

**Кабінет Міністрів України**  
**Національний університет біоресурсів і природокористування України**  
**Навчально-науковий інститут рослинництва, екології і біотехнологій**

**Навчально-методичні рекомендації з дисципліни**  
**«Біохімія»**  
**для ОКР «Бакалавр» напрямку підготовки Біотехнологія**

Прилуцька С.В., Демчук Т.Л., Бойко О.А., Коломієць Ю.В.

## ПЕРЕДМОВА

Лабораторні (практичні) роботи є складовою частиною навчальної програми з дисципліни «Біохімія» для студентів ОКР «Бакалавр» за напрямком підготовки Біотехнологія. Навчально-методичне видання складається із шести основних розділів: білки, ферменти, вуглеводи, нуклеїнові кислоти, ліпіди та вітаміни. Воно містить методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт студентами, основні правила поведінки і техніки безпеки у біохімічній лабораторії. Основною метою навчально-методичного видання є закріплення фундаментальних теоретичних знань та формування практичних навичок у студентів при вивченні загального курсу «Біохімія».

Це навчально-методичне видання складається з 16 лабораторних робіт, контрольних запитань до кожного розділу згідно навчальної програми, а також Додаток-завдання щодо написання структурних формул сполук основних класів біоорганічних речовин, що допоможе студенту самостійно підготуватися до практичного заняття і засвоїти теоретичний матеріал. У лабораторній роботі наведено принцип методу, основні структурні формули та реакції речовин, перелік матеріалів, реактивів та обладнання, а також детальний опис ходу виконання роботи. Після завершення лабораторної роботи студент має записати у зошиті результати та висновки, що дозволить розвинути навички у студентів планувати, виконувати та аналізувати результати наукової роботи.

### ***Правила поведінки та техніки безпеки в навчальній лабораторії.***

1. Перед тим як приступити до виконання лабораторної роботи уважно ознайомтесь із завданням та правилами техніки безпеки, обладнанням, матеріалами.
2. Нагрівати рідину в пробірці треба поступово, спрямовуючи отвір пробірки в напрямку від себе та свого товариша тому, що внаслідок перегріву може відбутися викид рідини.
3. Не нахилитися над пробіркою, в якій кипить рідина.
4. Нюхаючи речовини у лабораторії, треба спрямовувати до себе пари рухом руки.
5. Ніяких речовин у лабораторії не пробувати на смак, а також пити з хімічного посуду.
6. Досліди з отруйними речовинами проводити під витяжною шафою.
7. Розчиняти кислоту у воді треба шляхом додавання кислоти до води по краплинах, весь час перемішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сірчаної кислоти відбувається розігрів розчину.
8. Виливаючи у раковину кислотні та лужні розчини потрібно спочатку їх нейтралізувати лугом чи кислотою відповідно.
9. Розлиті кислоти та лужні розчини треба засипати піском або віднейтралізувати і тільки після цього проводити прибирання.
10. Досліди з бензолом, ефіром та спиртом треба проводити на відстані від полум'я під витяжною шафою.
11. При використанні речовин для досліду звертайте увагу на підписи, в разі сумніву, звертайтеся до лаборанта або викладача.
12. Хімічні реакції необхідно виконувати в тих об'ємах, концентраціях і послідовності, а також використовувати такий лабораторний посуд та обладнання, що вказані у методичних вказівках.
13. Відразу ж повідомляйте викладача або лаборанта про помічені недоліки і порушення правил безпеки.
14. Не заходити в лабораторію, коли працює не ваша група.
15. На робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей (мобільних телефонів, нетбуків, сумок тощо).
16. При роботі у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яка вам доручена. Категорично забороняється робити іншу роботу.
17. Під час виконання лабораторної роботи не ходіть без діла по лабораторії, цим Ви відволікаєте увагу товаришів і залишаєте без нагляду своє робоче місце.
18. По закінченні роботи треба прибрати своє робоче місце, вимити посуд. Після приведення робочого місця в належний стан, необхідно попередити лаборанта або викладача про закінчення роботи, занести результати виконаної роботи у зошит, написати висновок, підписати протокол лабораторної роботи у викладача або лаборанта і тільки після цього залишити лабораторію.

### **СТРОГО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ:**

1. Вносити з лабораторії реактиви та обладнання.
2. Вмикати/вимикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу.
3. Проводити досліди з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції.
4. Тримати у лабораторії особистий одяг і інші речі, а також вживати їжу.
5. Залишати без нагляду запалені пальники та нагрівачі.

6. Проводити дослідження без наявності спецодягу (халатів).
7. Набирати ротом за допомогою піпетки концентровані кислоти, луги та отруйні речовини.
8. Працювати з незаземленим обладнанням.
9. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для надання допомоги у разі необхідності.

**НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЄ ЗНАННЯ ІНСТРУКЦІЙ РОБОТИ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕЧОВИН, ПРАВИЛ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ!**

#### **Речовини, які вимагають обережного поводження**

1. **АЗОТНА КИСЛОТА** (концентрована) викликає опіки шкіри. Пари цієї кислоти здійснюють подразнюючу дію на дихальні шляхи та очі. Азотна кислота може вибухати при взаємодії з скипидаром та спиртом, а також із солями пектинової кислоти, карбідами та порошками металів.
2. **АЦЕТОН** – це легка речовина, яку краще зберігати у герметично закритому скляному посуді. У разі виникнення пожежі спричиненої реакцією із ацетоном краще використовувати воду у розпиленому вигляді.
3. **ЛУГИ** при попаданні на шкіру та слизові оболонки викликають сильні опіки. Їх необхідно зберігати у сухому місці, ізольованому від води та нагріву.
4. **КАЛІЙ МАРГАНЦЕВОКИСЛИЙ** вибухає при обробці концентрованою сірчаною кислотою, спиртом, ефіром та горючими речовинами.
5. **КАЛІЙ ТА НАТРІЙ АЗОТНОКИСЛИЙ** можуть викликати подразнення шкіри, вони є легкозаймистими речовинами. Зберігати ці речовини необхідно у сухому місці та у скляному посуді.
6. **СІРЧАНА КИСЛОТА** при попаданні на шкіру викликає важкі опіки. Пари сірчаної кислоти можуть викликати подразнення слизових оболонок. Гасити полум'я треба піском або золою, застосовувати воду не можна. Зберігати сірчану кислоту необхідно у скляному щільно закритому посуді.
7. **СОЛЯНА КИСЛОТА** викликає опіки шкіри. Пари соляної кислоти викликають сильні опіки слизових оболонок. При пожежі застосовують воду, або нейтралізуючі речовини (бікарбонат натрію).
8. **ОЦТОВА КИСЛОТА** може також викликати важкі опіки шкіри. Пари цієї кислоти викликають подразнення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. При взаємодії оцтової кислоти з азотною кислотою може виникнути спалах, таке полум'я необхідно гасити водою.

#### *Перша допомога при нещасних випадках*

1. При опіках кислотами та лужними розчинами слід промивати ушкоджене місце під сильним струменем води, потім нейтралізувати кислоту – 1% розчином бікарбонату натрію, а луг – 1% розчином оцтової кислоти. При хімічних опіках очей, їх слід промивати водою, потім 1% розчином бікарбонату натрію (у випадку із кислотою), чи 2% розчином борної кислоти (у випадку із лугом).
2. При отруєннях газами, людину слід негайно вивести на свіже повітря, дати випити велику кількість молока та забезпечити спокій. У разі послабленого дихання потерпілому слід зробити штучне дихання.

## РОЗДІЛ 1. БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ.

### Лабораторна робота №1.

#### «Кольорові (якісні) реакції на білки та амінокислоти».

##### 1. Біуретова реакція на пептидні зв'язки.

*Принцип реакції.* Білки в лужному розчині за наявності двохвалентного сульфату міді утворюють комплексні сполуки міді, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка.

*Матеріали та реактиви.* 1% водний розчин білка (ячний або альбумін), 10% розчин NaOH чи KOH, 1% розчин CuSO<sub>4</sub>.

*Обладнання.* Скляні палички, штатив, пробірки, піпетки, крапельниця.

*Хід роботи.* Спочатку необхідно приготувати розчин ячного білка. Для цього білок одного яйця відділяють від жовтка, розчиняють його у 15-20 кратному об'ємі дистильованою водою. Отриманий розчин білка фільтрують через 3-4 шару марлі.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка, 1 мл розчину NaOH і додають 1-2 краплі розчину CuSO<sub>4</sub> та обережно перемішують. Після чого розчин у пробірці має забарвитися у синьо-фіолетовий колір.

##### 2. Реакції на амінокислоти.

###### А. Реакція з азотистою кислотою.

*Принцип реакції.* Продуктом взаємодії α-амінокислот з азотистою кислотою, яка утворюється в реакції нітриту натрію та оцтової кислоти, є газоподібний азот.

*Матеріали і реактиви.* 1% водний розчин білка (ячний або альбумін), 5% розчин нітриту натрію (NaNO<sub>2</sub>), концентрована оцтова кислота (CH<sub>3</sub>COOH).

*Обладнання.* Штатив, пробірки, крапельниця.

*Хід роботи.* У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 5 крапель розчину білка, додають 5 крапель розчину NaNO<sub>2</sub> і 2 краплі розчину CH<sub>3</sub>COOH. Суміш у пробірці обережно перемішують, після чого має спостерігатися виділення газу.

###### Б. Реакція утворення комплексної солі міді.

*Принцип реакції.* Під час нагрівання амінокислоти з карбонатом міді (CuCO<sub>3</sub>) утворюється комплексна сполука міді, яка має синє забарвлення.

*Матеріали і реактиви.* 1% водний розчин білка (ячний або альбумін), сухий карбонат міді.

*Обладнання.* Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

*Хід роботи.* У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають на кінчику лопатки сухий карбонат міді, далі вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння. Розчин у пробірці має забарвитися у синій колір.

### ***В. Ксантинпротейнова реакція на циклічні амінокислоти.***

*Принцип реакції.* В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця, під дією азотистої кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

*Матеріали і реактиви.* 1% водний розчин білка (тирозин-вмісний), концентрована азотна кислота ( $\text{HNO}_3$ ), 10% розчин  $\text{NaOH}$ .

*Обладнання.* Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

*Хід роботи.* У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до появи жовтого забарвлення та охолоджують до кімнатної температури і додають 1-2 краплі 10% розчину  $\text{NaOH}$ . Після чого суміш у пробірці має забарвитися у помаранчевий колір.

### ***Г. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти.***

*Принцип реакції.* При нагріванні розчинів цистину або цистеїну у лужному середовищі відбувається гідроліз сульфгідрильної групи з подальшим утворенням відповідних сульфідів натрію або калію. Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів (іонів свинцю), які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору.

*Матеріали і реактиви.* 1% водний розчин білка (яєчний), реактив Фоля (до 10% розчину ацетату свинцю  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  додають 10% розчин  $\text{NaOH}$  до розчинення осаду), 20% розчин  $\text{NaOH}$ .

*Обладнання.* Штатив, пробірки, піпетки, скляні палички, водяна баня.

*Хід роботи.* У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають 2 мл 20% розчину  $\text{NaOH}$  і 1 мл реактиву Фоля. Вміст пробірки ретельно перемішують і поступово нагрівають на водяній бані до появи бурого чи чорного осаду сульфїду свинцю.

## **Лабораторна робота №2.**

### **«Реакція осадження білків. Фізико-хімічні властивості білків».**

Для осадження білків використовують методи висолювання, що обумовлені нейтралізацією заряду білка з одночасною дегідратацією його колоїдних частинок. При висолюванні білок майже не втрачає свої фізико-хімічні властивості і у разі зміни концентрації солі може переходити назад у розчин. При висолюванні біологічні властивості білків мають зворотній характер.

*Матеріали та реактиви.* 1% водний розчин яєчного білка, 1% розчин оцтової кислоти, насичений розчин хлориду натрію, 10% розчин гідроксиду натрію, концентрована азотна кислота, 20% розчин сульфосаліцилової кислоти, 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТОК), 10% розчин пікринової кислоти, насичений розчин таніну, 1% розчин гексаціано (II)-ферату калію, 0,1% розчин сульфату міді, 1% розчин ацетату міді, 96% розчин етилового спирту, 95% розчин ацетону, насичений розчин сульфату амонію, кристалічний сульфат амонію.

*Обладнання.* Фільтрувальний папір, скляні палички, пробірки зі штативом, крапельниця, піпетки градуйовані, пробірки центрифужні, лійки скляні, пальник, водяна баня, центрифуга.

**А. Осадження білків при нагріванні.** Більшість білків при нагріванні втрачають свої нативні властивості за рахунок руйнування нековалентних зв'язків. Найкращим методом осадження білків є кип'ятіння його розчину при значеннях рН середовища наближених до ізоелектричної точки білків.

