

**Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет
імені Івана Пулюя**

**Кафедра харчової
біотехнології та хімії**

Методичні вказівки
до лабораторних робіт з дисципліни
«Біохімія»
для студентів спеціальності
163 «Біомедична інженерія»
усіх форм навчання

Тернопіль – 2019

Методичні вказівки до лабораторних робіт з дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» всіх форм навчання. – Тернопіль: ТНТУ, 2019. – 78 с.

Укладачі: д.б.н., проф. Юкало В.Г.
к.т.н., ст. викл. Сторож Л.А.

Рецензент: д.б.н., проф. Столяр О.Б.

Методичні вказівки розглянуто на засіданні кафедри харчової біотехнології і хімії.

Протокол № 3 від «24» жовтня 2018 р.

Методичні вказівки схвалено та рекомендовано до друку на засіданні методичної комісії факультету інженерії машин, споруд та технологій Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Протокол № 4 від «29» листопада 2018 р.

Вступ

Лабораторний практикум складений на основі програми дисципліни «Біохімія» для студентів спеціальності «Біомедична інженерія».

Метою даних методичних вказівок є ознайомлення студентів з методами біохімічних досліджень, які доповнюють теоретичну частину курсу.

В практикум включені лабораторні роботи і методики, що застосовуються у медицині і біотехнології. До кожної лабораторної роботи додаються короткі теоретичні відомості.

Перед виконанням лабораторних робіт студенти повинні самостійно вивчити теоретичний матеріал відповідного розділу курсу. На заняття студенти повинні приходити із заздалегідь оформленою роботою. При цьому записується мета виконання роботи, хімізм реакцій і коротко порядок її виконання. До проведення експериментів допускаються студенти, ознайомлені з методикою роботи, обладнанням і приладами.

Під час виконання роботи проводяться відповідні спостереження над об'єктом дослідження, які записуються в зошит для лабораторних робіт, а кінцеві результати оформляються у вигляді висновків.

Лабораторна робота №1

ВИДІЛЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ З ЕРИТРОЦИТІВ КРОВІ

Мета роботи: виділити гемоглобін із еритроцитів крові; ознайомитися з методичними підходами, що використовуються при виділенні протеїнів із різних тканин і біологічних рідин.

Теоретичні основи виділення протеїнів

Для вивчення будови, амінокислотного складу і властивостей будь-якого протеїну, його необхідно виділити із біологічного об'єкту. При цьому, як правило, вибирають об'єкт, багатий даним протеїном. Оскільки протеїни не можуть дифундувати через мембрани і оболонки клітин в оточуючий розчин, то для екстрагування протеїнів необхідно провести повне руйнування клітин і їх структур. Цю процедуру називають **гомогенізацією** і проводять з використанням гомогенізаторів різних типів, шляхом розтирання матеріалу в ступці з піском, обробки ультразвуком, швидкого заморожування і розморожування. При проведенні гомогенізації необхідно звернути увагу на вибір середовища, в яке поміщають тканини, і на температуру.

Із гомогенатів протеїни виділяють шляхом екстрагування водою, розчинами солей, органічних розчинників (етанол, ацетон, діоксан). Вибір розчинника залежить від здатності протеїнів, які виділяють, розчинятися у ньому. Суміш протеїнів, що одержують у результаті екстрагування, далі необхідно розділити на окремі протеїнові фракції. При цьому використовують відмінності у розчинності окремих протеїнів при різних значеннях рН, іонної сили розчинів, температури середовища.

Найбільші труднощі при виділенні протеїнів виникають у зв'язку з їх денатурацією. Для збереження нативної структури молекул протеїнів необхідно при екстрагуванні уникати застосування концентрованих розчинів кислот, лугів, детергентів, не допускати спінювання розчинів. Всі роботи з протеїнами необхідно проводити при температурі не вище 4°C.

Матеріали, реактиви, обладнання: кров з добавленим антикоагулянтом, фізіологічний розчин NaCl, дистильована вода, центрифуга, центрифужна вага, центрифужні пробірки, піпетки, посуд для збору плазми, мірний циліндр на 10 см³, мірна колба на 100 см³.

Контрольні запитання

1. В чому полягає біологічна роль протеїнів в організмі?
2. Хімічний склад протеїнів.
3. Якими властивостями характеризуються протеїни в розчинах?
4. Класифікація протеїнів.
5. Які властивості протеїнів використовують при їх виділенні?

Лабораторна робота №2

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА ПРОТЕЇНИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Мета роботи: ознайомитися з універсальними (біуретова, нінгідринова) і специфічними (ксантопротеїнова, Паулі, Сакагучі, Адамкевича, Фоля) реакціями на протеїни; практично одержати кольорові продукти реакції.

Теоретичні основи хімії амінокислот і протеїнів

Протеїни є біополімерами, які побудовані із α -амінокислот, з'єднаних між собою пептидними зв'язками. Пептидний зв'язок – це зв'язок між Карбоном карбонільної групи і Нітрогеном імідної групи амінокислотних залишків, що входять до складу пептидної групи.

В протеїнах розрізняють чотири рівні структурної організації. Первинна структура визначається послідовністю амінокислотних залишків. Під вторинною структурою розуміють спосіб скручування поліпептидного ланцюга в спіральну або іншу конформацію (β -структуру), під третинною – спосіб розміщення ділянок поліпептидної спіралі в просторі. Четвертинна структура означає розміщення в просторі окремих поліпептидних ланцюгів в макромолекулярний комплекс.

До складу протеїнів входить близько 20 α -амінокислот, що відносяться до L-ряду і здатні повертати площину поляризованого світла (за винятком гліцину). Всі амінокислоти розділяються за своєю

здатністю бути синтезованими в тому чи іншому живому організмі. Це привело до поняття про незамінні амінокислоти.

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА ПРОТЕЇНИ І АМІНОКИСЛОТИ

Матеріали, реактиви, обладнання: 1% розчин казеїну, 0,1 моль/дм³ розчини амінокислот (лізину, тирозину, аргініну), 10% і 30% розчини NaOH, 1% розчин CuSO₄, сечовина (кристали), 0,5% розчин нінгідрину в ацетоні, концентрована нітратна кислота, концентрована оцтова кислота, концентрована сульфатна кислота, 0,7% розчин α-нафтолу в спирті, гіпоброміт натрію, 5% розчин (CH₃COO)₂Pb, штативи з пробірками, піпетки.

