологічних рідинах заснований на утворенні в лужному середовищі забарвленого комплексу пептидних зв'язків з іонами Cu^{2+} (біуретова реакція). Інтенсивність забарвлення розчину, що при цьому виникає, прямо пропорційна концентрації білка і визначається за допомогою фотоколориметричного методу аналізу.

При визначенні концентрації білка за допомогою фотоколориметричного методу попередньо будують калібрувальний графік з використанням стандартного розчину білка (бичачого сироваткового альбуміну, сироваткового альбуміну людини або амінокислоти тирозину).

При визначенні вмісту білка у пробах, що досліджуються, дотримуються тих самих умов, що і при побудові калібрувального графіка.

Чутливість кількісного визначення білків біуретовим методом складає 2–10 мг білка в 1 мл проби.

Методика визначення концентрації речовини в розчині за допомогою фотоколориметричного методу аналізу.

В основі кількісного аналізу за допомогою спектрофотометричного (або фотоколориметричного методу) лежить закон Бугера–Ламберта–Бера:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cl},$$

де I_0 , I – інтенсивність світла, що падає, і світла, що пройшло через досліджуваний розчин відповідно;

ε – молярний коефіцієнт поглинання (екстинції), л/моль см;

c – концентрація розчину, моль/л;

l – товщина шару (кювети), см.

У практичній роботі зручніше користуватися логарифмічною формою запису закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$A = \lg(I_0/I) = \varepsilon cl,$$

де A – абсорбція (оптична густина).

Для визначення концентрації розчину за допомогою фотоколориметричного методу аналізу будують калібрувальний графік.

Для цього серією робочих розведень готують декілька розчинів досліджуваної речовини з відомою концентрацією (5–6 розчинів). Для кожного розчину вимірюють оптичну густину при визначеній довжині хвилі. Для визначення максимуму полоси поглинання (довжини хвилі) попередньо записують спектр поглинання досліджуваного розчину у видимій області.

Потім будують графік залежності $A = f(C)$ (Рис. 1). Через накопичення точок найкращим чином (за допомогою методу найменших квадратів) проводять лінію – калібрувальний графік. Якщо закон Бугера–Ламберта–Бера в обраному діапазоні виконується, то графік буде мати вид прямої лінії, яка перетинатиме точку 0.

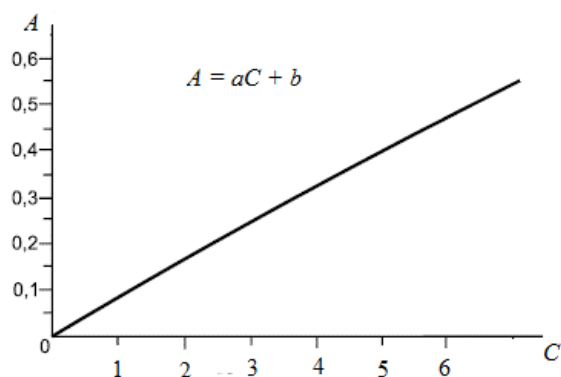


Рис. 1 – Калібрувальний графік

Концентрацію розчину, що досліджується, можна розрахувати, використовуючи рівняння прямої лінії $y = a \cdot x + b$, яке в координатах $A = f(C)$ матиме вигляд $A = aC + b$,

де a – тангенс куту нахилу прямої лінії на калібрувальному графіку;

b – відрізок, що відсікається від вісі ординат прямою лінією, на графіку.

Хід роботи

1 мл розчину препарату, що містить від 1 до 10 мг білка, поміщають у пробірку, додають 4 мл біуретового реактиву. Ретельно перемішують і залишають на 30 хв за кімнатної температури. Оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі в діапазоні 540–650 нм в кюветі з товщиною 10 мм. Як розчин порівняння використовують суміш тих самих розчинів, але замість білкового препарату використовують 1 % розчин NaCl або дистильовану воду. Вміст білка у розчині, що досліджується, визначають за допомогою калібрувального графіка.

Калібрувальний графік будують у межах концентрацій 1–10 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину при обраній довжині хвилі. Вимір оптичної густини починають з розчину з найменшою концентрацією.

Таблиця 5

Дані для побудови калібрувального графіка

№	Робочий розчин біуретового реактиву, мл	Стандартний розчин білка, мл	1 % розчин NaCl або дист. H ₂ O	Вміст білка у пробі, мг/мл	Концентрація білка у розчині, г/л	Оптична густина
1	4	0,2	0,8			
2	4	0,4	0,6			
3	4	0,5	0,5			
4	4	0,6	0,4			
5	4	0,8	0,2			
6	4	1,0	0			

За результатами вимірів будують калібрувальний графік: по вісі абсцис відкладають значення концентрації білка (С), а по вісі ординат – значення оптичної густини (А).

За допомогою калібрувального графіка визначають концентрацію розчину білка, що досліджується.

Значення концентрації білка у сироватці крові здорової людини складає 65–85 г/л. Отже, якщо об'єктом дослідження є розчин сироватки крові, його попередньо розводять у 10 разів: 1 мл сироватки крові доводять 1 % розчином NaCl або дистильованою водою до об'єму 10 мл.

У цьому випадку значення концентрації білка, знайдене за допомогою калібрувального графіка, помножують на коефіцієнт розведення (x10).

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні запитання.

Контрольні питання

1. Який принцип лежить в основі кількісного визначення вмісту білка біуретовим методом?
2. Наведіть схему реакції взаємодії фрагменту молекули білка з біуретовим реактивом.

