Міністерство освіти і науки України
Харківський державний університет харчування та торговлі

ПРАКТИКУМ

з біологічної хімії

Навчальний посібник
для студентів технологічних (спеціальності ТХ 8.091711;ТХК 8.091702; ТКО 7.091706; ТМ 7.091709)
факультетів

Харків 2011

Рекомендовано кафедрою
гігєни харчування
та мікробіології,
протокол засідання № 13
від 29.03.2004 р.

Схвалено методичною комісією
інженерно-технологічного
факультету,
протокол засідання № 4
від 16.04.2004 р.

Схвалено вченою радою
університету,
протокол засідання № 9
від 30.04.2004 р.

Рецензент проф. П.П.Пивоваров

ЗМІСТ

Вступ.....5
Правила техніки безпеки для студентів, які працюють у біохімічній лабораторії.....6
Перша допомога при нещасних випадках у біохімічній лабораторії.....7
План лабораторних занять 8
Тема 1. **Будова тіла людини і його хімічний склад**.....14
Хімічний склад організмів.....15
Лабораторна робота № 1. Хімічний склад організму.....16
Тема 2. Загальні властивості амінокислот.....19
Лабораторна робота № 2. Загальні властивості амінокислот.....20
Лабораторна робота № 3. Кількісне та якісне визначення амінокислот формольним титруванням.....22
Лабораторна робота № 4. Кольорові реакції на амінокислоти.....25
Тема 3. Фізико-хімічні властивості білків.....29
Лабораторна робота № 5. Фізико-хімічні властивості білків.....31
Лабораторна робота № 6. Дослідження білків молока.....34
Лабораторна робота № 7. Визначення ізоелектричної точки розчинів білків.....37
Лабораторна робота № 8. Визначення кількості білків за біуретовою реакцією.....39
*Лабораторна робота№ 9.*Вивчення перетравлювальності білків ферментами шлунково-кишкового тракту 40
Лабораторна робота № 10. Визначення білка за методом Лоурі.....42
Тема 4. Складні білки.....45
Лабораторна робота 11. Виділення та якісне визначення складу нуклеопротеїнів, глюкопротеїдів, фосфопротеїнів.....50
Тема 5. Властивості ферментів.....55
Лабораторна робота № 12. Властивості ферментів.....57
Лабораторна робота № 13. Окислювально-відновлювальні ферменти (оксидоредуктази).....60
Лабораторна робота № 14. Визначення активності каталази.....66
Тема 6. Підсумкове заняття по білкам, обміну білків, ферментам, окислювально-відновлювальних процесах, синтезу білка.....69
Тема 7. Вуглеводи.....72
Лабораторна робота № 15. Дослідження вуглеводів.....75
Лабораторна робота № 16. Виявлення редукуючих вуглеводів.....78
Лабораторна робота № 17. Визначення глюкози у присутності фруктози йодометричним методом.....81
Тема 8. Обмін вуглеводів.....83
Лабораторна робота № 18. Дослідження продуктів обміну вуглеводів.....86
Тема 9. Ліпіди.....92
Лабораторна робота № 19. Дослідження ліпідів та ліпоїдів.....94

Лабораторна робота № 20. Омилення триглицеридів у водно-спиртовому розчині.....100
Лабораторна робота № 21. Якісні реакції на альдегіди (з реактивом Шиффа).....101
Тема 10. Обмін ліпідів.....103
Лабораторна робота № 22. Дослідження продуктів обміну ліпідів.....105
Тема 11. Підсумкове заняття по вуглеводам і ліпідам.....109
Тема 12. Вивчення хімічного складу продуктів рослинного походження.....110
Лабораторна робота № 23. Візуальний метод визначення органічних кислот.....110
Лабораторна робота № 24. Визначення вмісту чистого пектину.....112
Лабораторна робота № 25. Визначення лужності.....113
Тема 13. Вітаміни.....115
Лабораторна робота № 26. Дослідження водорозчинних вітамінів.....121
Лабораторна робота № 27. Визначення кількості аскорбінової кислоти у продуктах рослинного походження.....124
*Лабораторна робота № 28.*Дослідження жиророзчинних вітамінів.....125
Тема 14. Регуляція обміну речовин.....129
*Лабораторна робота № 29.*Дослідження гормонів.....129
Тема 15. Підсумкове заняття по вітамінам і гормонам.....132
Список літератури.....133

ВСТУП

Біологічна хімія – це наука, що вивчає хімічну природу речовин, з яких побудовано організм, закономірності їхніх перетворень, тобто усі хімічні процеси, що відбуваються в живому організмі від надходження до нього поживних речовин і до утворення та виведення кінцевих продуктів обміну речовин, а також роль хімічних речовин, що регулюють ці процеси. Саме тому, вивчення біохімії є дуже важливим для спеціалістів, що працюють в харчових галузях виробництва, забезпечують виробництво, транспортування, зберігання, приготування та споживання продуктів харчування та страв. Практикум розраховано на студентів технологічних факультетів економічних вузів та вузів харчової промисловості споживчої кооперації та економічних, які готують спеціалістів для галузі харчування, виробництва продуктів харчування, їх зберігання, переробки,контролю якості.

У навчальній літературі відсутні такі профілізовані практикуми з біохімії, де б ураховувалися особливості лабораторно-практичних занять з курсу цієї дисципліни для зазначених вузів, а також ступінь підготовки студентів, якого досягнуто при вивченні органічної та фізичної хімії на попередніх курсах.

Навчальний посібник складено у відповідності до програм курсу „Біологічна хімія” і підготовлений з метою надання допомоги студентам інженерно-технологічних і товарознавчих факультетів вищих закладів освіти у доскональному вивченні теоретичного матеріалу та набутті відповідних практичних навичок виконання біохімічних досліджень харчових продуктів.

Виходячи зі змісту навчальної дисципліни „Біологічна хімія”, даний навчальний посібник покликаний допомогти студентам поєднати теоретичні знання і практичні навички в опануванні основних тем курсу. Практикум спрямований на формування у студентів здатності самостійно мислити, аналізувати отримані результати досліджень, на поглиблене опанування навчального матеріалу і засвоєння теоретичних знань. Він надає студентам можливість заздалегідь готуватися до семінарських занять, виконувати лабораторні і біохімічні дослідження та розрахунки кількості відповідних хімічних речовин, здійснювати самоконтроль своїх знань та заздалегідь готуватися до підсумкових занять з курсу.

Вибір тем зумовлено не лише необхідністю ілюстрування теоретичного матеріалу і його кращого засвоєння, але й важливістю ряду біохімічних методів для практики громадського харчування і харчових виробництв, для контролю технологічних процесів, якості сировини та готової продукції відповідних підприємств.

Такий практикум сприятиме підвищенню якості підготовки фахівців сфери громадського харчування та торгівлі продовольчими товарами.

Опису методів дослідження передує короткий виклад теоретичного матеріалу з даної теми, який є необхідним для пов'язування з ним лабораторної

роботи. У кінці кожного заняття наведено контрольні запитання, відповіді на які мають допомогти студентам краще засвоїти навчальний матеріал.

Для виконання лабораторних робіт крім класичних методів залучено сучасні, які є доступними за умов лабораторії, наприклад, хроматографія: адсорбційна, розділювальна, у тонкому шарі, флюорометрія тощо.

До відповідних розділів включено методи, що використовуються в харчових лабораторіях, наприклад, експрес-проба на свіжість молока; визначення активності пероксидази як показника ступеня теплової обробки м'яса; гальмування поліфенолоксидази гіпосульфітом Na, який використовується для попередження потемніння картоплі та інших рослинних об’єктів і деякі інші.

Практикум призначений для студентів інженерно-технологічних та товарознавчих спеціальностей, які навчаються за навчальними планами підготовки бакалаврів, спеціалістів і магістрів відповідних фахових спрямувань.

Правила техніки безпеки для студентів, які працюють у біохімічній лабораторії .

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватися чистоти, гігієни й ладу. Ніякі речовини у лабораторії не можна куштувати. Категорично забороняється використовувати лабораторний посуд для їжі та пиття.

Досліди слід проводити лише у чистому посуді. Не дозволяється працювати у лабораторії ,якщо відсутні викладач або лаборант.

Забороняється залишати будь-які речовини в посуді без етикеток чи напису. Перед проведенням кожного досліду необхідно уважно прочитати етикетку, старанно оглянути апаратуру і посуд, а також переконатися, що всі хімічні реактиви, матеріали і розчини відповідають зазначеним у даній роботі.

Склянки з речовинами чи розчинами слід брати однією рукою за шийку, а другою підтримувати дно.

Пробірки і колби, в яких нагрівають рідини і тверді тіла, слід тримати похило, отвором від себе і товарищів.

Для відбору концентрованих кислот і лугів необхідно використовувати піпетки з грушами.

Не можна виливати до раковини концентровані розчини кислот і лугів. У таких випадках слід користуватися посудом для зливу. Під час роботи з ефіром, ацетоном та іншими вибуховонебезпечними речовинами необхідно дотримуватися надзвичайної обережності.

Досліди з легкозаймистими органічними речовинами слід проводити під тягою. Категорично забороняється в цей час користуватися у лабораторії вогнем.

Забороняється відганяти ефір та інші легкозаймисті речовини на відкритому вогні. З цією метою слід використовувати колби-нагрівачі з закритою спіраллю або водяні бані. Під час роботи на центрифузі не слід відчиняти кришку, поки ротор не зупиниться.

У разі зіпсованості електричної, газової чи водопровідної мереж, каналізації, лабораторної апаратури, приладів, аналітичних терезів, тяги слід негайно повідомити викладача чи лаборанта.

Залишаючи лабораторію, необхідно перевірити, чи закриті газові, водопровідні крани, чи вимкнуті електроприлади і погашене світло.

У кожній лабораторії мають бути захисні окуляри, маски, респіратори і засоби протипожежного захисту: ящик із піском, асбестова ковдра, наповнені вогнегасники.

У випадку виникнення пожежі слід повідомити чергового пожежної охорони, вжити необхідних заходів, надати першу допомогу потерпілим.

На доступному місці в лабораторії мають знаходитися медикаменти для надання першої медичної допомоги: спиртовий розчин таніну, водяні розчини перманганату калію, борної кислоти, гідрокарбонату натрію, йодний настій, вата, пластир, бинти, мазь від опіків.

Перша допомога при нещасних випадках у біохімічній лабораторії

При попаданні на шкіру концентрованого лугу вражену ділянку слід промити великою кількістю води, потім обробити 1%-м розчином оцту і знову промити великою кількістю води.

При опіках шкіри концентрованим розчином кислоти вражену ділянку промити водою, обробити 3%-м розчином гідрокарбонату натрію, а потім знову промити водою.

При попаданні кислоти або лугу в очі слід одразу промивати то одне око, то інше струменем води протягом 3...5 хвилин. Потім очі необхідно промити розчином гідрокарбонату натрію (при опіках кислотою) або розчином борної кислоти (при опіках лугом). Після цього необхідно негайно звернутися до лікаря.

При термічних опіках першого ступеня обпечене місце слід присипати двовуглекислим натрієм (питна сода), рисовим, картопляним крохмалем чи тальком; або зробити примочки спиртовим розчином етилового спирту, таніну або свіжовиготовленим 2%-м розчином $NaHCO_3$ чи 5%-м $KMnO_4$.

У випадку виникнення пожежі слід негайно виключити газ, вимкнути електроприлади, засипати піском або накрити асбестовою ковдрою. Сильне полум'я гасять за допомогою вогнегасників.

При займанні одягу потерпілого слід облити водою або обернути простирадлом.

План лабораторних занять

Назва теми	Обсяг годин	№ заняття	Зміст лабораторного заняття	Форма поточного контролю
1	2	3	4	5
1. Будова тіла людини і його хімічний склад	2	1	Вивчення хімічного складу органічних речовин,виявлення наявності азоту,сірки,вуглецю та кальцію,фосфору у складі органічних речовин.	Опитування
2. Загальні властивості амінокислот	6			
	2	2	Вивчення загальних властивостей амінокислот, у тому числі наявність аміногруп в амінокислотах за допомогою азотисто-кислого натрію та оцтової кислоти по нінгідрину Визначення буферних властивостей амінокислот та виявлення пептичного зв’язку між амінокислотами.	Опитування
	2	3	Кількісне та якісне визначення амінокислот формольним титруванням. Якісне визначення наявності карбоксильної групи у амінокислотах за методом Серенса. Кількісне визначення ά-аміногруп формольним титруванням.	Опитування
	2	4	Кольорові реакції на амінокислоти; виявлення наявності тирозину, триптофану, метіоніну, гістидину у складі білків.	Опитування

1	2	3	4	5
3. Фізико-хімічні властивості білків.	16			
	2	5	Вивчення фізико-хімічних властивостей білка: вплив на розчин білка азотної кислоти, органічних кислот, іонів важких металів, органічних розчинників, хлориду натрію, сірчанокислого амонію.	Опитування
	2	6	Дослідження білків молока. Вивчення осадження казеїну хлористим кальцієм, ацетоном; визначення домішок у складі молока (формальдегіду, хлору, перекису водню).	Опитування
	2	7	Визначення казеїну методом формольного титрування.	Опитування
	2	8	Визначення ізоелектричної точки розчинів білків. Ознайомлення з правилами вимірювання на іономері. Проведення визначення ізоелектричної точки розчину желатину при різних співвідношеннях компонентів в реакційній суміші.	Опитування
	2	9	Визначення кількості білків за біуретовою реакцією. Ознайомлення з технікою проведення вимірювань на фотоелектроколориметрі. Виготовлення калібровочного графіку по сивороточному альбуміну. Визначення кількості білків за біуретовою реакцією на ФЕК.	Опитування

1	2	3	4	5
	2	10	Вивчення перетравлювальності білків ферментами шлунково-кишкового тракту in vitro. Ознайомлення з будовою „штучного шлунку”.	Опитування
	2	11	Проведення гідролізу білкового розчину у „штучному шлунку”	Опитування
	2	12	Визначення білка за методом Лоурі. Ознайомлення з технікою проведення вимірювань на спектрофотометрі. Виготовлення калібровочного графіку по тирозину. Вимірювання оптичної платності білкового розчину на спектрофотометрі.	Опитування
4. Складні білки	4			
	2	13	Виділення та якісне визначення складу нуклеопротеїнів, глюкопротеїнів, фосфопротеїнів.	Опитування
	2	14	Ознайомлення з процесом гідролізу дріжджів. Виявлення у складі гідролізату вуглеводів, фосфору, пептидних зв’язків. Вивчення складу глюко- та фосфопротеїнів.	Опитування
5.Властивості ферментів	6			
	2	15	Властивості ферментів: вплив температур, pH, активаторів та інгібіторів на активність ферментів.	Опитування
	2	16	Окислювально-відновлювальні ферменти. Вивчення впливу на їх активність різних факторів .	Опитування

1	2	3	4	5
	2	17	Визначення активності каталази зернових продуктів.	Опитування
6. Підсумкове заняття по білкам, обміну білків, ферментам, окислювально-відновлювальним ферментам.	2	18	Проведення підсумкового заняття по вивченим темам (білки, обмін білків, ферменти, біологічне окислення).	Колоквіум
7. Вуглеводи.	6			
	2	19	Дослідження властивостей вуглеводів та здатності до пе-ретравлення ферментами: са-харози – ферментами дріжд-жів, крохмалю – амілазою, взаємодію з реактивом Фелінга.	Опитування
	2	20	Виявлення редукуючи вуглеводів. Вивчення вмісту редукуючих вуглеводів у складі харчових продуктів (моркві, молоці, цукру).	Опитування
	2	21	Визначення глюкози у присутності фруктози йодометричним методом.	Опитування
8. Обмін вуглеводів.	2	22	Дослідження продуктів обміну вуглеводів: виявлення молочної кислоти у м’язах, перетравлення вуглеводів фе-рментами шлунково-кишко-вого тракту, дослідження окислення моносахаридів у кислому та лужному середовищі, використання фосфату у процесі бродіння.	Опитування

1	2	3	4	5
9. Ліпіди.	6			
	2	23	Дослідження властивостей ліпідів та ліпоїдів: вивчення простих і складних ліпідів (реакція з сірчаною кислотою, емульгування ліпідів, константи ліпідів, акролеінова проба, якісна реакція на лецитін).	Опитування
	2	24	Дослідження омилення тригліцеридів у водно-спиртовому розчині.	Опитування
	2	25	Вивчення якісних реакцій на альдегіди з реактивом Шиффа.	Опитування
10. Обмін ліпідів	2	26	Дослідження продуктів обміну ліпідів: фурфуролова проба на жовчні кислоти, виявлення кетонових тіл пробою Лібена, йодоформна реакція на аміак, реакція на ацетон (з нітропрусидом натрію за пробою Люголя).	Опитування
11. Підсумкове заняття по вуглеводам і ліпідам.	2	27	Підсумкове заняття по вуглеводам і ліпідам (властивості, розщеплення в шлунково-кишковому тракті і тканинах.	Колоквіум
12. Вивчення хімічного складу продуктів рослинного походження.	2	28	Виявлення присутності органічних кислот у продуктах рослинного походження (візуальний метод). Визначення вмісту чистого пектину у продуктах рослинного походження (універсальним методом). Вивчення лужності у продуктах рослинного походження.	Опитування

1	2	3	4	5
13. Вітаміни.	4 2 2	 29 30	 Визначення наявності водорозчинних вітамінів у продуктах рослинного походження (якісна реакція на аскорбінову кислоту, окислювання вітаміну С, якісна реакція на вітаміни B_1, B_6, РР. Вивчення наявності аскорбінової кислоти у продуктах рослинного походження. Вивчення властивостей жиророзчинних вітамінів (вітаміну А, каротиноїдів, вітамінів Е, Д, К.	 Опитування Опитування Опитування
14. Регуляція обміну речовин.	2	31	Дослідження гормонів, якісні реакції на адреналін, інсулін.	Опитування
15. Підсумкове заняття по вітамінам і гормонам	2	32		Колоквіум

ЗАНЯТТЯ 1

Тема І. БУДОВА ТІЛА ЛЮДИНИ І ЙОГО ХІМІЧНИЙ СКЛАД

Біохімія вивчає хімічний склад живої матерії, перетворення в ній речовин і зв'язок хімічних процесів в організмі з його функціями. Біохімія є основою багатьох дисциплін, у тому числі профільних для інженера-технолога: фізіології харчування, технології виробництва продуктів харчування, мікробіології, санітарії та гігієни, товарознавства, загальної технології харчових виробництв.

Тіло людини складається з клітин. Вони об'єднанні у тканини, органи, системи, різні за складом і функціями,що зумовлюють єдність організму, як цілого, забезпечуються наявністю нейрогуморальної регуляції, яка складається з двох відділів: нервової системи і гуморальної.

Нервова система складається з розташованих особливим чином клітин - *нейронів.* Тіло нейрона має відростки – *аксони* і *дендрити,* за допомогою яких нейрони поєднуються один з одним та з іншими клітинами, утворюючи *синапси.* Сигнали від рецепторів надходять до тіла нейрона і через синапси передаються до ЦНС і далі - до робочих органів.

Гуморальна регуляція забезпечується хімічними речовинами – *гормонами,* які виробляються в залозах внутрішньої секреції і переносяться до різних ділянок організму рідинами – кров'ю, лімфою. Гормони беруть участь у регуляції обміну речовин у тканинах і органах. Так, гормони щитовидної залози регулюють інтенсивність витрат енергії організмом. Виробляють гормони і підшлункова, надниркові, статеві та інші залози.

Функції обох відділів нейрогуморальної системи, взаємопов'язані, забезпечують тонку регуляцію обміну речовин та процесів життєдіяльності в організмі.

Зв'язок організму з навколишнім середовищем через їжу здійснюється шлунково-кишковим трактом. У ньому здійснюється травлення складних харчових речовин, які перетворюються у форму, доступну для засвоєння. Цій системі належить важлива роль у виділенні незасвоєних залишків харчових речовин, отруйних продуктів, які утворилися з них і потрапили до організму в процесі виробничої діяльності, а також деяких продуктів обміну речовин, наприклад, холестерину, кальцію, заліза та ін. В одному з відділів шлунково-кишкового тракту – товстому кишечнику – синтезуються деякі вітаміни.

Провідна роль у виділенні з організму продуктів обміну речовин належить органам виділення: ниркам і сечовому міхуру, легеням, шкірі.

Транспорт усіх поживних речовин, а також кисню і продуктів розпаду, здійснюють рідкі середовища організму – кров і лімфа, їхній рух забезпечується серцем. Всі клітини організму на 99 % складаються з водню, кисню, вуглецю і

азоту. Вони з'єднані між собою та з іншими елементами, створюючи білки, жири, вуглеводи, похідні цих речовин.

Високомолекулярні органічні молекули у живих організмах побудовані зі сполук більш простих, невеликих молекул "будівельних блоків", які утворюють макромолекули білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів, ліпідів.

Різноманітність хімічних сполук в організмі зумовлена властивостями складових його елементів. Вуглець у більшій мірі, ніж інші елементи, здатен утворювати стабільні молекули різних конфігурацій і розмірів із безліччю функціональних груп. Різні сполучення речовин утворюють структурну основу клітин. Основними хімічними елементами, що входять до складу живого організму, є так звані органогени: C, O, H, S.

Постачання організму пластичними та енергетичними ресурсами, необхідними для обміну речовин і процесів життєдіяльності, забезпечується їжею. Вона повинна містити такі компоненти, які в організмі не можуть синтезуватися: біологічно цінні білки, вітаміни, мінеральні речовини та ін.

Хімічний склад організмів

Із 105-ти елементів періодичної системи Менделєєва у складі клітин виявлено близько 60-ти. Хімічні компоненти клітин можна розділити на неорганічні (вода і мінеральні солі) і органічні (білки, вуглеводи, жири і нуклеїнові кислоти).