*Хід роботи.* У п'ять пробірок за допомогою піпетки вносять по 2,5 мл розчину яєчного білка. Розчин білка в пробірці №1 нагрівають до кипіння, він мутнішає, спостерігається опалесценція розчину, що зумовлено руйнуванням гідратної оболонки навколо молекули білка, але міцели білка заряджені й тому залишаються в розчині, не випадаючи в осад. У пробірку №2 додають 1-2 краплі оцтової кислоти (для слабокислої реакції) та нагрівають до кипіння. Після відстоювання білок випадає в осад. За цих умов молекули білка втрачають заряд, тому що рН середовища близький до ізоелектричного стану. У пробірку №3 додають 1,5 мл розчину оцтової кислоти (для кислої реакції) і нагрівають до кипіння. Під час кипіння розчину осад не утворюється, оскільки молекули білка набувають позитивного заряду, що підвищує їх стійкість. У пробірку №4 додають 2,5 мл насиченого розчину хлориду натрію та нагрівають до кипіння. У пробірці спостерігається випадіння білого осаду. Його утворення викликане тим, що білок внаслідок взаємодії з іонами хлориду натрію втрачає свій заряд. У пробірку №5 додають 2 мл розчину гідроксиду натрію для створення лужного середовища і нагрівають до кипіння. Під час кип'ятіння рідини осад у пробірці не утворюється, оскільки в лужному середовищі збільшується від'ємний заряд білка.

**Б. Осадження білків кислотами.** Неорганічні та органічні кислоти осаджують білки в результаті денатурації та дегідратації білкових молекул, а також внаслідок утворення комплексних солей білків із кислотами. При надлишку всіх неорганічних кислот, крім азотної кислоти, осад розчиняється внаслідок утворення позитивного заряду на молекулі білка.

*Хід роботи.* У три пробірки вносять по 1 мл кислоти: у пробірку №1 – концентровану азотну кислоту, у пробірку №2 – 10% розчин ТОК, у пробірку №3 – 20% розчин сульфосаліцилової кислоти. До кожної пробірки по стінці обережно додають по 1 мл розчину білка. У пробірці №1 на межі розділення двох рідин утворюється осад у вигляді білкового кільця (проба Гелера). Вміст перемішують, доливають надлишок азотної кислоти й пересвідчуються, що осад не зникає. У пробірках №2 та №3 спостерігається випадіння білка в осад.

**В. Осадження білків органічними розчинниками.**

*Хід роботи.* У дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. Потім у пробірку №1 додають 1 мл розчин етилового спирту, в пробірку №2 — ацетону. Розчини в обох пробірках мутнішають. Якщо до них додати по 1 мл насиченого розчину хлориду натрію, через деякий час білок випадає в осад.

**Г. Осадження білків алкалоїдними еактивами.** Механізм осадження білків алкалоїдними реактивами (таніном, пікриною, гексаціановою, фосфорно-вольфрамовою, фосфорно-молібденовою, феритовою кислотами та їх солями) зумовлений утворенням нерозчинних сполук цих реактивів із азотистими групами білка. В таких сполуках алкалоїдні реактиви є аніонами, а білки — катіонами. Для надання молекулі білка позитивного заряду розчин білка підкислюють оцтовою кислотою. В результаті позитивно заряджені частки білка легко взаємодіють із

від'ємно зарядженими молекулами осаджувача. Білки, що мають позитивний заряд (протаміни, гістони), добре осаджуються алкалоїдними реактивами в середовищі без попереднього підкислення середовища інкубації.

*Хід роботи.* У три пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка, по 0,5 мл розчину оцтової кислоти й по дві-три краплі таких речовин: у пробірку №1 — розчину пікринової кислоти, у пробірку №2 — насичений розчин таніну, у пробірку №3 — розчину гексаціано-(II)-ферату калію. У пробірках спостерігається випадіння осаду. Після додавання надлишку розчину гексаціано-(II)-ферату калію та розчину таніну осад розчиняється.

**Д. Осадження білків іонами важких металів.** Солі важких металів (міді, ртуті, цинку, срібла, свинцю) здатні осаджувати білки, що обумовлено утворенням комплексних сполук. Іони важких металів з'єднуються із сульфгідрильними (SH) групами радикалів залишків амінокислот, що призводить до зміни конформації молекул білків.

*Хід роботи.* У дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. В пробірку №1 додають по краплям 5% розчин сульфату міді, в пробірку №2 — 5% розчину ацетату свинцю та спостерігають утворення осаду (з сіллю міді — блакитного кольору, свинцю — білого). Внаслідок додавання надлишку розчинів сульфату міді та ацетату свинцю осад, що утворився у пробірках, розчиняється.

**Е. Осадження білків хлористим натрієм.** У водному розчині більшість білків та їх часток (міцел) заряджені й гідратовані, що зумовлює осадження білків у розчинах. Але за високої концентрації середніх солей (сульфату амонію, хлориду натрію), молекули яких у водних розчинах гідратовані, руйнуються водні оболонки білкових молекул. У результаті цього знижується електричний заряд білкової молекули за рахунок іонів солі, які адсорбуються на ній, міцели білка злипаються одна з одною, збільшуються та випадають в осад.

*Хід роботи.* У пробірку вносять 3 мл розчину яєчного білка та хлорид натрію до повного насичення, через кілька хвилин в осад випадають глобуліни. Суміш фільтрують через фільтрувальний папір. У фільтраті містяться альбуміни, які не осаджуються. Якщо до фільтрату додати 1 мл розчину оцтової кислоти й нагріти суміш до кипіння на водяній бані, то альбуміни випадуть в осад.

### Лабораторна робота №3.

#### «Кількісне визначення білка».

Методи концентраційного аналізу, зокрема фотометричні (спектрофотометричні та колориметричні) базуються на законі Бугера-Ламберта-Бера.

Завдяки розсіюванню світла в оптично неоднорідному середовищі інтенсивність плоскої світлової хвилі поступово зменшується внаслідок її поширення в середовищі. Ця залежність описується законом Бугера-Ламберта:  $I = I_0 e^{-E d}$ , де  $I_0$  та  $I$  — інтенсивність падаючого та розсіяного світла, відповідно;  $d$  — товщина шару розсіюючого середовища;  $E$  — коефіцієнт екстинції (він чисельно дорівнює товщині шару розсіюючого середовища, після проходження якого інтенсивність світла зменшується в  $e \approx 2,718$  рази).



Для розбавлених розчинів розсіюючої речовини справедливим є закон Бера:  $E = \epsilon \cdot c$  і закон Бугера-Ламберта-Бера приймає вигляд:  $I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$ , де  $c$  - концентрація розсіюючої речовини;  $\epsilon$  - екстинція (стала, що залежить від довжини хвилі світла та властивостей розсіюючої речовини).

Спектр поглинання речовини – це залежність інтенсивності поглинутого світла речовиною від довжини хвилі ( $\lambda$ , нм). Молекули поглинають світло у широкому діапазоні довжин хвиль, тому їх спектри лежать в різних областях: ультрафіолет (200-400 нм), видиме (400-700 нм), близьке інфрачервоне (700-1200 нм).

Спектрофотометрія базується на вимірюванні поглинання монохроматичних випромінювань досліджуваних речовин у розчинах. Спектрофотометричні методи дозволяють виявляти у незначних кількостях досліджувані речовини, які в процесі дослідження не руйнуються.

Розчини, які використовуються у спектрофотометричних вимірюваннях мають бути: прозорими, не містити пухирців повітря, які збільшують розсіювання світла; кімнатної температури, оскільки на стінках кювет може утворюватися конденсат води; об'єм рідини у кюветі має бути достатнім для того, щоб потік випромінювання проходив повністю через товщину розчину. Кювети для вимірювань мають бути чистими та сухими. Краплі, подряпини і бруд на стінках кювет розсіюють або поглинають світло. Оптичні стінки кювет не слід торкатися пальцями.

Для визначення концентрації досліджуваної речовини, зокрема кількості білка, у досліджуваному розчині з використанням спектрофотометра спочатку необхідно побудувати *калібрувальну криву (графік)*. Для побудови калібрувальної кривої готують декілька, не менше п'яти, стандартних розчинів досліджуваної речовини із відомою концентрацією та згідно протоколу виконують усі умови даної реакції. Далі вимірюють екстинцію, або оптичну густину поглинання проб при певній довжині хвилі (згідно протоколу). За результатами вимірювання екстинції стандартних розчинів, зокрема білка, будують на міліметровому папері калібрувальний графік, тобто залежність оптичної густини розчину ( $\lambda$ , нм) від вмісту білка (мг/мл). Калібрувальну криву будують, наносячи відносно вісі абсцис (X) відомі значення концентрації стандартних розчинів, а на вісі ординат (Y) – відповідну їх екстинцію при певній довжині хвилі. Калібрувальна крива має мати вигляд прямої, яка виходить із початку координат. При зміні реактивів калібрувальний графік потрібно побудувати заново. Графік, отриманий при роботі на одному спектрофотометрі не підходить для роботи на іншому приладі, оскільки прилади відрізняються чутливістю спектрофотометричних визначень.

Кількісне визначення білка у розчинах за допомогою спектрофотометра полягає у вимірюванні їх інтенсивності поглинання світла із біуретовим реактивом при довжині хвилі 540-650 нм та реактивом Фоліна (метод Лоурі) - при 660-750 нм.

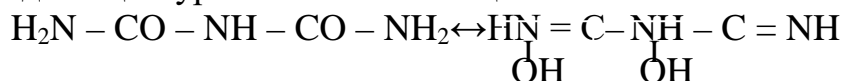
## 1. Спектрофотометричне визначення концентрації білка з біуретовим реактивом.

*Принцип реакції.* Амінокислоти, які утворюють не менше двох пептидних зв'язків (-CO-NH-), у лужному середовищі за наявності сульфату міді (II) утворюють комплекси з атомами міді, що забарвлені у фіолетовий колір.

Уперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена з біуретом, тому вона й має назву біуретова. Біурет, який можна одержати під час нагрівання сечовини до температури 180°C, не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки:

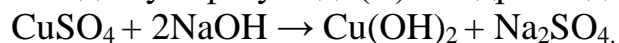


У лужному середовищі біурет зазнає енолізації за такою схемою:

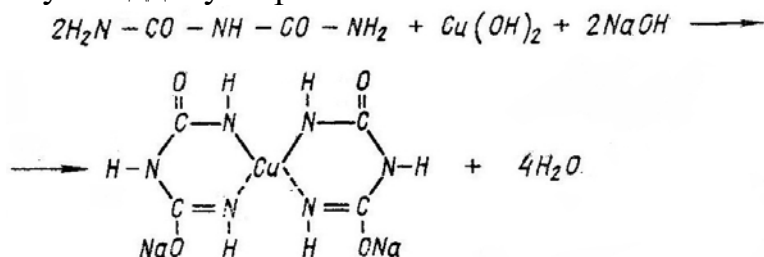


Дві молекули енольної форми біурету взаємодіють із гідроксидом міді (II) й утворюють комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

Гідроксид міді (II) для проведення біуретової реакції одержують, як правило, в результаті реакції взаємодії сульфату міді (II) із гідроксидом натрію (чи калію):



Комплекс біурету з міддю утворюється за такою схемою:



Подібний комплекс із міддю можуть утворювати деякі амінокислоти, в яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної та амінної групи. Прикладом такої амінокислоти може бути аспарагін.

*Матеріали і реактиви.* Розчин телячого сироваткового альбуміну (ТСА) (вихідна концентрація білка 4 мг/мл), біуретовий реактив (0,15 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  та 0,6 г  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (виннокислий натрій, калій) розчиняють в 50 мл дистильованої води, добре перемішують, додають 30 мл 10% розчину  $\text{NaOH}$  вільного від вуглекислого натрію, додають 0,2 г  $\text{KI}$  (для попередження самовільного відновлення) та розчиняють. Отриманий розчини у колбі доводять до об'єму 200 мл дистильованою водою та зберігають у темному місці).

*Обладнання.* Штатив з пробірками, скляні палички, піпетки, спектрофотометр, кювета.

*Хід роботи.* 1) Спочатку методом серійних розведень готують стандартні концентраційні розчини білка. Для цього у контрольну пробірку (К) та пробірки 2-5 вносять по 1 мл дистильованої води. У пробірку 1 вносять 2 мл вихідного розчину ТСА (концентрація білка 4 мг/мл), звідти відбирають 1 мл розчину білка (4мг/мл) та переносять у пробірку 2 (концентрація білка 2 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 2 переносять 1 мл розчину у пробірку 3 (концентрація

білка 1 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 3 переносять 1 мл розчину у пробірку 4 (концентрація білка 0,5 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 4 переносять 1 мл розчину у пробірку 5 (концентрація білка 0,25 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 5 відбирають 1 мл розчину, який далі у дослідах не використовують.

2) Потім до кожної пробірки додають по 4 мл біуретового реактиву, проби витримують упродовж 30 хв за кімнатної температури та вимірюють оптичне поглинання проб на спектрофотометрі при ( $\lambda$  540 нм).

Для послідовності виконання роботи та внесення реактивів можна скористатися таблицею:

№ п/п	конц. білка, мг/мл	dist H <sub>2</sub> O, мл	Станд. розчини білка	біурет. реактив, мл	t кімн °С, 30 хв	E опт. погл., $\lambda$ 540, нм
К	-	1	-	4	+	
1	4	-	2 мл вихідного білка	4	+	
2	2	1	1 мл із пробірки 1	4	+	
3	1	1	1 мл із пробірки 2	4	+	
4	0,5	1	1 мл із пробірки 3	4	+	
5	0,25	1	1 мл із пробірки 4	4	+	
-	-	-	1 мл із пробірки 5 вилити	-	-	-

3) Будують калібрувальну криву (за ТСА) для визначення концентрації білка: на вісі абсцис (x) відкладають відомі концентрації стандартних розчинів (мг/мл) білка (ТСА), а на вісі ординат (y) – оптичну густину поглинання при ( $\lambda$  540 нм). Усі точки з'єднують між собою прямою.