3. Який вміст загального білка в крові здорової дорослої людини відповідає нормі?
4. Яка точність кількісного визначення вмісту білка біуретовим методом?
5. Сформулюйте закон Бугера–Ламберта–Бера.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА У РОЗЧИНІ

Спектрофотометричний метод визначення концентрації білка заснований на здатності ароматичних амінокислот (триптофану, тирозину і меншою мірою – фенілаланіну) поглинати ультрафіолетове світло в області з максимумом поглинання при 280 нм.

Умовно прийнято вважати, що при концентрації білка у розчині 1 мг/мл, величина оптичної густини при 280 нм дорівнює 1 при товщині кювети 10 мм.

При визначенні концентрації білка за допомогою спектрофотометричного методу попередньо будують калібрувальний графік з використанням стандартного розчину білка (бичачого сироваткового альбуміну, сироваткового альбуміну людини або амінокислоти тирозину) (див. лабораторну роботу № 5).

Концентрація розчину білка, що досліджується, повинна становити від 0,05 до 2 мг/мл.

Слід пам'ятати, що цей метод володіє значними обмеженнями, оскільки його неможливо з рівною ефективністю використовувати для визначення білків різних класів, адже вміст в них ароматичних кислот дуже різниться. Крім того, визначенню білка у біологічних рідинах цим методом може заважати присутність нуклеїнових кислот і нуклеотидів (більше 20 %). В цьому випадку оптичну густину одного і того ж розчину вимірюють при двох довжинах хвиль – 260 и 280 нм; а вміст білка (X , мг/мл) розраховують за формулою Калькара:

$$X = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260},$$

де A – значення оптичної густини при відповідній довжині хвилі.

Хід роботи

Для побудови калібрувального графіка стандартного розчину білка шляхом розведення готують шкалу робочих розчинів з відомою концентрацією білка. Для цього в 6 пробірок додають відповідно 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 і 1,0 мл стандартного розчину білка і доводять вміст пробірки до об'єму 10 мл 1 % розчином NaCl або дистильованою водою. Оптичну густину робочих білкових розчинів вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм в кюветі з товщиною 10 мм. Як розчин порівняння використовують 1 % розчин NaCl або дистильовану воду.

Таблиця 6

Дані для побудови калібрувального графіка

№	Стандартний розчин білка, мл	1 % розчин NaCl або дист. H ₂ O	Вміст білка у пробі, мг/мл	Концентрація білка у розчині, г/л	Оптична густина
1					
2					
3					
4					
5					
6					

За результатами вимірів будують калібрувальний графік: по вісі абсцис відкладають значення концентрації білка (С), а по вісі ординат – значення оптичної густини (А).

За допомогою калібрувального графіка визначають концентрацію розчину білка, що досліджується.

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні запитання.

Контрольні питання

1. На чому заснований метод спектрофотометричного визначення концентрації білка в біологічних рідинах?
2. Якими обмеженнями володіє цей метод?
3. Класифікація амінокислот, що входять до складу білків.
4. Метод найменших квадратів. Характеристика і галузь застосування.

5. Наведіть структурні формули ароматичних амінокислот, що входять до складу білків. Вкажіть хромофорні групи, що входять до їхнього складу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ

Дослід № 1. Доказ наявності гідроксильних груп у D-глюкозі і дисахаридах

У пробірки наливають по 3–4 мл розчинів D-глюкози, мальтози, лактози та сахарози, додають по 1–2 мл розчину натрій гідроксиду з масовою часткою NaOH 5 %. Потім краплями додають розчин купрум (II) сульфату з масовою часткою CuSO_4 5 %. Осад купрум (II) гідроксиду, що при цьому з'являється, швидко розчиняється, і в пробірках утворюються прозорі розчини синього кольору.

Ці розчини зберігають для наступного дослідю.

Дослід № 2. Відновна дія вуглеводів (проба Троммера)

Розчини, що одержали в попередньому досліді, нагрівають до кипіння. Що спостерігається? Зробіть висновок про відновну дію D-глюкози, мальтози, лактози та сахарози відносно до солі Купрум (II).

Дослід № 3. Реакція срібного дзеркала (реакція Толленса)

У пробірку наливають 1 мл 0,5 %-ого розчину аргентум (I) нітрату і додають краплями розчин амоніаку. Спочатку утворюється сірий осад, який швидко розчиняється у надлишку амоніаку. До амоніачного розчину аргентум оксиду, що утворився, додають 3 мл глюкози. Пробірку ставлять в гарячу воду на 5–10 хв. На стінках пробірки утворюється дзеркальний наліт металічного срібла.

Дослід № 4. Взаємодія вуглеводів з реактивом Фелінга

Реактив Фелінга – мідний алкогольат сегнетової солі. При взаємодії з відновлюючими (редуючими) цукрами рідина Фелінга відновлюється з утворенням купрум (I) оксиду.

У пробірки наливають по 0,5 мл реактиву Фелінга і по 0,5 мл розчинів D-глюкози, мальтози, лактози та сахарози. Суміші нагрівають до кипіння. Що спостерігається?

Дослід № 5. Гідроліз сахарози

Налийте в пробірку 4–5 мл розчину сахарози і додайте 0,5 мл розведеної сульфатної кислоти. Пробірку нагрійте на водяній бані 10–15 хв. Розчин розділіть на дві пробірки. В одній пробірці нейтралізуйте вміст розчином натрій гідроксиду, а потім додайте 0,5 мл реактиву Фелінга і нагрійте на водяній бані. До другої пробірки додайте декілька крапель реактиву Селіванова і нагрійте на водяній бані. Що спостерігається?