Людина задовольняє потребу в поживних речовинах за рахунок харчових продуктів, які різняться за вмістом тих чи інших органічних і неорганічних речовин. Наприклад, молоко містить майже всі необхідні людині речовини; овочі і картопля – багато вуглеводів; м'ясо, риба, борошняні продукти і сири – велику кількість білків; фрукти – вітаміни. Тому для повноцінного харчування їжа повинна бути різноманітною.

Значення *води* для організму дуже велике. Так, тварини, які позбавлені води, гинуть набагато раніше, ніж тварини, позбавлені їжі. Штучне вилучення однієї п'ятої частки всієї кількості води, що є в організмі, призводить до зупинення життєвих функцій.

За невеликим винятком (кістки, емаль зубів), вода є переважним компонентом клітин. Вона служить розчинником для багатьох речовин, а також дисперсійним середовищем, якому належить значна роль у колоїдній системі цитоплазми. Всі біохімічні процеси організму відбуваються виключно у водному середовищі, а у багатьох реакціях вода бере безпосередню участь. Вода використовується і для виведення речовин з організму.

Мінеральні речовини. Вода і солі становлять близько 2/3 маси тіла людини. В організмі людини більша частина мінеральних речовин випадає на долю кісток, до складу яких входить переважно нерозчинний у воді фосфорнокислий кальцій. Рідини тіл людини і тварин – це розчини електролітів, яким належить важлива роль у підтримці осмотичного тиску кислотно-лужної рівноваги організму.

Переважаючими катіонами при цьому є натрій і калій, а аніонами – хлор і бікарбонат. Нормальна життєдіяльність організму (дихання, обмін речовин, кровотворення, робота нервової системи та ін.) можлива тільки при відносно постійному сольовому складі тіла. Мінеральні речовини умовно ділять на дві групи: макро- і мікроелементи. Макроелементи (калій, натрій, кальцій, магній, фосфор, хлор, залізо та ін.) містяться у достатньо великих кількостях, а мікроелементи (мідь, марганець, цинк, кобальт, йод, золото, молібден, фтор та ін.) містяться в організмі у незначних кількостях, але дуже важливі для протікання багатьох біохімічних процесів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

“ХІМІЧНЙЙ СКЛАД ОРГАНІЗМУ”

Мета заняття: вивчити хімічний склад організму людини.

План заняття

1.Ознайомити студентів з правилами техніки безпеки при роботі у біохімічній лабораторії.

2.Ознайомити студентів з засобами першої допомоги при нещасних випадках, що трапляються при роботі в біохімічній лабораторії.

3. Визначити наявність вуглецю в органічних тканинах.

4. Визначити вміст азоту і сірки у тканинах організму людини.

5. Виявити вміст кальцію і фосфору в соляно-кислій витяжці з кістки.

1. Визначення наявності вуглецю в органічних тканинах.

Вуглець виявляється за потемнінням тканин при спалюванні органічних сполук концентрованою сірчаною кислотою.

Об'єкт дослідження: 1. Яєчний білок;
2. Сало;
3. Глюкоза.

Обладнання і посуд: чашки порцелянові.

Реактиви: сірчана кислота (концентрована).

Техніка виконання роботи

В одну порцелянову чашку кладуть шматок яєчного білку, в другу – сало, в третю – глюкозу. До кожного продукту додають по 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Спостерігають швидкість зміни забарвлення продуктів.

2. Визначення вмісту азоту і сірки у тканинах організму людини.

Азот визначають у вигляді аміаку, що утворюється під дією лугів на тканини при нагріванні. Внаслідок летючості NH_3 виявляють за запахом, а також за посинінням червоного лакмусового папірця, який вводять у випари, що виділяються при нагріванні суміші у пробірці.

Наявність сірки виявляють за допомогою плюмбіту натрію, з яким при нагріванні вона утворює чорний осад PbS

Об'єкт дослідження:1. Ніготь;
2. Світле волосся.

Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Нагрівальний прилад.

Реактиви; 1. Гідроксид натрію, 10 %-й розчин;
2. Плюмбіт натрію (утворюється при додаванні до 0,5 %-го розчину оцтовокислого свинцю 20 %-го розчину гідроксиду натрію до розчинення осаду гідрату окису свинцю);
3. Червоний лакмусовий папірець.

Техніка виконання роботи

А. Визначення вмісту азоту в тканинах

До однієї пробірки кладуть кусочок нігтя, до другої – світле волосся, у кожну додають по 1…2 мл розчину NaOH і кип'ятять. До отвору пробірки притуляють лакмусовий папірець. Слідкують, чи з’явився запах аміаку, а також чи змінився колір лакмусового папірця.

Б. Визначення вмісту сірки в тканинах (Реакція Фоля)

У пробірки з нігтем і волосиною добавляють по 1 мл плюмбіту натрію і нагрівають. Спостерігають зміну забарвлення.

3. Виявлення кальцію і фосфору в солянокислій витяжці з кістки.

Об'єкт дослідження: солянокисла витяжка з кістки – кістка витримана в 0,5%-ному розчині HCI.

Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Щавелевокислий амоній, 4 %-ний розчин;
2. Молібденовий реактив (до 7,5 %-го водного розчину молібденовокислого амонію добавляють рівний об'єм 32 %-го HNOз).

Техніка виконання роботи

А. Виявлення кальцію

У пробірку наливають 1 мл солянокислої витяжки з кістки, додають рівний об'єм щавелевокислого амонію. Спостерігають зміну прозорості розчину.

Б. Виявлення фосфору

У пробірку наливають I мл витяжки з кістки, додають рівний об'єм молібденового реактиву і нагрівають. Спостерігають появу жовтого осаду.

Контрольні запитання

1. Які елементи входять до складу живої матерії в найбільшій кількості?
2. Що є джерелом пластичних і енергетичних ресурсів організму?
3. Які системи забезпечують можливість пристосування організму до зовнішнього середовища?
4. Які тканини багаті на сірку?

ЗАНЯТТЯ 2

Тема 2. ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКИСЛОТ

Білки – це хімічний субстрат життя. Вони являють собою високомолекулярні сполуки різноманітної будови,що складаються із залишків амінокислот.

Всі прояви життєдіяльності – подразнення, травлення, рух, розмноження та інші – пов'язані з білками, вони є незамінними структурними компонентами організму людини, тварин, рослин, мікроорганізмів.

За джерело білків, що входять до складу клітин організму людини, правлять протеїни їжі. Вони перетравлюються в шлунково-кишковому тракті, перетворюючись на амінокислоти, з яких у тканинах утворюються власні білки з різними функціями: каталітичною (ферменти), захисною (імунні сполуки, антитіла та ін.), інформаційною, регуляторною (ряд гормонів), репродуктивною (разом з нуклеїновими кислотами), транспортною. Вони також беруть участь у багатьох інших життєво важливих процесах.

Незважаючи на свою різноманітність, білки мають приблизно однаковий хімічний склад. Азот – обов'язковий хімічний елемент у складі білка, його вміст близько 15... 18 % від усієї маси білка. Тому за кількістю азоту, визначеною з кінцевих продуктів розпаду речовин, які виділились із організму, можна робити висновок щодо інтенсивності обміну білків.

Протеїни здатні на високу реакційну активність і можуть з'єднуватися з багатьма речовинами за рахунок електростатичних сил, ковалентних, водневих та інших зв'язків, тому що містять у своєму складі різноманітні полярні і неполярні групи. В залежності від просторового розташування та їх кількості, взаємовпливу сусідніх груп, вони виявляють підвищену або знижену активність порівняно з реакційною здатністю низькомолекулярних сполук.

Таким чином, у білках завдяки великому розміру їх молекул і складності конфігурації, унікальної для кожного протеїна, виникають нові якості, невластиві окремим компонентам, з яких складаються ці полімери.

До складу харчових білків входить більше 20-х різних амінокислот. Спільним в їх будові є наявність аміногруп в α-позиції (рідким винятком є β-амінокислоти).

У залежності від pH-середовища амінокислоти можуть бути у формі аніонів, катіонів, електронейтральних біполярних іонів або у вигляді суміші цих форм з домінуванням однієї з них. У сильнокислих розчинах амінокислоти присутні у вигляді позитивних іонів, а у лужних – у вигляді негативних іонів, тобто розчини амінокислот являють собою амфотерні електроліти.

Наявність в амінокислотах аміно- і карбоксигруп зумовлює їхні буферні властивості, тобто в залежності від складу розчину вони можуть утворювати різні солі, реагуючи як з кислотами, так і з лугами.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

“ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ АМІНОКІСЛОТ”

Мета заняття: вивчити загальні властивості амінокислот.

План заняття

1. Визначити наявність ά-аміногруп в амінокислотах за допомогою азотистокислого натрію та оцтової кислоти.
2. Визначити наявність ά-аміногруп в амінокислотах (по нінгідрину).
3. Визначити буферні властивості амінокислот.
4. Виявити пептидний зв’язок між амінокислотами.

1. *Визначення наявності аміногрупи в амінокислотах за допомогою азотистокислого натрію та оцтової кислоти*

Об'єкт дослідження: будь-яка амінокислота (5 %-й розчин) або гідролізат якого-небудь білка (10 %-й розчин).

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 2 мл.

Реактиви: 1. Азотистокислий натрій, 3 %-й розчин;
2. Оцтова кислота концентрована (льодяна) або H_2SO_4 1,5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В одну пробірку наливають 1 мл розчину, що досліджується (амінокислота або білок). У другу – стільки ж води (контрольна проба). В обидві пробірки доливають рівний об'єм азотистокислого натрію і по 1 мл оцтової або сірчаної кислоти. Суміш струшують. Порівнюють інтенсивність утворення бульбашок із газоподібного азоту в обох пробірках - (поодинокі бульбашки газу в контрольній пробі – це окиси азоту, що утворюються в результаті руйнування азотистої кислоти).

2. Дослідження наявності α- аміногрупи в амінокислотах

Реакцією α-аміногрупи, що характерна та частіше всього застосовується, є нінгідрінова реакція (для точного визначення зовсім незначних концентрацій амінокислот). Усі амінокислоти і пептиди, що містять α-аміногрупу, дають з нінгідрином синє забарвлення

Об'єкт дослідження: будь-яка амінокислота (5 %-й розчин) або гідролізат білка (10 %-й розчин).

Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Штатив з пробірками;
3. Крапельниці.

Реактиви: нінгідрін, 0,2 % - й спиртовий розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл розчину, що досліджується, додають 1 мл нінгідрину. Суміш нагрівають до кипіння і дають остигнути. Спостерігають появу забарвлення.

3.Визначення буферних властивостей амінокислот

Буферні властивості амінокислот визначають шляхом співставлення кількості лугу або кислоти, які треба додати до розчину цих речовин і до води, щоб змінити реакцію середовища на лужну або, відповідно, на кислу. Обидві рідини мають близькі вихідні значення pH. З метою визначити, як змінюється цей показник у лужну сторону використовують за індикатор фенолфталеїн, який набуває червоного забарвлення при pH 8,3..10. Зміна реакції середовища на кислу визначається за допомогою метилоранжу, для якого зона переходу жовтого забарвлення в нейтральному і слабкокислому середовищі на оранжеве відбувається при pH 3,1...4,4.

Об'єкт дослідження: розчин будь-якої амінокислоти або гідролізату білків.

Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки на 2 мл з поділками.

Реактиви: 1. Гідрооксид натрію, 0,05 н розчин;
2. Соляна кислота 0,05 н розчин;
3. Фенолфталеїн, 0,1 %-й розчин у 50 %-му спиртовому розчині;
4. Метилоранж, 0,1 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки наливають по 2 мл розчину амінокислоти або гідролізату білків, у дві інші – по 2 мл води. В одну пробірку з джерелом амінокислот і в одну з водою доливають по 1-2 краплі фенолфталеїну, після чого з допомогою NaOH доводять реакцію до слабколужної. Спостерігають, який об'єм лугу витрачений у кожній пробі для зміни pH на лужну.

До решти пробірок наливають по 1-й краплі метилоранжу і титрують HCl до появи оранжевого забарвлення. Відзначають, скільки витрачено HCl для зміни pH.

4. Виявлення пептидного зв 'язку між амінокислотами

В молекулах білків усі амінокислоти зв'язані пептидним зв'язком (первинна структура протеїнів). Пептидний зв'язок виявляється за допомогою біуретової реакції Піотровського по утворенню фіолетово-червоної сполуки груп - CO–OH - з міддю в сильно-лужному середовищі.

Об'єкт дослідження: 1. Яєчний білок, 1 % - й розчин;
2. Молоко;
3. Желатин, 1 %-й розчин;
4 Глікоколь, 1 %-й розчин.

Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетка на 1 мл;
3. Крапельниці.

Реактиви: 1. Гідрооксид натрію, 10 % - й розчин;
2. Мідь сірчанокисла, 5 % - й розчин.

Техніка виконання роботи

В одну пробірку наливають 1 мл розчину яєчного білка, другу - стільки ж молока, у третю - желатину, у четверту - глікоколю. До кожної пробірки доливають рівний об'єм гідроксиду натрію, перемішують і додають по 1мл краплі розчину сірчанокислої міді. Слід уникати надміру $CuSO_4$, синій колір якого буде маскувати фіолетово-червоне забарвлення, яке свідчить про наявність пептидних зв'язків. Визначають зміну забарвлення в кожній пробірці.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

“КІЛЬКІСНЕ ТА ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТ ФОРМОЛЬНИМ ТИТРУВАННЯМ”

Мета заняття: вивчити кількісне та якісне визначення амінокислот за методом формольного титрування.

План заняття

1.Виявити наявність карбоксильної групи у амінокислотах за методом Серенса (якісне визначення).

2.Виконати кількісне визначення ά-аміногруп формольним титруванням.

1. *Виявлення карбоксильної групи у амінокислотах (формольоване титрування) методом Серенса (якісне визначення).*

Наявність карбоксильної групи в амінокислотах виявляють методом, запропонованим Серенсом, згідно з яким аміногрупи зв'язуються формальдегідом. Внаслідок дії цього реактиву на амінокислоту виявляються кислотні властивості карбоксильної групи.

Для впливу на амінокислоти формальдегід повинен мати нейтральну реакцію. Тому його нейтралізують перед дослідженням слабким розчином гідроксиду натрію використовуючи як індикатор фенолфталеїн. Аналогічним чином реакцію амінокислоти або гідролізату білків, що досліджуються, доводять до слабко-лужної реакції за фенолфталеїном.

Після поєднання обох рідин можна спостерігати зникнення забарвлення внаслідок визволення карбоксильної групи від взаємодії з аміногрупою, що була зв'язана з формальдегідом.

Якщо відтитрувати кількість іонів водню в пробі розчином NaOH, можна кількісно визначити вільні аміногрупи. Цей метод як і реакція Ван-Сляйка, застосовується для дослідження ходу гідролізу білків.

Об'єкт дослідження: розчин будь-якої амінокислоти або гідролізат білка.
Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки на 1...2 мл.
Реактиви: 1. Формальдегід, 5 % - й розчин;
2. Гідроксид натрію, 0,05 н розчин;
3. Фенолфталеїн, 0,1 % - й розчин у 50 % - му етанолі.

Техніка виконання роботи

В одну пробірку наливають 1 мл розчину амінокислоти або гідролізату білка, у другу – стільки ж формальдегіду. До кожної пробірки доливають по 1...2 краплі фенолфталеїну і нейтралізують зміст, додаючи по краплинах NaOH до слабко-рожевого забарвлення. Вміст однієї пробірки переливають до другої. Спостерігають зміну забарвлення.

2. Кількісне визначення ά-аміногруп формольним титруванням

Кількісне визначення α-аміногруп можливо виконати одночасно з визначенням карбоксильних груп титруванням, тому що кількість карбоксильних груп еквівалентна кількості пов'язаних з формальдегідом α-аміногруп.

Об'єкт дослідження: розчин будь-якої амінокислоти або гідролізат білка.
Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки на 1; 5; 10 мл;
3. Колби на 100 мл;
4. Мірні циліндри.
Реактиви: 1. Формальдегід, 5 % -й розчин;
2. Гідрооксид натрію, 0,05 н розчин;
3. Фенолфталеїн, 0,1 % -й розчин у 50 % - му етанолі;
4. Дистильована вода;
5. Формольна суміш.

Техніка виконання роботи

Готують дві колби об'ємом 100 мл. До однієї вносять 40 мл розчину, який досліджується, до другої – 40 мл дистильованої води. Додають по 10 крапель розчину фенолфталеїну та розчин 0,05 н NaOH до появи ледве помітного рожевого кольору. Потім до обох колб додають по 10 мл формольної суміші та титрують з бюретки розчином гідроксида натрія до появи ледь помітного рожевого забарвлення. Колір контролю та розчину, який досліджується, повинен бути однаковим.

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

$$C = (A-B)fQ/V,$$

де А і В – об'єми розчину гідроксида натрія, що пішов на титрування проби та контролю відповідно (мл);

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину гідроксида натрія;

Q – маса амінокислот, що еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину гідроксида натрія (0,7 мг);

V – об'єм розчину амінокислоти, що був взятий для аналізу.

Контрольні запитання

1. Яка роль білків в організації і функціях живої матерії ?
2. Чим відрізняється елементарний склад білків від інших органічних речовин, що містяться в клітинах організму ?
3. Які є структурні одиниці білків, що зумовлюють їх різноманітність ?
4. Які функціональні групи характерні для всіх амінокислот ?
5. Чим зумовлено буферні властивості амінокислот ?
6. Який тип зв'язку між амінокислотами є характерним для білків ?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

„КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ"

Мета заняття: вивчити кольорові реакції на амінокислоти.

План заняття

1.Виявити наявність тирозину у складі різних білків за допомогою ксантопротеїнової реакції.

2.Виявити наявність триптофану у складі білків за допомогою реакції Адамкевича.

3.Визначити наявність метіоніну у складі білків.

4.Виявити наявність гістідіну за допомогою реакції Ерліха.

Присутність білка можна виявити рядом кольорових реакцій. Ці реакції зумовлені наявністтю в молекулі білка тієї чи іншої амінокислоти або хімічного групування, яке вони утворюють. Тому кольорові реакції на білки використовують для доказу білкової природи речовини, вивчення амінокислотного складу різних природних білків і кількісного визначення в білках тієї чи іншої амінокислоти.

1.Виявлення тирозину у складі різних білків (ксантопротеїнова реакція).

Білки при нагріванні з міцною азотною кислотою дають жовте забарвлення. Реакція зумовлена наявністю в білку ароматичних амінокислот, які зазнають нітрування азотною кислотою. Ці нітропохідні амінокислоти забарвлені у жовтий, а у лужному середовищі – в оранжевий колір (солі хіноїдної структури).

Об'єкт дослідження: 1. Гідролізат білка;
2. Желатин, 1 %-й розчин.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2.Піпетки;
3. Крапельниці;
4. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. HNOз концентрована;
2. NaOH, 30 % - й розчин.

Техніка виконання роботи

В одну пробірку вносять 0,5 мл розчину яєчного білка, у другу – 0,5 мл желатину. Добавляють по 0,5 мл концентрованої HNOз і обережно (!) нагрівають. У разі появи жовтого забарвлення суміш охолоджують і додають розчин 30 %-й NaOH по краплинах до появи помаранчевого забарвлення.

2.Виявлення триптофану в складі білків (реакція Адамкевича).

При додаванні до нерозбавленого білка незначної кількості гліоксилової кислоти в присутності концентрованої H_2SO_4 з'являється червоно-фіолетове забарвлення, зумовлене здібністю триптофану в кислому середовищі взаємодіяти з альдегідами, даючи забарвлені продукти конденсації червоно-фіолетового кольору. Як джерело гліоксилової кислоти можна використати льодяну оцтову, в якій гліоксилова кислота завжди присутня в невеликій кількості.

Об'єкт дослідження: 1. Яєчний білок нерозбавлений або сироватка крові;
2. Желатин, 1 %-й розчин.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Крапельниці;
3. Піпетки;
4. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Концентрована оцтова кислота;
2. H_2SO_4 концентрована.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки вносять по 0,5 мл нерозбавленого яєчного білка (або сироватки крові) і розчину желатину. Добавляють до кожної по 0,5 мл концентрованої оцтової кислоти (діє, як водоотбираюча речовина), злегка нагрівають. Після охолодження по стінці доливають 1 мл концентрованої H_2SO_4. Спостерігають появу червоно-фіолетового кільця при наявності триптофану.

3.Виявлення наявності метіонину у складі білків

Метіонин є важливим джерелом лабільних метільних груп. Вони потрібні для синтезу ацетілхоліну, адреналіну, креатіну та інших біологічно активних речовин. Метіонин відіграє важливу роль в обміні ліпідів, тобто стимулює їхнє окислення і, як слідство, - зменшення кількості ліпідів у тканинах. Тому харчові джерела метіонину необхідні при захворюваннях печінки, при пошкодженому жировому обміні, при контакті з пошкоджуючими факторами.

При нагріванні метіонину з концентрованими лугами він руйнується з утворенням Na_2S. При додаванні до нього оцтовокислого свинцю утворюється PbS чорного кольору.

Об'єкт дослідження: 1. Яєчний білок, 10 %-й розчин;
2. Желатин, 1 %-й розчин.
Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Їдкий натрій, 30% - й розчин;
2. Оцтовокислий свинець, 5% - й розчин.

Техніка виконання роботи

У першу пробірку наливають 1 мл яєчного білка, у другу – 1 мл розчину желатину. У кожну пробірку додають по 5 крапель 30 %-го NaOH і по 0,5 мл 5 %-го розчину $(CH_3COO)_2PB$. Обидві проби нагрівають і спостерігають утворювання чорного осаду PbS при наявності в складі білку амінокислот, що містять сірку.

4.Реакція Ерліха на гістідін

При змішуванні розчину № 1 (сульфанілова кислота в HC1) з розчином № 2 ($NaNO_2$, водний розчин) і аміака утворюється діазобензолсульфонова кислота, яка з гістідіном дає вишнево-червоне забарвлення.