- Присутність протеїнів у біологічних об'єктах або розчинах можна визначити за допомогою кольорових реакцій, які обумовлені наявністю амінокислот в протеїнах, їх специфічними групами або пептидними групами.

Існують два різновиди кольорових реакцій:

- універсальні – біуретова (на всі протеїни) і нінгідринова (на всі α-амінокислоти і протеїни);
- специфічні – тільки на деякі амінокислоти як у молекулі протеїну, так і в розчинах окремих амінокислот.

Кольорові реакції широко використовують для виявлення протеїнової природи речовин, вивчення амінокислотного складу різних природних протеїнів і пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот. Багато з них є досить чутливими та високо специфічними, що дозволяє відкривати незначні кількості протеїнів, ті чи інші амінокислоти в лікарських засобах, у гідролізатах протеїнів, у біологічних рідинах і тканинах організму. Кольорові реакції застосовуються у клініко-біохімічних лабораторіях при проведенні різних аналізів та в науково-дослідній роботі.

Біуретова реакція

В лужному середовищі в присутності іонів Cu²⁺ розчини протеїнів набувають фіолетового забарвлення з червоним або синім відтінком залежно від кількості пептидних зв'язків у молекулі. Продукти неповного гідролізу протеїнів, що містять не менше двох пептидних зв'язків, дають біуретову реакцію з червоним відтінком.

Реакція обумовлена наявністю пептидних груп, які у лужному середовищі утворюють з іонами Cu^{2+} забарвлений комплекс. В лужному середовищі пептидна група присутня у своїй таутомерій енольній формі.

Іон Cu^{2+} взаємодіє з негативним зарядом дисоційованої в цих умовах ОН-групи – виникає солеподібний зв'язок. Крім того, іон Cu^{2+} утворює додаткові дисоційовані координаційні зв'язки з атомами Нітрогену, що беруть участь в утворенні пептидного зв'язку за рахунок їх неподільних електронних пар.

Комплекси можуть утворюватися за участю двох і трьох атомів Нітрогену пептидних груп, що обумовлює відтінок забарвлення. У великій концентрації біуретову реакцію дають також амінокислоти гістидин та аспарагін. Свою назву біуретова реакція отримала від похідного сечовини – біурету, який також дає цю реакцію.

Нінгідрінова реакція

Амінокислоти, пептиди та протеїни дають синє або фіолетове забарвлення з нінгідрином (гідрат трикетогідриндену). Реакція характерна для α -аміногруп амінокислот.

При нагріванні протеїнів з водним розчином нінгідрину виділяються CO_2 і NH_3 , нінгідрин відновлюється, окиснюючи α -вуглецевий атом амінокислот з утворенням альдегіду. Потім відновлений нінгідрин взаємодіє з NH_3 і другою молекулою нінгідрину. В результаті утворюється кольоровий продукт (синє або фіолетове забарвлення) мурексидної будови.

Ксантопротеїнова реакція

Переважає більшість протеїнів при нагріванні з концентрованою нітратною кислотою дає жовте забарвлення. Реакція обумовлена наявністю в протеїнах циклічних амінокислот (*тирозину* і *триптофану*), які при взаємодії з нітратною кислотою утворюють нітропохідні жовтого кольору. Амінокислота фенілаланін нітрується важко і її участь в ксантопротеїновій реакції сумнівна. Ксантопротеїнова реакція не є строго специфічною. Оскільки вона обумовлена нітруванням ароматичного кільця, то її дають сполуки, що не є амінокислотами, наприклад, фенол, і не дають протеїни, в яких відсутні циклічні амінокислоти (желатин).

Нітропохідні амінокислот в лужному середовищі утворюють солі хіноїдної природи, забарвлені в оранжевий колір.

Реакція на триптофан

При додаванні до протеїнів гліоксилової кислоти на межі з концентрованою сульфатною кислотою утворюється червоно-фіолетове кільце. Реакція зумовлена присутністю в молекулі протеїну триптофану, який, реагуючи з гліоксиловою кислотою (присутня у вигляді домішки в концентрованій оцтовій кислоті), дає забарвлені продукти конденсації. Концентрована сульфатна кислота приймає участь у реакції як водовіднімаючий агент.

Реакція на аргінін (реакція Сакагучі)

Протеїни дають червоне забарвлення при взаємодії з гіпобромітом і α -нафтолом в лужному середовищі. Реакція зумовлена присутністю у протеїнах залишків аргініну, що містить гуанідинові групи. В результаті реакції утворюється сполука цеглянисто-червоного кольору – продукт конденсації аргініну з α -нафтолом. Гіпоброміт натрію відіграє роль окиснювача.

Реакція на цистеїн і метіонін

При нагріванні розчину протеїну з лугом і ацетатом п्लомбуму розчин забарвлюється в бурий або чорний колір, реакція зумовлена присутністю у протеїнах амінокислот цистеїну і метіоніну. Ці амінокислоти при кип'ятінні з лугом втрачають сульфур, що відщеплюється у вигляді сірководню. Сірководень взаємодіє з лугом, при цьому утворюються сульфіді, які при взаємодії з ацетатом п्लомбуму дають чорні осад сульфідів п्लомбуму.

Контрольні запитання

1. Класифікація амінокислот. Незамінні амінокислоти.
2. Напишіть дипептид із заданих амінокислот.
3. Назвіть універсальні кольорові реакції на протеїни і амінокислоти.
4. За допомогою яких реакцій можна встановити присутність тирозину, триптофану, аргініну, цистеїну, метіоніну? Приведіть відповідні рівняння реакції.

Лабораторна робота №3

ХРОМАТОГРАФІЯ АМІНОКИСЛОТ

Мета роботи: ознайомитися з особливостями хроматографічного розділення; розділити суміш амінокислот методом хроматографії на папері.

Теоретичні основи хроматографії

Метод хроматографії на папері використовується для визначення амінокислотного складу протеїнів. Він дозволяє протягом декількох годин здійснити розділення суміші амінокислот з якісним і кількісним визначенням їх на хроматограмі.