Дослід № 6. Кислотний гідроліз крохмалю

До шести пробірок додайте водопровідної води (по 1/2 пробірки) і по 1–2 краплини йодною води (розчин йоду в калій йодиді).

У колбу об'ємом 100 мл налийте 40 мл клейстерного крохмалю і додайте 2 мл розчину сульфатної кислоти з масовою часткою 20 %. Декілька крапель одержаної суміші додайте з колби до першої пробірки з йодною водою, при цьому спостерігається утворення характерного синього кольору крохмалю з йодом. Колбу з крохмалем поставте на металеву сітку, доведіть розчин до кипіння і через кожні 2 хв відливайте по декілька крапель гідролізату до чергової пробірки з йодною водою до зникнення кольору. Потім прокип'ятіть вміст колби ще 5 хв, відлийте 0,5 мл розчину і проведіть реакцію з реактивом Фелінга. Для цього нейтралізуйте вміст пробірки розчином Натрій гідроксиду з масовою часткою NaOH 10 %, додайте 0,5 мл реактиву Фелінга і нагрійте до кипіння. Що спостерігається?

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні запитання.

Контрольні питання

1. Біологічні функції вуглеводів.
2. Класифікація вуглеводів. На прикладі моносахаридів глюкози і фруктози охарактеризуйте основні властивості моносахаридів.
3. Фізіологічно значимі дисахариди: мальтоза, лактоза, сахароза. Наведіть структуру, охарактеризуйте основні властивості та біологічну роль.
4. Фізіологічно значимі полісахариди: крохмаль, глікоген, клітковина. Наведіть структуру, охарактеризуйте основні властивості та біологічну роль.
5. Наведіть схему гідролітичного розщеплення крохмалю, назвіть проміжні і кінцеві продукти цієї реакції.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РЕДУКУЮЧИХ ЦУКРІВ (ЗА МЕТОДОМ ШОРЛЯ)

Розчин, що містить у своєму складі редукуючі цукри, кип'ятять з рідиною Фелінга. Оскільки рідина Фелінга береться у надлишку, то частина міді виявиться не відновленою і залишиться в окисній формі. Щоб визначити надлишкову кількість окисної міді, в охолоджену після кип'ятіння рідину додають розчин Калій йодиду і сульфатної кислоти. При цьому відбувається реакція:



Молекулярний йод, що виділяється, відтитрують розчином натрій тіосульфату:



Цей метод відрізняється простотою, точністю і можливістю визначення цукрів у достатньо широких межах: від 0,3 до 88,2 мг в 30 мл розчину.

Хід роботи

У конічні колби відповідного об'єму вносять піпеткою 3 мл розчину, що містять досліджувані цукри, і додають 2 мл розчину Фелінга. Вміст

колб перемішують, колби ставлять у киплячу водяну баню та нагрівають протягом 2 хв. Після того колби швидко охолоджують до кімнатної температури, додають 1 мл 30 %-го розчину калій йодиду KI, 1 мл 25 %-го сульфатної кислоти H₂SO₄ і відразу титрують 0,1 н розчином натрій тіосульфату до світло-жовтого забарвлення. Потім додають 3–4 краплі 1 %-го розчину крохмалю (індикатор) і продовжують титрування до зникнення синього забарвлення.

Аналогічно проводять холостий або контрольний дослід, в якому замість розчину, що досліджують, беруть ту ж саму кількість дистильованої води.

Різниця між величинами, що одержані в контрольному досліді, і при визначенні цукрів у розчині, що досліджується, помножена на поправлення до титру натрій тіосульфату, показує кількість відновленої міді, що виражена у мілілітрах точно 0,1 н розчину натрій тіосульфату.

Для перерахунку кількості 0,1 н розчину натрій тіосульфату, що відповідає кількості відновленої міді на цукор (мг), користуються наступними коефіцієнтами, що встановлені експериментальним шляхом: глюкоза – 3,3; фруктоза – 3,7; сахароза – 3,4; мальтоза – 5,4.

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні запитання.

Контрольні питання

1. Які вуглеводи відносяться до відновних (редуючих) та невідновних дисахаридів? Поясніть та наведіть приклади.
2. З якою метою здійснюють гідроліз сахарози у промисловості та під час визначення масової частки цукру у харчових продуктах?
3. Напишіть структурні формули сахарози, записані у проекції Фішера та Хеуорса, назвіть їх.
4. Принцип методу Шорля. Наведіть схему взаємодії будь-якого редуючого цукру з купрум (II) сульфатом в лужному середовищі.
5. З якою метою проводять контрольний дослід під час визначення вмісту редуючих цукрів йодометричним методом?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА СКЛАДУ ЛІПІДІВ

Дослід 1. Розчинення та емульгування жирів

Жири відносяться до неполярних органічних сполук, тому вони розчиняються тільки у неполярних органічних розчинниках (бензені, толуені, хлороформі та ін.). З водою жири утворюють нестійкі емульсії, які під час стояння швидко розпадаються на жир та воду. При додаванні до такої емульсії будь-якого емульгатору (1 %-го розчину Натрій карбонату, 1 %-го розчину мила, 1 %-го розчину Калій гідроксиду) утворюються відносно стійкі емульсії.

Емульгатори – поверхнево-активні сполуки, що знижують поверхневий натяг крапель жиру на межі жир–вода і таким чином перешкоджають злипанню їх у суцільний шар жиру; тому утворюються відносно стійкі емульсії.