Об'єкт дослідження: 1. Яєчний білок нерозбавлений;
2. Желатин ,1 %-розчин.
Обладнання і посуд: Штатив з пробірками.
Реактиви: 1. Розчин №1 (сульфанілова кислота в HCI);
2. Розчин №2 ($NaNO_2$, водний розчин);
2. NaOH – 30 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У першу пробірку наливають 1 мл яєчного білка, у другу – 1 мл розчину желатину. В обидві пробірки додають по 1 мл реактиву № 1, по 2...3 краплі реактиву № 2 і NaOH – 30 %-й до лужної реакції. Спостерігають зміну забарвлення.

Тема 3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ

Амінокислоти, з'єднуючись між собою пептидними зв'язками утворюють молекули білків великої маси. Природа амінокислот, послідовність їх сполучення в поліпептидних ланцюгах визначають первинну структуру білків.

При взаємодії активних груп амінокислот, що містяться в поліпептидному ланцюзі, з'являються вторинна, третинна, четвертинна структури білків.

Велика роль в організації вищих рівней структур білків належить водневим зв'язкам, що виникають між двома електронегативними атомами. Без огляду на те, що кожний з них є слабким, ефективність водневих зв'язків зумовлюється їхньою чисельністю, завдяки чому підсилюється дія скооперованості.

Від структури білків залежать їхні хімічні, фізичні і біологічні властивості. У природних нативних білках багато реакційноздатних груп екрановані, зв'язані і не проявляють активності. Функціональні властивості інших хімічних груп у поліпептидних ланцюгах білків можуть бути підсилені.

Після порушення нативності молекули, розриву зв'язків між поліпептидними ланцюгами, їх розгортання і внаслідок цього – безладної укладки в просторі з'являються нові реакційноздатні групи.

У результаті біологічна активність білків втрачається або змінюється її характер, хоча первинна структура не руйнується. Такий процес називається *денатурацією*.

Схильність білків до зміни конформації пов'язана з великим розміром їх молекул, внаслідок чого у них з'являються поверхневоактивні властивості на межі з частинками розчинника. Прагнення вільної поверхневої енергії до мінімуму зумовлює нестійкість білкових молекул, вони легко коагулюють, у результаті чого їхня сумарна поверхня зменшується.

При коагуляції може статися зворотна зміна конформації білкових молекул: при дії сильних агентів вона зворотно змінюється інколи і без коагуляції. Таким чином, денатурація стає зворотною.

У клітинах стійкість розчинів білків підтримується рядом факторів, серед яких важлива роль належить наявності одноіменного сумарного заряду в молекулі, взаємодії їх іонізованих ділянок з диполями води, сорбційним процесам, наявності захисних речовин.

Дії, що призводять до нейтралізації зарядів, зняттю водної оболонки або захисних колоїдів, зумовлюють денатурацію. Таку зміну молекул білків викликають сильні кислоти, луги, солі важких металів, алкалоїдні реактиви, органічні розчинники, детергенти, промениста енергія, іонізуюча радіація, нагрівання розчинів білків до температури, вищої за 60° С. Денатуруючий ефект на білки чинять сильне струшування, перемішування, внаслідок утворення піни. На поверхневих плівках її бульбашок відбувається зворотна зміна конформації молекул протеїнів

Зворотну коагуляцію білків зумовлюють солі лужних металів. На підприємствах харчування для денатурації білків, що містяться у харчових продуктах, частіше за все використовують нагрівання до температури, вищої за 60...80 ^{0}С. Прискорення теплового руху молекул білків викликає розрив водневих зв'язків між поліпептидними ланцюгами, в результаті чого змінюється конформація.

Для денатурації білків застосовують також збивання, наприклад, яєчного білка, дію оцтової кислоти (наприклад, при маринуванні).

Завдяки цим способам кулінарної обробки покращується доступність пептидних зв'язків для ферментів травлення, що містяться в харчотравних соках, а також відбувається знешкодження їжі (руйнування білків мікроорганізмів).

Захисну дію на молекули білків чинять ліпіди, концентровані розчини сахарів. Так, оскільки жовток яйця багатий на ліпіди, він перешкоджає одержанню доброї піни при збиванні білка.

Великі молекули білків можна відділити від менших частинок методом діалізу, використовуючи мембрани з незначними порами, через які крупні молекули не проходять. Так відділяють білки від продуктів їх розщеплення і від інших речовин з невеликими молекулами.

В ролі мембран використовують колоїдні целофанові плівки, стінки тонкої кишки та інші матеріали. З них виготовляють мішечки або натягують плівки на посудину без днища.

Усередині мембрани розміщують суміш речовин з різною молекулярною масою. Мішечок або посуд із плівкою занурюють у дистильовану воду або буферний розчин. Поступово дрібні молекули дифундують у зовнішнє середовище, а великі білкові частинки залишаться усередині. Змінюючи зовнішнє середовище, можна цілком відокремити білки від домішок, які складаються з молекул, невеликих за розміром.

Діаліз використовують при дослідженні перетравлення білків травними ферментами.

А.А.Покровський та І.Д. Ертанов створили прилад "штучний шлунок", в якому імітується процес видалення продуктів перетравлення білків (протягом дії травних соків) у розташовані нижче відділи шлунково-кишкового тракту. Утворені в результаті гідролізу альбумози, пептони, пептиди, амінокислоти мають молекули, менші за розміром, ніж білки, і можуть бути виведені за допомогою діаліазу зі сфери дії ферментів, активність яких може гальмуватися наведеними продуктами травлення.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

“ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ”

Мета заняття: вивчити фізико-хімічні властивості білків.

План заняття

1.Визначити вплив азотної кислоти на розчин білку.
2.Провести осадження білків органічними кислотами.
3.Осадити білки іонами важких металів.
4.Провести осадження білків органічними розчинниками.
5.Осадити білки хлоридом натрію.
6.Провести висолювання білків сірчанокислим амонієм.

І. Визначення впливу азотної кислоти на розчини білків.

Об'єкт дослідження: яєчний білок, 10 %-й розчин;
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 1...2 мл;
3. Крапельниця.
Реактиви: Азотна кислота 30 %, приготовлена на насиченому розчині хлористого натрію.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл азотної кислоти і під кутом 45° обережно по стіниці приливають піпеткою розчин білка. На межі обох рідин з'являється біле кільце коагульованого білка.

До суміші кислоти і білка додають воду і впевнюються в незворотності осаджування. Виявлено, що біле кільце на межі кислоти і розчину білка з'являється при його концентрації 0,0033 %. Даний метод використовується для кількісного визначення білка в сечі. Якщо в ній виявлено білок, то цю рідину розбавляють до найменшої концентрації, при якій кільце утворюється. Помножуючи 0,0033 % на розбавлення, знаходять кількість білка в сечі.

2.Осадження білків органічними кислотами.

Об'єкт дослідження: яєчний білок, 10 %-й розчин.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 1...2 мл;

3. Крапельниці.

Реактиви: 1. Трихлороцтова кислота, 10 %-й розчин;
2. Сульфосаліцилова кислота, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. В першу додають 1 мл розчину трихлороцтової кислоти, в другу – 1 мл розчину сульфосаліцилової кислоти. В обох пробах спостерігають появу осаду білку.

3.Осадження білків іонами важких металів

Об'єкт дослідження: гідролізат білка.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 1... 2 мл;
3. Крапельниці.

Реактиви: 1. $CuSO_4$, 5 %-й розчин;
2. Ацетат свинцю, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. В першу додають 1 мл розчину сірчанокислої міді, в другу – 1 мл ацетата свинцю. Спостерігають утворення осаду: в першій пробірці – блакитного кольору, в другій – білого кольору. При додаванні надлишка розчинів сульфата міді та ацетата свинцю спостерігають зникнення осаду внаслідок його розчинення.

4. Осадження білків органічними розчинами.

Об'єкт дослідження: гідролізат білка.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 1 ...2 мл;
3. Крапельниці.

Реактиви: 1. Етиловий спирт, 96 %-й ;
2. Ацетон, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки вносять по 1 мл яєчного білка. У першу додають 1 мл розчину етилового спирту, у другу – 1 мл розчину ацетону. Спостерігають помутніння розчинів.

5. *Осадження білків хлоридом натрію.*

Об'єкт дослідження: гідролізат білка.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки на 1...2 мл;
3. Крапельниці.

Реактиви: 1. Хлорид натрію;
2. Оцтова кислота, концентрована.

Техніка виконання роботи

У пробірку вносять 3 мл розчину яєчного білка та хлорид натрію до повного насичення. Спостерігають випадіння в осад глобулінів. Суміш фільтрують крізь паперовий фільтр. У фільтраті будуть альбуміни. Якщо до фільтрату додати 1 мл розчину оцтової кислоти і нагріти суміш до кіпіння на водяній бані, то альбуміни випадуть в осад.

6. Висолювання білків сірчанокислим амонієм.

При дії насиченого розчину сірчанокислого амонію відбувається дегідратація молекул білків і вони коагулюють, оскільки знижується захисна оболонка, яка складається з диполів води. Після розведення водою суміші білків і сірчанокислого амонію знову утворюється їх розчин. Осаджування різних білків починається при неоднаковій концентрації сірчанокислого амонію, а альбумінів – при повному насиченні ним. За допомогою висолювання можна розділити суміш різних білків.

Об'єкт дослідження: гідролізат білка.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Воронки;
3. Піпетка на 2 мл;
4. Фільтри.

Реактиви: 1. Сірчанокислий амоній, насичений розчин;
2. Сірчанокислий амоній, кристалевий.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл розчину яєчного білка, доливають рівний об'єм насиченого розчину сірчанокислого амонію. Потім до розчину додають кристалевий сірчанокислий амоній до появи мутності.. Енергійно струшують пробірку для розчинення солі. Переконавшись в коагуляції альбумінів, додають воду і спостерігають, чи станеться розчинення осаду.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

„ДОСЛІДЖЕННЯ БІЛКІВ МОЛОКА"

Мета заняття: провести вивчення біохімічного складу молока, у тому числі наявність домішок.

План заняття

1.Провести осадження казеїну за допомогою хлористого кальцію.

2.Осадити білки молока ацетоном.

3.Визначити наявність перекису водню у молоці.

4.Визначити у молоці присутність формальдегіду.

5.Виявити присутність хлору у молоці.

6.Провести визначення казеїну методом формольного титрування.

1.Осадження казеїну.

До складу молока входять різні білки: казеїни, лактоглобуліни. альбуміни. За кількістю переважає казеїн. У нейтральному середовищі вони не коагулюють при кип'ятінні, хоча і денатурують. Осадження казеїнів відбувається під впливом молочної кислоти, що утворюється під дією мікроорганізмів у процесі скисання молока. При коагуляції білків молока хлористим кальцієм в осад переходять усі їх фракції. Такий метод використовують, коли готують прісний сир з молока для дітей на молочних кухнях, а також білок молочний харчовий з пахти (відходи, що залишаються при виготовлені масла). Ці продукти в 4…5 разів багатші на кальцій та фосфор, ніж кисломолочний сир.

Об'єкт дослідження: молоко.

Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Штатив із пробірками;
3.Крапельниця.

Реактиви: кальцій хлористий, 10 % - й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають близько 2 мл молока і доводять його до кипіння, потім додають 5...6 крапель хлористого кальцію, спостерігаюь появу осаду.

2. Осадження білків молока ацетоном (використовується для вивчення свіжості молока)

Ацетон у нерозбавленому вигляді, визиваючи дегідратацію білків, осаджує їх із розчину. Наполовину розбавлений ацетон не викликає коагуляції білків молока. У разі накопичення в молоці кислот стійкість білків почне знижуватись і додавання 50 %-го розчину ацетону викликає їх коагуляцію. Це відбувається при такій кількості кислот у молоці, яка ще не відчувається на смак. Проба з ацетоном використовується для визначення свіжості молока, що особливо важливо для підприємств харчування, які обслуговують дітей, а також для дієтичних їдалень.

Об'єкт дослідження: молоко свіже.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Мірні циліндри на 10 мл.

Реактиви; 1. Ацетон, 50 %-й розчин;
2. Буфер, pH якого дорівнює 5,0 (змішують 10.3 мл 0,2 М розчину $Na_2HP0_4 \bullet 2H_2O$ із 9,70 мл 0,1 М лимонної кислоти $C_6H_8O_7$).
3. Папір індикаторний універсальний.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки наливають по 1 мл молока, в одну з них додають рівний об'єм лимоннокислого буфера, доводячи pH суміші до 5,0 (контролюють за допомогою індикаторного папірця). Струшуючи цю пробірку, переконуються у відсутності на стінках коагулянту (крихти на стінках пробірки). Потім в обидві пробірки доливають по 1 мл ацетону, енергійно струшують, спостерігають появу згустків на стінках пробірки.

3.Визначення наявності перекису водню у молоці.

Об’єкт дослідження: молоко свіже.
Обладнання і посуд: штатив з пробірками;
Реактиви: 1. H_2SO_4 розчин 1:3;
2.Крохмальний розчин KI (3 г KI та 3г крохмалю у 100 мл води).

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 2 мл молока,не перемішують; додають 1 мл розчину сірчаної кислоти і 0,2 мл крохмального розчину. Через 10 хвилин спостерігають за зміною кольору розчину у пробірці, не струшуючи її. Поява у пробирці окремих плям синього кольору засвідчує про присутність перекису водню у молоці.

4. Реакція на присутність формальдегіда у молоці.

Об’єкт дослідження: молоко свіже.
Обладнання і посуд: штатив із пробірками.
Реактиви: 1.Сірчана кислота (ρ=1,82);
2.Азотна кислота (ρ=1,3).

Техніка виконання роботи

До 1 мл розчину (100 мл H_2SO_4 і одна крапля HNO_3), обережно по стінці приливають таку ж кількість молока. При додаванні молока пробірку треба тримати у наклонному положенні так, щоб рідина не змішувалась, а один шар накладався на другий. При наявності формальдегіду через 1…2 хвилини з’являється фіолетове або темно-синє кільце.

5. Реакція на присутність хлору в молоці.

Об’єкт дослідження: молоко свіже.
Обладнання і посуд: 1. Колби на 50 мл;
2. Мірні циліндри.
Реактиви: 1. Йодид калію, 5%-й розчин;
2. Розчин крохмалю, 2 %-й розчин;
3. Соляна кислота, концентрована.

Техніка виконання роботи

До 10 мл молока приливають у колбу 1 мл 5 % розчину KI і 1 мл свіжеприготованого 2 % розчину крохмалю, перемішують, доливають 10 мл концентрованої соляної кислоти і перемішують.

Якщо у молоці присутній хлор, через 5…10 хвилин у колбі з ’являється синє забарвлення рідини.

6. Визначення казеїну формольним титруванням.

Об’єкт дослідження: молоко свіже.

Обладнання і посуд: 1. Конічна колба на 100мл;
2. Бюретка на 25-50 мл;
3. Воронки;
4. Мірні циліндри.

Реактиви: 1. Фенолфталеїн 1 %-й розчин;
2. Гідроксид натрію, 0,1 н розчин;
3. Формалін, 40 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В конічну колбу відмірюють циліндром 10 мл молока, додають 5 крапель розчину фенолфталеїну і з бюретки обережно титрують 0,1 н розчином лугу, увесь час перемішуючи рідину до появи незникаючого протягом хвилини слабо-рожевого забарвлення. Потім у рідину приливають 2 мл попередньо нейтралізованого розчину формаліну і, коли рідина почне обезбарвлюватися, знову продовжують обережно титрувати з тієї ж бюретки до появи слабо-рожевого забарвлення, не зникаючого протягом 1 хвилини. Рівень лугу у бюретці записують і по різниці з першим титруванням визначають кількість лугу, який пішов на друге титрування. Отриману цифру помножують на 1,47 і знаходять відсотковий вміст казеїну у молоці, а при помноженні на 1,94 визначають загальну кількість білка у молоці

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

„ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ РОЗЧИНІВ БІЛКІВ”

Мета заняття: визначити ізоелектричну точку білкового трозчину на іономері, опанувати навичками роботи на іономері.

План заняття

1.Ознайомитись з правилами проведення вимірів на іономері.

2.Провести визначення ізоелектричної точки розчину желатину при різних співвідношеннях компонентів в реакційній суміші.

1. Визначення ізоелектричної точки на іономері.

Об'єкт дослідження: желатин, 1 %-й розчин.
Обладнання і посуд: 1. Іономер;
2.Хімічні стакани на 50 мл;
3. Мірні циліндри.
Реактиви: 1. Оцтова кислота 0,1 моль/л;
2. Ацетат натрію 0,1 моль/л.

Техніка виконання роботи

У шість склянок відмірюють відповідну кількість (мл) розчину оцтової кислоти, ацетату натрію, дистильованої води та гідралізату білка (табл.1). Вміст кожної склянки перемішують, потім повільно доливають у всі склянки по 10 мл спирту (або ацетону). Через 30 хвилин визначають ізоелектричну точку. Вона буде відповідати pH склянки з найбільшим ступенем помутніння розчину.

Співвідношення компонентів реакційної суміші (мл) для визначення pH при виявленні ізоелектричної точки желатину.

Таблиця 1

Вода, мл	**CH_3COOH (0,1 моль/л)**	**CH_3COOH (1 моль/л)**	**CH_3COONa (0,1 моль/л)**	**Розчин гідролізату білка (1 %-ний)**	**pH середовище**
19	4	-	10	10	
17,5	2,5	-	10	10	
15	5	-	10	10	
10,0	10	-	10	10	
–	20	-	10	10	
16	-	4	10	10	

pH найбільш помутнілої суміші відповідає ізоелектричній точці гідролізату білка.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

„ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ БІЛКІВ ЗА БІУРЕТОВОЮ РЕАКЦІЄЮ"

Мета заняття: визначити кількість білків за біуретовою реакцією, опанування навичками роботи на фотоелектроколориметрі.

План заняття

1.Ознайомитись з технікою проведення вимірювань на фотоелектроколориметрі у розчинах, що досліджуються.

2.Побудувати калібровочний графік по сивороточному альбуміну.

3.Визначити кількість білків за біуретовою реакцією на фотоелектроколориметрі.

Методика грунтується на утворенні забарвленого у фіолетовий колір комплексу у наслідок взаємодії пептидних зв'язків білків з іонами двухвалентної міді у лужному середовищі. Однак визначенню білків за цією методикою заважає присутність солей амонію.

Об'єкт дослідження: білковий розчин № 1, № 2.

Обладнання і посуд: 1. Фотоелектроколориметр;
2. Мірні циліндри;
3. Мікропіпетки 0,1 мл.

Реактиви: 1. Біуретовий реактив;
2. Хлорид натрію, 0,9 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В першу пробірку (контрольну) вносять 0,1 мл 0,9 % розчину хлориду натрію та 5 мл біуретового реактиву. У другу пробірку вносять 0,1 мл білкового розчину та 5 мл біуретового реактиву, перемішують та витримують при кімнатній температурі 30 хвилин. Заміряють оптичну плотність розчину на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм. Кількість білка у розчині визначають за калібровочним графіком, який будують по стандартному розчину сироваточного альбуміну, вміст в 1 мл – 10 мг білка.

Виготовлення калібровочної кривої

Із розчину білка (100 г\л-10 г %) готують робочі розчини альбуміна 20, 40, 60, 80 г\л (2, 4, 6, 8 г %). Для цього до 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл розчину додають 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 мл 0,9 % розчину NaCl. З кожного розведення відбирають по 0,1 мл робочого розчину та вносять в пробірки, в яких налито по 5 мл біуретового реактиву. Після 30 хвилин вимірюють екстинцію стандартних проб на ФЕК напроти контроля. Будують графік, відкладаючи на осі абцис значення концентрації стандартних розчинів білка (в г\л), на осі ординат – відповідні величини оптичної щільності. Калібровочну криву потрібно час від часу перевіряти.

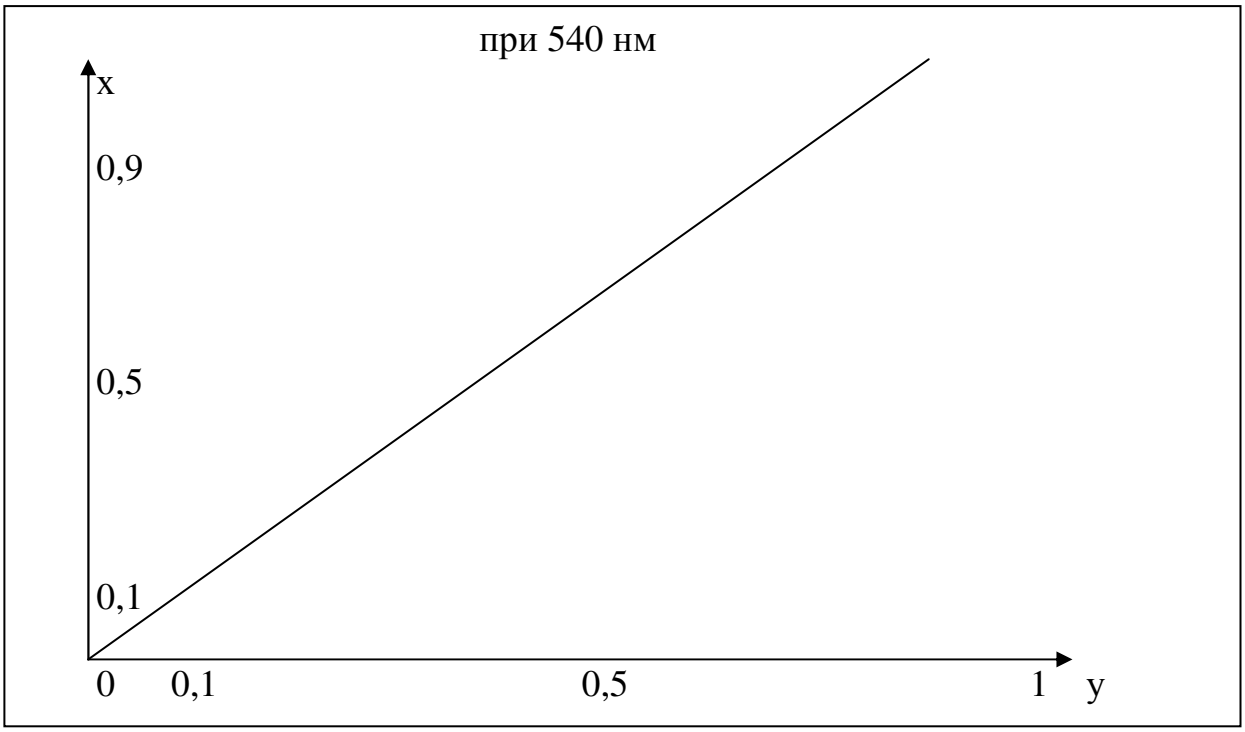

Рис.1 Калібровочний графік

x – оптична плотність при 540 нм,
y – кількість тирозина,мкг/мл.