Для амінокислотного аналізу використовують хроматографічний високоочищений папір. Амінокислоти наносять на смужку паперу близько до краю. Після цього через папір пропускають рухома фазу (суміш органічних розчинників) з боку нанесення амінокислот. Процес хроматографії проводять в закритій камері, повітря якої насичується парами розчинників. При проходженні хроматографії постійно відбувається розподіл амінокислот між рухомаю органічною фазою і нерухомаю водною, яка підтримується хроматографічним папером. Завдяки такому розподілу метод одержав назву розподільної хроматографії на папері.

Місце знаходження різних амінокислот на папері визначається їх коефіцієнтом розподілу α :

$$\alpha = \frac{C_n}{C_p} ,$$

де C_n – концентрація амінокислоти у водній нерухомаї фазі;

C_p – концентрація амінокислоти в органічній рухомаї фазі.

Чим більше значення α , тим повільніше рухається дана амінокислота. Всі амінокислоти мають індивідуальні значення коефіцієнту розподілу, тому кожна амінокислота переноситься рухомаю органічною фазою на певну віддаль від точки нанесення. Ця віддаль для кожної амінокислоти характеризується коефіцієнтом рухливості R_f . Коефіцієнт рухливості – це відношення шляху, пройденого амінокислотою, до довжини шляху, пройденого рухомаю фазою:

$$R_f = \frac{a}{b},$$

де a – відстань від місця нанесення розчину амінокислот до середини плями даної амінокислоти, мм;

b – шлях пройдений розчинником, мм.

Значення R_f для заданих умов хроматографії постійне для кожної амінокислоти і використовується для ідентифікації амінокислот. Розміщення амінокислот на папері після хроматографії виявляють за допомогою нінгідринового реактиву. За розташуванням та інтенсивністю забарвлених плям оцінюють якісний і кількісний амінокислотний склад досліджуваної суміші.

Матеріали, реактиви, обладнання: розчин амінокислот (0,1 моль/дм³ розчини лізину і фенілаланіну), н-бутанол, концентрована оцтова кислота, дистильована вода, 0,5 % розчин нінгідрину в ацетоні, хроматографічний папір, ножиці, олівець, лінійка, хроматографічна камера, мікропіпетки, термостат.

Контрольні запитання

1. В чому полягає принцип розділення та ідентифікації амінокислот методом хроматографії на папері?
2. Який порядок проведення хроматографії амінокислот на папері?
3. Що розуміють під коефіцієнтом рухливості, для чого він використовується?
4. Як проводять проявлення хроматограм та ідентифікацію на них амінокислот?

Лабораторна робота №4

СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ БІОМОЛЕКУЛ

Мета роботи: ознайомитися з теоретичними основами спектрофотометрії; вивчити спектри поглинання гемоглобіну.

Теоретичні основи спектрофотометрії

При пропусканні світла через шар речовини його інтенсивність зменшується. Це є наслідком взаємодії світлової хвилі з електронами речовини, в результаті чого частина світлової енергії передається електронам, а молекули речовини переходять із основного енергетичного стану в збуджений. Таке явище називають поглинанням світла. Інтенсивність поглинання визначається числом переходів за одиницю часу молекул поглинаючої речовини з основного в збуджений стан.

В основі спектрофотометричних досліджень лежить закон Бугера-Ламберта-Бера. Нехай через однорідну речовину проходить пучок паралельних монохроматичних променів довжиною хвилі λ . Виділимо елементарну ділянку шару речовини товщиною dl :

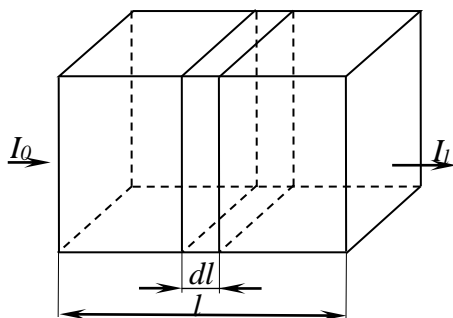


Рис. 4.1

При проходженні світла через таку ділянку його інтенсивність I послаблюється. Зміна інтенсивності dI пропорційна інтенсивності падаючого світла і товщині шару dl :

$$dI = -\kappa_{\lambda} \cdot I \cdot dl, \quad (4.1)$$

де κ_λ – монохроматичний натуральний показник поглинання, що залежить від властивостей середовища.

Знайдемо інтенсивність I_l світла, що пройшло через шар речовини товщиною l , якщо інтенсивність падаючого світла I_0 . Для цього проінтегруємо рівняння (4.1), попередньо розділивши змінні:

$$\int_{I_0}^{I_l} \frac{dI}{I} = -\kappa_\lambda \int_0^l dl.$$

В результаті отримаємо:

$$\ln I_l - \ln I_0 = -\kappa_\lambda \cdot l,$$

звідки:

$$I_l = I_0 \cdot e^{-\kappa_\lambda \cdot l}. \quad (3.2)$$

Це закон Бугера. Він показує, що інтенсивність світла зменшується в геометричній прогресії, якщо товщина шару зростає в арифметичній прогресії. Монохроматичний натуральний показник поглинання є величиною, оберненою віддалі, на якій інтенсивність світла послаблюється в e раз.

Монохроматичний натуральний показник поглинання розчину поглинаючої речовини в непоглинаючому розчиннику пропорційний концентрації c розчину (закон Бера):

$$\kappa_\lambda = \kappa_l \cdot c, \quad (4.3)$$

де κ_l – натуральний показник поглинання, віднесений до концентрації речовини.

Закон Бера справедливий тільки для розведених розчинів. В концентрованих розчинах він порушується через вплив взаємодії близько розташованих молекул поглинаючої речовини. Підставляючи рівняння (4.3) в (4.2), одержуємо закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$I_l = I_0 \cdot e^{-\kappa_l \cdot c \cdot l}, \text{ або } I_l = I_0 \cdot 10^{-\kappa_l \cdot c \cdot l}. \quad (4.4)$$

Відношення $\tau = \frac{I_l}{I_0}$ називається пропусканням; його значення

можуть змінюватися від 0 до 1. Часто цю величину виражають у відсотках. Якщо величина τ віднесена до шару речовини товщиною l см, тоді її називають коефіцієнтом пропускання.