Хід роботи

У шість сухих пробірок додають по 2 краплі жиру (тваринного або рослинної олії). В 1-у пробірку додають 2–3 мл бензену. В інші п'ять пробірок наливають точно по 2 мл дистильованої води. У другу пробірку додають кілька крапель 1 %-го розчину натрій карбонату, в 3-ю – кілька крапель 1 %-го розчину мила, в 4-у пробірку – 1 %-вий розчину калій гідроксиду, в 5-у – кілька крапель жовчі, 6-а пробірка – контрольна. Збовтують вміст всіх пробірок, ставлять їх по черзі у штатив і спостерігають утворення в пробірках 2–5 відносно стійких емульсій, а у шостій пробірці (контрольній) – розшарування нестійкої емульсії на жир та воду.

Дослід 2. Відкриття фосфатидилхоліну (лецитину) в яєчному жовтку

Метод полягає у гідролізі лецитинів яєчного жовтка в розчині натрій гідроксиду з подальшим визначенням в одержаному гідролізаті їхніх структурних компонентів: жирних кислот, гліцерину, аміноспирту холіну і фосфатної кислоти.

Хід роботи

Гідроліз лецитину. 200–300 мг яєчного жовтка поміщають в пробірку, до якої додають 1–2 мл 10 %-го розчину NaOH і кип'яють на водяній бані 15 хв.

Відкриття холіну. Холін при нагріванні у лужному середовищі перетворюється на триметиламін $N(CH_3)_3$, який можна виявити за запахом оселедцевого розсолу.

Після того гідролізат жовтка поділяють на три пробірки.

Відкриття жирних кислот. До гідролізату у першій пробірці додають по краплям 10 %-вого розчину хлоридної кислоти HCl до появи пластівчастої суспензії жирних кислот.

Відкриття фосфатної кислоти. До другої частини гідролізату обережно додають індикаторний реагент для виявлення фосфору, вміст пробірки нагрівають на водяній бані до появи жовтого забарвлення.

Відкриття гліцерину. До третьої частини гідролізату додають 5 крапель 10 %-го розчину NaOH і 1 краплю 1 %-го розчину $CuSO_4$. При перемішуванні спостерігають розчинення осаду $Cu(OH)_2$ і утворення прозорого розчину яскраво-синього кольору.

Дослід 3. Відкриття холестерину

Під дією концентрованої сульфатної кислоти відбувається дегідратація холестерину з утворенням сполуки червоного кольору – холестерилену.

Цю реакцію також можна використовувати для кількісного визначення холестерину, наприклад у сироватці крові. У сироватки крові здорової дорослої людини міститься 1,5–2,5 г/л холестерину.

Хід роботи

До сухої пробірки додають 1 мл хлороформного розчину холестерину і обережно по стінці пробірки доливають 0,5 мл концентрованої H_2SO_4 .

На межі двох рідин спостерігають появу червоного кільця.

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні запитання.

Контрольні питання

1. Ліпіди. Визначення. Класифікація ліпідів. Вкажіть принцип, який покладено в основу наведеної Вами класифікації.
2. Біологічні функції ліпідів.
3. Наведіть структурні формули сполук:
 - а) тригліцериду, що містить залишки олеїнової, лінолевої і лінолевої кислот;
 - б) бджолиного воску;
 - в) фосфатидної кислоти;
 - г) лецитину;
 - д) сфінгомієліну;
 - е) складного ефіру холестерину и пальмітинової кислоти.
4. Визначте підсумковий заряд лецитину в нейтральному, кислому і лужному середовищі.
5. Біологічна роль холестерину. Чи синтезується холестерин в рослинах?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ ДІЇ ТА ТЕРМОЛАБІЛЬНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

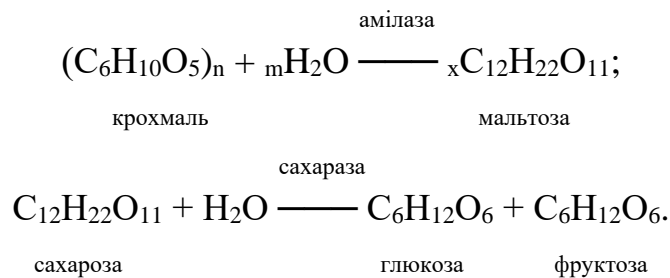
Дослід 1. Специфічність дії ферментів амілази слини і сахарози

Однією з унікальних властивостей ферментів є їхня висока специфічність у відношенні дії ферментів на субстрат.

Хід роботи

У дві пробірки наливають по 10 крапель 0,5 %-го розчину крохмалю та додають у першу пробірку 5 крапель розведеної в 5 разів слини, яка вміщує фермент амілазу, у другу – 5 крапель витяжки дріжджів, яка містить фермент сахаразу, перемішують і ставлять на водяну баню при 37 °С на 15 хв. У інші дві пробірки наливають по 10 крапель 0,5 %-го розчину сахарози. У першу пробірку додають 5 крапель розведеної в 5 разів слини, у другу – 5 крапель витяжки з дріжджів і залишають за цих же умов.

В цей період в пробірках під дією ферментів відбуваються реакції гідролізу крохмалю і сахарози, які перебігають за наступними схемами:



Дію ферментів виявляють або за зникненням субстратів, або за появою продуктів гідролізу субстратів (мальтози, глюкози, фруктози). Тому через 5 хв у перші дві пробірки з крохмалем додають по 1 краплі розчину йоду і спостерігають забарвлення субстрату.