Виготовлення біуретового реактиву: 0,15 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ та 0,6 г $NaKCuO_6 \cdot 4H_2O$ (сегнетова сіль), розчинюють у 50 мл дистильованої води. При енергійному перемішуванні приливають 30 мл 10 % розчину NaOH, додають 0,1г йодіду калію. Розчин доводять дистильованою водою до 100 мл.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 9

„ВИВЧЕННЯ ПЕРЕТРАВЛЮВАНОСТІ БІЛКІВ ФЕРМЕНТАМИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ”

Мета заняття: вивчити перетравлювальність білків ферментами шлунково-кишкового тракту in vitro.

План заняття

1.Ознайомитись з будовою „штучного шлунку”.
2.Провести гідроліз білкового розчину у „штучному шлунку”.
3.Дослідити інтенсивність гідролізу білків під дією суміші пепсину та трипсину.

І. Швидкість перетравлювання білків у шлунково-кишковому тракті протеолітичними ферментами є одним з основних показників, які визначають біологічну цінність харчових продуктів. Наслідки визначення перетравлюванності білків ферментами травлення in vitro мають можливість передбачити ступінь утилізації білків організмом.

Метод ґрунтується на послідовному впливі на білкові речовини об ’єкту, який досліджується, системою протеіназ, що складається з пепсину і трипсину, при безперервному виведенні із сфери реакції продуктів гідролізу діалізом. Зазначенний метод імітує умови, які є в організмі. Гідроліз проводять у спеціальному приборі, який складається з зовнішнього та внутрішнього сосудів, відокремлених напівпроникною мембраною. У внутрішній сосуд поміщують скляну мішалку, яка обертається електромоторчиком. Така конструкція прибору забезпечує безперервне перемішування маси, яка ферментується, та діалізу продуктів гідролізу.

Об’єкт дослідження: білковий розчин.
Обладнання і посуд: 1. Прибор „штучний шлунок”;
2. Електромішалка;
3.Термостат біологічний.
Реактиви: 1. Пепсин;
2. Трипсин;
3. Соляна кислота, 0,02 м, розчин;
4. Гідрооксид натрію, 1 н розчин;
5. Бікарбонатний буфер з pH 8,2…8,6.

Техніка виконання роботи

Наважку продукта поміщують у внутрішній сосуд, в який додають 15 мл 0,02 м розчину соляної кислоти, з pH 1,2. У зовнішній сосуд додають 60 мл соляної кислоти. Для додержання ізотонії внутрішній сосуд установлюють у зовнішній так, щоб мембрана занурювалась у розчин при умові рівняння рівня рідини у внутрішньому і зовнішньому сосудах. Проби інкубують у водяній бані при 37 градусах 15 хвилин при перемішуванні, потім у внутрішній сосуд додають 15 мг кристаличного пепсину (концентрація ферменту 1 мг/мл, що відповідає середній його концентрації у змістовній рідині шлунка). Ферментацію проводять при постійному перемішуванні 4 години.

Після ферментації зміст внутрішнього сосуда нейтралізують 5 м розчином гідроксида натрію, а потім додають 10 мл бікарбонатного буферу з pH 8,2…8,6. Зміст сосуду стаканчика заміщують також бікарбонатним буфером. При цьому, рідина обох сосудів повинна знаходитись на одному рівні. Після термостатування при температурі 37 градусів протягом 15 хвилин у внутрішній сосуд вносять 15 мг кристаличного трипсину і проводять ферментацію протягом 4 години. По закінченню ферментації зміст внутрішнього сосуду піддають діалізу в співвідношенні дистильованої води.

II. Про ступінь перетравлюванності білків продукта судять по накопиченню продуктів гідролізу білка після послідовної обробки наважки продукту пепсином і трипсином.

Накопичення продуктів гідролізу визначають по кольоровій реакції Лоурі.

(Дивись наступну роботу)

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

„ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА ЗА МЕТОДОМ ЛОУРІ”

Мета заняття: опанувати навичками визначення кількості білків у розчинах за допомогою спектрофотометра за методом Лоурі.

План заняття

1.Побудувати калібровочний графік по тирозину.

2.Провести вимірювання оптичної плотності білкового розчину на спектрофотометрі.

Метод грунтується на властивості утворень забарвлених продуктів при взаємодії реактива Фоліна з лужним розчином білків. Інтенсивність забарвлення в основному залежить від амінокислотного складу білка і вимірюється на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм.

Об’єкт дослідження: білковий розчин № 1, № 2.

Обладнання і посуд: спектрофотометр,

Реактиви: реактиви A,B,C,E (реактив Фоліна).

Техніка виконання роботи

У пробірку вносять по 1 мл розчинів блка № 1 і № 2, 5 мл реактиву С, перемішують і залишають при кімнатній температурі на 10 хвилин. Потім додають по 0,5 мл розчину реактиву Фоліна, це все перемішують і через 30 хвилин замірюють інтенсивність забарвлення на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм у відношенні до дистильованої води.

Кількість білка у розчинах визначають по калібровочному графіку, який будують з використанням розчину тирозину (20 мг кристаличного тирозина розчиняють у 200 мл 0,2 М розчину соляної кислоти).

Дані для будування калібровочного графіка

Таблиця 2

Розчин тирозина, мл	**Кількість 0,2 М розчину HCl, мл**	**Величина екстинкції**
0,1	0,9	0,113
0,2	0,8	0,208
0,3	0,7	0,316
0,4	0,6	0,401
0,5	0,5	0,511
0,6	0,4	0,614
0,7	0,3	0,706
0,8	0,2	0,817
0,9	0,1	0,900

За результатами вимірювань на ФЕК (λ=750 нм) будують калібровочний графік, для чого відкладають на вісі абсцис концентрацію стандартних розчинів тирозину, на вісі ординат –

значення оптичної плотності. По кривій знаходять концентрацію тирозина, що відповідає оптичній плотності, яку досліджували

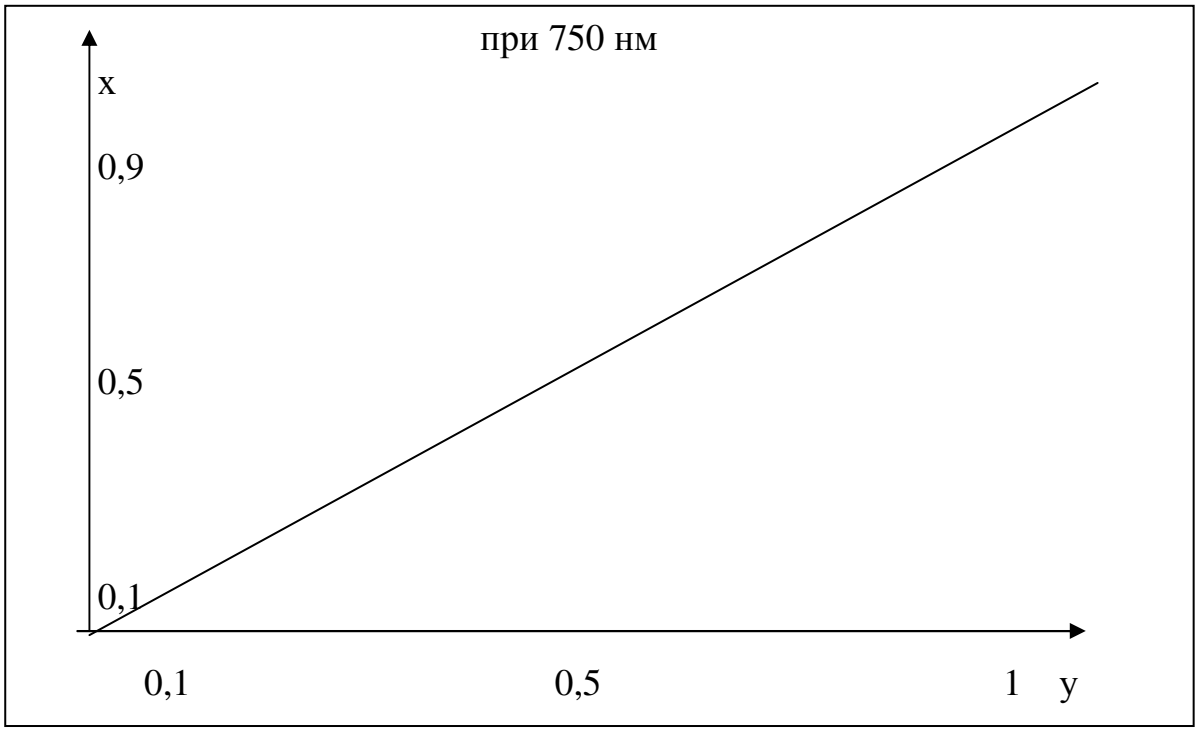

Рис. 2. Калібровочний графік

x – оптична плотність при 750 нм,
y – кількість тирозина,мкг/мл.

Контрольні запитання

1. Які фізико-хімічні особливості притаманні білкам ?
2 У чому полягає принцип методу діалізу і як він застосовується при вивченні травлення білків ?
3. Які фактори підтримують молекули білків у розчині ?
4. Які зміни структури білкових молекул відбуваються при денатурації ?
5. Як використовується денатурація в практиці приготування продуктів харчування ?

Тема 4 . СКЛАДНІ БІЛКИ

Складні білки складаються з простого білка і сполуки небілкової природи – простетичної групи (від грец. prosteto – приєдную, додаю). Залежно від хімічної природи простетичної групи складні білки поділяють на нуклеопротеїни, хромопротеїни, глікопротеїни, металопротеїни, фосфопротеїни і ліпопротеїни.

Нуклеопротеїни – складні білки, які у вигляді простетичної групи містять рибо- або дезоксирибонуклеїнові кислоти. Перші називаються рибонуклеопротеїнами (РНП), а другі – дезоксирибонуклеопротеїнами (ДНРП). Входять до складу всіх клітин і тканин організму. РНП локалізовані переважно в цитоплазмі, а ДНРП – в ядрі клітини.

Білкова частина нуклеопротеїнів представлена переважно групою простих білків – гістонів, які містять велику кількість залишків діаміномонокарбонових кислот (лізину, аргініну) і мають лужні властивості. В складі нуклеопротеїнів виявлені також протаміни та незначна частина альбумінів та глобулінів. Співвідношення між білковою та небілковою частинами коливається в значних межах. У середньому на білкову частину молекули припадає від 30 до 50 %. Зв'язок між білковою частиною та простетичною групою нуклеопротеїнів здійснюється за рахунок іонної дії між позитивно зарядженими радикалами діаміномонокарбонових кислот та негативно зарядженими залишками фосфату.

Молекулярна маса нуклеопротеїнів коливається від кількох десятків тисяч до мільйонів. Нуклеопротеїни відіграють в організмі важливу роль. Вони становлять основну масу рибосом - органел клітини, в яких здійснюються процеси білкового синтезу. Дезоксирибонуклеопротеїни становлять основну масу хроматину, входять до складу хромосом і забезпечують процеси збереження та передачі генетичної інформації

Хромопротеїни – прості білки, які у вигляді простетичної групи містять забарвлені похідні ізоалансазину (флавінові ферменти), каротину (родопсин), порфірину (гемоглобін, міоглобін, гемінові ферменти) та хлорофіл. В організмах людини, тварин і рослин хромопротеїни виконують життєво важливі функції –

беруть участь у забезпеченні енергетичних процесів, ферментативної активності біополімерів, транспортної функції крові, резервуванні кисню тощо.

Глікопротеїни – складні білки, які у вигляді простетичної групи містять залишки вуглеводів та їх похідних. Вони досить різні за структурою і складом олігосахаридної частини молекул. Залежно від якісного складу олігосахаридної частини вуглеводного компонента та способу зв'язку його з білковою частиною молекули всі вуглеводбілкові комплекси поділяють на істинні, або нейтральні глікопротеїни та кислі амінополісахариди.

Молекули нейтральних глікопротеїнів містять незначну кількість вуглеводів (0,4 – 5 %) переважно у вигляді аміносахаридів та їх похідних і не містять залишків гексуронових кислот і сульфату. Білкова частина сполучена з вуглеводним компонентом за допомогою міцних ковалентних зв'язків (О- або N – глікозидних). В утворенні О-глікозидних зв'язків беруть участь гідроксіамінокислоти – серин, треонін, гідроксипролін та гідроксигрупи залишків галактози, фукози, N – ацетилнейрамінової кислоти. Найчастіше О-глікозидний зв'язок утворюється через дисахаридний фрагмент (так званий кор), що складається із залишків галактози і N-ацетилглюкозаміну, сполучених β- 1,3-глікозидним зв'язком. Зв'язок між білковою частиною і коровою ділянкою здійснюється через спиртову групу галактози в першому положенні.

Залишки N-ацетилнейрамінової кислоти та фукози займають у складі олігосахаридної частини, як правило, термінальне положення і значною мірою визначають біологічну дію глікопротеїнів: N-глікозидні зв'язки в молекулах глікопротеїнів утворюються через залишок N-ацетилглюкозаміну та атом азоту амідної групи залишку аспарагіну поліпептидного ланцюга.

До складу олігосахаридної частини молекули N-глікозилпротеїнів можуть входити лише залишки монози і N-ацетилглюкозаміну (глікозилманозний тип) або містити додатково ще галактозу, фукозу, нейрамінові кислоти (комплексний тип).

Нейтральні глікопротеїни досить широко представлені в природі. До них належить значна частина білків сироватки крові, плазми, молока, яєць. Глікопротеїдну природу мають також ферменти, гормони, лектини, групоспецифічні субстанції крові, антигени багатьох вірусів. Встановлено, що біологічна специфічність О-глікозилглікопротеїнів залежить від структури олігосахаридного компонента, а біологічна специфічность N-глікозилглікопротеїнів - від стрктури білкової частини молекули. Біологічна роль нейтральних глікопротеїнів досить різна, а саме, забезпечення біологічної активності деяких ферментів і гормонів, міжклітинної взаємодії та специфічної рецепції на поверхні клітин. Кислі амінополісахариди (мукопротеїни) містять у складі олігосахаридної частини молекули > 5 % глюкозаміну, а також гексуронової кислоти та сульфати. Зв'язок між білковою й олігосахаридною частинами молекули здійснюється за допомогою слабкої нековалентної взаємодії.

Мукопротеїни поділяють на муцини і мукоїди. Муцини входять до складу слизових секретів (шлункового та кишкового соків, слини, слизової рідини) і

виконують захисну функцію. Вони входять до складу хрящів, зв'язок, синовіальної рідини, основної речовини сполучної тканини. Відрізняються мукопротеїни будовою вуглеводних компонентів, ступенем конденсації та розгалуженням олігосахаридних ланцюгів. Залежно від складу і будови мукоїди поділяють на хондромукоїди та гіаломукоїди. Перші містять хондроїтинсірчану кислоту і входять до складу хрящів, зя'язок, сухожилля, другі – гіалуронову кислоту і становлять основну масу сполучної тканини і забезпечують її нормальне функціонування. Значна кількість мукопротеїнів відіграє в організмі важливу біологічну роль. Так, гепарин є природним антикоагулянтом, гіалуронова кислота регулює проникність тканин тощо.

Фосфопротеїни – складні білки, які у вигляді простетичної групи містять залишки фосфату, зв'язані з білковою частиною складноефірними зв'язками через залишки оксіамінокислот – серину, треоніну.

Наявність залишків фосфату надає білкам кислого характеру. При гідролізі цих білків утворюється велика кількість серин- та треонінфосфату. До фосфопротеїнів належить велика кількість білків організму, які виконують важливі біологічні функції – входять до складу речовин, що забезпечують ріст і розвиток організмів. Усі фосфопротеїни , як правило, поділяють на три групи: казеїни (основні білки молока); яєчні білки (овоальбумін – основний компонент яєчного білка, вітелін і фосфовітин – білки жовтка). Фосфовітин – найбагатший на фосфор білок організму. Поліпептидний ланцюг його на $^1/_3$ побудований із залишків фосфосерину; тканинні фосфопротеїди – це група фосфопротеїдів, що представлена в основному ферментами. На їх частку припадає 1...5 мг/л фосфору тканин.

До фосфопротеїнів належать такі важливі ферменти, як гексокіназа, фосфорилаза печінки і м'язів, фосфогліцеромутаза та ін. Синтез фосфопротеїнів здійснюється шляхом фосфорилювання білка-попередника за участю АТФ та ферментів протеїнфосфокіназ , які знаходяться в різних органах і тканинах організму. Розщеплення в тканинах забезпечується ферментами фосфатазами, які каталізують гідролітичне відщеплення залишків фосфату. Фосфопротеїни – цінні компоненти продуктів харчування, відіграють важливу роль у забезпеченні повноцінності раціону. Вони є джерелом фосфату для формування кісткової тканини, синтезу незамінних амінокислот і холіну.

Ліпопротеїни – складні білки, які у вигляді простетичної групи містять ліпідний компонент, зв'язаний з білковою частиною . Найчастіше простетичною групою є нейтральні жири (тригліцеріди), фосфоліпіди, холестерин.Зв'язок між ліпідною і білковою частинами молекули ліпопротеїнів залежить від наявності або відсутності у складі ліпідів іонізованих груп. Якщо до складу простетичної групи ліпопротенів входять полярні ліпіди (фосфатиди), то між білковою і ліпідною частинами утворюються лабільні нековалентні зв'язки. Якщо до складу простетичної групи ліпопротеїнів входять неполярні ліпіди, які не мають іонізованих груп (тригліцеріди), то білкова частина розміщується на поверхні, утворюючи зовнішню гідрофільну оболонку, а всередині центр міцели утворює ліпідний компонент. Така будова ліпопротеїнів забезпечує виконання ними

важливої транспортної функції і зумовлює розчинність ліпопротеїнів у водному середовищі та інші властивості, які забезпечують участь їх у формуванні таких важливих структур, як біологічні мембрани. На частку ліпідів припадає близько 30% сухої маси мембран.

Ліпопротеїни досить розповсюджені в рослинних і тваринних організмах. Вони є складовою частиною цитоплазми та мембранних структур, мієлінових оболонок нервових волокон, хлоропластів рослин. Значна кількість ліпопротеїнів міститься у плазмі крові, вміст їх становить у середньому 700-1100 мг/ 100 мл. Комплекси білків з ліпідами містяться також у лімфі, синовіальній рідині, тканинах внутрішніх органів – нирках, легенях, печінці. Ліпопротеїни сироватки крові за густиною поділяють на кілька груп, що пов'язано з різним співвідношенням ліпідного і білкового компонентів у складі їх молекул. Найменшу густину мають хіломікрони $< 0,95$ г/см^3. На частку ліпідів у складі хіломікронів припадає близько 98 %. Хіломікрони є практично крапельками жиру, стабілізованими незначною кількістю білків. Ліпідний компонент у складі хіломікронів, представлений тригліцерідами, які становлять близько 80 % складу хіломікронів. Крім того, вони містять 7 % холестерину та 8 % фосфоліпідів. Більшу густину мають β-ліпопротеїни – 1,006 – 1,063 г/см^3. Вони, в свою чергу, поділяються на ліпопротеїни низької густини (ЛПНГ) та ліпопротеїни дуже низької густини (ЛПДНГ). β-ліпопротеїни синтезуються у печінці і становлять близько 5 % білків плазми крові. Молекули ЛПНГ містять 25 % β-глобулінів і 75 % ліпідного компонента. В ліпідній частині β-ліпопротеїнів переважають стерини і стериди: холестерин і його ефіри – 45 %, фосфоліпіди – 25 % та тригліцеріди – 10 %. Високий вміст холестерину та оптимальний розмір молекули (15...25 нм) сприяють інфільтрації їх в інтиму аорти, що зумовлює розвиток атеросклерозу. Ця фракція ліпопротеїнів називається атерогенними ліпопротеїнами. В патогенезі атеросклерозу, крім ліпопротеїнів низької густини, певна роль належить і ліпопротеїнам дуже низької густини (0,950...1,006 г/см^3). До їх складу входять 9 % білків та 91 % ліпідів (тригліцеридів). Ліпопротеїни плазми крові, густина яких становить 1,063...1,210 г/см^3, належать до ліпопротеїнів високої густини або ά-ліпопротеїнів. Синтезуються у кишках, печінці, крові і становлять близько 3 % білків плазми. Молекула ά-ліпопротеїнів містить 58 % глобулінів і 42 % ліпідного компонента, в складі якого переважають фосфоліпіди (30 %) та холестерин (12 %). Найменша кількість ліпідів характерна для $ά_2$-ліпопротеїнів або ліпопротеїнів дуже високої густини – 1,2 г/см^3. На частку ліпідів у них припадає близько 43 %. Ліпопротеїни є округлими часточками, діаметр яких зменшується із збільшенням густини. У середині часточок локалізуються неполярні ліпіди (тригліцеріди, стериди), а зовнішня поверхня їх оточена фосфоліпідами та стеринами. Співвідношення між ά- і β-ліпопротеїнами в організмі має важливе значення. За нормальних фізіологічних умов вміст ά- і β-ліпопротеїнів відповідно становить 2,6 та 3,6 г/л.. Збільшення або зменшення цих показників може стати причиною розвитку різних захворювань. Так, підвищенний вміст ліпопротеїнів спостерігається при серцево-

судинних захворюваннях, а зниження вмісту ά-глобулінів має місце при цирозі печінки.