Оптична густина речовини дорівнює:

$$D = \lg \frac{I}{\tau} = \lg \frac{I_0}{I_l}. \quad (4.5)$$

З рівнянь (4.4) і (4.5) одержуємо:

$$D = \kappa_1 \cdot c \cdot l. \quad (4.6)$$

Якщо концентрацію розчину виражають в молях на дм³, то натуральний показник поглинання, віднесений до концентрації речовини, називають молярним коефіцієнтом поглинання і позначають ε . В цьому випадку формула (4.6) приймає вигляд:

$$D = \varepsilon \cdot c \cdot l. \quad (4.7)$$

Молярний коефіцієнт поглинання чисельно дорівнює оптичній густині розчину з молярною концентрацією 1 моль/дм³ і товщиною 1 см. Кількісне визначення речовини за спектрами поглинання можна проводити в тому випадку, якщо досліджуваний зразок задовольняє вимоги закону Бугера-Ламберта-Бера:

- поглинаючі молекули розподілені по об'єму зразка рівномірно;
- поглинаючі молекули в інтервалі досліджуваних концентрацій не міняють характеру взаємодії одна з одною і з молекулами середовища;
- при проходженні через зразок розчину світловий потік послаблюється тільки за рахунок поглинання фотонів;
- світловий потік не викликає фотохімічних змін поглинаючих молекул.

Матеріали, реактиви, обладнання: розчин гемоглобіну людини, дистильована вода, мірні колби на 50, 100, 200 см³, фотометр КФК-3.

Аналіз спектрів поглинання широко застосовується при дослідженні гемоглобіну – основного компоненту еритроцитів. Функція гемоглобіну полягає у зворотному зв'язуванні молекулярного кисню і транспортуванні його до всіх клітин організму. Гемоглобін відноситься до складних протеїнів – гемопротеїнів. Його молекула складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів (2 α - і 2 β -ланцюги). Кожен ланцюг зв'язаний з гемом, в якому розміщений Fe²⁺.

При поглинанні кисню β -ланцюги гемоглобіну зближуються, при віддачі – розходяться. Розміщення α -ланцюгів при цьому мало міняється. Приєднання і віддача кисню молекулою гемоглобіну супроводжується структурними змінами, що приводить до зміни спектрів поглинання гемоглобіну. Відомі також інші похідні гемоглобіну – метгемоглобін і карбоксигемоглобін. В метгемоглобіні ферум знаходиться в трьохвалентному стані, в той час як в дезоксигемоглобіні і оксигемоглобіні – в двохвалентному. Кількість метгемоглобіну в крові людини збільшується при радіоактивному опроміненні, при попаданні в організм великої кількості нітратів з їжею. При взаємодії з СО гемоглобін зв'язує його і переходить в карбоксигемоглобін. Концентрація карбоксигемоглобіну в крові підвищується при отруєнні чадним газом, при курінні.

Кожна форма гемоглобіну характеризується певним спектром поглинання, який є залежністю оптичної густини від довжини хвилі λ .

Таким чином, при вивченні спектрів поглинання гемоглобіну можна не тільки визначити його концентрацію в розчині, але й проаналізувати, в якій формі він знаходиться, визначити кінетику переходу від одної форми до іншої.

В даній роботі для дослідження спектрів поглинання гемоглобіну використовується фотометр КФК-3. Фотометр КФК-3 застосовується для вимірювання коефіцієнтів пропускання і оптичної густини прозорих розчинів і прозорих твердих зразків, а також для вимірювання швидкості зміни оптичної густини речовини і визначення концентрації речовини в розчинах. Спектральний діапазон фотометра від 315 до 990 нм. В якості диспергуючого елемента у фотометрі застосовується дифракційна решітка. Спектральний інтервал, який виділяється монохроматором, не перевищує 7 нм.

Дифракційна решітка і дзеркало створюють в площині діафрагми D_2 розтягнуту картину спектру. Повертаючи дифракційну решітку навколо осі, паралельної штрихам решітки, щілиною діафрагми D_2 виділяють промені будь-якої довжини від 315 до 990 нм. Об'єктив створює в кюветному відділенні слабозбіжний пучок світла. Лінза зводить пучок, що пройшов кюветне відділення, на фотоприймачі у вигляді рівномірно освітленого світлового круга. В кюветному відділенні при роботі встановлюються прямокутні кювети з досліджуваним розчином.

Контрольні запитання.

1. В чому полягає явище поглинання світла?
2. Виведіть закон Бугера-Ламберта-Бера.
3. На чому базуються методи концентраційної колориметрії?
4. Яку інформацію можна одержати при вивченні спектрів поглинання гемоглобіну?
5. Опишіть принцип роботи КФК-3.

Лабораторна робота №5 МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ

Мета роботи: ознайомитися з найбільш поширеними методами визначення концентрації протеїнів. Визначити концентрацію протеїнів у заданих зразках методом Лоурі, біуретовим методом та з допомогою спектрофотометрії.

Теоретичні основи

Для визначення концентрації протеїнів у біохімії використовують ряд методів:

- метод К'ельдаля;
- спектрофотометрію в ультрафіолетовій області;
- колориметрію.

В основу *методу К'ельдаля* покладено визначення з високою точністю загального азоту в біологічних об'єктах. Не дивлячись на ряд модифікацій за свою багаторічну історію (1883 рік), метод широко використовується в лабораторній практиці і в деяких випадках є стандартом. Для визначення загального азоту за К'ельдалем, органічну речовину мінералізують при високій температурі концентрованою сульфатною кислотою. При цьому органічні речовини окиснюються в присутності каталізатора до CO_2 і H_2O , а весь азот переходить в амоніак і зв'язується з сульфатною кислотою, утворюючи сульфат амонію. Розчином лугу нейтралізують надлишок сульфатної кислоти і звільняють амоніак із сульфату амонію, який відганяється парою і зв'язується з розчином борної кислоти. При цьому утворюється борат амонію, який відтитровують стандартним розчином хлоридної або сульфатної кислот. Для розрахунку

концентрації протеїнів припускають, що весь азот в досліджуваному об'єкті входить до складу протеїнів. Тоді, знаючи, що азот в протеїнах становить в середньому 16 %, можна визначити концентрацію протеїнів. Метод К'ельдаля забезпечує високу точність при роботі з індивідуальними протеїнами з відомим вмістом азоту. Недоліками методу є велика трудомісткість, він важко піддається автоматизації, довготривалий.