## **2. Спектрофотометричне визначення концентрації білка за методом Лоурі.**

*Принцип методу.* Метод Лоурі ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину білка під час кольорової реакції Фоліна на білок з тирозиновими та цистеїновими радикалами білкової молекули. Реакція полягає у відновленні суміші фосфорно-вольфрамової та фосфорно-молібденової кислот із утворенням комплексної сполуки синього кольору. Реакція ініціюється комплексними сполуками міді, які виникають під час взаємодії білка з лужним розчином сульфату міді.

Для визначення концентрації білка в розчині, що досліджується за методом Лоурі, необхідно заздалегідь побудувати калібрувальний графік (див. Лаб. роб. №3.1) залежності інтенсивності поглинання від концентрації білка-стандарту. Тому за цим методом можна встановити абсолютний вміст білка в досліджуваному розчині лише в тому разі, якщо калібрувальний графік побудований для того білка, концентрацію якого визначають.

*Матеріали та реактиви.* Розчин білка, свіжоприготовлений (ex tempore) лужний розчин міді (50 мл 2% розчину карбонату натрію в 0,1 моль/л розчині гідроксиду натрію змішують із 1 мл 0,5% розчину сульфату міді в 1% розчині татрату натрію-калію), реактив Фоліна, який готують таким чином: фосфорно-вольфрамовий натрій (20 г) і фосфорно-молібденовий натрій (5г) розчиняють у 140 мл дистильованої води, додають 10 мл 80 % розчину ортофосфорної кислоти та 20 мл розчину концентрованої соляної кислоти. Одержану суміш кип'яють у колбі зі зворотним холодильником Лібіха протягом 10 год. Потім до розчину додають 30 г сульфату літію, 10 мл дистильованої води, дві-три краплі бромиду й без зворотного холодильника кип'яють у витяжній шафі для видалення бромиду. Розчин охолоджують, його об'єм доводять дистильованою водою до 200 мл і фільтрують. Перед роботою отриманий розчин розводять удвічі дистильованою водою.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, градуйовані піпетки, штатив для пробірок, годинник, спектрофотометр, кювета.

*Хід роботи.* До 0,2 мл розчину досліджуваного білка додають 1 мл лужного розчину міді, суміш ретельно перемішують та залишають за кімнатної температури на 10 хв. Потім додають 0,08 мл реактиву Фоліна й знову перемішують. Через 30 хв розчин забарвлюється в синій колір. Інтенсивність забарвлення (оптичну густину) проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм. Концентрацію білка в досліджуваному розчині визначають за калібрувальною кривою.

**3. Визначення концентрації білка за формулою Калькара за оптичним поглинаннями проб при  $\lambda 280$  та  $\lambda 260$  нм:**

$$C_{\text{білка}} (\text{мг/мл}) = 1,45 \cdot E_{280} - 0,74 \cdot E_{260} .$$

**4. Визначення концентрації білка за формулою Вітекера за оптичним поглинаннями проб при  $\lambda 235$  та  $\lambda 280$  нм:**

$$C_{\text{білка}} (\text{мг/мл}) = \frac{E_{235} - E_{280}}{2,51} .$$

**Лабораторна робота № 4.**

**«Виділення білків з рослинного матеріалу».**

Як відомо, білки у живому організмі становлять близько 45% від сухої ваги. Молекули білків відрізняються молекулярною масою, хімічною будовою, фізико-хімічними властивостями тощо, що дозволяє їх розділити та отримати ряд білкових фракцій. Для осадження білків використовують метод висолювання (див. Лаб робота №2). Реакції осадження використовуються для якісного та кількісного визначення білкових сполук. Реакції оборотного осадження використовують для виділення та розділення білків.

Білки за фізико-хімічними властивостями поділяються на прості та складні. До простих білків, або протеїнів належать: альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, глутеліни та проламіни.

*Альбуміни* — досить поширеними білками у складі клітин рослин та тварин. Це розчинені білки цитоплазми і складові фізіологічних рідин (крові, гемолімфи, молока тощо). Альбуміни добре розчиняються у воді, вони у своєму складі містять багато залишків лейцину (до 15%) і мало - гліцину, також містять лізин, аспарагінову та глутамінову кислоти. Альбуміни висолюються з розчину сульфатом амонію в межах насичення від 65% до 100%.

*Глобуліни* — також досить поширеними білками і є подібними за своєю хімічною природою до альбумінів. На відміну від альбумінів, глобуліни містять значну кількість гліцину (3-4%) і менш гідрофільні. Глобуліни гірше розчиняються у воді і висолюються 30-50% розчином сульфату амонію. Велика кількість глобулінів входить до складу сироватки крові.

*Глутеліни* — білки рослинного походження, що містяться переважно у складі насіння злаків. Вони багаті на глутамінову кислоту та лізин, добре розчиняються у розведених розчинах кислот та лугів. До цієї групи належать: білок пшениці — глутенін, білок кукурудзи — глутелін, білок ячменю — гордеїн, білок рису — оризенін тощо.

*Проламіни* — білки рослинного походження, що містяться в зернах злаків. Вони містять залишки проліну (10—15 %) та глутамінової кислоти (20—25 %). На відміну від глутелінів проламіни розчинні в 70% етиловому спирті. До проламінів належить білок ендосперму пшеничного зерна - гліадин. Разом з глутелінами проламіни є основними компонентами клейковини — субстанції білкової природи, кількість якої надає високу якість борошну та виробам з нього.

*Матеріали та реактиви.* Пшеничне борошно, біуретовий реактив, насичений розчин  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10% розчин NaCl, 0,2% розчини NaOH, 0,2% розчин оцтової кислоти, 70% розчин етилового спирту.

*Обладнання.* Паперові фільтри, скляні лійки, порцелянові ступки, штатив із пробірками, водяна баня.

*Хід роботи. Екстракція альбумінів.* До порцелянової ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл дистильованої води. Суміш, що утворилася, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Потім, через 2-3 хвилини, коли нерозчинні часточки борошна осядуть на дно ступки, рідину, що залишилася, відфільтровують через паперовий фільтр. Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води. Промивну воду відстоюють 3 хвилини і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення інших фракцій білка.

Фільтрат, який утворився після першої екстракції білків з борошна, перевіряють на вміст білків. Для цього у пробіру 1 наливають 1 мл фільтрату та проводять біуретову реакцію. В пробірку 2 вносять 1 мл фільтрату, а потім порціями по 0,5 мл - насичений розчин сульфату амонію, до утворення осаду. Фіксують кількість витраченого сульфату амонію та розраховують його приблизну концентрацію у розчині, за якої білок випадав у осад.

*Екстракція глобулінів.* Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів, обробляють 3 мл 10% розчину хлориду натрію та розтирають протягом 5 хвилин у ступці, відстоюють і відфільтровують. У фільтраті глобулінів визначають наявність білків із біуретовою реакцією та

проводять реакцію висолювання білків (аналогічно до того, як це описано для альбумінів).

Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води, промивну воду відстоюють упродовж 3 хвилин і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення наступних фракцій білка.

**Екстракція глутелінів.** Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів і глобулінів, обробляють 3 мл 0,2% розчину NaOH, розтирають, відстоюють і відфільтровують. Потім до 10 крапель лужної витяжки додають по краплях 0,2 % розчин оцтової кислоти до появи осаду глутелінів (розчин стає каламутним).

**Екстракція проламінів.** До порцелянової ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл 70% розчину етанолу. Суміш, що утворилась, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Вміст ступки відфільтровують. З фільтратом, який містить проламіни, проводять біуретову реакцію та реакцію осадження проламінів водою. Для цього до 10 крапель спиртової витяжки додають по краплинам дистильовану воду до появи осаду проламінів.

### **Запитання до Розділу 1 «Білки та амінокислоти».**

1. Загальна характеристика білків та амінокислот?
2. Загальна формула амінокислот.
3. Амінокислотний склад деяких рослинних білків.
4. Основні функції білків.
5. Основні принципи класифікації амінокислот. Навести представників.
6. Основні принципи класифікації білків. Навести представників.
7. Властивості білків та амінокислот (колоїдні, амфотерні, електро-хімічні, фізико-хімічні тощо).
8. Що таке ізоелектрична точка білків?
9. Які рівні структурної організації характерні для білків?
10. Ковалентні та нековалентні зв'язки, які приймають участь у стабілізації структури білків.
11. Охарактеризуйте пептидний зв'язок.
12. Що таке пептиди?
13. Чим відрізняється процес висолювання від денатурації білків?
14. Сучасні біохімічні методи ідентифікації та визначення концентрації білків. Критерії гомогенності білка.
15. Визначення амінокислотної послідовності білка.
16. Якісні реакції на білки та амінокислоти.
17. Гідроліз білків. Протеолітичні ферменти.
18. Кінцеві продукти розпаду амінокислот.
19. Біосинтез білків. Ферменти, рибосоми, РНК, білкові фактори ініціації тощо, які приймають участь у біосинтезі білка. Послідовність етапів. Синтез поліпептидних ланцюгів та посттрансляційні модифікації білків.

**РОЗДІЛ 2. ФЕРМЕНТИ.**  
**Лабораторна робота №5.**  
**«Ферменти. Вивчення дії ферментів».**

**1. Дія амілази.**

*Принцип методу.* Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз  $\alpha$ -глюкозидного зв'язку  $\alpha$ -1-4-крохмалю та глікогену до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуки синього кольору, амілодекстрин – фіолетового, еритродекстрин – червоно-бурого, ахродекстрин – жовтого.

*Матеріали та реактиви.* 0,2% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, розчин слини (див. нижче).

*Обладнання.* Штатив із пробірками, колби, піпетки, крапельниці, лійки, фільтрувальний папір.

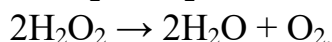
*Хід роботи.* Перед проведенням дослідів необхідно приготувати препарат ферменту амілази слини. Для цього здійснюються певні операції в наступній послідовності:

- а) ополіскують рот дистильованою водою для видалення залишків їжі;
- б) виміряють мірним циліндром 50 мл дистильованої води та набирають її в рот, а потім ополіскують протягом 3-5 хвилин думаючи при цьому про смачну їжу;
- в) переносять у стакан з рота рідину, яка містить амілазу;
- г) зібрану рідину фільтрують через паперовий фільтр у чистий хімічний стакан.

У дві пробірки наливають по 5 мл крохмального клейстеру, в пробірку 1 (дослід) додають 0,5 мл розчину слини, яка містить амілазу, в пробірку 2 (контроль) – 0,5 мл дистильованої води. Вміст обох пробірок ретельно перемішують і залишають відстоюватися за кімнатної температури. Через 15 хв в обидві пробірки додають по 5 краплин розчину йоду. В пробірці 1 з амілазою слини розчин через 1 год знебарвлюється, а в пробірці 2 без амілази колір розчину не змінюється, тобто залишається синьо-фіолетовим.

**2. Дія каталази.**

*Принцип методу.* Каталаза (клас оксидоредуктаз) прискорює реакцію розщеплення пероксиду водню на  $H_2O$  і  $O_2$ :



У цій реакції одна молекула пероксиду водню окислюється і є донором електронів, а друга відновлюється і є акцептором електронів.

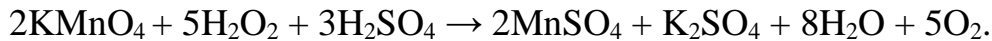
*Матеріали та реактиви.* Свіжа кров, свіжовиготовлений 3% розчин  $H_2O_2$ .

*Обладнання.* Штатив, пробірки, крапельниці, піпетки.

*Хід роботи.* В дві пробірки наливають по 5 мл розчину пероксиду водню. В пробірку 1 (дослід) додають краплину крові й перемішують. У пробірці 1 (з каталазою) внаслідок утворення молекулярного кисню з'являється велика кількість бульбашок. У пробірці 2 (без каталази) бульбашки газу не утворюються.

**3. Визначення активності каталази за методом Баха.**

*Принцип методу.* Кількість пероксиду водню, що залишився після дії на нього каталази, визначають шляхом титруванням розчином  $KMnO_4$  у кислому середовищі:



*Матеріали та реактиви.* Рослинний матеріал (картопля, морква, капуста цибуля), крейда (карбонат кальцію  $\text{CaCO}_3$ ), 10% розчин  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,1% розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$  на фосфатному буфері (35,0 мл 0,2 моль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  і 13,6 мл 0,2 моль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,0), розчин  $\text{KMnO}_4$  (0,002 моль/л).

*Обладнання.* Колби, піпетки, бюретки, порцелянові ступки, кварцевий пісок, лійки, фільтрувальний папір.