Нуклеїнові кислоти (від лат. nucIeus – ядро) - складні біополімери клітини, які включають велику кількість мононуклеотидних ланок. Зустрічаються в усіх видах організмів і характеризуються унікальними структурами та функціональними властивостями. Виявлені в 1869 р. Швейцарським дослідником Ф. Мішером у складі ядер лейкоцитів. У клітинах існують два види нуклеїнових кислот: рибонуклеїнові (РНК) та дезоксирибонуклеїнові (ДНК). Відрізняються вони за будовою, складом, властивостями та функціями:

Таблиця3

Показник	**ДНК**	**РНК**
Азотисті основи		
Склад :	Аденін, гуанін, цитозин, тимін	Аденін, гуанін, цитозин, урацил
	Вуглеводний компонент	
	Дезоксирибоза	Рибоза
Структура:	Дволанцюгова	Одноланцюгова
Молекулярна маса	Від десятків до сотень мільйонів	Від десятків до сотень тисяч
Локалізація в клітині	Ядро, мітохондрії, тілактоїди	Ядро і цитоплазма
Функції	Збереження генетичної інформації	Передача генетичної інформації

Для нуклеїнових кислот характерні кілька рівнів структури. Порядок чергування нуклеозидмонофосфатів у полінуклеотидному ланцюзі становить їх первинну структуру. Нуклеозидмонофосфати сполучені між собою за допомогою фосфодіефірних зв'язків, які утворюються внаслідок взаємодії гідроксильної групи біля C_3-атома рибози чи дезоксирибози одного нуклеотиду із залишком фосфату біля C_5-атома рибози чи дезоксирибози іншого нуклеотиду. Напрямок ланцюга позначається 5'→3'. На 5'-кінці міститься залишок фосфату, а на 3'-кінці – вільна ОН-група біля C_3-атома рибози чи дезоксирибози. Молекула ДНК складається з двох антипаралельних ланцюгів: 3'-кінець одного знаходиться навпроти 5'-кінця іншого. Для первинної структури ДНК характерний принцип комплементарності азотистих основ А–Т та Г−Ц пар, який визначається правилами Чаргаффа. Вторинна структура нуклеїнових кислот – просторова конфігурація полінуклеотидних ланцюгів. Для ДНК це правозакручена подвійна спіраль, яка може мати А-, В-, С-, Z-, або SBS-форму. Форми ДНК відрізняються за параметрами та функціями. Для вторинної структури РНК характерна також спіралізація, однак у межах лише одного ланцюга. Різні види РНК (вірусні,

рибосомні, транспортні, інформіційні) відрізняються деталями просторової структури. Третинна структура нуклеїнових кислот – просторове розміщення лінійних, дволанцюгових або кільцевих форм з утворенням суперспіралізованих структур. Біологічна роль нуклеінових кислот полягає у збереженні і передачі генетичної інформації.

*Розщеплення.*Нуклеїнові кислоти, які надходять до організму з продуктами харчування в складі нуклеопротеїнових комплексів, розщеплюються під дією специфічних ферментів на білки та нуклеїнові кислоти. Утворені сполуки піддаються наступним ферментативним перетворенням, внаслідок чого білки розщеплюються до амінокислот, а нуклеїнові кислоти – до їх складових компонентів. Катаболізм нуклеїнових кислот здійснюється під дією комплексу ферментів нуклеаз, нуклеотидаз і нуклеозидаз, в результаті чого утворюються пуринові та піримідинові основи, рибоза, дезоксирибоза, рибозо- та дезоксирибозо-1-фосфати, вільна фосфорна кислота. Утворені сполуки піддаються наступним перетворенням до кінцевих продуктів або включаються в інші процеси обміну. Так, пентози та їх фосфорні ефіри включаються в процеси обміну вуглеводів, фосфорна кислота використовується в процесах фосфорилювання, фосфоролізу тощо. Пуринові і піримідинові основи розщеплюються до кінцевих продуктів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

„ВИДІЛЕННЯ ТА ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ НУКЛЕОПРОТЕЇНІВ, ГЛЮКОПРОТЕЇНІВ, ФОСФОПРОТЕЇНІВ”

Мета заняття: вивчити, з яких компонентів складаються складні білки.

План заняття

1.Провести гідроліз дріжджів.
2.Виявити у гідролізаті дріжджів наявність вуглеводів, фосфору, пептидних зв’язків.
3.Вивчити склад глюкопротеїнів.
4.Вивчити фосфопротеїни молока.

1. Виявлення наявності вуглеводів, фосфору і пептидних зв’язків у гідролізаті нуклеопротеїнів дріжджів

Дослідження складу нуклеопротеїнів виконується після їх гідролізу, в результаті якого від білків відокремлюється компоненти нуклеїнових кислот. У гідролізаті можна виявити наявність поліпептидів (джерелом є білки нуклеопротеїнів), вуглеводи і фосфорну кислоту (джерело – нуклеїнові кислоти).

Об’єкт дослідження: дріжджі.

Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Ступка з товкачиком;
3. Центрифуга;
4. Скляна паличка.

Реактиви: 1. Діетиловий ефір;
2. Пісок скляний;
3. Гідрооксид натрію, 0,4 %-й розчин;
4. Сірчана кислота, 5 %-й розчин;
5. Молібденовий реактив.

Техніка виконання роботи

А. Одержання гідролізату дріжджів

5 г дріжджів кладуть до ступки, додають 10 крапель діетилового ефіру, 10 крапель води. Додають щіпку піску і ретельно розтирають до утворення гомогенату, приливають 30 мл розчину гідроксиду натрію і розтирають протягом 15 хв. потім центрифугують вміст ступки; осад, що випав, використовують для реакції гідролізу, який здійснюють шляхом кип’ятіння з 5 % сірчаною кислотою протягом 1 години. В результаті цього утворюються низькомолекулярні поліпептиди, пуринові основи, пентози і фосфорна кислота.

Визначення складу гідролізату дріжджів

В. Виявлення наявності поліпептидів у гідролізаті дріжджів

Об’єкт дослідження: гідролізат дріжджів.
Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Штатив із пробірками.
Реактиви: 1. NaOH, 10 %-й розчин;
2. $CuSO_4$, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл гідролізату, додають 2 мл 10 % розчину NaOH і 0,5 мл 5 % розчину сірчанокислої міді. Спостерігають появу фіолетового забарвлення, що свідчить про наяність пептидних зв’язків.

С. Проба Троммера на рибозу і дезоксирибозу, які містяться у гідролізаті дріжджів

Об’єкт дослідження: гідролізат дрі
Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Штатив із пробірками.
Реактиви: 1. NaOH, 10 %-й розчин;
2. $CuSO_4$, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 0,5 мл гідролізату, додають 1 мл 10 % -го розчину їдкого натра і 0,5 мл 1 %-го розчину сірчанокислої міді. Суміш перемішують і підігрівають до кіпіння. Спостерігають появу жовтого забарвлення, яке свідчить про утворення гідроксиду міді. Він при тривалому нагріванні перетворюється на оксид міді цеглисто-червоного кольору.

Д. Молібденова проба на фосфорну кислоту

Об’єкт дослідження: гідролізат дріжджів.

Обладнання і посуд: 1. Нагрівальний прилад;
2. Штатив із пробірками.
Реактиви: молібденовий реактив.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл гідролізату дріжджів, додають 2 мл молібденового реактиву і кип’ятять декілька хвилин. Спостерігають появу жовтого осаду фосфомолібденовокислого амонію.

2. Дослідження складу глюкопротеїнів

Глюкопротеїни містять як простетичну групу вуглеводу або їх похідні, а також залишки сірчаної або оцтової кислоти. Деякі з глюкопротеїнів мають велику в’язкість і називаються *мукополісахаридами* (mucos – слиз).

Одним із видів мукополісахаридів є муцин, який входить до складу слини, інших травних соків, слизів, що покривають поверхню шлунково-кишкового тракту. Ці слизові протеїни обволікають тверді частинки їжі і завдяки цьому захищають стінки травного тракту від пошкоджень.

В муцині, що виділяється зі слини, визначають наявність пептидних зв’язків за допомогою біуретової реакції і вуглеводу використовуючи α-нафтол (реакція Подобєдова). Реакція відбувається в концентрованій сірчаній кислоті, де з моносахаридів, що входять у муцин, утворюється оксиметилфурфурол. Він конденсується з α-нафтолом, утворюючи сполуку фіолетового кольору.

Об’єкт дослідження:слина (джерело глюкопротеїнів).

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Скляна паличка;
3. Нагрівальний прилад;
. 4. Крапельниці.

Реактиви: 1. Оцтова кислота (концентрована);
2. Гідрооксид натрію, 1 %-й розчин;
3. Сірчанокисла мідь, 5 %-й розчин;
4. Сірчана кислота концентрована;
5. ά-нафтол, 0,2 %-й розчин в етиловому спирті.

Техніка виконання роботи

А. Виділення муцину зі слини

Слину збирають у пробірку, потім додають розчин оцтової кислоти до появи згустка муцину. Згусток притискають до стінки пробірки скляною паличкою та промивають водою.

В. Виявлення пептидів у муцині

Згустки муцину кладуть у пробірку і проводять біуретову реакцію: додають 1 мл NaOH та 1 краплю $CuSO_4$. Відзначають зміну забарвлення.

С. Виділення вуглеводів з муцину

У пробірку кладуть згусток муцину, додають 5...6 крапель α-нафтолу, змішують і обережно по стінці нашаровують 1...2 мл концентрованої сірчаної кислоти. Спостерігають зміну забарвлення на межі двох шарів.

3.Вивчення складу фосфопротеїнів молока

Об’єкт дослідження: молоко.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Бумажні фільтри;
3. Воронки.
Реактиви: 1. Оцтова кислота, 10 %-й розчин;
2. NaOH, 1 %-й розчин;
3. $CuSO_4$, 5 %-й розчин;
4. H_2SO_4, 10 %-й розчин;
5. Молібденовий реактив.

Техніка виконання роботи

А. Виділення казеїну з молока

У пробірку наливають 2 мл молока, додають стільки ж дистильованої води і по краплинах 10 %-й розчин оцтової кислоти (уникати надлишку кислоти !). Випадає осад, який отфільтровують, декілька разів промивають дистильованою водою і знімають з фільтру у пробірку.

В. Вивчення складу фосфопротеїнів молока

Осад у пробірці розчиняють в 1 %-му розчині NaOH. Розчин фільтрують через бумажний фільтр, змочений водою Фільтрат використовують для проведення біуретової реакції і проби на фосфорну кислоту з молібденовим реактивом за методикою, яку наведено раніше.

Контрольні питання

1. Як побудовані нуклеопротеїни?
2. Як з’єднуються між собою тяжі ДНК і яка їх функція?
3. Де локалізовані в клітині ДНК і РНК?
4. З яких азотистих основ утворюється сечова кислота?
5. Яка роль в організмі глюкопротеїнів?
6. Яка роль в організмі ліпопротеїнів ?
7. Яка роль в організмі хромопротеїнів ?
8. Яка роль в організмі фосфопротеїнів ?

Тема 5. ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Ферменти (ензими) – це білки, що мають каталітичні властивості завдяки особливостям будови їх молекул. Ферменти характеризуються унікальним розташуванням активних груп, що взаємодіють з речовинами, на які вони діють (субстрати).

На відміну від більшості каталізаторів у неживій природі ферменти проявляють активність у м'яких умовах – при температурі тіла і нижчій, в зоні pH, яка мало відрізняється від нейтральної, при нормальному атмосферному тиску і та ін.

Функція ферментів полягає в забезпеченні в клітинах необхідної швидкості і напрямку біохімічних процесів, а також їх упорядкуванні в просторі і часі.

Активність ферментів дуже висока, одна їх молекула може викликати перетворення багатьох сотень і навіть мільйонів молекул інших речовин. При цьому сам ензим наприкінці реакції залишається незмінним. У процесі каталізу відбувається утворення проміжних сполук ферменту з субстратом, який може змінювати конформацію активного центру ензиму (теорія Кошланда щодо адаптації ферменту до субстрату при їхній взаємодії).

Ферментам властива висока специфічність дії по відношенню до субстратів або типів хімічних зв'язків у них.

Механізм впливу ензимів пов'язаний зі зниженою енергією активації реакції, завдяки чому вони протікають при відносно низьких температурах. За таких умов без каталізаторів число активованих (збуджених) молекул субстратів невелике і реакція між ними протікає надто повільно. Нагрівання до більш високих температур хоча й прискорює хід реакцій, які каталізуються, але одночасно зумовлює денатурацію ферментів, що призводить до припинення їхньої дії. Аналогічно впливають на ферменти інші денатуруючі агенти (сильні кислоти, органічні розчинники, промениста енергія і т. ін.).

Оскільки структура білків пов'язана з наявністю і співвідношенням позитивно й негативно заряджених груп, активність ферментів залежить від значення pH, яке визначає ступінь дисоціації відповідних іоногенних ділянок.

На дії ферментів впливають і гідрофобні групи, тому фактори від яких залежить їх розташування в просторі (тобто на вторинну, третинну і четвертинну структури молекул ензимів) можуть викликати гальмування (інгібірування) або підсилення каталітичної активності ензимів. До складу багатьох ферментів входять небілкові групи (простетичні групи, коферменти), у тому числі деякі вітаміни, метали.

Таким чином, характерними властивостями ферментів є такі:

1. Висока активність;
2. Специфічність каталітичної дії;
3. Тонка чутливість до pH середовища, до наявності активаторів або інгібіторів, які впливають на вищі рівні структури молекул ензиму;
4. Втрата каталітичної активності після нагрівання до високих температур або після дії інших денатуруючих агентів.

Швидкість реакцій, що каталізуються ферментами, може змінюватися в часі й залежить від їх кількості та концентрації субстрата.

Деякі ферменти знаходяться у клітинах і виділяються з них у неактивному стані (проферменти), вони потребують активування.

Одна й та сама реакція може каталізуватися кількома близькими за структурою ензимами, що різняться за умовами, в яких виявляється їх максимальна активність. Такі ферменти називають *ізоферментами* (ізоензимами).

Враховуючи всі розглянуті фактори, що впливають на активність ферментів, при роботі з ними дотримуються таких умов:

1. Препарати ферментів зберігають при можливо нижчих температурах;
2. Усі розчини готують тільки на дистильованій воді;
3. Старанно миють весь хімічний посуд (пробірки, колби, піпетки, палички, що використовуються для роботи з ферментами).

Ферменти мають велике практичне значення через те, що виробництво хліба, молочно-кислих продуктів, пива, чаю, вина, соків ґрунтується на використанні ферментативних процесів. Застосування ферментативних препаратів у процесі виробництва продуктів харчування розкриває великі можливості підвищення їх якості.

Класифікація ферментів. На цей час описано більш 4000 ферментів. У залежності від типу реакції каталізу їх розділяють на шість класів (табл.4).

Таблиця 4

№ класу	Назва класу	Характер реакцій, що каталізуються
1	Оксидоредуктази	Окислювально-відновлювальні реакції (дегідрогенази, оксідази, пероксидази та ін.)
2	Трансферази	Перенесення різних груп з однієї молекули на іншу (фосфо-, аміно-, метилтрансферази та ін.)
3	Гідролази	Розщеплення органічних сполук при участі води (ліпази, протеази, амілази та ін.)
4	Ліази	Негідролітичне відщеплення від субстрату груп CO_2, H_2O, H_2 (піруватдекарбоксилаза, альдолаза та ін.)
5	Ізомерази	Внутрішньомолекулярна перебудова і утворення оптичних ізомерів
6	Лігази (синтетази)	З'єднання двох молекул, що супроводжується гідролізом багатого енергією зв'язку (карбоксилаза, глутамінсинтетаза та ін.)

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 12

„ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ”

Мета заняття: вивчити властивості ферментів.

План заняття

1.Вивчити вплив різних температур на активність амілази.
2.Визначити чутливість ферментів до pH середовища.
3.Вивчити вплив активаторів та інгібіторів на активність ферментів.
4.Визначити специфічність дії ферментів.

1. Визначення впливу різних температур на активність амілази

Фермент амілаза каталізує гідроліз крохмалю до декстринів і мальтози. Такий процес відбувається, наприклад, у ротовій порожнині при вживанні з їжею продуктів, що містять крохмаль: картоплі, хліба, макаронних виробів. Джерелом амілази є слина. Цей фермент знаходиться і в інших відділах травного тракту, а також у печінці та інших тканинах. Різні типи амілаз використовуються в харчовій промисловості, наприклад, у пивоварній, де їх джерелом є рослини (ячмінь).

Дію амілази розпізнають по зникненню синього забарвлення, яке утворюється при додаванні йоду.

Об’єкт дослідження: слина, розбавлена в 500 разів або розчин панкреатину.

Обладнання і посуд: 1. Термостат, нагрітий до 37^0C;
2. Холодильник;
3. Піпетки на 1...2 мл;
4. Крапельниці;
5. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Крохмаль картопляний, 1 %-й розчин;
2. Розчин йоду – 0,1 н, розбавлений безпосередньо перед визначенням до 0,004 н.

Техніка виконання роботи

У 3 пробірки наливають по 1 мл джерела амілази, одну з них кип’ятять протягом не менш, ніж 5 хв. і дають охолонути; другу кладуть у холодильник для охолодження до 10^0C; третю – ставлять у термостат. Потім до всіх 3 пробірок приливають по 1 мл крохмалю і ставлять у термостат на 10 хв. при температурі 37^0C. Через 10 хв. до всіх пробірок приливають по 1...2 краплі розчину йоду.

Якщо крохмаль не перетравився амілазою, то утворюється синє забарвлення. При наявності продуктів гідролізу колір з йодом стає фіолетовим, червоним або жовтим в залежності від розміру утворених молекул декстринів. Амілодекстрини забарвлюються йодом у фіолетовий колір, ерітродекстрини – у червоний, ахродекстрини – утворюють жовте забарвлення, як і мальтоза. По кольору визначають глибину розщеплення крохмалю.

2. Визначення чутливості ферментів до pH середовища

Об'єкт дослідження: джерела амілази ті самі, що і в попередньому досліді.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками, закритими пробками;
2. Піпетки на 1...2 мл;

Реактиви: 1. Буферний розчин, pH якого дорівнює 5,0 (10,30 мл О,2 М Na_2HPO4 $2H_2O$ змішується з 9,70 0,1 М розчину лимоної кислоти);
2. Буферний розчин з pH 6,8 (15,45 мл 0,2 М Na_2HPO_4 змішується з 4,55 мл 0,1 М розчину лимонної кислоти);
3. Крохмаль, 1 %-й розчин;
4. Розчин йоду в йодистому калії 0,004 н., приготовлений шляхом розбавлення з 0,1 н. безпосередньо перед дослідженням. У такій концентрації, йод забарвлює крохмаль у синій колір і не припиняє дії амілази.

Техніка виконання роботи

У 2 пробірки наливають по 1 мл джерела амілази, в одну з них додають 1 мл буфера з pH 5,0; у другу – стільки ж із pH 6,8, в обидві пробірки приливають по 2 краплі йоду і по 1 мл крохмалю. Пробірки закривають пробками і залишають їх при кімнатній температурі, спостерігають за зникненням синього забарвлення в кожній пробі. Відзначають, при якому значенні pH швидше гідролізувався крохмаль.

ПРИМІТКА: якщо під дією двох крапель йоду крохмаль не посинів, додають ще однакову кількість розчину крохмалю в усі пробірки, доки не з'явиться синє забарвлення.

3. Визначення впливу активаторів та інгібіторів на активність ферментів

В організмі дія ферментів регулюється різноманітними механізмами: інтенсивністю синтезу каталітичних білків генетичним апаратом, їхнім руйнуванням продуктами реакції каталізу, гормонами і іншими факторами.

Важлива роль належить активаторам та інгібіторам ферментів, які впливають на різні їхні ділянки або беруть участь в утворенні тимчасових комплексів із субстратами.

Активатори та інгібітори дії ферментів використовуються для регуляції відповідних технологічних процесів, наприклад, заміс тіста, а також, в медичній практиці, для припинення життєдіяльності мікроорганізмів або заміщення недостатньої активності ензимів у тканинах, наприклад, у підшлунковому соку.

Об'єкт дослідження: джерела амілази ті самі, що і в попередньому досліді.
Обладнання і посуд: штатив із пробірками.

Реактиви: 1. NaCl, 1 %-й розчин;
2. Крохмаль, 1 %-й розчин;
3. Сірчанокисла мідь, 5 %-й розчин;
4. Розчин йоду у йодистому калії, 0,004 н. свіжо виготовлений;
5. Дистильована вода.

Техніка виконання роботи

Готують три пробірки. У першу приливають 2,5 мл води, у другу – 2 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у третю – 2 мл води та 0,5 мл розчину $CuSO_4$. В усі три пробірки вносять по 2,5 мл розчину амілази, перемішують і додають по 1 мл розчину крохмалю, потім знов перемішують і ставлять у термостат при температурі 37^0 С. Через 5…10 хвилин додають по 1…3 краплі розчину йоду. Рідина у першій пробірці забарвлюється у фіолетовий або червоний колір, у другій – в червоний або жовтий, у третій – у синій.

Здобуті результати свідчать про те, що активатором амілази є NaCl (друга пробірка), а інгібітором $CuSO_4$ (третя пробірка).

4. Визначення специфічності дії ферментів

Ферментам притаманна специфічність дії, оскільки вони здатні каталізувати тільки певні хімічні реакції.

Специфічність дії ферментів буває абсолютна, відносна, групова і стереохімічна.