Зручним і швидким способом визначення концентрації протеїнів у розчинах є *спектрофотометрія*. З амінокислот, які входять до складу протеїнів, дві (триптофан, тирозин) і в меншій мірі фенілаланін поглинають в ультрафіолетовій області спектру. Оптична густина розчинів протеїнів, що містять вказані амінокислоти, при 280 нм прямо пропорційна їх концентрації в розчині.

Визначення оптичної густини в далекій ультрафіолетовій області спектру використовують як більш чутливий метод, який менше залежить від амінокислотного складу протеїнів. Найкращі результати отримують при 205 нм (поглинання пептидних груп). Коефіцієнти екстинкції для більшості протеїнів при цій довжині хвилі вкладаються в інтервал 28,5-33. В даній роботі використовується одна із методик, що базуються на поглинанні протеїнів при 205 нм.

В основу *колориметричних методів* покладені кольорові реакції на протеїни. Найвідомішими колориметричними методами визначення концентрації є біуретовий і метод Лоурі.

Біуретовий метод базується на реакції протеїнів у лужному середовищі з сульфатом купруму. При цьому появляється фіолетове забарвлення, інтенсивність якого (визначається за допомогою фотоелектроколориметра) прямо пропорційна концентрації протеїнів у розчині. Метод не набув широкого застосування через малу чутливість.

Метод Лоурі є поширенішим завдяки високій чутливості і простоті виконання. Метод оснований на утворенні забарвлених продуктів синього кольору в результаті двох самостійних реакцій:

- 1) біуретової реакції протеїнів з іонами купруму в лужному середовищі;

- 2) реакції відновлення фосфорномолібденової і фосфорновольфрамної солей реактиву Фроліна амінокислотами тирозином і триптофаном.

Метод Лоурі приблизно в 100 раз чутливіший від біуретового методу, в 10-20 разів від спектрофотометричного. Метод Лоурі, зважаючи на його високу чутливість, зазвичай використовують для визначення низьких концентрацій протеїну (в межах 10–60 мг/дм³). Недоліком методу Лоурі є його менша специфічність, ніж біуретового. На інтенсивність забарвлення впливають ряд речовин, які можуть міститися в розчинах протеїнів (трис-буфер, цистеїн, дитіотреїтол, аскорбінова кислота, сульфат амонію, детергенти, сахароза в концентрації 10 %). Тому при визначенні концентрації протеїнів в розчинах з названими речовинами необхідно робити відповідний контроль або попередній діаліз.

Контрольні запитання.

1. В чому полягає визначення концентрації протеїнів за методом К'ельдаля?
2. Які амінокислоти мають максимум поглинання при 280 нм? Як використовується ця особливість в лабораторній практиці?
3. На яких реакціях базується кількісне визначення концентрації протеїнів біуретовим методом і методом Лоурі?
4. Дайте порівняльну характеристику різних методів визначення концентрації протеїнів?
5. Опишіть порядок визначення кількості протеїнів методом Лоурі та біуретовим методом.

Лабораторна робота №6 ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи: ознайомитися з будовою і властивостями ферментів. Визначити активність заданого протеолітичного препарату.

Теоретичні основи

Ферменти – це біологічні каталізатори, які синтезуються в клітинах живих об'єктів і є простими або складними протеїнами. Усі

відомі ферменти за хімічною природою є протеїнами і, відповідно, володіють всіма їх фізико-хімічними властивостями.

Ферменти в організмі можуть синтезуватися зразу з ферментативною активністю, але деякі утворюються в неактивному вигляді (пепсиноген, трипсиноген) або мають неактивну конформацію (алостеричні ферменти). Для активного їх функціонування необхідна активація за рахунок спеціальних процесів.

Швидкість реакції, яку каталізують ферменти, залежить від:

- 1) кількості або активності ферменту;
- 2) концентрації субстрату;
- 3) рН і складу реакційного середовища;
- 4) температури;
- 5) присутності активаторів і інгібіторів.

В біохімії часто під поняттям кількості ферменту розуміють його активність. Це зумовлено тим, що буває важко визначити концентрацію молекул ферменту в живих об'єктах. Існує декілька способів вираження активності ферментів. Згідно з рекомендацією комісії по ферментах Міжнародного біохімічного союзу за *одиницю активності ферменту* (Е) приймають таку його кількість, яка каталізує перетворення 1 моль субстрату за 1 хвилину при заданих умовах визначення. Рекомендованою є температура 30°C (або вказується температура, при якій проводилося визначення). Решту умов повинні бути оптимальними.

Ферменти є високоспецифічними каталізаторами, тобто діють, як правило, на структурно близькі субстрати, що мають подібні радикали або функціональні групи. Якщо специфічність *абсолютна*, фермент може каталізувати перетворення тільки однієї сполуки. Якщо специфічність *відносна* – декілька близьких сполук можуть бути субстратом для даного ферменту. Проявом високої специфічності ферментів є їх *стереоспецифічність*, тобто здатність перетворювати тільки певні стереоізомери, наприклад L- або D-амінокислоти, L- або D-моносахариди; цис-, транс-ізомери.

Ферменти дуже чутливі до зміни рН середовища. Це пов'язано з дією іонів Нідрогену на активні центри ферментів. Залежно від рН середовища амінокислотні залишки, що формують активний центр, можуть бути в різному ступені іонізації. Крім того, концентрація іонів H^+ у середовищі впливає на іонізацію і заряд субстрату. Для

кожного ферменту або групи ферментів існує оптимальне значення рН (рН-оптимум), при якому вони проявляють максимальну каталітичну активність. Більшість ферментів виявляє максимальну активність у слабкислому, нейтральному або слаболужному середовищах. При роботі з ферментами рН задається за допомогою спеціальних буферних систем.