*Хід роботи.* Спочатку готують препарат каталази, для цього 10 г рослинного матеріалу (картопля, морква, капуста, цибуля тощо) ріжуть на маленькі шматочки та розтирають у порцеляновій ступці з невеликою кількістю кварцевого піску, додають порціями 5 раз по 10 мл дистильованої води і залишають отриману суміш для настоювання на 10 хвилин, після чого розчин фільтрують (для роботи використовують фільтрат). Ступку промивають, промивні води фільтруючи зливають у колбу. Вміст колби доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою. Каталаза інактивується у кислому середовищі, тому для нейтралізації кислот рослинного матеріалу перед початком гомогенізації у ступку на кінчику шпателя додають  $\text{CaCO}_3$  (крейда).

В дві колби наливають по 10 мл розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У колбу 1 (контроль) додають 5 мл розчину дистильованої води, а у колбу 2 (дослід) – 5 мл розчину  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Потім у кожну колбу додають по 20 мл препарату каталази. Вміст обох колб інкубують за кімнатної температури (20-25°C) упродовж 30 хв, перемішуючи час від часу. Після завершення інкубації вміст колб титрують розчином  $\text{KMnO}_4$  до утворення стійкого рожевого забарвлення від надлишку  $\text{KMnO}_4$ .

Активність каталази визначають за кількістю  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що розклався та розраховують за формулою:

$$A = (B - A) \cdot f \cdot Q,$$

де (B—A) – різниця результатів титрування зразків 1 (контроль) та 2 (дослід) 0,002 моль/л розчином  $\text{KMnO}_4$ , мл; f – коефіцієнт поправки на титр 0,002 моль/л розчину  $\text{KMnO}_4$ ; Q – кількість пероксиду водню (1,7 мг), яка відповідає 1 мл 0,002 моль/л розчину  $\text{KMnO}_4$ .

## **Лабораторна робота №6. «Властивості ферментів».**

### ***Термолабільність ферментів.***

#### ***1. Вплив температури на активність амілази слини.***

*Принцип методу.* Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури і визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

*Матеріали та реактиви.* 1% розчин крохмалю, розчин слини (див. Лаб. роб. № 5.1), 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, лід.

*Обладнання.* Штатив з пробірками, піпетки, колби, лійки, фільтрувальний папір, водяна баня, термостат, скляні палички, скляні або фарфорові пластинки.

*Хід роботи.* У чотири пронумеровані пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. Пробірку 1 обережно ставлять у кип'ячу водяну баню (100°C), пробірку 2 – у водяну баню за температури 40°C, пробірку 3 залишають за



кімнатної температури, а пробірку 4 ставлять у лід. Через 10-15 хвилин в усі пробірки, залишаючи їх з тих же умов, додають по 1 мл розчину слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю стежать за реакцією з йодом. Для цього на скляну або фарфорову пластинку наносять кілька краплин розчину йоду й змішують їх із краплинами суміші, яку беруть з кожної пробірки через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 хвилин.

Зміна забарвлення розчину крохмалю з йодом свідчить про гідроліз у кожній пробірці. У пробірці 1, що містилась на водяній бані при 100°C, суміш забарвлюється в синій колір. Фермент у ній інактивований, і гідроліз крохмалю не відбувається. В інших пробірках інтенсивність забарвлення залежить від ступеня гідролізу крохмалю: в пробірці 2 за оптимальної температури (40°C) – жовте, в пробірках 3 і 4 колір розчинів може бути червоним чи фіолетово-червоним.

### ***Вплив рН середовища на активність ферментів.***

#### ***1. Вплив рН на активність амілази.***

*Принцип методу.* Вплив рН на активність амілази визначається за зміною інтенсивності забарвлення розчину крохмалю з йодом. Оптимум рН для амілази слини становить 6,8, при кислому та лужному показниках рН середовища активність амілази знижується.

*Матеріали та реактиви.* 1% розчин крохмалю, розчин слини (див. Лаб. роб. № 5.1), дистильована вода, 0,1 М НСІ, 0,1М NaOH, розчин Люголя або 0,1% йоду.

*Обладнання.* Штатив з пробірками, піпетки, водяна баня або термостат, скляні палички, колби, лійки, фільтрувальний папір.

*Хід роботи.* У три пробірки за допомогою піпетки вносять по 5 мл 0,1% розчину крохмалю. Після цього у пробірку 1 додають 1 мл розчину 0,1М НСІ, у пробірку 2 - 1 мл розчину 0,1М NaOH, у пробірку 3 – 1 мл дистильованої води. Потім у кожну пробірку додають по 2 мл препарату амілази слини. Вміст пробірок добре перемішують і ставлять їх у термостат на 20-25 хвилин при температурі 36-38°C. Після завершення інкубації пробірки виймають з термостату та додають у кожну пробірку по 5 крапель розчину Люголя або 0,1% йоду. Спостерігають за змінами забарвлення вмісту пробірок.

#### ***3. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази.***

*Принцип методу.* Активатором амілази є NaCl, а інгібітором - CuSO<sub>4</sub>. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності NaCl і CuSO<sub>4</sub>.

*Матеріали та реактиви.* Розчин слини ((див. Лаб. роб. № 5.1), дистильована вода, 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, 1% розчин NaCl, 1% розчин CuSO<sub>4</sub>.

*Обладнання.* Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, колби, лійки, фільтрувальний папір, термостат.

*Хід роботи.* В пробірку 1 наливають 2,5 мл дистильованої води, в пробірку 2 – 2 мл дистильованої води та 0,5 мл розчину NaCl, у пробірку 3 – 2 мл дистильованої води та 0,5 мл розчину CuSO<sub>4</sub>. В усі пробірки додають по 2,5 мл розчину слини, ретельно перемішують і ставлять в термостат при 38°C. Через 5 хв в усі пробірки додають по 5 краплин розчину йоду. Рідина в пробірці 1 забарвлюється в фіолетовий або червоний колір, у пробірці 2 – у червоний або

жовтий, у пробірці 3 – у синій. Одержані результати свідчать, що активатором амілази є NaCl (пробірка 2), а інгібітором – CuSO<sub>4</sub> (пробірка 3).

### Запитання до Розділу 2 «Ферменти».

1. Що таке ферменти?
2. Застосування ферментів.
3. Будова ферментів.
4. Коферменти та їх біологічна роль.
5. Фізико-хімічні властивості ферментів.
6. Механізм дії ферментів.
7. Що таке ізоферменти?
8. Які вам відомо мультиферментні системи, де вони локалізовані у клітині та їх функції?
9. Специфічність дії ферментів.
10. Які фізико-хімічні чинники впливають на протікання ферментативної реакції?
11. Як впливають активатори та інгібітори на каталіз ферментативних реакцій?
12. Оборотно та необоротно інгібування ферментативних реакцій.
13. Що таке константа Міхаеліса?
14. Яку залежність пояснює рівняння Міхаеліса-Ментена?
15. Як можна визначити величини K<sub>m</sub> та V<sub>max</sub>?
16. Конкурентне та неконкурентне інгібування ферментативних реакцій ферментативних реакцій та методи його визначення.
17. Сучасна номенклатура та класифікація ферментів.
18. В яких одиницях виражається активність ферментів?

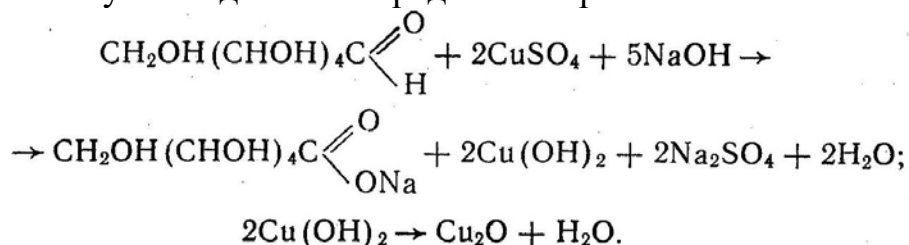
## РОЗДІЛ 3. ВУГЛЕВОДИ.

### Лабораторна робота № 7.

#### «Вуглеводи. Якісні реакції. Моносахариди».

##### 1. Реакція Троммера.

*Принцип реакції.* Розчини гексоз (наприклад, глюкози або фруктози) в лужному середовищі під час нагрівання відновлюють гідроксид міді (II) до оксиду міді (I), а самі окислюються до альдонових кислот. Цю реакцію за участю глюкози в загальному вигляді можна представити рівняннями:



*Матеріали та реактиви.* 5% розчин глюкози, 5% розчин гідроксиду натрію, 5% розчин сульфату міді.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, газовий пальник або спиртівка.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 3 мл розчину глюкози та 1 мл розчину гідроксиду натрію. До суміші обережно додають 4-5 крапель розчину сульфату

міді, при цьому утворюється осад гідроксиду міді (II), який внаслідок перемішування чи струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває блакитного забарвлення. Пробірку обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають за зміною забарвлення її вмісту (випадіння жовтого осаду гідроксиду міді (I) чи червоного осаду геміосиду міді).

## 2. Реакція Фелінга.

*Принцип реакції.* В реактиві Фелінга іони міді (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції гексоз (у всіх редуруючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий же, як і в реакції Троммера. Вуглеводи, які містять напівацетальний гідроксил або альдегідну групу, при кип'ятінні з реактивом Фелінга в лужному середовищі утворюють червоний осад  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Перевагою реактиву Фелінга є те, що мідь у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді окису міді (II).

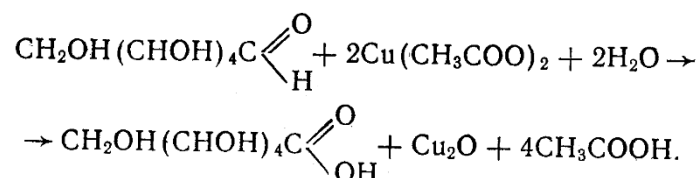
*Матеріали та реактиви.* 5% розчин глюкози, реактив Фелінга, який готують безпосередньо перед використанням, змішуючи однакові об'єми (1:1) розчинів (розчин 1: 200 г калій-натрію виннокислого  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}_4\text{H}_2\text{O}$  та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у дистильованій воді та доводять до об'єму 1 л; розчин 2: 40 г сульфату міді розчиняють у дистильованій воді та доводять до об'єму 1 л).

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, газовий пальник або спиртівка.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози та 2 мл реактиву Фелінга (1мл розчину 1 та 1 мл розчину 2). Вміст пробірки перемішують, обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

## 3. Реакція Барфедда.

*Принцип реакції.* Гексози в реакції з ацетатом міді спричинюють утворення геміоксиду міді. Сумарне рівняння реакції для глюкози має такий вигляд:



Ця реакція відбувається в середовищі зі значенням рН, близьким до нейтрального (7,0). За цих умов редукуючі дисахариди не окислюються, що дозволяє відрізнити їх від моносахаридів.

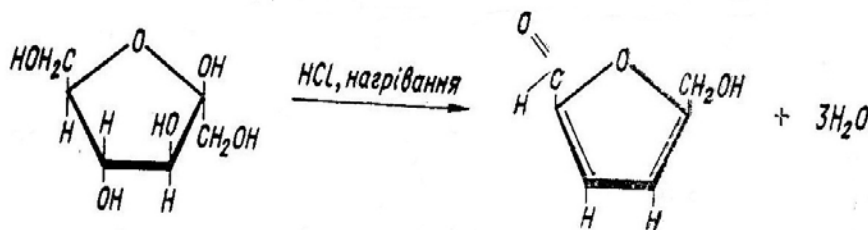
*Матеріали та реактиви.* 5% розчин глюкози, реактив Барфедда (13,3 г ацетату міді  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  розчиняють у 200 мл гарячої дистильованої води за температури  $70^\circ\text{C}$ . Суміш фільтрують і до фільтрату додають 1,9 мл льодяної оцтової кислоти).

*Обладнання.* Скляні палички, піпетки градуйовані, штатив із пробірками, газовий пальник або спиртівка.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози і 1 мл реактиву Барфедда. Вміст пробірки перемішують, обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

#### 4. Реакція Селіванова на кетози.

*Принцип реакції.* Кетози, на відмінну від альдоз, при нагріванні із концентрованою соляною кислотою зазнають дегідратації. Під час нагрівання фруктози чи інших кетоз із соляною кислотою утворюється оксиметилфурфурол. Рівняння реакції за участю фруктози має такий вигляд:



Оксиметилфурфурол із резорцином утворюють сполуку (продукт конденсації), забарвлену у вишнево-червоний колір.

*Матеріали та реактиви.* Кристалічний резорцин, 5% розчин фруктози, 5% розчин глюкози, 20% розчин соляної кислоти.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, баня водяна, термометр лабораторний, лопаточка чи шпатель.

*Хід роботи.* У пробірку 1 вносять 5 мл розчину фруктози, а в пробірку 2 – 5 мл розчину глюкози. Потім до кожної пробірки вносять по 1 мл розчину соляної кислоти та по декілька кристаликів резорцину, вміст пробірок ретельно перемішують та нагрівають на водяній бані (80°C) протягом 5-10 хв. Після чого у пробірці 1 спостерігають зміну забарвлення розчину у вишнево-червоний колір.

### Лабораторна робота № 8.

#### «Вуглеводи. Якісні реакції. Полісахариди».

##### 1. Гідроліз крохмалю.

*Принцип реакції.* Під час нагрівання розчину крохмалю з мінеральними кислотами відбувається гідроліз крохмалю з утворенням глюкози, яку можна виявити характерними реакціями на моносахариди, зокрема, реакцією Троммера.