Ферменти специфічні відносно як типу реакцій, що каталізуються, так і субстратів, на які вони діють. Деяким ферментам притаманна абсолютна специфічність, що виявляється з дії тільки на один будь-який субстрат. Висока специфічність ферментів визначається тим, що тільки деякі строго визначені функціональні групи, що входять до складу ферментів, можуть брати участь в утворенні фермент-субстратних комплексів.

Амілаза слини прискорює гідроліз тільки полісахаридів, не впливаючи на дисахариди. Мальтаза слини прискорює гідроліз дисахарида мальтози, що утворюється при гідролізі крохмалю, але зовсім не впливає на інший дисахарид – сахарозу. Сахароза не має вільної альдегідної групи, тому не дає реакції з реактивом Фелінга. Реакція може бути позитивною тільки в тому разі, якщо сахароза розщепиться на свої складові – глюкозу і фруктозу.

Об’єкт дослідження: 1. Розчин амілази.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Термостат або водяна баня 38^0 С;
3. Крапельниці;
4. Піпетки.

Реактиви: 1. Сахароза, 1 %-й і 0,5 %-й розчини;
2. Крохмаль, 1 %-й розчин;
3. Їдкий натр, 10 %-й розчин;
4. Сульфат міді, 5 %-й розчин;
5. Реактив Фелінга I;
6. Реактив Фелінга II.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки приливають по 1 мл розчину амілази.У першу пробірку додають 2...3 мл 1 %-го розчину крохмалю, у другу – 2...3 мл 1 %-го розчину сахарози. Обидві пробірки ставлять на 10 хв. у термостат або водяну баню при температурі 38^0 С, після чого проводять реакцію Фелінга, тобто в обидві пробірки додають рівний об’єм реактиву ФелінгаI і Фелінга II (по 0,5 мл) і нагрівають до кипіння.

Позитивна реакція Фелінга має місце в пробірці, де зустрічаються субстрат та відповідний фермент, результатом дії якого є гідроліз, наприклад, крохмалю та амілази. При цій реакції утворюються мальтоза, а потім глюкоза, яка має вільну альдегідну групу, що забезпечує появу червоного осаду закису міді.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 13

„ОКИСЛЮВАЛЬНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНІ ФЕРМЕНТИ (ОКСИДОРЕДУКТАЗИ)”

Мета заняття: вивчити вплив різних факторів на активність оксидоредуктаз.

План заняття

1.Провести дегідрування янтарної кислоти сукцінатдегідрогеназою м’язів.
2.Вивчити відновлення метиленової сині дегідрогеназою дріжджів.
3.Вивчити окислення формальдегіду дегідрогеназою молока.
4.Вивчити вплив кисню повітря на молекулярну структуру субстрату.
5.Вивчити вплив іонів хлору на активність поліфенолоксидази.
6.Виявити вплив підвищеної температури на активність пероксидази хріну.
7.Дослідити властивості рибофлавіну утворювати зворотню окислювально-відновлювальну систему.
8.Визначити роль поліфенолоксидази овочів у зміні їх забарвлення.

Клас оксидоредуктаз включає ферменти, що беруть участь в окисленні та відновлюванні різних речовин. Окислення може здійснюватися декількома шляхами:

1. $AO + ½\ O_2 \longrightarrow AO_2$ (приєднання кисню);
2. $AH_2 + B \longrightarrow A + BH_2$ (відняття водню);
3. $A^{2+} \longrightarrow A^{3+} + e^-0$ (відняття електрона).

Ферментам цього класу належить важлива роль у диханні та бродінні. До оксидоредуктаз належать, зокрема, дегідрогенази, оксидази і пероксидази.

Дегідрогенази. Дегідрогенази каталізують окислення субстрату шляхом відняття від нього водню, тобто перенесення водню від донора (здатного до окислення субстрату) на відповідний акцептор. Акцептором може бути кисень або будь-яка речовина, що міститься у тканинах організму. У дослідах використовують штучний акцептор – метиленову синь (МС). Дегідрогеназа відбирає водень від субстрату і віддає його МС, яка відновлюється і перетворюється в безбарвну сполуку (MCH_2). Отже, обезбарвлення розчину може свідчити про дію дегідрогенази. Лейкоформа (MCH_2) легко окислюється киснем повітря, тому досліди проводять при відсутності повітря (у пробірках Тунберга або звичайних пробірках під шаром рослинної олії).

Оксидази. Окислення різних субстратів за рахунок кисню повітря каталізують оксидази. До цієї групи ферментів належать поліфенолоксидаза і тирозиназа. Саме дією поліфенолоксидази пояснюється потемніння поверхні розрізаного яблука або картоплини. Цей фермент окислює полі- і монофеноли, дубильні речовини та інші органічні сполуки з утворенням темнозабарвлених продуктів. Тирозиназа бере участь в окисленні амінокислоти тирозину до темного пігменту меланіна („мелас” – від грецьк. чорний).

Пероксидаза. Пероксидаза каталізує окислення субстрата за рахунок кисню перекису водню за схемою: $AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + 2H_2O$. У лабораторіях широко використовують метод визначення активності пероксидази, в основу якого покладено окислення пірегалолу в присутності перекису водню до пурпурогаліну, що утворює в розчині червоно-бурий осад.

1. Дегідрування янтарної кислоти сукцинатдегідрогеназою м’язів

У м’язовій тканині міститься сукцинатдегідрогеназа, яка окислює янтарну кислоту в фумарову. Коферментом цього ферменту є флавінаденіндинуклеотид (ФАД).

Об’єкт дослідження: свіжа м’язова тканина.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Термостат;
3. Водяна баня на 40^0 С;
4. Часи або секундомір.

Реактиви: 1. Гідроксид натрія, 10 %-й розчин;

2. Янтарна кислота, нейтралізована лугом, 5 %-й розчин;
3. Метиленова синь (МС), 0,001 %-й розчин;
4. Трихлороцтова кислота (ТХО), 20 %-й розчин;
5. Олія.

Техніка виконання роботи

Близько 5 г здрібненого свіжого м'яса добре промивають на марлі дистильованою водою і віджимають. Відмиту кашицю заливають 1 мл дистильованої води і ретельно перемішують.

У дві пробірки приливають по 2 краплі розчину МС, 0,5 мл розчину янтарної кислоти й 1 мл олії. В обидві пробірки вносять по 2 мл гомогенату, струшують і кладуть у водяну баню (40^0 С). У першій пробірці дію ферменту зразу ж зупиняють, додаючи 1 мл розчину ТХО. Засікають час з моменту внесення ферменту до знебарвлення розчину в другій пробірці. Активність дегідрогенази виражають у хвилинах, необхідних для знебарвлення МС. Одержані результати записують і роблять висновок.

2. Відновлювання МС дегідрогеназою дріжджів

В процесі бродіння глюкози, викликаного дегідрогеназами дріжджів, відбувається відновлення їх коферменту НАД до $НАДН_2$, який перетворює водень на оцтовий альдегід, що також утворюється при бродінні. Якщо до такої системи (глюкоза + дріжджі) додати МС, то $НАДН_2$ буде переносити кисень на МС, викликаючи її знебарвлення:

$$МСН_2 + О_2 \rightleftharpoons МС + Н_2О_2.$$

Об'єкт дослідження: дріжджі пекарські сухі.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Термостат;
3. Водяна баня на 40^0 С;
4. Часи або секундомір.
Реактиви: 1. Глюкоза, 5 %-й розчин;
2. Метиленова синь (МС), 0,001 %-й розчин;
3. Олія;
4. Трихлороцтова кислота, 20 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

Сухі пекарські дріжджі (0,5 г) ретельно розтирають у ступці товкачиком з 10-кратним об'ємом дистильованої води до одержання однорідної суспензії. Якщо дріжджі свіжі, використовують 5-кратний об'єм води.

У дві пробірки приливають по 2 краплі розчину МС, 0,5 мл розчину янтарної кислоти та 1 мл олії. В обидві пробірки вносять по 2 мл гомогенату, струшують і

кладуть у водяну баню (40^0 С). У першій пробірці дію ферменту зразу ж зупиняють, додаючи 1 мл розчину ТХО. Засікають час з моменту внесення ферменту до знебарвлення розчину в другій пробірці. Активність дегідрогенази виражають у хвилинах, необхідних для знебарвлення МС. Одержані результати записують і роблять висновок.

3. Окислення формальдегіду дегідрогеназою молока

У молоці містяться дегідрогенази, що потрапляють із молочної залози та з мікрофлори молока. Альдегіддегідрогеназа окислює формальдегід до мурашиної кислоти.

Об'єкт дослідження: молоко (джерело ферменту).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Термостат;
3. Водяна баня на 40^0 С;
4. Годинник або секундомір.
Реактиви: 1.Формальдегід, 0,4 %-й розчин;
2. Метиленова синь (МС), 0,001 %-й розчин;
3. Трихлороцтова кислота, 20 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В одну пробірку вливають 3 мл кип'яченого молока, у другу – 3 мл свіжого. В обидві пробірки додають 0,5 мл розчину формальдегіду та 1 краплю розчину МС. Вміст струшують і пробірки розташовують у водяній бані (40^0 С). Фіксують час, необхідний для знебарвлення МС. Активність ферменту виражають, як і в досліді 2. Одержані результати записують і пояснюють.

У всіх дослідах з дегідрогеназами використовували ТХО або високу температуру для інактивації ферменту. Ці фактори незворотно денатурують ферментний білок, тому при послідуючій інкубації в оптимальних умовах активність ферментів не виявлялася (контрольний варіант дослідів).

4.Вплив кисню повітря на молекулярну структуру субстрату

Об'єкт дослідження: 1. Яблуко;
2. Бульба картоплі.
Обладнання і посуд: 1. Вакуумний ексикатор;
2. Ніж.

Техніка виконання роботи

Розрізають яблуко та бульбу картоплі навпіл і поміщують по одній половинці у вакуумний ексикатор, з якого потім відкачують повітря. Дві другі

половинки залишають на повітрі. Останні швидко темніють, тоді як в ексикаторі без доступу повітря зразки зберігають початкове забарвлення. Це доводить,що кисень повітря служить акцептором водню,який відбирається від субстрату.

5.Іон хлору - інгібітор поліфенолоксидази

Об'єкт дослідження: 1. Яблуко;
2. Бульба картоплі.
Обладнання і посуд: ніж.
Реактиви: 1. Натрій хлористий;
2. Натрій йодистий;
3. Калій хлорноватистокислий (бертолетова сіль).

Техніка виконання роботи

Два яблука розрізають навпіл. Першу половину залишають для контролю, другу посипають NaCl, третю – NaI, четверту – $KClO_3$. Усі половинки залишають на повітрі на 30 хвилин. Звичайно, перша, третя, четверта половинки яблук темніють, а друга залишається без зміни. Отже, можна зробити висновок, що іон Cl^- - інгібує поліфенолоксидазу. NaI використовують для того, щоб довести, що ефектом інгібірування в складі NaCI володіє CI^-, а не Na^+. Використання $KClO_3$ показує, що хлор гальмує дію ферменту тільки у вигляді іона Cl^-.

6. Вплив температури на активність пероксидази хріну

Об'єкт дослідження: екстракт хріну.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Палички скляні;
3. Піпетки;
4. Термометри;
5. Водяна баня.
Реактиви: 1. Пірогалол, 1 %-й розчин;
2. Перекис водню, 2 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

Щоб визначити вплив температури на активність пероксидази, проводять досліди при $0...4^0$ С (крига), 20, 40, 50, 60, 70, 80^0 С (водяні бані).

При цьому кожний студент проводить визначення при певній температурі. Для одержання вірогідних результатів слід строго дотримуватись умов виконання аналізу.

В пробірку вносять 2 мл розчину перекису водню й 3 мл розчину пірогалолу. Вміст пробірки доводять до заданої температури (нагріваючи або охолоджуючи), а потім додають 3 мл екстракту хріну, заздалегідь термостатованого при тій

самій температурі в окремій пробірці. Вміст пробірки постійно перемішують скляною паличкою. Ретельно заміряють час до появи червоно-бурого осаду. Активність пероксидази виражають у секундах, необхідних для появи забарвлення.

Результати досліду записують і на основі даних, отриманих усіма студентами при різних температурах, будують графік, який характеризує вплив температури на активність пероксидази хріну.

7. Дослідження властивості рибофлавіну утворювати зворотню окислювально-відновлювальну систему

Об'єкт дослідження: Рибофлавін.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Гумові або коркові пробки.
Реактиви: 1. Рибофлавін, 0,015 %-й розчин;
2. HCl, концентрована;
3. Цинк, шматочки.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл розчину рибофлавіну, потім додають 5 крапель HCl та шматочок цинку. Закорковують і залишають на 10...20 хв. Спостерігають зникнення жовтого кольору рибофлавіну. Спочатку під впливом виділяющогося водню колір розчину поступово змінюється: спочатку з жовтого на зелений, а потім на рожевий і поступово обезбарвлюється (рибофлавін відновлений). Відкорковують пробірки і через 10...20 хвилин спостерігають появу жовтого кольору розчину (рибофлавін окислений).

8. Визначення ролі поліфенолоксидази в зміні забарвлення картоплі та впливу на неї гіпосульфіту натрію

Під впливом цього ферменту з циклічних амінокислот, що входять до складу білків картоплі, утворюються темнозабарвлені сполуки, внаслідок чого він темніє.

Об'єкт дослідження: сира картопля.
Обладнання і посуд: парцелянові ступки з товкачиками.
Реактиви: гіпосульфіт натрію, 0,1 н розчин.

Техніка виконання роботи

У дві ступки кладуть по шматочку картоплі (1...2 г) і розтирають до однородної маси. Потім в першу ступку додають 2...3 мл розчину гіпосульфіту

Na та перемішують. Сполуки залишають на повітрі на 15...20 хв., потім фіксують зміну забарвлення у кожній ступці.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 14

„ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ”

Мета заняття: вивчити активність каталази.

План заняття

1.Визначити активність каталази, що міститься у зернових продуктах.

До групи окислювально-відновлювальних ферментів відноситься велика кількість ферментів, які здійснюють перенесення водню. Вони грають велику роль у диханні та бродінні. До окислювально-відновлюванних ферментів відносяться: пероксидаза, дегидрогеназа,каталаза та інші.

Предтавником ферментів, що каталізують розщеплення перекису водню, є каталаза, яка інтенсивно разлагає перекис водню :

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$$

Перекис водню є отруйною для клітини речовиною, вона утворюється у окислювально-відновлювальному процесі при відновленні молекулярного кисню.

Каталаза – це двокомпонентний фермент. Одним компонентом його є гематин, який представляє собою окислювальну простетичну групу гемоглобіна крові. Каталаза паралізується синільною кислотою, сірководнем, фторидами.

Визначення каталази засновано на обміні перекису водню шляхом титрування її перманганатом калія. Реакція іде за рівнянням:

$$2KMnO_4+5H_2O_2+4H_2SO_4 \rightarrow 2KMnSO_4+2MnO_4+8H_2O+5O_2$$

Про кількість перекису водню, який руйнується ферментом, судять по різниці в обємах (у $см^3$) 0,1 моль/$дм^3$ розчину перманганату калію, витраченого для титрування у контрольних і робочих дослідженнях.

1. Визначення активності каталази

Об’єкт дослідження: мука.

Обладнання і посуд: 1. Мірна колба на 100 мл;
2.Штатив з пробірками;
3.Нагрівальний прилад;
4.Аналітичні терези;
5.Сухий фільтр.

Реактиви: 1. Толуол;

2. Перекис водню, 1 %-й розчин;
3. Гідроксид натрію, 0,1 н;
4. Сірчана кислота, 10 %-розчин;
5. $KMnO_4$, 0,1 н-й розчин.

Техніка виконання роботи

На аналітичних терезах важать і переносять у мірну колбу муку, масою 2г. У колбу приливають дистильовану воду, добре перемішують з мукою, додають 2-3 краплі толуолу, доводять водою до риски і настоюють 2 години при кімнатній температурі. Після настоювання рідину відфільтровують через сухий складчатий фільтр. У фільтраті визначають каталазу.

Відбирають дві проби прозорого розчину об'ємом 20 $см^3$, одну для досліджень, другу – контрольну. Контрольну кип'ятять у колбі 5 хвилин на асбесті.

До контрольної та проби, яку будуть досліджувати, приливають дистильовану воду об'ємом по 3 $см^3$, перекис водню, який попередньо нейтралізували розчином гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/$дм^3$, і залишають на 30 хвилин при кімнатній температурі.

Після проходження 30 хвилин до проби приливають сірчану кислоту по 5 $см^3$ і перекис водню, який залишився, відтитровують розчином перманганату калію концентрацією 0,1 моль/$дм^3$.

Про активність каталази судять по кількості мг перекису водню, що руйнується за 30 хвилин ферментом, який міститься у 1 г досліджуваного матеріалу.

Активність каталази (х) визначають по формулі:

$$X=(V\ KMnO_4I - VKMnO_4II)\cdot 1,7\cdot V0/m(\ прод\ \cdot Vp),\ де$$

Х – активність каталази зернового продукту (маса перекису водню у мг на 1 г продукта)

V $KMnO_4$I – об'єм розчину з ($KMnO_4$) =0,1 моль/$дм^3$, витраченого на титрування контрольного зразка, $см^3$

V$KMnO_4$II – об'єм розчину з ($KMnO_4$) =0,1 моль/$дм^3$, витраченого на титрування досліджуваного зразка, $см^3$ (1см·0,1 моль/$дм^3$ розчину перманганату калію є еквівалентним 1,7 мг перекису водню)

V_0 - об 'єм води, яку брали для обробки наважки,$см^3$

Vp - об 'єм фільтрату, який брали для аналізу, $см^3$

Контрольні питання

1. Яка біологічна роль ферментів ?

2. Чим різняться умови дії ферментів і каталізаторів у неживій природі ?
3. Які фактори впливають на активність ферментів ?
4. Які особливості будови ферментів, що впливають на їхні властивості ?
5. В які групи об’єднують ферменти ?
6. Сучасні уявлення про окислювально-відновлювальні процеси.
7. Написати загальну схему дихання тканин.
8. Які вітаміни входять до складу ферментів дихального ланцюга ? Їх формули.
9. Напишіть формулу НАД і поясніть його роль у клітковому диханні.
10. Напишіть формулу ФАД і поясніть його роль у клітковому диханні.
11. Напишіть формулу АТФ і вкажіть, на яких етапах дихання вона утворюється.

.

Тема 6. ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ ПО БІЛКАМ, ОБМІНУ БІЛКІВ, ФЕРМЕНТАХ, ОКИСЛЮВАЛЬНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ ПРОЦЕСАХ,СИНТЕЗУ БІЛКА

Контрольні питання

1. Функціональне значення білків.
2. Що таке зворотне і незворотне осадження білків?
3. Що таке денатурація білків і чим вона може бути викликана?
4. Дайте класифікацію амінокислот, в основу якої покладена відмінність у полярності радикалів амінокислот.
5. Напишіть формули амінокислот з негативно зарядженими полярними радикалами. Як вони впливають на властивості білків?
6. Напишіть формули амінокислот з позитивно зарядженими полярними радикалами. Як вони впливають на властивості білків?
7. Які амінокислоти називають гомоциклічними? Напишіть їх формули і вкажіть на значення.
8. Які амінокислоти називають гетероциклічними? Напишіть їх формули і вкажіть на значення.
9. Напишіть формули незамінних амінокислот. Вкажіть на їх значення.
10. Напишіть формули сірковмісних амінокислот. Вкажіть на їх значення.
11. Напишіть формули гідроксивмісних амінокислот. Вкажіть на їх значення.
12. Що розуміють під первинною структурою білка? Які зв'язки формують цю структуру?
13. Сполука амінокислот з утворенням пептидних зв'язків.
14. Напишіть трипептид, тетрапептид з різних амінокислот і дайте їм назву.
15. Напишіть можливі дипептиди з амінокислот: лейцину і аспарагінової кислоти, аргініну, лізину і глютамінової кислоти.
16. Біуретова реакція, її роль у розкритті пептидних зв'язків.
17. Що являє собою вторинна структура білка? Які зв'язки її формують?
18. Що розуміють під третинною структурою білка? Які зв'язки беруть участь у формуванні третинної структури білка?
19. Що розуміють під четвертинною структурою білка?
20. Що таке нуклеопротеїни?
21. Яка біологічна роль нуклеопротеїнів і їх простетичної групи – нуклеїнових кислот?
22. Дайте схему гідролізу нуклеопротеїнів.
23. Що є нуклеїнові кислоти? В яких межах коливається їх молекулярна маса?
24. Які речовини називаються мононуклеотидами? Напишіть формули АМФ, АТФ, яка роль АТФ в організмі?
25. Чим різняться структури РНК, ДНК? Перелічте компоненти, що входять до складу РНК, ДНК.

26. Назвіть різновиди рибонуклеїнових кислот. Вкажіть на роль кожної з них.

27. Які азотисті основи зустрічаються у складі РНК? Напишіть їх формули.

28. Назвіть азотисті основи, що входять до складу ДНК. Напишіть їх формули. Який вуглевод міститься в ДНК?

29 Що таке комплементарність азотистих основ у молекулах ДНК? Напишіть їх формули. Напишіть формули азотистих основ, комплементарних аденіну, гуаніну.

30. Роль ДНК в організмі.

31. Які види ДНК зустрічаються в клітині? Їх структура, молекулярна маса, роль в організмі.

32. Яка роль нуклеїнових кислот у біосинтезі білка ?

33 Яких перетворень зазнають білки в шлунково-кишковому тракті? Значення цих процесів.

34. Яка роль соляної кислоти в травленні?

35. Охарактеризуйте дію пепсину.

36. Охарактеризуйте дію трипсину і хімотрипсину.

37. Як діють на пептиди карбоксипептидаза і амінопептидаза?

38. У чому біологічний сенс виділення протеолітичних ферментів у неактивній формі?

39. Що розуміється під гниттям білків у кишечнику?

40. Напишіть аміни, які утворюються в кишечнику при гнитті з діаміно-монокарбонованих кислот.