Кожна ферментативна реакція проходить з максимальною швидкістю при певній температурі (температурний оптимум). В межах фізіологічних умов швидкість ферментативної реакції зростає із збільшенням температури, але після досягнення певного значення температури починається теплова інактивація протеїнової молекули і швидкість різко падає.

Всі ферменти поділяються на шість класів залежно від характеру процесу, який вони каталізують:

1. Оксидоредуктази Переносять Гідроген або електрони і каталізують біологічне окиснення.
2. Трансферази Переносять групи атомів за допомогою специфічних переносників. Вони відіграють важливу роль в біохімічних перетвореннях і можуть переносити метильні, карбоксильні, аміно-, сульфо- та інші групи.
3. Гідролази Каталізують гідролітичне розщеплення субстратів (протеїнів, полісахаридів, ліпідів, нуклеїнових кислот).
4. Ліази Каталізують негідролітичне відщеплення груп (CO_2 , NH_3 , H_2O та ін.).
5. Ізомерази Зумовлюють взаємоперетворення ізомерів.
6. Лігази Ферменти, що синтезують зв'язки ($\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{C}-\text{O}$ та ін.).

Визначення активності протеолітичних ферментів

Протеолітичні ферменти каталізують реакцію гідролітичного розщеплення пептидних зв'язків в молекулах протеїнів і пептидів.

Активність протеолітичних ферментів можна визначити за допомогою різних методів, вибір яких визначаються природою субстрату. При використанні у якості субстрату протеїнів (казеїн, гемоглобін) можна визначити гідролізований протеїн після осадження трихлороцтовою кислотою методом К'ельдаля або колориметрією. Активність протеаз також можна оцінити на основі прямого титрування карбоксильних груп, які звільняються при умові, що виключається їх електростатична взаємодія із звільненими при гідролізі аміногрупами. Уникнути цього можна за допомогою етанолу (зсуває рівновагу дисоціації) або при нагріванні з формальдегідом, який взаємодіє в цих умовах з аміногрупами. Використовують також синтетичні пептиди, які відповідають умовам специфічності ферментів. Так, дипептид гідролізується пепсином:

Амінокислоти, що звільняються при гідролізі пептидів, можна визначити за допомогою нінгідрину.

Матеріали, реактиви і обладнання: ферментний препарат; 2%-ний розчин казеїнату натрію; універсальний буфер; розчин трихлороцтової кислоти, 0,3 М; розчин хлоридної кислоти, 0,2 Н; розчин карбонату натрію, 0,5 М; Реактив Фоліна; тирозин; стакани на 50 см³; колби мірні на 50, 100, 1000 см³; пробірки; піпетки; фотометр КФК-3; термостат; центрифуга.

Контрольні запитання

1. Роль ферментів і їх поширення в живих об'єктах.
2. Як впливають на активність ферментів температура, рН, інгібітори і активатори?
3. Будова ферментів. Механізм дії.
4. Класифікація ферментів.
5. В яких одиницях вимірюється активність ферментів?
6. Одержання ферментів і їх використання в промисловості.
7. Властивості, класифікація і поширення протеолітичних ферментів.
8. Методи визначення протеолітичної активності.
9. На чому базується метод визначення активності протеаз по Ансону?

Лабораторна робота №7

ВУГЛЕВОДИ І ЛІПІДИ

Мета роботи: ознайомитися з будовою і властивостями вуглеводів та ліпідів, провести характерні реакції.

Будова і властивості вуглеводів

Вуглеводами називаються поліоксикальдегіди і поліоксикетони або сполуки, що перетворюються в них у процесі гідролізу.

За здатністю до гідролізу вуглеводи поділяють на:

- Прості вуглеводи (моносахариди) – низькомолекулярні сполуки, що не піддаються гідролізу.
- Складні вуглеводи (олігосахариди, полісахариди) – піддаються гідролізу, кінцевими продуктами якого є моносахариди.

Моносахариди поділяють на альдози (містять альдегідну групу) і кетози (містять кетогрупу). В залежності від кількості атомів Карбону у молекулі моносахариди поділяються на тріози, тетрози, пентози, гексози, гептози і т.д. Найбільш поширеними в живих об'єктах моносахаридами є пентози (рибоза, дезоксирибоза, ксилоза, арабіноза) і гексози (глюкоза, галактоза, фруктоза). Вони містять асиметричні атоми Карбону і, відповідно, існують у вигляді стереоізомерів. З метою позначення просторової будови кожного із стереоізомерів вуглеводи розділяють на два ряди: D-ряд і L-ряд. Більшість природних вуглеводів відносяться до D-ряду.

Моносахариди можуть існувати у розчинах у відкритій альдегідній і закритій напівацетальній формах. Перетворення відкритої форми моносахариди в циклічну відбувається внаслідок внутрішньомолекулярної взаємодії карбонільної або кетонної групи з просторово найбільш близькою спиртовою групою.

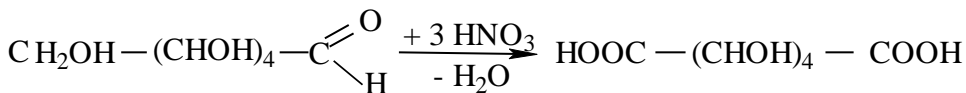
У хімічному відношенні моносахаридам властива висока реакційна здатність. Вони вступають у хімічні реакції у циклічній і ациклічній формах. Моносахариди дають цілий ряд реакцій, характерних для альдегідів і кетонів.

Альдози легко окиснюються з перетворенням альдегідної групи у карбоксильну, що веде до утворення альдонових кислот:



Ця реакція використовується для кількісного визначення альдоз.

Енергійне окиснення моносахаридів, наприклад концентрованою нітратною кислотою, веде до утворення двохосновних поліоксикислот, які називаються альдаровими:



При відновленні альдоз і кетоз утворюються багатоатомні спирти. Наприклад, при відновленні D-глюкози утворюється D-сорбіт.