Із вмістом двох інших пробірок (дослід із сахарозою) проводять реакцію з рідиною Фелінга. Для цього до неї додають 5–6 крапель досліджуваної рідини, перемішують і нагрівають до кипіння. Слід мати на увазі, що сахароза (невідновлюючий дисахарид) не має вільних напівацетальних гідроксилів і реакції відновлення не дає, в той час як продукти її гідролізу – глюкоза і фруктоза – відновлюють рідину Фелінга до появи жовтого осаду купрум (I) гідроксиду (CuOH) або червоного осаду купрум (I) оксиду (Cu₂O).

Результати дослідження оформлюють у вигляді Табл. 7.

Таблиця 7

Специфічність дії ферментів амілази слини і сахарази

№ досліджу	Фермент	Субстрат	Контрольні реакції		Пояснення реакції
			з йодом	з рідиною Фелінга	
1	амілаза	крохмаль			
2	сахараза	крохмаль			
3	амілаза	сахароза			
4	сахараза	сахароза			

Дослід 2. Термолабільність амілази слини

Під термолабільністю розуміють залежність каталітичної активності ферментів від температури. Та температура, за якої фермент є найбільш активним, називається температурним оптимумом цього ферменту. Кип'ятінням фермент повністю інактивується (втрачає свої каталітичні якості) в результаті теплової денатурації. За температури нижче 0 °С ферменти не інактивуються, але тимчасово зупиняють свою дію.

Хід роботи

У три пробірки наливають по 5 крапель слини та по 20 крапель дистильованої води, одержують слину, розведену в 5 разів. В одній із пробірок розчин слини кип'ятять над полум'ям горілки з метою інактивації ферменту і швидко охолоджують холодною водопровідною водою. У другій пробірці розчин слини залишають без кип'ятіння. Третю пробірку з розчином тримають на льоді 5 хв. У всі три пробірки додають по 10 крапель 0,5%-го розчину крохмалю. Рідину у пробірках перемішують і залишають за кімнатної температури. Через 5 хв вміст кожної пробірки поділяють на дві частини. З однією частиною проводять реакцію з йодом, з іншою – реакцію з рідиною Фелінга (як описано раніше). У пробірці, де фермент амілаза інактивований кип'ятінням, розщеплення крохмалю не відбувається. Результати записують у вигляді Табл. 8.

Таблиця 8

Термолабільність ферменту амілази слини

№ досліджу	Матеріал дослідження	Субстрат	Контрольні реакції		Пояснення реакції
			з йодом	з рідиною Фелінга	
1	свіжа слина	крохмаль			
2	кип'ячена слина	крохмаль			
3	охолоджена слина	крохмаль			

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Що розуміють під поняттями «специфічність дії ферментів», «термолабільність ферментів»?
2. Які типи специфічності дії ферментів Ви знаєте?
3. Наведіть схему реакції ферментативної сечовини? Який фермент каталізує цю реакцію? Який тип специфічності дії демонструє цей фермент?
4. Що таке «стереоспецифічність дії ферментів»? Наведіть приклади.
5. Як залежить активність ферментів від температури?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ. ВПЛИВ АКТИВАТОРІВ ТА ІНГІБІТОРІВ НА ДІЮ ФЕРМЕНТІВ

Дослід 1. Визначення активності амілази слини (за Вольгемутом)

Амілазна активність слини вимірюється кількістю крохмалю, розщепленого 1 мл слини за певний проміжок часу (зазвичай 3 хв).

Визначення амілазної активності базується на знаходженні максимального розведення слини, при якому ще відбувається розщеплення крохмалю до стадії червоного забарвлення з йодом. Метод знаходить широке використання в клінічній практиці.

При визначенні амілазної активності слини зручно спостерігати дію активаторів. Так, NaCl у розведених розчинах прискорює дію амілази слини на крохмаль. Розчин CuSO₄ дуже уповільнює її дію.

Хід роботи

1. В окремій (нульовій) пробірці розводять слину 1:10, для чого до 1 мл слини додають 9 мл дистильованої води.

2. Наливають у десять пронумерованих пробірок по 1 мл дистильованої води.

3. У першу пробірку додають 1 мл слини, розведеної в 10 разів (із нульової пробірки).

4. Перемішують вміст першої пробірки шляхом трикратного всмоктування піпеткою рідини із пробірки, а потім випуску рідини із піпетки; 1 мл одержаного розчину переносять із першої пробірки в другу.

5. Перемішують таким же чином вміст другої пробірки і переносять 1 мл із другої пробірки в третю і т. д. Із десятої пробірки 1 мл рідини виливають як надлишок.

Таким чином, одержують ряд розведень слини, причому концентрація ферменту в кожній наступній пробірці в два рази менша, ніж у попередній.

6. Починаючи з цього моменту, дослід ведуть у трьох варіантах.

1-й варіант: наливають у всі 10 пробірок ще по 1 мл дистильованої води.

2-й варіант: для виявлення активуючої дії розчину NaCl у всі 10 пробірок замість 1 мл дистильованої води вносять по 1 мл 1 %-го розчину NaCl.

3-й варіант: для виявлення інгібуючої дії розчину CuSO_4 у всі 10 пробірок замість 1 мл дистильованої води вносять по 1 мл 1 %-го розчину CuSO_4 .

7. Потім додають у всі 10 пробірок (починаючи з десятої, потім в дев'яту тощо) по 2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю і перемішують вміст кожної пробірки. Додавання крохмалю треба починати з пробірки, яка містить у собі найменшу концентрацію амілази, оскільки розщеплення на холоді в ній іде дуже повільно, і помилка за рахунок неодночасного додавання субстрату практично не позначиться на результатах визначення.