41. Де і як знешкоджуються продукти гниття білків?

42. Які токсичні речовини виникають при гнитті з триптофану? Як вони знешкоджуються?

43. Які токсичні речовини виникають при гнитті з фенілаланіну? Як вони знешкоджуються?

44. Які токсичні речовини виникають при гнитті з тирозину? Як вони знешкоджуються?

45. Теорія біологічного каталізу.

46. Які речовини називають ферментами?

47. Яка хімічна природа ферментів?

48. Чим різняться біологічні каталізатори і неорганічні?

49. Що таке одно- і двокомпонентні ферменти.

50. Сучасні уявлення щодо механізму дії ферментів.

51. Які активні центри мають ферменти ?

52. Чому при високій температурі каталітична дія ферментів припиняється?

53. Чому активність ферментів залежить від pH середовища?

54. Наведіть приклади pH – оптимумів для дії деяких ферментів.

55. У чому полягає специфічність дії ферментів?

56. Наведіть приклади абсолютної, відносної, стереохімічної специфічності дії ферментів.

57. Дайте сучасну класифікацію і номенклатуру ферментів.

58. Як діють активатори та інгібітори ферментів ?

59. Що таке є конкурентне і неконкурентне інгібірування активності ферментів. Наведіть приклади.

60. Які процеси називаються окислювально-відновлювальними?

61. Сучасні уявлення про окислювально-відновлювальні процеси.

62. Яка участь кисню в біологічному окисленні?

63. Перелічте основні ферменти тканинного дихання.

64. Які вітаміни входять до складу ферментів дихального ланцюга?

65. Напишіть формулу НАД і поясніть його роль у тканинному диханні.

66. Напишіть формулу ФАД і поясніть його роль у тканинному диханні.

67. Дайте характиристику цитохромів і поясніть їхню роль у тканинному диханні.

68. Напишіть формулу АТФ і вкажіть, на яких етапах тканинного дихання вона утворюється.

69. Як здійснюється окислювальне дезамінування амінокислот в організмі? Які ферменти беруть участь у ньому?

70. Як транспортується аміак із тканин у печінку і нирки?

71. Механізм реакцій переамінування. Роль цього процесу в обміні амінокислот.

72. Яка роль належить α-кетокислотам (пировиноградна, щавелево-оцтова, α-кетоглютарова) у перетворенні амінокислот?

73. Як здійснюється синтез сечовини в печінці?

74. Які амінокислоти беруть участь у синтезі сечовини?

75. Напишіть реакції синтезу сечовини за теорією Кребса і вкажіть, у чому її недоліки.

76. Як здійснюється синтез сечовини згідно з сучасними уявленнями? Роль карбомілфосфату і аспарагінової кислоти у цьому процесі.

77. Утворення і роль біогенних амінів в організмі.

78. Які продукти травлення нуклеопротеїнів їжі всмоктуються у кров?

79. Як відбувається травлення і всмоктування нуклеопротеїнів? Які ферменти перетравлюють нуклеїнові кислоти в кишечнику?

80. Які нуклеотиди є макроергічними речовинами?

81. Які кінцеві продукти утворюються при розпаді в організмі нуклеїнових кислот?

82. Напишіть процес утворення сечової кислоти з аденіну і гуаніну.

83. Умови, які необхідні для реалізації в клітині процесу синтеза білка.

84. Синтез білка у клітині.

Тема 7. ВУГЛЕВОДИ

В міру поглиблення наших знань про природу життєвих процесів нам відкривається багатогранна роль енергетичного резерву, головних структуруючих речовин (клітинні мембрани), еластиків (міжклітинна речовина), мастила (синовіальна рідина в суглобах) та багато інших.

За сучасною класифікацією вуглеводи поділяють на три основні групи в залежності від їхнього складу, структури та властивостей: моносахариди, олігосахариди та полісахариди.

Моносахариди – є похідними багатоатомних спиртів з загальною формулою $C_nH_{2n}O_n$, відрізняються будовою та різним розташуванням у просторі функціональних груп. За характером останніх вони поділяються на *альдози* та *кетози*, а за кількістю атомів вуглецю моносахариди поділяють на *біози, триози, тетрози, пентози* та *гексози*. Найбільше значення в організмі людини мають триози (гліцериновий альдегід та діоксіацетон), пентози (рибоза, дезоксирибоза, арабіноза та ксилоза) та гексози (глюкоза, фруктоза, маноза та галактоза).

Олігосахариди – до їхнього складу входить від 2 до 10 залишків моносахаридів, що з'єднані глікозидними зв'язками. До цієї групи відносяться дисахариди (сахароза, мальтоза, лактоза та целобіоза), трисахариди (рафіноза), тетрасахариди (стахіоза) тощо.

Полісахариди – це високомолекулярні вуглеводи, що складаються з великої кількості моносахаридів. Полісахариди поділяють на *гомополісахариди* – до їхнього складу входять моносахариди одного типу (крохмаль, глікоген, клітковина, целюлоза, пектин, інсулін тощо) та *гетерополісахариди*, глюкозаміни та мукополісахариди, які складаються з моносахаридів різного виду та їх похідних, а також азотистих основ, органічних кислот тощо (гіалуронова кислота, хондроітинсірчана кислота, гепарин, сіалові кислоти). Всі вони входять до складу тваринних, рослинних та бактеріальних клітин.

Але тваринні, рослинні і бактеріальні клітини мають значні відмінності насамперед у середовищі знаходження цих клітин. Так, клітини тваринного організму занурені у спеціальне рідке середовища – кров або лімфу. Сумарні молярні концентрації низькомолекулярних речовин у позаклітинних рідинах тварини і в цитоплазмі близькі. Тому тваринні клітини знаходяться в осматичній рівновазі з середовищем, а їх мембрани не зазнають механічних навантажень через нерівномірну дифузію води у середину клітини або з неї.

Рослинні і бактеріальні клітини знаходяться в цілковито іншому становищі. Зовнішнім середовищем для них часто бувають розбавлені водяні розчини – майже чиста вода, тоді як сумарна полярність вмісту клітин дорівнює величині порядку кількох десятих. Вільна дифузія води у середину клітини, тобто за градієнтом концентрації, розвиває в ній надмірний тиск (до 20 атм), який тонка мембрана витримати не може. Тому такі клітини оточені жорсткою клітинною стінкою, яка надає їм певної стійкої форми і захищає їх від зовнішніх механічних дій.

Молекулярну міцну механічну основу стінки рослинної клітини складає нерозгалуджений полісахарид, побудований із 1,4 – зв'язаних залишків β-Д-глюкози (целюлоза або клітковина). Лінійні макромолекули целюлози зв'язані у пучки за рахунок міжмолекулярних взаємодій, в яких домінують водневі зв'язки. Цементуючим матеріалом, що зв'язує клітини між собою, служать полісахариди інших класів – геміцелюлози (напівклітковини), пектинові речовини та інші.

Пектинові речовини являють собою високомолекулярні полісахариди, велика кількість яких міститься в ягодах і овочах. Як мономірні залишки вони містять Д-галактуронову кислоту.

Пектинові речовини неоднорідні, тому зустрічаються у вигляді протопектину, пектину і пектинової кислоти.

Пектинова кислота є полігалактуроновою кислотою. Це лінійний полісахарид із залишків Д-галактуронової кислоти, з'єднаних 1,4 - зв'язками.

Пектин є похідним пектинової кислоти, в якій частина карбоксильних груп утворює ефіри з метиловим спиртом, тобто пектин – це складний ефір метилового спирту і пектинової кислоти. Метаксильована полігалактуронова кислота – розчинний пектин.

Пектин у чистому вигляді – це білий порошок без смаку і запаху, добре розчинний у воді. У рослинних тканинах ¼ частина пектинових речовин знаходиться у вигляді розчинного пектину, який входить до складу клітинного соку, а ¾ пектинових речовин – це нерозчинний у воді протопектин. Протопектин утворює міжклітинний прошарок у розчинній тканині та зумовлює її твердість.

Протопектин розглядають як гетерополімер зі складною розгалудженою структурою. Головний ланцюг протопектину складається з молекул пектину, з'єднаних моносахаридом рамнозою. До головного ланцюга приєднані ланцюжки геміцелюлоз (галактани і арабани). Отже, протопектин (нерозчинний пектин) і пектин (розчинний пектин) містять у своєму складі метиловий ефір полігалактуронової кислоти. При цьому протопектин і пектин різного походження різняться за ступенем метилювання.

Характерною властивістю багатьох полісахаридів є їх здатність до утворення драглів у водних розчинах. Для утворення полісахаридного драглю потрібно, щоб лінійні молекули були організовані в дірчасту просторову сітку, в чарунках якої знаходиться вода. Природа вузлів цієї сітки дозволяє пов'язувати структуру полімеру з його здатністю до утворення драглів. Наприклад, припускають, що у драглях пектинів вузли утворюються за рахунок високометильованих ділянок різних ланцюгів пектинових кислот, які зв'язуються у водних розчинах гідрофобними взаємодіями, а низькометильовані й тому добре гідратовані ділянки утворюють міжвузлові проміжки. Отже, чим більше метоксильних груп у молекулі пектину, тим сильніше здатність до утворення драглів цих сполук. Таку високу здатність має пектин ряду сортів яблук, апельсинів, айви, чорної смородини. Пектин овочей характеризується низькою здатністю утворювати драглі.

Гідрофобні взаємодії у вузлах пектинових драглів порівняно слабкі та легко розриваються через гідратацію моносахаридних залишків. Тому міцні драглі утворюються тільки при умові зниження термодинамічної активності води. Таке зниження досягається за рахунок розчинення у воді добре гідратованих низькомолекулярних речовин, наприклад, сахарози. Утворення пектинових драглів у присутності сахарози є основою багатьох кондитерських виробництв – приготування варення, конфітюрів, мармеладів, пастили, желе і т. ін.

Здатність пектину до утворення драглів у присутності цукру підвищується в кислих розчинах. Так, 1 г пектину може зажелювати до 750 г кислого розчину цукру.

Процеси дозрівання плодів, овочей і ягід, а також їх розм'якшування при тепловій кулінарній обробці пов'язані з перетвореннями пектинових речовин. Під час розвитку рослинних тканин у них накопичується нерозчинний протопектин. Вміст пектинових речовин у плодах, ягодах і овочах характеризується такими значеннями, %:

Яблука – 0,82...1,29;
Абрикоси – 1,03;
Слива – 0,96...1,14;
Чорна смородина – 1,52;
Клюква – 0,50...1,30;
Морква – 2,50;
Цукровий буряк – 2,50.

При дозріванні та зберіганні плодів і овочів поступово зменшується вміст протопектину й накопичується розчинний пектин. Цей процес каталізується спеціальним ферментом – протопектиназою. При цьому тканини рослинного матеріалу стають м'якішими, ніжнішими. У разі теплової обробки продуктів рослинного походження зв'язок між клітинами слабшає через перехід протопектину в пектин, і консистенція тканини розм'якшується.

Таким чином, нерозчинний протопектин під дією протопектинази або теплової обробки переходить у розчинний пектин (частково або повністю метильована пектинова кислота), який у присутності кислих розчинів сахарів здатен до утворення желе тим більше, чим вищою є ступінь метилювання пектинової кислоти.

Під дією на розчинний пектин розбавлених лугів або ферменту пектази метоксильні групи (-OCH_3) легко відщеплюються та утворюють метиловий спирт і пектинову кислоту, які не здатні до утворення драглів у присутності сахарози. Тому при промисловому одержанні пектину стараються уникнути його лужного або ферментативного гідролізу, що викликає зниження здатності пектину утворювати драглі.

Пектинові речовини грають велику роль у харчуванні: сприяють нормальному травленню, виконуючи разом із клітковиною механічну роль у кишечнику; виводять із організму солі важких металів та радіонуклідів зв'язують надлишок холестерину, виконують роль протирадіаційних сполук.

Найбільше значення, як джерела енергії, для організму людини мають засвоювані вуглеводи (крохмаль, сахароза, глюкоза, фруктоза, які надходять із рослинною їжею, і в складі молока – лактоза).

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 15

„ДОСЛІДЖЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ”

Мета заняття: провести дослідження властивостей вуглеводів та їхньої здатності до перетравлення ферментами.

План заняття

1.Дослідити перетравлення сахарози ферментами дріжджів.
2.Вивчити перетравлення крохмалю ά-амілазою за методом Вольгемута.
3.Визначити взаємодію вуглеводів із гідрооксидом міді за допомогою реакції Троммера.
4.Вивчити взаємодію вуглеводів з реактивом Фелінга.

1. Дослідження перетравлення сахарози ферментами дріжджів

Об’єкт дослідження: сахароза, 0,5 %-й розчин.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Витяжка з дріжджів;
2. Мідь сірчанокисла, 5 %-й розчин;
3. Гідроксид натрію, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки наливають по 1 мл 0,5 %-го розчину сахарози. У першу додають 0,5 мл витяжки з дріжджів. Обидві проби ставлять у термостат на 15 хв. при температурі 37^{o}С. Потім проводять пробу Троммера на наявність редукуючих вуглеводів.

2. Дослідження перетравлюваності крохмалю (кількісне визначення активності α-амілази за методом Вольгемута)

Об’єкт дослідження: крохмаль, 1 %-й розчин.
Обладнання і посуд: штатив із пробірками.
Реактиви: 1. Витяжка з підшлункової залози, розбавлена в 1000 разів (джерело α-амілази);
2. Йод, 0,02 н. розчин.

Техніка виконання роботи

У чотири пробірки наливають по 1 мл води. У першу приливають 1 мл джерела ферменту, потім з неї відбирають 1 мл вмісту і переносять у другу пробірку, а потім з другої 1 мл приливають у третю пробірку, з третьої – в четверту, а з неї 1 мл рідини виливають, тобто послідовно розбавляють фермент у 2, 4, 8, і 16 разів.

До всіх пробірок додають по 1 мл 1 %-го розчину крохмалю і поміщують у термостат при температурі 37°С. Через 10 хвилин додають по 1 краплі 0,02 н. розчину йоду. Відзначають забарвлення. Активність ферменту визначають за найменшою концентрацією джерела ферменту, яка викликала зникнення синього забарвлення. Потім помножують розбавлення в цій пробі на 1000 і одержують показник активності, який виражається кількістю мілілітрів 1 %-го розчину крохмалю, що розщеплює 1 мл нерозбавленого джерела фермента при температурі 37°С протягом 10 хвилин:

$$Д\ ^{10/}_{37}{}^{o} = 1000 \cdot а,$$

де : Д– активність ферменту;

а – розбавлення ферменту в пробірці, що передує тій, в якій забарвлення синє.

Результати дослідів заносяться в табл. 5

Таблиця 5

№ проби	**1**	**2**	**3**	**4**
Розбавлення джерела ферменту				
Забарвлення з I_2				
Наявність декстринів				

3. Взаємодія вуглеводів із гідроокисом міді (реакція Троммера)

Всі моносахариди, а також більш складні сахари, що мають вільну карбонільну (альдегідну або кетонну) групу, мають здатність відновлюватися у лужному середовищі.

Реакція Троммера полягає у відновленні окисної міді в закисну. При цій реакції сірчанокисла мідь реагує з лугом, утворюючи блакитний гідрат окису міді. При його нагріванні колір змінюється на жовтий, а потім на червоний.

Об’єкт дослідження: набір сахарів.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Глюкоза, 1 %-й розчин;
2. Мальтоза, 1 %-й розчин;
3. Фруктоза, 1 %-й розчин;
4. Лактоза, 1 %-й розчин;
5. Сахароза, 1 %-й розчин;

6. Крохмаль, 1 %-й розчин;
7. Гідроокис натрію, 10 %-й розчин;
8. Сульфат міді, 5 % розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірки (за кількістю існуючих у лабораторії вуглеводів) наливають по 1 мл глюкози, лактози, мальтози, фруктози,сахарози, крохмалю, добавляють такий же об'єм гідроокису натрію і 0,5 мл сульфату міді до появи блакитного осаду гідроокису міді. Усі пробірки обережно нагрівають. Моносахариди і поновлені дисахариди (лактоза і мальтоза) відновлюють гідроокис міді до закисі міді – осад жовтого кольору, який при тривалому нагріванні перетворюється на оксид міді – осад цеглисто-червоного кольору. Сахароза і крохмаль (необновлені вуглеводи) не змінюють забарвлення гідроокису міді.

Роблять висновок щодо відповідності властивостей вуглеводів у залежності від хімічної будови.

4. Взаємодія вуглеводів з реактивом Фелінга

Механізм реакції з Фелінговою рідиною такий само, як і реакції Троммера. Перевагою Фелінгової рідини є те, що мідь при надлишку реактиву не випадає у вигляді окису міді.

Об'єкт дослідження: набор сахарів.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Глюкоза, 1 %-й розчин;
2. Мальтоза, 1 %-й розчин;
3. Фруктоза, 1 %-й розчин;
4. Лактоза, 1 %-й розчин;
5. Сахароза, 1 %-й розчин;
6. Крохмаль, 1 %-й розчин;
7. Реактив Фелінга (Фелінг I + ФелінгII у рівних об'ємах)

Техніка виконання роботи

У пробірки (за кількістю існуючих у лабораторії вуглеводів) наливають по 1 мл глюкози, фруктози, лактози, мальтози, сахарози, крохмалю, додають такий же об'єм реактиву Фелінга. Пробірки обережно нагрівають. Моносахариди, відновлені дисахариди (лактоза і мальтоза), відновлюють реактив Фелінга через гідрооксид міді жовтого кольору до окису міді цеглисто-червоного кольору. Сахароза і крохмаль (невідновлені вуглеводи) не змінюють забарвлення реактиву Фелінга.

Роблять висновок щодо відповідності властивостей вуглеводів у залежності від хімічної будови.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 16

„ВИЯВЛЕННЯ РЕДУКУЮЧИХ ВУГЛЕВОДІВ”

Мета заняття: вивчити вміст редукуючих вуглеводів у складі харчових продуктів.

План заняття

1.Провести реакцію Селіванова на визначення кетоз.
2.Виявити наявність моносахаридів у моркві.
3.Визначити редукуючий вуглевод-лактозу у молоці.
4.Виявити зміст сахарози у харчовому цукрі.
5.Провести ізомерізацію глюкози у фруктозу.

1.Реакція Селіванова на визначення кетоз

Найважливішою кетозою є фруктоза. Вона зустрічається в природі як у вільному (у складі меду), так і в зв’язаному (у складі сахарози, деяких інших полісахаридів) стані. У живих організмах фруктоза перетворюється на глюкозу.

Характерною реакцією на фруктозу та інші кетози є реакція Селіванова. Суть реакції полягає в тому, що при нагріванні розчину кетози з концентрованою соляною кислотою утворюється оксиметилфурфурол, який із резорцином дає продукт конденсації червоного кольору. Ця реакція дає можливість визначити як вільні, так і зв’язані кетози.

Швидше реакція Селіванова відбувається з фруктозою.

Об’єкт дослідження : фруктоза, 1 %-й розчин.
Обладнання і посуд : 1. Штатив із пробірками;
2. Водяна баня;
Реактиви: 1. Реактив Селіванова.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 0,5 мл розчину фруктози, додають 1 мл реактиву Селіванова і кілька хвилин нагрівають. Спостерігають червоне забарвлення розчину.

Роблять висновок щодо значення цієї реакції для визначення фруктози.

2.Виявлення моносахаридів у моркві

Об’єкт дослідження: морква.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Реактив Фелінга (Фелінг І+ Фелінг ІІ у рівних об’ємах);
2. Реактив Селіванова.

Техніка виконання роботи

Кладуть у пробірку трохи протертої моркви, додають 5 мл води, струшують 2…3 хвилини, фільтрують і фільтрат ділять на дві частини. В одній пробірці відкривають моносахариди реакцією Фелінга, у другій – фруктозу – реакцією Селіванова.

3.Виявлення редукуючого вуглеводу лактози в молоці

Об’єкт дослідження: молоко.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Фільтри паперові;
3. Нагрівальний прилад;
4. Мірний циліндр;
5. Мірні колби на 100 мл.
Реактиви: 1. Реактив Фелінга (Фелінг І+Фелінг ІІ у рівних об’ємах);
2. КОН, 1 %-ий розчин.

Техніка виконання роботи

В мірний циліндр на 50 мл виміряють 2,5 мл молока, додають 40 мл дистильованої води і 1 мл 1 % розчину КОН. Об’єм суміші доводять до 50 мл. Струшують вміст. Фільтрують. Відмірюють в окрему пробірку 2-3 мл фільтрату і проводять раакцію Фелінга.

4.Виявлення сахарози в харчовому цукрі.

Об’єкт дослідження: цукор, 1 % розчин.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Сірчана кислота, концентрована;
2. Реактив Фелінга (Фелінг І+Фелінг ІІ у рівних об’ємах);
3. Реактив Селіванова.

Готують 1 %-й розчин харчового цукру. З 1...2 мл розчину проводять реакцію Фелінга. 2…3 мл розчину цукру піддають кислотному гідролізу, гідролізат розливають у дві пробірки: в одній після нейтралізації проводять реакцію Фелінга, у другій – реакцію Селіванова.

5.*Ізомерізація глюкози у фруктозу.*

Глюкоза і фруктоза – моносахариди.Глюкоза – виноградний, фруктоза – плодовий цукор. Моносахариди, що містять альдегідну групу, одержали назву альдоз (глюкоза), а ті, що містять кетонну групу – кетоз (фруктоза). Усі альдози і кетози є ізомерами. Це ізомерія альдоз і кетоз з відкритим ланцюгом і з однаковим числом атомів вуглевода в молекулі.

Глюкоза і фруктоза мають однакову молекулярну формулу $C_6H_{12}O_6$, отже є ізомерами.

Всі моносахариди, що мають в окисній формі вільний глюкозидний гідроксил, а у відкритій – вільну карбонільну групу, в тому числі глюкоза, фруктоза, при нагріванні в лужному розчині легко розщеплюються, подібно до альдегідів і кетонів, утворюючи брунатний або чорний розчин.