Молекули моносахаридів, з'єднуючись між собою з виділенням води, утворюють молекулу полісахариду. Полісахариди поділяються на олігосахариди і вищі полісахариди. Олігосахариди включають від 2 до 10 залишків моносахаридів. Важливе значення в біохімії і фізіології людини мають дисахариди лактоза, сахароза, мальтоза. Вищі полісахариди складаються із багатьох залишків моносахаридів. До них відносяться крохмаль, целюлоза, глікоген.

Дисахариди складаються з двох залишків моносахаридів, з'єднаних між собою глікозидним зв'язком. За будовою і хімічними властивостями їх можна розділити на два типи: відновлюючі і невідновлюючі. Якщо моносахариди з'єднані у молекулі дисахариду так, що глікозидний гідроксил одного із моносахаридів залишається вільним, то такий дисахарид є відновлюючим. Ці дисахариди за властивостями аналогічні моносахаридам (можуть відновлювати оксиди аргентуму і купруму). Ними є мальтоза і лактоза.

Невідновлюючі дисахариди утворюються за участю напівацетальних гідроксилів обох залишків моносахаридів. Представником є сахароза.

Сахароза легко піддається гідролізу під впливом слабких кислот або ферментів. При цьому гідролізат набуває лівого обертання, тоді як вихідний розчин глюкози має праве обертання. Процес отримав назву інверсії, а суміш рівних кількостей α -D-глюкози і β -D-

фруктози називають інвертованим цукром. Гідроліз сахарози можна легко прослідкувати за допомогою поляриметра.

Найважливішим серед вищих полісахаридів є крохмаль, глікоген і целюлоза. Вони є гомополісахаридами, що складаються із залишків D-глюкози і відповідають загальній формулі $(C_6H_{10}O_5)_n$. Різниця у властивостях цих сполу зумовлена особливостями їх будови. Ланцюги крохмалю складаються із залишків α -D-глюкози, з'єднаних між собою 1,4-глікозидними зв'язками.

Целюлоза побудована із залишків β -D-глюкози, з'єднаних між собою 1,4-глікозидними зв'язками.

Целюлоза і крохмаль поширені в рослинних організмах. Глікоген входить до складу тканин тваринного походження (печінка, м'язи).

ХАРАКТЕРНІ РЕАКЦІЇ НА ВУГЛЕВОДИ

Матеріали, реактиви і обладнання: кров, 3% розчин глюкози, 5,5 ммоль/л розчин глюкози, 1% розчин крохмалю, 5% розчин $CuSO_4$, 5% розчин α -нафтолу, концентрована H_2SO_4 , реактив Люголя (в декількох cm^3 води розчиняють 1 г йодистого калію, потім розчиняють 1 г йоду і доводять водою до 300 cm^3), 3% розчин трихлороцтової кислоти, ортотолуїдиновий реактив, центрифуга, фотометр КФК-3, штатив з пробірками, водяна баня, лійка, алюмінієва фольга, фільтрувальний папір.

Реакція Тромера

Моносахариди мають здатність відновлювати в лужному середовищі іони купруму, бісмуту, аргентуму та інші, що зумовлено наявністю альдегідної групи. Кетози також дають реакції відновлення металів, хоч мають не альдегідну, а кетонну групу (фруктоза), яка не окиснюється слабкими окиснювачами. Проте фруктоза в лужному середовищі легко перетворюється в глюкозу і проявляє відновлюючі властивості.

Розчин глюкози в лужному середовищі відновлює купрум (II) оксид в купрум (I) оксид. Перший етап реакції полягає в утворенні купрум (II) гідроксиду при взаємодії купрум сульфату з лугом.

При нагріванні купрум (II) гідроксид відновлюється в купрум (I) гідроксид жовтого кольору, а карбонільна група глюкози

окиснюється до карбоксильної. Утворюється глюконова кислота. Жовтий купрум (I) гідроксид при дальшому нагріванні, втрачаючи молекулу води, переходить в купрум (I) оксид червоного кольору. Надлишок CuSO_4 маскує реакцію, бо купрум (II) гідроксид при нагріванні втрачає воду і перетворюється на купрум (II) оксид чорного кольору.

Реакція з α -нафтолом

Відношення пентоз і гексоз до мінеральних кислот різне, що використовують для їх ідентифікації. Так, при нагріванні з розбавленим розчином HCl або H_2SO_4 пентози перетворюються у фурфурол.

У випадку гексоз також проходить дегідратація з циклізацією, але утворений α -оксиметилфурфурол, на відміну від фурфуролу, нестійкий і легко гідролізується. Фурфурол, взаємодіючи з α -нафтолом, дає фіолетове забарвлення. Якщо замість нафтолу застосувати тимол, то виникає червоне забарвлення. З флороглюцином і хлоридною кислотою фурфурол дає вишнево-червоне забарвлення.

ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КРОХМАЛЮ

Для крохмалю характерною є реакція з йодом. Поява забарвлення пояснюється утворенням молекулярних комплексних сполук йоду з полісахаридними ланцюгами крохмалю, а також адсорбцією йоду розгалуженими молекулами амілопектину. При переведенні його в іонний стан – забарвлення зникає.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ПО КОЛЬОРОВІЙ РЕАКЦІЇ З ОРТОТОЛУЇДИНОМ

Концентрація глюкози в крові людини в нормі підтримується в інтервалі $3,3\text{-}5,5$ ммоль/дм³. При деяких захворюваннях вміст глюкози в крові може збільшуватися в 2-3 рази. Такий стан називається *гіперглюкоземією*. Може спостерігатися зниження концентрації глюкози, тоді говорять про *гіпоглюкоземію*. Тому кількісне визначення глюкози в крові має велике діагностичне значення.

В основу методу кількісного визначення глюкози покладена кольорова реакція з ортотолуїдином. Інтенсивність забарвлення при цьому прямо пропорційна концентрації глюкози. Вміст глюкози визначають у безпротеїновому фільтраті крові, тому протеїни попередньо осаджують 3% розчином ТХО. Метод є специфічним і дає можливість визначати власне глюкозу, бо інші редуруючі речовини крові (глутатіон, глюкуронова і аскорбінова кислоти та ін.) з ортотолуїдиновим реактивом не дають забарвлення.