8. Водночас усі 10 пробірок ставлять у нагріту до 37°C водяну баню.

9. Через 30 хв виймають пробірки із бані, швидко охолоджують їх під струмом холодної водопровідної води, перемішують вміст кожної пробірки і ставлять по черзі у штатив.

10. Доливають у кожну пробірку по 2 краплі розчину Люголя, перемішують і спостерігають у пробірках гаму кольорів від жовтого до синього. Жовтий колір свідчить про відсутність крохмалю, червоно-бурий – про присутність проміжних продуктів розщеплення (декстринів), синій – про присутність крохмалю або продуктів його початкового розщеплення.

Результати спостережень заносять у Табл. 9.

Таблиця 9

Залежність забарвлення вмісту пробірок від розведення слини

№	Відношення розведення слини	Забарвлення вмісту пробірки при додаванні розчину Люголя
1	1/20	
2	1/40	
3	1/80	
4	1/160	
5	1/320	
6	1/640	
7	1/1280	
8	1/2560	
9	1/5120	
10	1/10240	

11. Обчислюють амілазну активність слини таким чином. У пробірці, де рідина забарвлена ще в синій колір, розщеплення крохмалю не сталося. Достатнє розщеплення крохмалю, очевидно, має місце у тій пробірці, де немає синього відтінку. Наприклад, це спостерігається у п'ятій пробірці;

а у шостій пробірці вже є синій відтінок. У п'ятій пробірці нерозведеної слини було 1/320 мл. Складаємо пропорцію:

1/320 мл нерозведеної слини розщеплює 2 мл 0,1%-го розчину крохмалю,

а 1 мл слини розщеплює X мл розчину крохмалю

$$X = \frac{1 \times 2}{1/320} = 640 \text{ мл.}$$

Висновок. 1 мл нерозведеної слини розщеплює за 30 хв за 37 °С 640 мл 0,1 %-го розчину крохмалю.

При порівнянні результатів усіх трьох визначень виявляється різниця в активності амілази.

Результати досліду оформляються у вигляді Табл. 10.

Таблиця 10

Вплив активаторів та інгібіторів на амілазну активність слини

Фактор, що впливає на амілазну активність слини	№ пробірки, в якій спостерігається розщеплення крохмалю	Величина амілазної активності	Пояснення реакції
Нормальна ААС			
0,85 % NaCl			
1 % CuSO ₄			

У нормі амілазна активність слини людини складає 260–320 одиниць.

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Наведіть приклади активаторів ферментів органічної та неорганічної природи.
2. Чому збільшується активність ферментів при дії активаторів?
3. Що таке інгібітор ферментів? Які типи інгібіторів Вам відомі?

4. Які інгібітори називають конкурентними? Неконкурентними? Наведіть приклади.

5. Поясніть, чому малонова кислота є інгібітором у реакції дегідратування янтарної кислоти.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ ВПЛИВ рН СЕРЕДОВИЩА НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

Кожен фермент проявляє максимум своєї каталітичної дії при строго визначеному значенні рН середовища – рН-оптимуму дії ферменту. Вплив рН середовища на молекулу ферменту полягає у впливі на стан і ступінь іонізації кислотних і основних груп амінокислот, що входять до складу активного центру ферменту (а саме: COOH-групи дикарбонових амінокислот, SH-групи цистеїну, імідазольного азоту гістидину, NH₂-групи лізину тощо). При різкому зсуві від оптимуму рН середовища ферменти підлягають конфірмаційним змінам, які можуть призводити до втрати активності внаслідок денатурації або зміни заряду.

Дослід 1. Вплив рН середовища на активність амілази слини

Хід роботи

У сім пробірок наливають розчини 0,2 М натрій гідроортофосфату і 0,1 М лимонної кислоти в обсягах, що зазначені в таблиці. Таким чином одержують буферні розчини зі значенням рН середовища від 5,6 до 8.

Таблиця 11

Вплив рН середовища на активність амілази слини

№	Об'єм 0,2 М розчину Na ₂ HPO ₄ , мл	Об'єм 0,1 М розчину лимонної кислоти, мл	Значення рН середовища	Об'єм 0,5 %-го розчину крохмалю, мл	Об'єм слини, мл	Забарвлення в реакції з йодом
1	2	3	4	5	6	7
1	5,8	4,2	5,6	1	0,5	
2	6,3	3,7	6,0	1	0,5	
3	6,9	3,1	6,4	1	0,5	

Закінчення таблиці 11

1	2	3	4	5	6	7
4	7,7	2,3	6,8	1	0,5	
5	8,7	1,3	7,2	1	0,5	
6	9,4	0,6	7,6	1	0,5	
7	9,7	0,3	8,0	1	0,5	

До кожної пробірки додають по 1 мл 0,5 %-го розчину крохмалю і по 0,5 мл розведеної в 10 разів слини. Вміст пробірок ретельно перемішують і залишають на 10 хв у термостаті за температури 38 °С. Після того пробірки охолоджують і додають до кожної по 1 краплі розчину йоду, спостерігаючи забарвлення, що з'являється. Відзначають, при якому значенні рН середовища відбулось найбільш повне розщеплення крохмалю під дією амілази слини (жовте або буре забарвлення з йодом).