*Матеріали та реактиви.* Концентрована соляна кислота, 1% розчин крохмалю, 15% розчин гідроксиду натрію, 1% розчин сульфату міді.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, годинник.

*Хід роботи.* В обидві пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. В пробірку 1 (дослід) вносять 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти, а в пробірку 2 (контроль) 2-3 краплі дистильованої води. Вміст обох пробірок кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв. Після чого у кожену із пробірок вносять по 2 мл розчину гідроксиду натрію та по 5 крапель розчину сульфату міді й нагрівають (проводять реакцію Троммера). В пробірці 1 (дослід), де проводився гідроліз крохмалю соляною кислотою під час нагрівання, утворюється червоний осад геміоксиду міді (позитивна реакція Троммера), а в пробірці 2 (контроль) осад не утворюється (негативна реакція Троммера).

##### 2. Гідроліз клітковини.

*Принцип реакції.* Гідроліз клітковини мінеральними кислотами відбувається значно повільніше, ніж крохмалю. Якщо ж клітковину заздалегідь обробити 80% розчином сірчаної кислоти, то процес гідролізу клітковини значно прискориться.

*Матеріали та реактиви.* Вата (джерело клітковини), 3% і 80% розчини сірчаної кислоти, насичений розчин NaOH, реактиви Фелінга та Барфедда.

*Обладнання.* Скляні палички, крапельниці, штатив із пробірками, водяна баня, лакмусовий папірець.

*Хід роботи.* I. Невелику кількість вати (100-200 мг) вносять у пробірку, заливають 0,5 мл 3% розчину сірчаної кислоти та кип'ячать на водяній бані протягом 10 хв. Після нейтралізації вміст пробірки ділять на 2 частини. II. В іншій пробірці таку ж кількість вати заздалегідь обробляють 0,5 мл 80% розчину сірчаної кислоти до повного розчинення, потім розбавляють водою до об'єму 1 мл і кип'ячать на водяній бані протягом 5 хв. Після нейтралізації вміст пробірки також поділяють на 2 частини.

З отриманими гідролізатами, які містять оброблену та необроблену вату, проводять реакцію Фелінга (додають по 1 мл розчину Фелінга, перемішують та нагрівають до кипіння) та реакцію Барфедда (додають по 1 мл реактиву Барфедда, перемішують та нагрівають до кипіння).

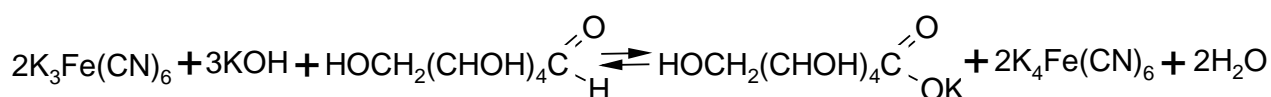
У пробірках, де знаходилася необроблена сірчаною кислотою вата, осад червоного кольору не утворюється (негативні реакції Фелінга та Барфедда). У пробірках, які містили заздалегідь оброблену вату, випадає червоний осад геміоксиду міді (позитивні реакції Фелінга та Барфедда), що свідчить про утворення глюкози.

## Лабораторна робота №9.

### «Вуглеводи. Визначення концентрації глюкози у рослинному матеріалі».

#### 1. Визначення концентрації глюкози за методом Хагендорна-Іссена.

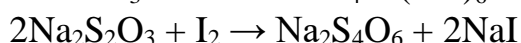
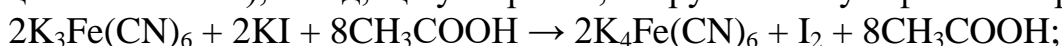
*Принцип методу.* Метод заснований на здатності глюкози в безбілковому фільтраті в лужному середовищі під час нагрівання відновлювати червону кров'яну сіль (гексаціано-(III)-ферат калію –  $K_3Fe(CN)_6$ ) в жовту кров'яну сіль (гексаціано-(II)-ферат калію –  $K_4Fe(CN)_6$ ). Рівняння реакції має такий вигляд:



Внаслідок зворотності цієї реакції гексаціано-(II)-ферат калію під дією сульфату цинку переводять у нерозчинну сіль – цинк-гексаціано-(II)-ферат калію:



Гексаціано-(III)-ферат калію беруть із надлишком і його невитрачений у реакції залишок визначають йодометрично, в кислому середовищі (наприклад, за наявності оцтової кислоти), а йод, що утворився, титрують тіосульфатом натрію:



Як індикатор молекулярного йоду використовують крохмаль.

Вміст глюкози розраховують по спеціальній таблиці (див. нище), згідно якої певному об'єму тіосульфата натрію, що було витрачено на титрування йоду, а, відповідно, надлишка гексаціаноферата калію (III), відповідає та кількість міліграм глюкози, яка прореагувала в реакції.

*Матеріали та реактиви.* Вата гігроскопічна для фільтрування розчинів, рослинний матеріал (фрукти), розчин гідроксиду калію (0,1 моль/л), 0,45% розчин сульфату цинку, лужний розчин гексаціано-(III)-ферату калію (1,65  $K_3Fe(CN)_6$  і 10,6 г безводного карбонату натрію розчиняють у дистильованій воді до об'єму 1 л), розчин сульфату цинку в розчині хлориду натрію (10 г сульфату цинку та 50 г хлориду натрію розчиняють у дистильованій воді й доводять об'єм розчину до 200 мл), розчин йодиду калію (5 г йодиду калію розчиняють у 25 мл дистильованої води), розчин тіосульфату натрію (0,05 моль/л), 3% розчин оцтової кислоти, 1% розчин крохмалю.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки із штативом, колби конічні (об'єм 50 мл), воронки скляні, піпетки, крапельниці, водяна баня, бюретки, чашка, годинник, терка, бинт.

*Хід роботи.* Спочатку необхідно приготувати рослинний матеріал. Для цього фрукти (помаранч або яблуко) натерти на мілкій терці, вичавити сік та профільтрувати.

В дві пробірки наливають по 1 мл розчину гідроксиду калію. В пробірку 1 (дослід) додати 0,1 мл рослинного матеріалу (фруктовий сік), а в пробірку 2 (контроль) – 0,1 мл дистильованої води. Потім вносять по 5 мл 0,45% розчину сульфату цинку, перемішують і ставлять на 2-3 хв на кип'ячу водяну баню. Після цього суміші фільтрують у конічні колби через ватний тампон, вкладений у воронку. Воронку та ватний тампон промивають гарячою дистильованою водою три рази по 2 мл, не доливаючи нової порції води до повного відтоку попередньої. До фільтрату в кожній колбі доливають 2 мл лужного розчину гексаціано-(III)-ферату калію та кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв.

У кожну колбу додають по 2,6 мл розчину сульфату цинку в розчині хлориду натрію, по 0,4 мл розчину йодиду калію, вміст колб перемішують та додають ще по 2 мл розчину оцтової кислоти та по 3 краплі розчину крохмалю. Суміш титрують 0,05 моль/л розчином тіосульфату натрію до зникнення забарвлення, яке утворилося під час додавання крохмалю.

За витраченими на титрування проби та контролю об'ємами тіосульфату натрію (мл) за таблицею (див. нижче) визначають концентрацію глюкози й розраховують різницю між масою глюкози в контрольній та досліджувальній пробах.

Масову концентрацію глюкози (мг/мл) розраховують за формулою:

$$C = \frac{(B - A)}{V},$$

де А і В – маси глюкози, визначені за табл. в пробі та контролі;  
V – об'єм рослинного матеріалу (0,1 мл), взятий для аналізу.

Таблиця. Залежність вмісту глюкози від об'єму титранта

Об'єм тіосульф. натрія, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,131	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,098	0,097	0,095	0,093	0,092
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,021	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002

Примітка: - об'єм тіосульфату натрію за вертикаллю – цілі та десяті частки мілілітра, за горизонталлю - соті частки.

### Запитання до розділу 3 «Вуглеводи».

1. Що таке вуглеводи? Їх емпірична формула. Функції вуглеводів.
2. Класифікація вуглеводів. Навести приклади.
3. Класифікація моносахаридів. Навести приклади.
4. Класифікація полісахаридів. Навести приклади.
5. Властивості моносахаридів, олігосахаридів та полісахаридів.
6. Що таке сахарні кислоти? Як вони утворюються?
7. Які Вам відомо типи циклічних, або ланцюгових форм вуглеводів?
8. Що таке епімери? Навести приклади.
9. Які кінцеві продукти розпаду вуглеводів утворюються анаеробним шляхом (гліколіз та спиртове бродіння) та скільки молекул АТФ при цьому утворюється?
10. Які кінцеві продукти розпаду вуглеводів утворюються аеробним шляхом та скільки молекул АТФ при цьому утворюється?
11. Шляхи синтезу вуглеводів у рослин.
12. Охарактеризуйте пентозофосфатний шлях утворення вуглеводів?
13. Що таке глюконеогенез? Які сполуки приймають участь у глюконеогенезі?
14. Охарактеризуйте цикл Кальвіна (де він відбувається, рівняння, функції).
15. Якісні реакції на вуглеводи.
16. Методи визначення кількості вуглеводів у рослинному матеріалі.

**РОЗДІЛ 4. ЛІПІДИ.**  
**Лабораторна робота №10.**  
**«Ліпіди. Фізико-хімічні властивості».**

**1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії.**

*Принцип методу.* Характерними властивостями жирів є їх добра розчинність у багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, диетиловий ефір тощо) і нерозчинність у воді. Під час змішування жирів із водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, в якому вони утворюються. Наявність у воді речовин — емульгаторів (мила, жовчні кислоти, карбонати тощо) збільшує стійкість емульсій. Утворення емульсій зумовлене тим, що в поверхневий водяний шар, який оточує жирові краплинки, спрямовуються поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонату, котрі обволікають краплинки жиру й перешкоджають їх злиттю.

*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), 96% етиловий спирт, бензол, хлороформ, 1% розчин карбонату натрія ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

*Обладнання.* Штатив з пробірками, крапельниці, піпетки.

*Хід роботи.* 1) В чотири пробірки наливають по 0,2—0,3 мл олії, потім у пробірку 1 додають 5 мл води, у пробірку 2 — 5 мл спирту, у пробірку 3 — 5 мл бензолу, у пробірку 4 — 5 мл хлороформу. Вміст усіх пробірок енергійно струшують. У пробірці 1 олія та вода швидко розділяються на два шари, у пробірці 2 утворюється каламутний розчин внаслідок недостатньої розчинності олії в спирті, в пробірках 3 і 4 розчини прозорі.

2) У дві пробірки вносять по декілька краплин олії. В пробірку 1 додають 2 мл води, в пробірку 2 — 2 мл розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Вміст пробірок інтенсивно струшують і спостерігають утворення, емульсії. Відзначають різницю стійкості емульсій у двох пробірках.

**2. Розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol.**

*Принцип методу.* Рідка фаза, що рухається по шару адсорбента за рахунок капілярних сил, здатна переміщувати компоненти суміші, яку розділяють, з різними швидкостями. Розташування точок сполук, які розділяють, відповідає коефіцієнту розділення  $R_f$ , що визначається співвідношенням відстаней, які проходять сполуки фронтом розчинника від їх старту (значення  $R_f$  завжди менше одиниці). Ліпіди на хроматограмі розташовуються за меншим значенням  $R_f$ : ефіри холестеролу, триацилгліцероли, жирні кислоти, холестерин, фосфоліпіди.

*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), суміш хлороформу та метанолу (1:1), розчинник – суміш n-гексану, ефіру та оцтової кислоти (80:20:1), кристалічний йод, пластинки Silufol, фільтри.

*Обладнання.* Піпетки, пробірки із штативом, лійки, стакани, водяна баня, газовий пальник, термостат.

*Хід роботи.* До 0,1 мл олії додають 10 мл суміші хлороформу та метанолу і інкубують протягом 5 хв при температурі 50°C. Після інкубації



суміш фільтрують, а потім випаровують. Сухий залишок розчиняють у 1 мл суміші хлороформу та метанолу.

Пластинку Silufol (15×15 см) промивають розчинником (n-гексан, ефір, оцтова кислота) та сушать у термостаті протягом 30 хв при температурі 100°C. На пластинку на відстані 2 см від нижнього краю наносять 10-20 мкл розчину ліпідів і здійснюють розділення висхідним способом у розчиннику на відстанні 10 см. Після чого пластинку висушують під витяжною шафою у парах йоду. Для цього стакан із декількома кристаликами йоду накривають склом та ставлять на водяну баню (50°C) на декілька хвилин. У цей же стакан уже за кімнатної температури на 3-5 хв поміщають пластинку. Ліпіди виявляються у вигляді жовтих або жовто-коричневих точок (плям) на білому чи слабо-жовтому фоні пластинки.

За допомогою лінійки та формули:  $R_f = a/b$  розраховують коефіцієнти  $R_f$  виявлених речовин. Коефіцієнт  $R_f$  дорівнює відношенню відстаней, яку пройшла речовина (від місця нанесення на бумазі до середини плями на хроматограмі) (a) до відстані, яку пройшов розчинник (b) (мм).