Будова і властивості ліпідів

Жири і жироподібні речовини об'єднують в одну групу, що називається ліпідами. Речовини цієї групи відрізняються за хімічною природою, але всі володіють гідрофобними властивостями і розчиняються в неполярних розчинниках: ефірі, бензолі, хлороформі та ін.

Залежно від будови і властивостей ліпіди можна розділити на такі групи:

- нейтральні жири;
- фосфоліпіди;
- воски;
- стероїди;
- пігменти (хлорофіл, каротиноїди).

Жири – запасні речовини, що можуть відкладатися у великих кількостях в деяких тканинах рослинного і тваринного походження. За хімічною будовою жири – суміш складних ефірів (гліцеридів), утворених трьохатомним спиртом гліцерином і вищими карбоновими кислотами.

В результаті кислотного гідролізу нейтральних жирів можна одержати гліцерин і жирні карбонові кислоти. Швидкість гідролізу зростає при підвищених температурі і тиску.

Фосфоліпіди – гліцериди, які відрізняються від нейтральних жирів тим, що містять залишок ортофосфатної кислоти.

Головну масу природних фосфатидів складають лецитини і кефаліни. До складу лецитинів входять азотиста основа холін. До складу кефалінів – етанол амін.

Лецитин, кефалін і фосфатидилсерин переважно зустрічаються в мембранах.

Воски відносяться до жироподібних речовин. Це складні ефіри, утворені жирними кислотами і вищими одноатомними спиртами аліфатичного ряду.

До стероїдів відносяться стероли і їх похідні. Стероли входять в комплекси з протеїнами до складу мембран, цитоплазми, де відіграють суттєву роль в регуляції обміну речовин в клітині. Найпоширенішим представником стеролів є холестерин.

Більшість методів кількісного визначення жиру базуються на його здатності розчинятися в органічних розчинниках. При екстракції органічними розчинниками в розчин переходять не тільки жири, але і жироподібні речовини: вільні жирні кислоти, воски, стероїди, пігменти. Тому одержаний продукт називають «сирим жиром». Найчастіше в практиці визначення жирів застосовують екстракцію ефіром в апараті Сокслета. Екстракція проходить безперервно протягом 5-6 годин. Після чого ліпіди одержують у вигляді розчину в ефірі, а знежирений зразок зважують і за різницею знаходять вміст ліпідів.

ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ ЛІПІДІВ

Матеріали, реактиви, обладнання: тваринні жири і олії, хлороформ, етиловий спирт, розчинник: гексан, діетиловий ефір, оцтова кислота (у співвідношенні за об'ємом 80:20:2), 10% спиртовий розчин фосфорномолібденової кислоти, свідки для ідентифікації: холестерин, тригліцериди, вільні жирні кислоти, пластинки «Силуфол», хроматографічна камера, мікропіпетка на 0,1 см³, пульверизатор, термостат.

Найефективнішим і широко застосовуваним методом фракціонування суміші ліпідів є хроматографія. Головну роль при аналітичному фракціонуванні відіграє адсорбційна хроматографія в тонкому шарі сорбенту. В основі адсорбційної хроматографії лежить розділення ліпідів відповідно до їх полярності. Адсорбентом при тонкошаровій хроматографії служить силікагель. Сила взаємодії ліпиду з адсорбентом визначається в основному водневими та іонними зв'язками, в меншій мірі – силами Ван-дер-Ваальса.

Силікагель є продуктом полімеризації ортокремнієвої кислоти (H_4SiO_4). Адсорбційні властивості силікагелю обумовлені присутністю на поверхні зерен гідроксильних груп, які за рахунок водневих зв'язків взаємодіють один з одним і водою. Гідратований силікагель мало активний як адсорбент. При нагріванні від 50 до 110°C відбувається дегідратація, що приводить до значного збільшення адсорбційної здатності силікагелю.

Для аналітичного розділення ліпідів виготовляють пластинки з товщиною шару силікагелю не більше 0,25 мм або використовують готові пластини «Силуфол». В цих пластинках тонкий шар силікагелю закріплений на алюмінієвій фользі за допомогою крохмалю. При підготовці пластинок «Силуфол» для роботи їх необхідно активізувати нагріванням при 105°C протягом 40 хв.

У якості розчинників при тонкошаровій хроматографії ліпідів часто використовують системи:

- 1) гексан – діетиловий ефір – оцтова кислота;
- 2) хлороформ – метиловий спирт – аміак;
- 3) хлороформ – метиловий спирт – вода та ін.

Проявляють хроматограми парами I_2 , 10 % розчином фосфорномолібденової кислоти.

Контрольні запитання

1. Дайте характеристику будови і властивостей головних класів вуглеводів.
2. Біологічні функції вуглеводів у живих об'єктах.
3. Опишіть хімізм характерних реакцій на вуглеводи (реакція Тромера, з α -нафтолом, з J_2).
4. Яким методом можна визначити концентрацію глюкози в крові? Опишіть хід роботи і приведіть відповідну реакцію.
5. Дайте характеристику найважливіших груп ліпідів.
6. На чому базуються методи кількісного визначення ліпідів?
7. Поясніть принципи розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії.
8. Опишіть хід проведення тонкошарової хроматографії.

Список посилань

1. Біохімія : Навч. посібник для студ. Практикум / Кучеренко М.Є., Войцицький В.М., Бабенюк Ю.Д. та ін - К. : Либідь, 1995. – 464 с.
2. Біохімія. Курс лекцій: Навчальний посібник / О.Б. Столяр. – Тернопіль: вид-во Карп'юка. 2001. – с. 247: іл. 20.
3. Біохімія : Підручник / Кучеренко М.Є., Виноградова Р.П., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М. та ін. - К. : Либідь, 1995. - 151 с.
4. Біохімія : практикум : навч. посібник / А. В. Лисиця. – Суми : Університетська книга, 2009. – 240 с.
5. Губський Ю.І. Біологічна хімія. Підручник. – Київ. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 656 с.
6. Марінцова Н.Г. Біологічна хімія / Н.Г. Марінцова, Л.Р. Журахівська, І.І. Губицька, Л.Д. Болібрух, М.С. Курка, В.П. Новіков: підручник. – Львів : Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2009. – 324 с.
7. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980. – 581 с.