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Хімічна природа ферментів.
2. Поясніть, чому активність ферментів залежить від величини рН середовища, у якому перебігає ферментативна реакція.
3. Наведіть графічну залежність активності ферменту від величини рН середовища.
4. Наведіть оптимальні значення рН, за яких проявляють максимальну активність ферменти: пепсин, трипсин, амілаза слини, аргінази.
5. Наведіть схему дисоціації тетрапептиду валіл–тирозил–пролін–гіс-тидину при значенні рН < 7.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛІПАЗ У НАСІННІ ОЛІЙНИХ АБО ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

Визначення активності ліпаз засноване на титруванні розчином лугу вільних жирних кислот, що утворюються при взаємодії ферментів, по-

передньо виділених з рослинної сировини, з рослинною олією. Ферментативну реакцію також можна проводити при змішуванні з рослинною олією подрібненого насіння олійних або злакових культур.

Обладнання: лабораторні ваги, фарфорові ступки з товкачиками, марля для фільтрування, водяна баня, бюретка на 25 мл, конічні колби для титрування, піпетки, мірні колби, крапельниця для індикатора.

Реактиви:

- фосфатний буфер (рН=7,4): 11,866 г NaH_2PO_4 розчиняють в 1 л дистильованої води; 4,537 г KH_2PO_4 розчиняють в 500 мл дистильованої води; потім 182 мл розчину калій дигідрофосфату змішують з 818 мл розчину натрій гідрофосфату;

- дистильована вода;
- 0,05 М розчин КОН;
- 1 %-вий спиртовий розчин фенолфталеїну.

Хід роботи

У фарфорову ступку поміщають 30 г насіння і розтирають товкачиком до одержання однорідної маси. Потім до ступки приливають 200 мл фосфатного буферного розчину (рН = 7,4) і ретельно перемішують суміш впродовж 15 хв. Після того суміш переносять на марлю, складену у чотири шари, та віджимають ферментний екстракт у фарфорову чашку або у лабораторний стакан. Піпеткою відбирають 2 проби ферментного екстракту по 5 мл і переносять їх до конічних колб. Одну колбу ставлять на 10 хв у киплячу водяну баню для інактивації ферментів. Після охолодження цієї колби до обох колб (з активними та інактивованими ферментами) приливають піпеткою об'єм рослинної олії масою 3 г. Суміш, що одержали, перемішують, колби залишають на 30 хв у термостаті за температури 30 °С, точно фіксуючи час початку ферментативної реакції. Потім суміші в колбах титрують з 3 краплями розчину фенолфталеїну водним 0,05 М розчином КОН.

Обробка і оцінка результатів. Активність ліпаз розраховують згідно з формулою:

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot K \cdot 2.8}{m \cdot t},$$

де A – активність ліпази в мг КОН, що витрачається на титрування вільних жирних кислот, які утворюються при ферментатив-

ному гідролізі жиру протягом 1 год. у перерахунку на 1 г рослинної сировини;

V_1 – об'єм 0,05 М розчину КОН, що витрачається на титрування вільних жирних кислот, які утворюються при ферментативному гідролізі жиру;

V_2 – об'єм 0,05 М розчину КОН, що витрачається на титрування аналітичної проби з інактивованими ферментами;

K – поправка до титру 0,05 М розчину КОН;

m – наважка рослинної сировини, г;

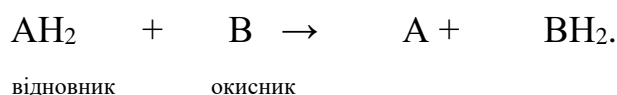
2,8 – кількість калій гідроксиду в 1 мл 0,05 М розчину КОН, мг;

T – тривалість ферментативної реакції в годинах.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14

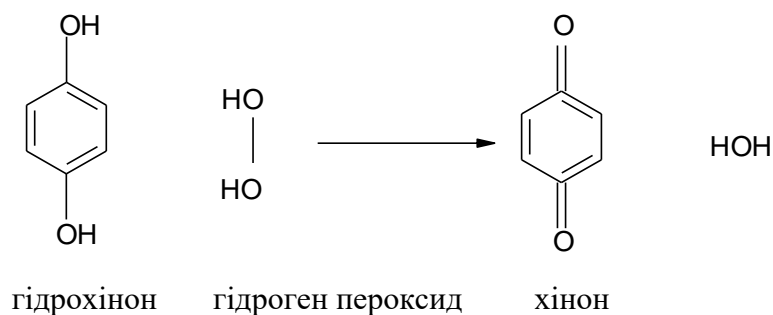
ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ОКСИДОРЕДУКТАЗ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

До класу оксидоредуктаз відносять багаточисельні ферменти, що каталізують окисно-відновні реакції, в яких за наведеною нижче схемою відбувається перенесення відновлювальних еквівалентів (двох атомів Гідрогену, двох електронів або гідрид-іону H^-) від відновника (специфічного субстрату реакції) до окисника (відносно специфічного субстрату):



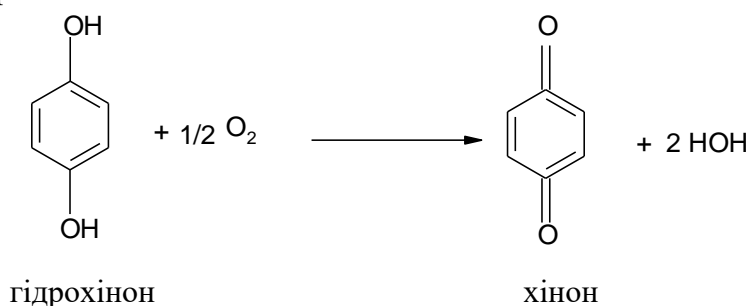
Розрізняють наступні основні оксидоредуктази: аеробні дегідрогенази або оксидази, що каталізують перенос протонів (електронів) безпосередньо на кисень; анаеробні дегідрогенази, що прискорюють перенос протонів (електронів) на проміжний субстрат; цитохроми, що каталізують перенесення лише електронів. До цього класу ферментів відносять також каталазу і пероксидазу, що каталізують реакції за участю перекису водню.