### **Лабораторна робота №11.**

#### **«Ліпіди. Фізико-хімічні властивості».**

#### **Визначення хімічних параметрів жирів.**

##### **1. Визначення числа омилення.**

*Принцип методу.* Числом омилення називають кількість гідроксиду калію (мг), яка потрібна для нейтралізації всіх жирних кислот (вільних і тих, що входять до складу триацилгліцеролів), що містяться в 1 г жиру.

*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), 0,1% розчин фенолфталеїну, розчин HCl (0,5 моль/л), спиртовий розчин КОН (0,5 моль/л). Для виготовлення цього реактиву 40 г КОН розчиняють у 30 мл води, залежно від концентрації спиртового розчину, беруть відповідну кількість водяного розчину КОН і розводять перегнаним за наявності NaOH (на 100 г спирту 5 г NaOH) спиртом. Спирт із таким вмістом NaOH кип'ятять із зворотним холодильником протягом години, потім переганяють. Розчин відстоюють добу, фільтрують і зберігають у добре закоркованій склянці з темним склом.

*Обладнання.* Колби об'ємом 50 мл, зворотний холодильник, водяна баня, піпетки, бюретки, крапельниці.

*Хід роботи.* В колбу 1 (дослід) додають 0,5 г жиру, в колбу 2 (контроль) — 0,5 мл води. В обидві колби доливають по 15 мл спиртового розчину КОН і кип'ятять із зворотним холодильником на водяній бані протягом 50 хв до повного омилення гліцеридів і нейтралізації вільних жирних кислот. Потім у обидві колби додають по десять краплин розчину фенолфталеїну й титрують теплим розчином HCl до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Кількість КОН, мг (число омилення — ЧО), витрачена на нейтралізацію всіх жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, визначають за формулою:

$$\text{ЧО} = (B - A) \cdot f \cdot Q/a,$$

де (B—A) - різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків розчином соляної кислоти (0,5 моль/л), мл; а — наважка досліджуваного жиру, г; f — коефіцієнт поправки на титр розчину HCl (0,5 моль/л); Q — кількість KOH (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл розчину KOH (0,5 моль/л).

## 2. Визначення кислотного числа жиру.

*Принцип методу.* Кислотністю жиру, або кислотним числом (КЧ), називають кількість KOH (мг), яка потрібна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру.

*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), спирт, нейтралізований за фенолфталеїном, розчин KOH (0,1 моль/л), 0,1% розчин фенолфталеїну.

*Обладнання.* Колби об'ємом 50 мл, піпетки, бюретки.

*Хід роботи.* У колбу внести 1 г жиру, додати 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, добре перемішати для максимального розчинення вільних жирних кислот. Отриману емульсію титрують розчином KOH до появи рожевого забарвлення (забарвлення не повинно зникати протягом 0,5—1 хв).

Кількість KOH (мг), яку було витрачено на титрування вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, визначають за формулою:

$$KЧ = A \cdot f \cdot Q / a,$$

де А — об'єм розчину KOH (0,1 моль/л), витрачений на титрування досліджуваної проби, мл; а — наважка жиру, г; f — коефіцієнт поправки на титр розчину KOH (0,1 моль/л); Q — кількість KOH (5,61 мг), еквівалентна 1 мл розчину KOH (0,1 моль/л).

## 3. Визначення ефірного числа жиру.

*Принцип методу.* Ефірним числом (ЕЧ) називають кількість KOH (мг), яка потрібна для нейтралізації всіх утворених під час омилення триацилгліцеролів жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Це число визначають за різницею між ЧО жиру та його КЧ.

Якщо відоме значення ЕЧ жиру, можна, використовуючи розрахунковий метод, обчислити вміст гліцеролу. Для вивільнення однієї молекули гліцеролу необхідно витратити три молекули KOH.

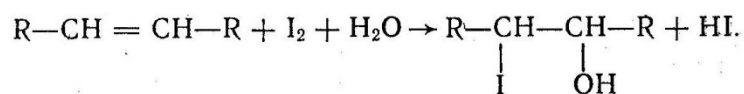
Кількість гліцеролу в жирі, %, розраховують за формулою:

$$C = 96,02 \cdot EЧ \cdot 100 / 56,11 \cdot 3 \cdot 1000,$$

де 96,02 — молекулярна маса гліцеролу; ЕЧ—ефірне число жиру; 56,11 — молекулярна маса KOH.

## 4. Визначення йодного числа жиру.

*Принцип методу.* Йодним числом (ЙЧ) називають кількість йоду (г), яка може прореагувати з 100 г жиру. Це число відповідає кількості ненасичених жирних кислот у жирі. Визначення ЙЧ ґрунтується на реакції приєднання йоду за місцем подвійного зв'язку, яка відбувається за рівнянням:



*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), спиртовий розчин йоду (0,1 моль/л), 1% розчин крохмалю, розчин Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,05 моль/л).

*Обладнання.* Дві конічні колби об'ємом 50 мл, піпетки, бюретки.

*Хід роботи.* В колбу 1 (дослід) вносять наважку жиру 0,1—0,2 г, у колбу 2 (контроль) - 0,1—0,2 мл води, в обидві колби додають по 10 мл спиртового розчину йоду, перемішують і залишають на 15 хв. Через 15 хв вміст колб титрують розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  до появи жовтуватого забарвлення. Потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, суміш титрують до зникнення синього забарвлення.

Йодне число визначають за формулою:

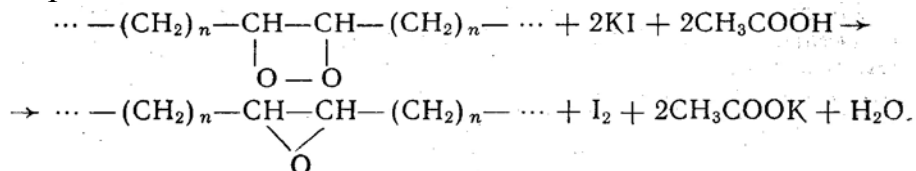
$$\mathbf{ЙЧ} = (B - A) \cdot f \cdot Q \cdot 100 / a \cdot 1000,$$

де  $(B - A)$  – різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків розчином гіпосульфиту натрія (0,05 моль/л), мл;  $a$  — наважка досліджуваного жиру, г;  $f$  — коефіцієнт поправки на титр розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,05 моль/л);  $Q$  - кількість  $\text{I}_2$  (12,69 мг), еквівалентна 1 мл розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,05 моль/л).

### 5. Визначення пероксидного числа в згірклому жирі.

*Принцип методу.* Пероксидним числом називають кількість (мл), розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , витрачену на титрування вільного йоду, що виділився під час окислення КІ пероксидним утворенням 1 г жиру.

Метод ґрунтується на здатності пероксидного угруповання жиру реагувати з КІ в кислому середовищі:



Реакція дуже чутлива, тому слід робити контрольні проби, щоб уникнути помилки, спричиненої можливим утворенням йоду під час окислення КІ киснем повітря.

*Матеріали та реактиви.* Олія (рослинна), насичений розчин КІ, хлороформ, розчин  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,005 моль/л), 1% розчин крохмалю, льодяна оцтова кислота.

*Обладнання.* Дві конічні колби об'ємом 50 мл, піпетки, бюретки, крапельниці.

*Хід роботи.* В колбу 1 (дослід) вносять наважку жиру (1 г), у колбу 2 (контроль) - 1 мл води, у кожену колбу додають по 5 мл льодяної оцтової кислоти, по 6 мл хлороформу та по 1 мл свіжовиготовленого насиченого розчину КІ. Вміст колб струшують протягом 5 хв, після чого титрують розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  у присутності 10 краплин розчину крохмалю як індикатора.

Пероксидне число, тобто кількість 0,005 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (мл), яка витрачена на титрування 1 г жиру, дорівнює:

$$\mathbf{C} = (A - B) \cdot f,$$

де  $(A - B)$  — різниця результатів титрування досліджуваного та контрольного зразків розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,005 моль/л);  $f$  — коефіцієнт поправки на титр розчину  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,005 моль/л).

### Запитання до розділу 4 «Ліпіди».

1. Що таке ліпіди? Охарактеризуйте їх властивості.
2. Функції ліпідів.
3. Перерахуйте хімічні параметри жирів та методи їх визначення.

4. Структурні компоненти ліпідів (гідрофобні та гідрофільні).
5. Класифікація ліпідів. Навести приклади.
6. Чим відрізняються насичені жирні кислоти від ненасичених? Навести приклади.
7. Охарактеризуйте ферменти, які каталізують реакції гідролізу жирів (ліпази). Навести приклади.
8.  $\beta$ -окиснення жирних кислот. Де і за яких умов відбувається цей процес, що є кінцевими продуктами?
9. Основні етапи  $\beta$ -окиснення жирних кислот.
10. Як відрізняється  $\beta$ -окиснення насичених і ненасичених жирних кислот?
11. Біосинтез жирних кислот. Де і за яких умов відбувається цей процес, яка сполука є попередником біосинтезу жирних кислот?
12. Охарактеризуйте ліпідні полімери рослин, наприклад, кутин, суберин та воски.
13. Метаболізм триацилгліцеролів, фосфо- та сфінголіпідів.

## РОЗДІЛ 5. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ.

### Лабораторна робота № 12.

**«Нуклеїнові кислоти. Виділення та якісні реакції на їх складові».**

#### **1. Виділення нуклеопротеїдів.**

*Принцип методу.* Дезоксирибонуклеопротеїди добре розчиняються в лугах і сольових розчинах та осаджуються після нейтралізації розчинів або розведення розчинів солей. Рибонуклеопротеїди також добре розчиняються в лужних розчинах та осаджуються в ізоелектричній точці неорганічними кислотами. Кінцевими продуктами при гідролізі нуклеїнових кислот є: вуглеводи (пентози - дезоксирибоза та рибоза), азотисті основи (пуринові та піримідинові) та залишок фосфорної кислоти.

*Матеріали та реактиви.* Сухі пекарські дріжджі, 0,4% і 0,02 моль/л розчин їдкового натрію, 5% розчин оцтової кислоти, 10% розчин  $H_2SO_4$ .

*Обладнання.* Порцелянова ступка з товчачиком, центрифужні та хімічні пробірки, штатив для пробірок, центрифуга, колба із круглим дном, пробка із скляною трубкою, лійки, фільтрувальний папір, водяна баня.

*Хід роботи.* Для приготування гідролізату дріжджів №1 - 10 г сухих дріжджів старанно розтирають у порцеляновій ступці протягом 15 хв із 50 мл 0,4% розчину NaOH, який додають невеликими порціями. Отриману суміш центрифугують протягом 10 хв при 2000g. **Надосад** відбирають та помішуючи доливають до нього 15-20 мл розчину оцтової кислоти. Отриману суміш центрифугують за тих же умов. Осад розчиняють у 15-20 мл розчину NaOH (0,02 моль/л).

Отриманий гідролізат нуклеопротеїдів використовують у якісних реакціях на вуглеводи, зокрема, пентози.

Для приготування гідролізату нуклеопротеїдів дріжджів №2 - у колбу із круглим дном вносять 1 г свіжих пекарських дріжджів, 20 мл розчину сірчаної кислоти та 20 мл дистильованої води, колбу закривають пробкою, в яку

вставляють скляну трубку довжиною 20-30 см (як зворотній холодильник) та кип'ятять на водяній бані протягом 35 хвилин. Після чого рідину у колбі охолоджують, об'єм доводять дистильованою водою до початкового та фільтрують.

Отриманий гідролізат використовують для якісних реакцій на білки, пуринові основи та залишок фосфорної кислоти.

## **2. Виявлення білків у гідролізаті нуклеопротеїдів дріжджів (біуретова реакція).**

*Принцип реакції.* Білки в лужному середовищі із сульфатом міді утворюють комплексні сполуки, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка.

*Матеріали та реактиви.* Гідролізат нуклеопротеїдів дріжджів №2, 10% розчин NaOH, 1% розчин CuSO<sub>4</sub>.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки із штативом, піпетки, крапельниця, лакмусовий папірець.

*Хід роботи:* У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 0,5 мл гідролізату №2, нейтралізують розчином їдкою натрію (за лакмусом), потім додають 0,5 мл розчину NaOH і 2-3 краплі розчину CuSO<sub>4</sub> та обережно перемішують. Виникнення синьо-фіолетового забарвлення розчину у пробірці свідчить про наявність білків у гідролізаті нуклеопротеїдів.

## **3. Виявлення вуглеводів.**

*А. Якісна реакція з орцином (реакція Біаля) на пентози.*

*Принцип методу.* Рибози у присутності концентрованої соляної кислоти під час нагрівання перетворюються на фурфурол, який із орцином за наявності хлориду заліза (III) утворює забарвлену в синьо-зелений колір, а із флорглюцином – в вишнево-червоний колір.

*Матеріали та реактиви.* Гідролізат нуклеопротеїдів дріжджів №1, концентрована соляна кислота, кристалічний орцин, 0,1% розчин флорглюцину.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки із штативом, водяна баня.

*Хід роботи.* В дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату дріжджів №1. У пробірку 1 додають 1 мл HCl та декілька кристаликів орцину, а у пробірку 2 – 1,5 мл розчину флорглюцину. Вміст обох пробірок перемішують. Пробірку 1 кип'ятять на водяній бані протягом 6 хв, а пробірку 2 нагрівають до кипіння. Вміст пробірок охолоджують та спостерігають у пробірці 1 (із орцином) утворення синьо-зеленого забарвлення, а у пробірці 2 (із флорглюцином) – вишнево-червоного.

*В. Якісна реакція із дифеніламіном на дезоксипентози.*

*Принцип методу.* При нагріванні дезоксипентоз у кислому середовищі утворюються сполуки (фурфуролів спирт, оксилевулиновий альдегід тощо), які конденсуються із дифеніламіном та утворюють сполуки синього кольору.

*Матеріали та реактиви.* Гідролізат нуклеопротеїдів дріжджів №1, розчин дифеніламіну (1 г дифеніламіну розчиняють у суміші концентрованої сірчаної кислоти (2, 75 мг) і льодяної оцтової кислоти (100 мл)).

*Обладнання.* Пробірки із штативом, піпетки.

*Хід роботи.* У пробірку до 2 мл гідролізату дріжджів №1 додають 2 мл дифеніламінового реактиву. Вміст пробірок перемішують та кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв. Якщо у гідролізаті нуклеопротейдів міститься дезоксирибоза то вміст пробірки забарвлюється у синій колір, а якщо рибоза – то у зелений колір.

#### **4. Виявлення пуринових основ.**

*Принцип методу.* Пуринові основи із солями срібла утворюють комплексні сполуки.

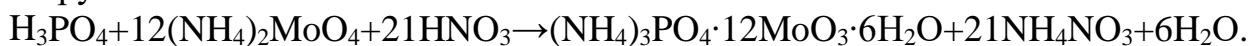
*Матеріали та реактиви.* Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №2, концентрований розчин амоніаку, 1% розчин AgNO<sub>3</sub>.

*Обладнання.* Пробірки із штативом, піпетки, лакмусовий папірець.

*Хід роботи.* До 1 мл гідролізату дріжджів №2 додають концентрований розчин амоніаку до утворення рН лужного середовища (за лакмусовим папірцем) і 0,5 мл розчину AgNO<sub>3</sub>. Через 3-5 хв утворюється пухкий осад срібних солей пуринових основ.

#### **5. Виявлення фосфорної кислоти (молібденова реакція).**

*Принцип реакції.* Фосфорна кислота взаємодіє із молібденовим реактивом, при цьому утворюється сполука фосфорна сіль молібдату амонію жовтого кольору:



*Матеріали та реактиви.* Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №2, молібденовий реактив (7,5 г молібдату амонію розчиняють у 100 мл води і додають 100 мл 32% розчину азотної кислоти з відносною щільністю 1,2, повне розчинення молібдату амонію відбудеться після додавання азотної кислоти).

*Обладнання.* Пробірки із штативом, піпетки, водяна баня.

*Хід роботи.* До 1 мл гідролізату дріжджів додають 1мл молібденового реактиву та кип'ятять. За присутності фосфорної кислоти у гідролізаті нуклеопротейдів дріжджів рідина у пробірці забарвлюється в лимонно-жовтий колір, а при охолодженні випадає кристалічний осад жовтого кольору.

### **Запитання до розділу 5 «Нуклеїнові кислоти».**

1. Що таке нуклеїнові кислоти? Навести приклади.
2. Функції нуклеїнових кислот.
3. Чим відрізняється нуклеотид від нуклеозиду?
4. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
5. Характерні особливості структурного складу та будови ДНК.
6. Характерні особливості структурного складу та будови РНК.
7. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
8. Рівні структурної організації ДНК.
9. Правило компліментарності (правило Чаргаффа) азотистих основ у складі нуклеїнових кислот.
10. Де міститься генетична інформація у клітині?
11. Будова (структурно-функціональний стан) хромосоми.
12. Поняття геному.

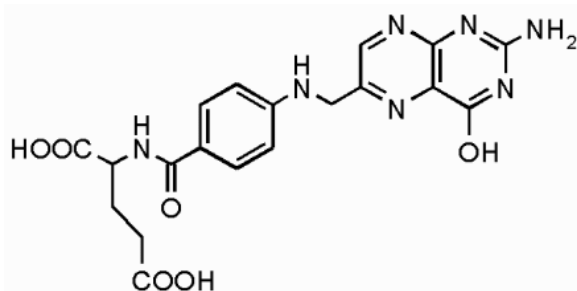
13. Структура і будова РНК. Типи РНК: інформаційна, транспортна, рибосомальна.
14. Ферменти, які приймають участь у гідролізі нуклеїнових кислот.
15. Кінцеві продукти розпаду пуринових і піримідинових основ.
16. Що таке реплікація ДНК? Назвати ферменти, які приймають участь та послідовність етапів цього процесу.
17. Що таке транскрипція РНК? Назвати ферменти, які приймають участь та послідовність етапів цього процесу.

## РОЗДІЛ 6. «ВІТАМІНИ».

### Лабораторна робота №13.

#### «Водорозчинні вітаміни. Виділення фолієвої кислоти (вітамін В<sub>9</sub>) з дріжджів».

**Фолієва кислота** (вітамін В<sub>9</sub>, В10, В11, птероїлглутамінова кислота) вперше була виділена із листя шпинату. Молекула фолієвої кислоти складається із глутамінової кислоти, *p*-аміно бензойної кислоти та гетероциклічної сполуки – заміщеного птеридину.



*Структурна формула фолієвої кислоти (вітамін В<sub>9</sub>).*

Фолієва кислота погано розчиняється в холодній воді, етанолі, краще – в гарячій воді. Фолієва кислота не має коферментних властивостей, однак при відновленні перетворюється на тетрагідрофолієву кислоту. Тетрагідрофолієва кислота – переносник одно вуглецевих груп: метильної, метиленової, формільної, формінної. Тетрагідрофолієва кислота бере участь у біосинтезі азотистих основ нуклеїнових кислот, креатину, метіоніну, в утворенні серину з гліцину тощо. Фолієва кислота біохімічно пов'язано із обміном і функціями вітаміну В12.

Відсутність у їжі фолієвої кислоти викликає анемію та лейкопенію (порушення синтезу еритроцитів і лейкоцитів) та інші зміни обміну речовин. Добова потреба людини у фолієвій кислоті становить 0,2-0,5 мг. У значних кількостях фолієва кислота міститься в листі рослин, овочах, фруктах, особливо великий вміст у суниці.

**Принцип методу.** Фолієва кислота добре розчиняється в лужних розчинах, зокрема NaOH (0,1 моль/л). Екстрагована фолієва кислота із дріжджів за ультрафіолетового опромінення здатна викликати інтенсивну блакитну флюоресценцію.

**Матеріали та реактиви.** Пекарські дріжджі, кварцевий пісок, концентрована оцтова кислота, 0,4% розчин перманганату калію, 3% розчин пероксиду водню, розчини гідроксиду натрію (0,1 моль/л та 0,005 моль/л), лакмусовий папірець.

*Обладнання.* Штатив для пробірок, центрифужні пробірки, центрифуга, флюорисцента лампа, порцелянова ступка, піпетки.

*Хід роботи.* В порцеляновій ступці розтирають 10 г дріжджів із 10 мл розчину NaOH (0,1 моль/л) та 2 г кварцевого піску протягом 5 хвилин. Отриману рідину центрифугують при 800g протягом 15 хвилин. Надосад обережно переносять в інші пробірку та використовують у подальших реакціях.

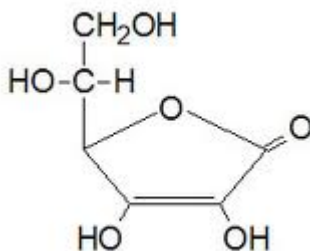
До 10 крапель надосадової рідини додають 20 крапель концентрованої оцтової кислоти (рН 3,0) та 10 крапель розчину  $\text{KMnO}_4$  так, щоб рожеве забарвлення не зникло протягом 10 хвилин. Якщо рожеве забарвлення розчину є нестійким, то необхідно додати ще декілька крапель  $\text{KMnO}_4$ . Через 10 хвилин надлишок перманганату калію видаляють шляхом додавання 4-5 крапель розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  та додають 4-5 мл розчину гідроксиду натрію (0,005 моль/л) до рН 4,0 — 4,5, використовуючи лакмусовий папірець.

Фолієва кислота в лужному розчині за умови опромінення в ультрафіолетовому діапазоні світла здатна до флюоресценції (виникає блакитне світіння).

### Лабораторна робота №14.

#### «Водорозчинні вітаміни. Кількісне визначення вітаміну С (аскорбінової кислоти) у рослинному матеріалі».

*Вітамін С або аскорбінова кислота* вперше було виділено із лимонного соку (1933р). Завдяки антискорбутним властивостям (попередження розвитку цинги) цей вітамін назвали аскорбіновою кислотою.



*Структурна формула аскорбінової кислоти (вітаміну С).*

Молекула вітаміну С за будовою подібна до гексоз і є лактоном дієнол гулонової кислоти. Ця кислота може віддавати два атоми водню, перетворюючись на дегідроаскорбінову кислоту. Аскорбінова кислота добре розчиняється у воді та метанолі, гірше – в етанолі. Вона добре окислюється киснем повітря, особливо у присутності іонів важких металів (міді, заліза) з підвищенням рН і температури середовища. Без кисню аскорбінова кислота може витримати нагрівання до 100 °С.

Біологічна роль аскорбінової кислоти – приймає участь в окисно-відновних процесах, завдяки її властивості віддавати та приєднувати атоми водню. Основна роль цього вітаміну – це підтримання сульфгідрильних груп ферментативних білків у відновному стані, що забезпечує активність ряду ферментів. Коферментну роль аскорбінової кислоти виявлено у реакціях гідроксилування біомолекул.



Більшість тварин та усі рослини можуть синтезувати цей вітамін з глюкози. У організмі людей, мавп, мурчаків і деяких інших хребетних тварин цей вітамін не синтезується. Мікроорганізми не мають і не потребують цього вітаміну.

Середньодобова потреба дорослих у вітаміні С становить 50-70 мг. Найкращим джерелом вітаміну С є шипшина, чорна смородина, томати, цитрусові, білокачанна капуста, зелені овочі, горіх грецький, перець червоний.

*Принцип методу.* Визначення аскорбінової кислоти ґрунтується на її окисно-відновних властивостях, а саме при окисленні аскорбінова кислота відновлює йодат калію до вільного йоду, кількість якого розраховують за реакцією з крохмалем.

*Матеріали та реактиви.* Фрукти (яблука, мандарини, апельсини), овочі (морква, цибуля, редис), 2% розчин НСІ, 1% розчин КІ, 0,5% розчин крохмалю, 0,1 н розчин КІО<sub>3</sub> (0,3568 г КІО<sub>3</sub> розчиняють у 1 л води, 100 мл цього розчину переносять у колбу на 1 л і доводять водою до мітки), їдкий натрій, фенолфталеїн.

*Обладнання.* Порцелянова ступка, колби мірні об'ємом на 100 мл, фільтрувальний папір, мірні циліндри, піпетки, мікробюретки.

*Хід роботи.* Наважку 2-10 г (залежно від вмісту вітаміну С) рослинного матеріалу розтирають з невеликою кількістю дистильованої води у порцеляновій ступці. Отриману суміш переносять в мірну колбу об'ємом на 100 мл, вміст колби доливають дистильованою водою до мітки і фільтрують через сухий фільтр в сухий стаканчик або конічну колбу об'ємом на 100 мл. Для титрування використовують 10 мл фільтрату до якого приливають 1 мл 2% розчину НСІ, 0,5 мл 1% розчину КІ, 2 мл 0,5% розчину крохмалю і 6-7 мл дистильованої води. Вміст колби 1 титрують 0,01н розчином йодату калію з мікробюретки до виникнення стійкого синього забарвлення. Паралельно необхідно зробити контрольну пробу. Для цього у колбу 2 замість фільтрату вносять 10 мл дистильованої води, додають всі реактиви згідно протоколу та вміст колби 2 також титрують до виникнення стійкого синього забарвлення.

Кількість вітаміну С (мг %) визначають за формулою:

$$C = \frac{(a - b) \cdot T \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 0,8806}{H \cdot V_2},$$

де С – кількість вітаміну С; (а – b) - кількість 0,01 н йодату калію, витраченого на титрування дослідного та контрольного зразків, мл; Т – поправка до титру 0,01 н йодату калію; V<sub>1</sub> – загальний об'єм витяжки, мл; V<sub>2</sub> – об'єм витяжки взятої для титрування (10 мл); Н – наважка рослинного матеріалу, г.

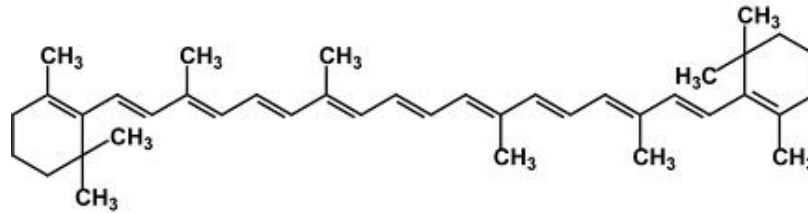
*Примітка.* 1 мл 0,01н розчину йодату калію відповідає 0,8806 мг аскорбінової кислоти. Якщо вміст аскорбінової кислоти низький, беруть 0,001 н йодат калію (1 мл відповідає 0,088 мг вітаміну С).