Пероксидаза каталізує реакцію перенесення атомів Гідрогену із субстратів (або відновлення анаеробних дегідрогеназ) на Гідроген пероксид з ароматичних поліфенолів, наприклад, гідрохінону:



Пероксидаза міститься у м'ясистих лусках цибулі та листі капусти.

Поліфенолоксидаза (або просто фенолоксидаза) каталізує реакцію окислення ароматичних поліфенолів, наприклад, пірокатехіну або гідрохінону, киснем повітря:



Фенолоксидаза міститься у соку картоплі і яблук, крім того, у цих же соках міститься і пероксидаза. Наявністю фенолоксидази пояснюється потемніння на повітрі розрізаних бульб картоплі та яблук. Вони містять ароматичні поліфеноли (наприклад, пірокатехін), споріднені гідрохінону. Фенолоксидаза нагріванням інактивується, тому відварені клубні картоплі у повітрі не темнішають.

Про дію пероксидаз та фенолоксидаз роблять висновок за появою забарвлення продуктів реакції – відповідних їм хінонів. Інтенсивність забарвлення хінонів і є доказом того, що відбулася ферментна реакція, тобто фермент активний. Відсутність забарвлення свідчить або про відсутність ферменту, або про те, що він інактивований.

У дослідах з пероксидазою слід мати на увазі, що окиснення гідрохінону гідроген пероксидом може відбуватися і за відсутності пероксидази. В цьому випадку відбувається суто хімічна окисно-відновна реакція.

Хід роботи

Беруть шість чистих пробірок. У 1-у, 2-у, 3-ю та 4-у пробірки наливають по 1 мл досліджуваного соку; вміст 1-ї та 2-ї пробірок для інактивації

ферментів нагрівають до кипіння над полум'ям горілки, а потім швидко охолоджують струменем холодної води. У 5-у і 6-у пробірки, замість досліджуваного соку, наливають по 1 мл дистильованої води. До всіх шести пробірок вносять на кінчику ножа гідрохінон. Потім у 1-у, 3-ю та 5-у пробірки додають по 5 крапель дистильованої води, а в 2-у, 4-у та 6-у пробірки – по 5 крапель 2 %-го гідроген пероксиду. Вміст кожної пробірки ретельно перемішують і залишають на 15 хв.

Результати досліду заносять у таблиці. Для кожного соку складається окрема таблиця!

Таблиця 12

Визначення активності оксидоредуктаз рослинного походження

№ пробірки	Склад реакційної суміші	Забарвлення, що спостерігається	Пояснення реакції
1	Прокип'ячений сік, гідрохінон, вода		
2	Прокип'ячений сік, гідрохінон, H ₂ O ₂		
3	Свіжий сік, гідрохінон, вода		
4	Свіжий сік, гідрохінон, H ₂ O ₂		
5	Вода, гідрохінон, вода		
6	Вода, гідрохінон, H ₂ O ₂		

Завдання для самостійної роботи: вивчити теоретичний матеріал з теми, підготувати відповіді на контрольні питання.

Контрольні питання

1. Які ферменти належать до класу оксидоредуктаз?
2. Яку хімічну природу та механізм дії мають дегідрогенази, оксидази, каталази, пероксидази, цитохроми, цитохромоксидази?
3. Наведіть структурні формули кофакторів:
 - а) НАД⁺; НАДН;
 - б) ФАД, ФАДН₂, ФМН.
4. Хімічна природа та механізм дії анаеробних дегідрогеназ.
5. Хімічна природа та механізм дії аеробних дегідрогеназ.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Базова

1. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М.: «Медицина», 1998. – 704 с.
2. Кучеренко М. Є. Біохімія / М. Є. Кучеренко, Р. П. Виноградова, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К.: Либідь, 1995. – 464 с.
3. Основы биохимии Ленинджера: у 3-х Т. / Д. Нельсон, М. Кокс: пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – Т. 1: Основы биохимии. Строение и катализ. – 694 с.
4. Основы биохимии Ленинджера: у 3-х Т. / Д. Нельсон, М. Кокс: пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм. – 636 с.
5. Филиппович Ю. В. Основы биохимии / Ю. В. Филлипович. – М.: Высш. шк., 1986. – 623 с.

Допоміжна

1. Кучеренко Н. Е. Биохимия: практикум / Н. Е. Кучеренко, А. М. Васильев, Р. П. Виноградова и др. – К.: Вища шк., 1988. – 128 с.
2. Новиков Н. Н. Лабораторный практикум по биохимии растений / Н. Н. Новиков, Т. В. Таразанова. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, 2012. – 97 с.
3. Пустовалова Л. М. Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов на/Д, 1999. – 544 с.
4. Шапиро Д. К. Практикум по биологической химии / Д. К. Шапиро. – Минск: Высш. шк., 1988. – 265 с.
5. Шевряков М. В. Практикум з біологічної хімії / М. В. Шевряков, Б. В. Яковенко, О. Ф. Явоненко. – Суми: ВТД «Університетська книга», 2003. – 204 с.