Перевага цього методу в порівнянні з методом Муррі, полягає в тому, що визначення вітаміну С можна проводити в забарвлених екстрактах рослин.

## Лабораторна робота №15.

### «Жиророзчинні вітаміни. Кількісне визначення вітаміну А у рослинному матеріалі».

**Вітамін А** (каротиноїди, антиксерофтальмічний фактор), під цією назвою об'єднується група похідних рослинних пігментів – каротинів. Біологічне значення для людини мають  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -каротини.



Структурна формула  $\beta$ -каротину

В організмі людини та тварин  $\beta$ -каротин може ферментативно перетворюватися на вітамін А1, тому каротини називають провітамінами – попередниками вітаміну А. Вітамін А термостабільний, може витримувати нагрівання до 100-120  $^{\circ}\text{C}$  у безкисневому середовищі, стійкий до дії лугів, легко окиснюється киснем повітря, однак у кислому середовищі та під дією сонячного світла швидко руйнується.

Вітамін А бере участь в окисно-відновних процесах, тканинному диханні, процесах біосинтезу білків, нуклеїнових кислот, кортикостероїдів та входить до складу зорового пігменту людини - родопсину. Біологічна роль вітаміну А полягає у зоровій функції у формах ретинолу, ретиналю, ретинолової кислоти.

Середньодобова потреба дорослої людини у вітаміні А становить 0,75-1,5 мг. У разі перевищення рекомендованих доз вітаміну у 20-30 разів спостерігаються токсичні ефекти та загибель людей. Особливо багато вітаміну А міститься в печінці риб і ссавців, які живуть у водах Арктики.

**Принцип методу.** Вітамін А екстрагують із рослинного матеріалу органічними розчинниками та визначають його кількість спектрофотометричним методом за інтенсивністю поглинання світла при довжині 700 нм, оскільки інтенсивність забарвлення екстракту пропорційна вмісту у ньому вітаміну.

**Матеріали та реактиви.** Морква, кварцевий пісок, ацетон, бензин, безводний сульфат натрію, порошок каротину.

**Обладнання.** Порцелянова ступка, скальпель, фільтрувальний папір, лійка, мірна колба об'ємом на 100 мл, піпетки, розподільна лійка, пробірки, спектрофотометр, кювета.

**Хід роботи.** За допомогою скальпеля дрібно нарізають 1 г сирової моркви та розтирають у порцеляновій ступці із кварцевим піском, додавши 5 мл ацетону. Отриману суміш фільтрують через складчастий паперовий фільтр у мірну колбу об'ємом на 100 мл. Осад промивають новими порціями ацетону до тих пір, поки останній не перестане забарвлюватися у жовтий колір.

До ацетонової витяжки каротину за допомогою піпетки додають 10 мл бензину та 3 мл води. Колбу закривають і струшують протягом 2-3 хвилин. Вміст колби переносять у розподільну лійку. Після розшарування рідин у лійці, нижній шар, що містить ацетон і воду, обережно зливають. Верхній бензиновий шар, який

містить екстракт каротину, переносять у пробірку для подальших досліджень. Для зневоднення бензинової витяжки в пробірку додають 1 г безводного сульфату натрію.

Вимірюють оптичну густину поглинання проб на спектрофотометрі чи фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі (625-740 нм). Як контрольну пробу використовують квету з бензином. Стандартний розчин каротину: 0,203 мг каротину розводять в 100 мл бензину.

Вміст каротину розраховують за формулою:

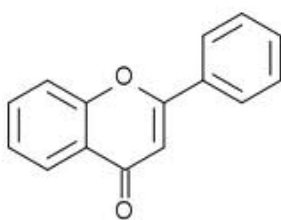
$$A = \frac{E_2 \cdot V \cdot 0,203}{E_1 \cdot m \cdot 100},$$

де  $E_2$  - екстинція каротинової витяжки дослідної проби,  $E_1$  - екстинція каротинової витяжки стандартного розчину,  $V$  - об'єм витяжки, мл (3 мл);  $m$  - наважка моркви, г (1 г).

### Лабораторна робота №16.

#### «Вітаміноподібні речовини. Кількісне визначення вітаміну Р в чаї (за методом Левенталя)».

Біофлавоноїди – це сполуки рослинного походження. Більшість біофлавоноїдів добре розчинні у воді, нерозчинні в етиловому ефірі, хлороформі і бензолі. На сьогодні відомо близько 150 біофлавоноїдів, які характеризуються Р-біологічною активністю – це катехіни, халкони, флавіни, флавори тощо. Біофлавоноїди характеризуються наявністю у хімічній формулі ароматичних бензольних кілець і ядра, які з'єднані між собою трьох вуглецевим фрагментом. Флавоноїди поділяються на декілька груп в залежності від хімічної структури. Біологічна роль біофлавоноїдів: антиоксидантні та протизапальні властивості, нормалізують ліпідний, вуглеводний та білковий обміни у клітині, стабілізують основну речовину сполучної тканини, інгібуючи гіалуронідазу, при недостатній кількості біофлавоноїдів підвищується проникність кровоносних судин, що супроводжується кровотечами.



Структурна формула вітаміну Р.

До речовин, що мають Р-вітамінну активність, належать широко поширені в рослинному світі глікозиди — рутин і геспередин, а також танін, що міститься в чайному листі і винограді.

*Принцип методу.* Рутин здатен окислюватись перманганатом калію, як індикатор використовують індигокармін, який взаємодіє із  $KMnO_4$  після того, як окислиться весь рутин. Встановлено, що 1 мл розчину перманганату калію (0,02 моль/л) окислює 6,4 мкг рутину.

*Матеріали та реактиви.* Чай, 0,01 моль/л розчин перманганату калію, індикатор індигокармін (1г індигокарміну розтирають і додають 50 мл концентрованої сірчаної кислоти, об'єм до 1 л доводять дистильованою водою, фільтрують і зберігають в темному скляному посуді).

*Обладнання* Водяна баня, фільтрувальний папір, колби, мікробюретки.

*Хід роботи.* Наважку чаю 100 мг заливають 50 мл гарячої дистильованої води і доводять до кипіння на водяній бані. Отриманий екстракт охолоджують і фільтрують. У колбу 1 (дослід) наливають 10 мл фільтрату чаю, а у колбу 2 (контроль) 10 мл дистильованої води. В обидві колби додають по 10 мл дистильованої води і 5 крапель індигокарміну. У колбі 1 утворюється сине забарвлення. Вміст обох колб ретельно перемішують та титрують розчином  $\text{KMnO}_4$  до появи стійкого жовтого забарвлення. Різниця між дослідним і контрольним титруванням (без екстракту) являє собою кількість мл 0,01 моль/л  $\text{KMnO}_4$ , що витрачається на окислення рутину.

Для визначення вмісту (мкг) вітаміну Р використовують формулу:

$$X = A \cdot V_1 \cdot k / V_2 \cdot P,$$

де k - стандартний коефіцієнт титрування (3,2), A - різниця кількості 0,01 моль/л розчину  $\text{KMnO}_4$ , що пішло на титрування дослідної і контрольної проб,  $V_1$ - об'єм (мл), в якому розчинена дослідна наважка чаю,  $V_2$ - об'єм рослинного матеріалу (мл), взятий для аналізу, P- кількість чаю, г, взятого для аналізу.

### **Запитання до розділу 6 «Вітаміни».**

1. Що таке вітаміни? Що є їх джерелом?
2. Що відбувається в організмі людини при нестачі та надлишку вітамінів?
3. Що таке вітаміноподібні речовини? Навести приклади.
4. Біологічні функції вітамінів.
5. Класифікація вітамінів.
6. Характеристика водорозчинних вітамінів. Навести приклади.
7. Характеристика жиророзчинних вітамінів. Навести приклади.
8. Біохімічна роль фолієвої та аскорбінової кислот.
9. Чому рослини із високим вмістом вітаміну С не слід піддавати дії високих температур?
10. Чому рослини із високим вмістом піридоксину (вітамін  $\text{B}_6$ ) слід зберігати у темному місці?
11. Які вітаміни є стійкими до дії високих температур, а які – ні? Як це впливає на їх біологічні властивості?
12. Який вітамін входить до складу коферментів – ФМН та ФАД?
13. Який вітамін входить до складу коферментів – НАД та НАДФ?
14. Який вітамін входить до складу коферменту-А?

**ДОДАТОК** - Завдання щодо написання структурних формул сполук основних біоорганічних класів.

### ***Розділ 1. Білки та амінокислоти.***

Написати:

- 1) загальну формулу амінокислот.
- 2) структурну формулу дипептида (на ваш вибір), позначте пептидний зв'язок.
- 3) структурні формули найбільш поширених 20 амінокислот та підпишіть кожен згідно їх класифікації:
  - а) замінна або незамінна,
  - б) за кількістю амінних та карбоксильних груп,
  - в) в залежності від полярності радикальних груп (*неполярні (гідрофобні); полярні, але незаряджені; позитивно заряджені; негативно заряджені*),
  - г) за природою походженням - ациклічні (аліфатичні) або циклічні (гомоциклічні або гетероциклічні).
- 4) структурні формули складних білків: хромопротеїдів – хлорофілів а і в, гемоціаніну.

### ***Розділ 2. Ферменти.***

Написати структурні формули таких коферментів:

- 1) Нікотинамідні (НАД та НАДФН).
- 2) Флавінові (ФАД).
- 3) Хінони (убіхінон - КоQ).
- 4) Нуклеозидфосфати (АМФ, АДФ, АТФ).
- 5) Ацилювання (КоА).
- 6) Тетрагідрофолієва кислота.
- 7) Біотин.

Написати повну назву кожної сполуки.

### ***Розділ 3. Вуглеводи.***

Написати структурні формули:

- 1) Моносахаридів: тріоз, тетроз, пентоз, гексоз, представників підписати.
- 2) Альдоз та кетоз, представників підписати.
- 3) Глюкози, манози, рибози дезоксирибози у циклічній та ланцюговій формах. Вказати їх конфігурації та конформації (D- чи L- та ,  $\alpha$ - чи  $\beta$ -).
- 4)  $\beta$ -D-фруктофуранози та  $\beta$ -D-глюкопіранози.
- 5) Олігосахаридів: а) дисахариди (сахароза, лактоза, мальтоза трегалоза), б) трисахариди (мелицитоза, рафіноза), в) тетрасахарид (стахіоза).
- 6) Полісахариду (крохмаль), вказати сполука є гомо- чи гетеро- полісахаридом.

### ***Розділ 4. Ліпіди.***

Написати структурні формули:

- 1) жирних кислот, спиртів та альдегідів (насичені та ненасичені). На прикладі пальмітинової, стеаринової, лінолевої та ліноленової кислот.
- 2) триацилгліцеролів (гліцерол та його похідні).
- 3) фосфоліпідів (фосфатидилсерин, фосфатидилхолін, фосфатидил-етаноламін, фосфатидова кислота).
- 4) сфінголіпідів (сфінгомелін, глюкоцереброзид).

### ***Розділ 5. Нуклеїнові кислоти.***

Написати структурні формули:

- 1) пуринових (аденін, гуанін) та піримідинових (цитозин, тимін, урацил) основ.
- 2) нуклеотидів, які входять до складу ДНК (дАМФ, дГМФ, дЦМФ і дТМФ).
- 3) нуклеотидів, які входять до складу РНК (АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ).

### ***Розділ 6. Вітаміни.***

Написати структурні формули:

1) водорозчинних вітамінів: тіамін (вітамін В<sub>1</sub>), рибофлавін (вітамін В<sub>2</sub>), нікотинова кислота (вітамін В<sub>5</sub>, РР), пантотенова кислота (вітамін В<sub>3</sub>), піридоксин (вітамін В<sub>6</sub>), біотин (вітамін Н), фолієва кислота (вітамін В<sub>с</sub>), кобаламін (вітамін В<sub>12</sub>), аскорбінова кислота (вітамін С).

2) жиророзчинних вітамінів: вітамін А<sub>1</sub> (каротиноїди), вітамін D<sub>3</sub> (холекальциферол), вітамін К<sub>1</sub> (філохінон), вітамін Е (токоферол).

3) вітаміноподібних речовин: карнітин, інозитол, ліпоєва кислота, рутин, катехін, вітамін В<sub>13</sub> (оротова кислота), вітамін В<sub>15</sub> (пангамова кислота).

### ***Розділ 7. Фітогормони.***

Написати структурні формули: етилену, гіберелінової, абсцизової, індолилоцтової кислот.

## **РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА**

1. Біохімія. Підручник / Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М., Виноградова Р.П., Войціцький В.М., Курський М.Д., Рибальченко В.К., Цудзевич Б.О. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2002. – 480 с.
2. D.L. Nelson, M.M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. Publisher: W.H. Freeman (15th Edition), 2009, ISBN-10: 0-7167-7108-X. ISBN-13: 978-0-7167-7108-1. 1100 p.
3. Молекулярна біологія. Підручник / Сиволоб А.В. – К: ВПЦ «Київський університет», 2008. – 384 с.
4. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Под ред. Н.Н. Третьякова. – М.: Колос, 2000. – 640 с.
5. Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высшая школа, 1980. – 446с.
6. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 509 с.
7. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
8. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. - Ростов-на-Дону: Изд-во “Феникс”, 1999. - 544 с.