При осмолюванні утворюється складна суміш речовин, при цьому вуглеводи ізомерізуються по різних напрямках. При дії дуже слабких лугів вуглеводи не зазнають глибоких змін, проте все ж здатні ізомеризуватися. Так, глюкоза в таких умовах частково ізомерізується у фруктозу.

Об’єкт дослідження: 1. Глюкоза, 10 %-й розчин;
2. Фруктоза, 10 %-й розчин;
3. Сахар, 10 %-й розчин.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки;
3. Крапельниці;
4. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Концентрований розчин лугу;
2. Розбавлена сірчана кислота, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

Дослід проводять одночасно з кількома різними вуглеводами, використовуючи готові 5…10 %-і розчини або розчинюючи 0,1…0,2 г вуглеводів в 1…2 мл дистильованої води.

До 1 мл розчину вуглеводу додають удвічі менший об’єм концентрованого розчину лугу, нагрівають суміш до кипіння і кип’ятять 2…3 хв. Відзначають зміну забарвлення розчину, якщо таке спостерігається. Потім охолоджують рідину і підкислюють її розбавленою сірчаною кислотою, при цьому забарвлення блідніє і з’являється виразний запах карамелі (палений цукор).

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 17

“ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ У ПРИСУТНОСТІ ФРУКТОЗИ ЙОДОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ”

Мета заняття: визначити наявність глюкози у присутності фруктози йодометричним методом.

План заняття

1.Провести визначення глюкози у присутності фруктози за допомогою йодометричного методу.

В основі цієї методики лежить здатність молекулярного йоду (I_2) у лужному середовищі окислювати тільки альдегідоспирти, не діючи на кето-спирти.

При внесенні надмірної кількості йод, який не прореагував, можна визначити у кислому середовищі титруванням гіпосульфітом натрію (індикатор-розчин крохмалю).

Об’єкт дослідження: розчин гідролізату сахарози.

Обладнання та посуд: 1. Скляні палички;
2. Колби конічні (об’ємом 50 мл);
3. Піпетки;
4. Крапельниці;
5. Бюретки.

Реактиви: 1. Йод, 0,05 н розчин;
2. Гідроксид калію, 0,05 н розчин;
3. Соляна кислота, 10 %-й розчин;
4. Гіпосульфіт натрію, 0,05 н розчин ($Na_2S_2O_3$);
5. Крохмаль, 1 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві колби вносять по 50 мл розчину йоду. В одну з них (проба) додають 10 мл розчину, який досліджується (гідролізат сахарози або інвертний цукор), а в другу (контроль) – 10 мл дистильованої води. Потім, збовтуючи, доливають по краплям 10 мл розчину гідроксиду калію і залишають стояти при кімнатній температурі 15 хв. Після цього до обох колб доливають по 10 мл розчину соляної кислоти і 2...3 краплі розчину крохмалю. Вміст колб титрують розчином гіпосульфіту натрію до зникнення синього забарвлення, яке з’явилося в результаті додавання крохмалю.

Масову концентрацію глюкози у досліджуваному розчині (мг/мл) обчислюють за формулою:

$$C = (B – A) \cdot f \cdot Q \cdot V_o/V_1, \text{ де}$$

А і В – об'єми розчину гіпосульфіту натрію, який необхідний для титрування проби і контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину гіпосульфіту натрію, що дорівнює 1;

Q – маса глюкози (9 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину гіпосульфіту натрію;

V_o – загальний об'єм проби: 50 + 10 (вуглевод) +10 (КОН) + 10 (HCl) = 80 (мл);

V_1 – об'єм досліджуваної суміші, яку взяли для аналізу – 10 мл.

Контрольні запитання

1. Яка роль вуглеводів у харчуванні та життєдіяльності ?
2. Напишіть формули основних представників класів моно-, оліго- і полісахаридів ?
3. Які речовини мають властивості до утворення драглів у водних розчинах? Назвіть основних представників.

Тема 8. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

За добу людина вводить в організм від 300 до 600 г вуглеводів. З них 35 % припадає на долю моносахаридів і дисахаридів, а 65 % - на долю полісахаридів. Вони представлені переважно крохмалем. Кількість глікогену в їжі – від 4 до 15 г на добу. Основним джерелом вуглеводів є продукти рослинного походження: хліб, крупи, овочі, фрукти, ягоди.

Всі вуглеводи, крім клітковини і пектинових речовин, зазнають гідролітичного розщеплення ферментами в шлунково-кишковому тракті.

Ферменти, які каталізують гідроліз крохмалю, називаються *амілазами*, а ті, що гідролізують дисахариди, називають за назвою розщеплюваних ними вуглеводів: *сахараза, мальтаза, лактаза*. Всі вони мають оптимум дії у слабо лужному середовищі і неактивні в кислому середовищі. Винятком є *амілаза слини,* яка має оптимум дії при нейтральному pH = 6,8.

Крохмаль починає перетравлюватися у ротовій порожнині під дією ферменту α-амілази слини. Під її впливом він розщеплюється на дрібні уламки – декстрини. Оскільки в шлунку відсутні ферменти, що розщеплюють вуглеводи, то їх гідроліз відбувається до тієї пори, поки шматок їжі повністю не просякне шлунковим соком. Остаточне розщеплення крохмалю та інших дисахаридів (сахароза, мальтоза, лактоза) відбувається у дванадцятипалій кишці під впливом ферментів соку підшлункової залози*: α-амілази, сахарази, лактази, мальтази.*

Кінцевим продуктом розщеплення вуглеводів є моносахариди. Стінкою тонкого кишечнику вони всмоктуються і надходять у воротну вену, яка транспортує вуглеводи в печінку. Всмоктування глюкози, галактози і фруктози відбувається після попереднього фосфорилювання в кишковій стінці з утворенням гексозофосфорних ефірів. При переході сахарози з клітин кишкової стінки в кров гексозофосфорні ефіри розщеплюються і цукор (глюкоза) надходить у кровотік. Фосфорилювання глюкози каталізується ферментом *гексокіназою* і відбувається з витраченням молекули АТФ на кожну молекулу глюкози.Тому воно супроводжується підсилюванням окислювальних процесів у клітинах кишкової стінки, що забезпечують ресинтез АТФ, яка витрачається на всмоктування глюкози. Після прийняття їжі концентрація цукру у воротній вені підвищується, що призводить до розвитку *аліментарної гіперглікемії.* В печінці під дією ферменту *фосфорилази* моносахариди перетворюються на глікоген. Моносахариди, які всмоктуються в кров, по системі воротної вени перш за все потрапляють у печінку. Частина глюкози затримується і відкладається в клітинах печінки у вигляді глікогену, а частина надходить у велике коло кровотоку. Яка частина глюкози буде затримана клітинами печінки, залежить від потреби клітин у енергії, від гликогенних запасів у них, від інтенсивності всмоктування. Чим печінка бідніша глікогеном, тим більше глюкози вона затримує. Глюкоза швидко надходить у велике коло кровообігу, крохмаль сприяє накопиченню глікогену в печінці. Саме тому перед виконанням спортивних навантажень рекомендують їжу, багату на крохмаль.

При вживанні чистої глюкози всмоктування відбувається дуже швидко, концентрація її в крові воротної вени різко підвищується. Значна частина глюкози не встигає затриматися в печінці і йде у велике коло кровообігу.

Якщо необхідно швидко забезпечити м’язи вуглеводами, слід вводити до раціону глюкозу. Швидко потрапляючи у велике коло кровообігу, глюкоза сприяє підвищенню рівня цукру в крові.

У нормі вміст цукру в крові дорівнює 80...120 мг %. Підтримка постійного рівня цукру забезпечується рядом факторів. Важлива роль у цьому процесі належить гормонам. Так, *інсулін* – гормон підшлункової залози знижує вміст глюкози в крові – викликає гіпоглікемію, тому що він активує глюкокіназу, яка сприяє утворенню глікогену з глюкози, а також поліпшує проникнення глюкози у клітини.

Глюкагон – гормон підшлункової залози – сприяє розщепленню глікогену, отже викликає підвищений вміст глюкози в крові – гіперглікемію.

Гормон, що утворюється в мозковій речовині надниркової залози – *адреналін* – активує фосфорилазу печінки, що сприяє розщепленню глікогену до глюкози, та її активне окислення в клітині з виділенням енергії.

Тироксин – гормон щитовидної залози – викликає утворення глюкози з інших проміжних продуктів обміну речовин, частково роз’єднується дихання з

фосфорилюванням. Аналогічно діє і гормон передньої долі гіпофізу – АКТГ (адринокортикотропний гормон).

При значному зниженні вмісту глюкози в крові рефлекторно збуджується центр проміжного мозку, який надсилає імпульси, що підсилюють розщеплення глікогену і сприяють підвищенню вмісту глюкози в крові.

У спортсменів перед змаганнями, при виконанні тяжкої фізичної роботи, під впливом навколишнього середовища розвивається *умовно-рефлекторна гіперглікемія.*

В разі вживання значної кількості солодких вуглеводів за один прийом (більше 150 г) виникає *аліментарна гіперглікемія.* Регулярне переїдання солодких вуглеводів призводить до виснаження інсулярного апарату підшлункової залози і до розвитку цукрового діабету.

Глюкоза, яка надходить з крові в органи, підлягає фосфорилюванню, яке каталізується ферментом гексокіназою з витрачанням однієї молекули АТФ. Глюкоза-6-фосфат перетворюється на глюкоза-1-фосфат. Він при участі відповідного ферменту вступає у взаємодію з уридинтрифосфатом (УТФ) із утворенням уридиндифосфат-глюкози (УДФ-глюкоза) і пірофосфату. УДФ-глюкоза взаємодіє з глікогеном, тобто сприяє збільшенню ланцюга глікогену на один глюкозний залишок.

Вуглеводи є основним джерелом енергії в організмі людини. У процесі перетравлення вуглеводів, як і інших органічних речовин їжі, енергія практично не звільнюється, і цей процес (розщеплення і всмоктування) потребує додаткових енерговитрат з боку організму, зокрема для перистальтики кишечнику і руху ворсинок. Окислення вуглеводів у тканинах є найважливішою ланкою обміну речовин, що зумовлює повне використання їх для енергетики і пластики організму, а також для утворення кінцевих продуктів – CO_2 і H_2O.

У вищих тварин відбувається як анаеробний, так і аеробний процес обміну вуглеводів.

Проте, основним процесом, що може забезпечити повне використання енергії вуглеводів в організмі людини і тварини, є окислення їх за участю атмосферного кисню, тобто аеробний обмін. Реакціям анаеробного циклу, особливо в м’язах, належить обмежена, але важлива роль у забезпеченні організму енергією.

Гліколіз (від грецьк. – глікос- солодкий, лізис – розчинення) являє собою систему анаеробних біохімічних реакцій, зумовлених перетворенням глюкози на молочну кислоту. Якщо процес починається з глікогену, він називається глікогенолізом. Перетворення глюкози на молочну кислоту (і при глікогенолізі, і при гліколізі) відбувається через процес фосфорилювання глюкози з утворенням проміжних субстратів. Крім того, у процесі окислення відбувається поетапне вивільнення енергії з субстратів і поетапне її засвоювання. Енергія гліколізу не використовується безпосередньо, а резервується у молекулах АТФ – акумуляторах енергії.Варте уваги, що реакція переетерифікації (перенесення

фосфору з субстрату на АДФ) зумовлена окислювально-відновним процесом між фосфогліцериновим альдегідом і піровиноградною кислотою.

Дійсно, при блокуванні реакції відновлення ПВК у молочну кислоту за рахунок $НАДН_2$ могла б статися регенерація $НАД^+$, яка необхідна для перетворення (окислення) фосфоргліцерінового альдегіду на фосфогліцеринову кислоту. Ця окислювально-відновна реакція має велике значення в гліколізі і бродінні. Важлива роль належить і відщепленню води від 2-фосфогліцерінової кислоти, тому що утворена при цьому енольна форма фосфопіровиноградної кислоти є другою макроергічною сполукою, яка взаємодіє з АДФ, сприяє перетворенню її на АТФ.

Гліколіз є одним із процесів, що забезпечують організм, особливо м'язи, енергією. Важливість його визначається також тим, що в процесі гліколізу утворюються речовини, які необхідні для біосинтезу в тканинах деяких життєво-важливих сполук. Наприклад, фосфодиоксіацетон використовується для біосинтезу жирів. Таким чином, саме гліколіз готує напівфабрикати, які в наступному окислюються до CO_2 і H_2O в аеробних умовах.

Анаеробне окислення вуглеводів закінчується утворенням піровиноградної або молочної кислоти.

Луі Пастер, вивчаючи взаємозв'язок між аеробним і анаеробним окисленням, звернув увагу на гальмування гліколізу диханням. Це явище одержало назву *пастерівського ефекту*. Гальмування відбувається на стадії перетворення фруктозо-6-фосфату в 1,6-фруктозо-дифосфат.

Біля 70 % ПВК окислюється до CO_2 і H_2O через стадію утворення ацетіл-КоА. При обміні білків, жирів і вуглеводів протягом доби на кожен 1 кг маси тіла утворюється біля 10 г оцтової кислоти, що при масі 70 кг дорівнює 700 г. Окислення цієї кількості оцтової кислоти до CO_2 і H_2O є основним джерелом енергії в організмі людини. При аеробному окисленні в одному циклі утворюється 1 молекула $НАДН_2$ на стадії декарбоксилювання ПВК з утворенням ацетил-КоА. Окислення ізолимонної кислоти в щавлевоянтарну супроводжується утворенням також молекули $НАДН_2$. При декарбоксилуванні α-кето-глутарової кислоти з утворенням сукцинил-коА виділяється $НАДН_2$. Перетворення сукцинил-КоА на янтарну кислоту супроводжується утворенням 1 молекули АТФ за рахунок ГТФ (субстратне фосфоролювання). Дегідрування янтарної кислоти відбувається з виділенням $ФАДН_2$, а дегідрування яблучної – з виділенням $НАДН_2$. Відомо, що одна молекула $НАДН_2$ еквівалентна 3 молекулам АТФ, а 1 молекула $ФАДН_2$ – 2 молекулам АТФ.

Аеробне окислення вуглеводів – магістральний шлях обміну речовин. Динамічну сталість його компонентів підтримують спеціальні механізми: наприклад, перетворення ПВК на ЩОК, кількості ЩОК за рахунок дезамінування глютамінової кислоти для відшкодування кількості ά-кетоглутарової та ін.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 18

„ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ ВУГЛЕВОДІВ”

Мета заняття: дослідити продукти обміну вуглеводів.

План заняття

1.Провести якісну реакцію на молочну кислоту.
2.Вивчити травлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті.
3.Дослідити окислення моносахаридів і дисахаридів у кислому і лужному середовищах.
4.Визначити наявність глюкози у розчинах.
5.Вивчити використання неорганічного фосфату в процесі бродіння.

1. *Якісна реакція на молочну кислоту (реакція Уффельмана).*

Молочна кислота у присутності фенолята заліза (реактив Уффельмана), забарвленого у фіолетовий колір, утворює лактат заліза жовто-зеленого кольору.

Об’єкт дослідження: м’ясо.

Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Крапельниці;
3. Ступка з товкачиком.

Реактиви: 1. Кварцовий пісок;
2. Реактив Уффельмана (20 крапель 1 %-го розчину фенолу + 2 краплі 1 %-го розчину хлорного заліза до появи фіолетового кольору);
3. Молочна кислота.

Техніка виконання роботи

М’язи ріжуть ножицями і розтирають 1 г у ступці з невеликою кількістю кварцового піску протягом 3 хв., приливають 5 мл води, перемішують і зразу фільтрують через змочену водою вату. 1...2 мл фільтрату додають до реактиву Уффельмана. У присутності молочної кислоти фіолетове забарвлення рідини переходить у жовто-зелене. Утворюється лактат заліза.

Для порівняння проводять реакцію Уффельмана з розчином молочної кислоти і спостерігають появу жовто-зеленого забарвлення.

2.Травлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті

Метою роботи є вивчення впливу слини, шлункового соку і панкреатину (ферментного препарату, який був здобутий з підшлункової залози) на полісахариди їжі: крохмаль і целюлозу.

Об'єкт дослідження: 1. Крохмаль, 1 %-й розчин;
2. Целюлоза, 1 %-а водяна суспензія.

Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки;
3. Бюретки;
4. Термостат;
5. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. Шлунковий сік;
2. Панкреатин, 5 %-й розчин;
3. Сульфат міді, 5 %-й розчин;
4. Гідроксид натрію, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

Готують проби відносно табл. 6

Таблиця 6

№ проби	Розчин крохмалю, мл	Суспензія целюлози, мл	Слина, мл	Шлунковий сік, мл	Панкреатин, мл
1	1,0	-	1,0	-	-
2	-	1,0	1,0	-	-
3	1,0	-	-	1,0	-
4	-	1,0	-	1,0	-
5	1,0	-	1,0	1,0	-
6	-	1,0	1,0	1,0	-
7	1,0	-	-	-	2,0
8	-	1,0	-	-	2,0

Для інкубації пробірки ставлять на 30 хв. у термостат при температурі 37^{o} С. Після інкубації зміст кожної пробірки аналізують на присутність продуктів розщеплення полісахариду за допомогою реакції Троммера. Для цього у кожну з 8 пробірок доливають по 1 мл 10 %-го розчину гідроксиду натрію та 1...3 краплі сульфату міді. Обережно нагрівають верхню частину розчину у пробірці до закипання і кип'ятять 1 хв. Поява червоного осаду оксиду міді вказує на позитивну реакцію Тромера у присутності глюкози і мальтози.Отримані дані зводять у таблицю.

Таблиця 7

№ проби	Субст-рат	Знаходжен-ня продуктів реакції	Фермент, який роз-щеплює вуглеводи	Джерела ферменту	Відділ шлунково-кишково – го тракту	Поясне-ння результа-тів
1	2	3	4	5	6	7

3.Окислення моносахаридів і дисахаридів у кислому і лужному середовищах

Дисахариди окислюються повільніше моносахаридів і в лужному середовищі сполуки двовалентної міді не відновлюються. Це можна виявити за допомогою кислого реактиву Барфеда, що містить ацетат міді в кислому середовищі. При нагріванні моносахаридів і відновних дисахаридів з реактивом Барфеда двовалентна мідь відновлюється тільки з розчинами моносахаридів.

Об’єкт дослідження: 1. Глюкоза, 1 %-й розчин;
2. Лактоза, 1 %-й розчин;
3. Мальтоза, 1 %-й розчин.

Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Нагрівальний прилад.

Реактиви: реактив Барфеда (13,3 г ацетату міді розчиняють в 200 мл гарячої води. Фільтрують і до фільтрату додають 1,9 мл льодяної оцтової кислоти).

Техніка виконання роботи

У першу пробірку наливають 1 мл розчину глюкози, в другу – такий самий об’єм лактози, в третю – мальтози. Потім додають в пробірки по 1 мл реактиву Барфеда і нагрівають. Випадіння осаду оксиду міді спостерігають лише в пробірці з глюкозою. Роблять висновок щодо окислення моносахаридів і відновних дисахаридів залежно від середовища.

4. Визначення наявності глюкози в розчинах

В крові міститься глюкоза, яка є джерелом енергії після переходу цього вуглеводу в тканини. У сечі здорової людини глюкози не повинно бути, тому що вона підлягає зворотньому всмоктуванню в міру проходження первинної сечі через звиті канальці нефрону. Проте при деяких захворюваннях нирок глюкоза з’являється і у вторинній сечі. Існують і інші причини переходу глюкози в сечу із крові (цукровий діабет, вживання за одне приймання їжі великої кількості цукру або меду, емоційне збудження).

Об’єкт дослідження: 1. Сеча здорової людини;

2. Сеча людини з захворюванням нирок.

Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Крапельниці;
3. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. NaOH, 10 %-й розчин;
2. Сульфат міді, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки наливають по 1 мл сечі здорової та хворої людини, приливають 1 мл NaOH та 1 мл сульфату міді. Суміші кип'ятять. Поява червоного осаду свідчить про наявність редуцируючого вуглеводу (глюкози) у сечі.

5. Використання неорганічного фосфату в процесі бродіння

У процесі спиртового бродіння, як і при гліколізі, відбувається фосфоролітичний розпад вуглеводів. При цьому утворюються проміжні продукти – фосфорні ефіри гексоз, триоз та АТФ. При фосфолюванні зв'язується неорганічний фосфат, концентрація якого в розчині знижується.

Про кількість неорганічного фосфату судять по реакції утворення комплексної фосфомолібденової кислоти, котру потім відновлюють в молібденову синь.

Об'єкт дослідження: дріжджі (отмиті від фосфатів та висушені).

Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Ступки порцелянові;
3. Піпетки;
4. Воронки;
5. Паперові фільтри;
6. Ваги;
7. Термостат.

Реактиви: 1. Сахароза або глюкоза, 1 %-й розчин;
2. Фосфати, (6 г Na_2HPO_4 $2H_2O$ та KH_2PO_4 на 1 л води);
3. ТХУ, 10 %-й розчин;
4. Молібдат амонію, 5 %-й розчин;
5. Аскорбінова кислота, 0,5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В ступці розтирають 1 г відмитих і висушених пивних дріжджів з 1 г сахарози (глюкози) і 5 мл води. Суміш переносять в пробірку, додають 5 мл розчину фосфатів, перемішують, відміряють 1 мл суміші і переносять у пробірку, яка містить 1 мл 10 %-го розчину ТХУ (проба № 1).

Суміш, що лишилася, ставлять у термостат при температурі 37^{o} С на 30 хв. (проба № 2), на 1 годину (проба № 3), на 1,5 години (проба № 4). Беруть по 1 мл суміші, що бродить та переносять у відповідно пронумеровані пробірки, в які налито по 1 мл ТХУ. Кожну з чотирьох проб фільтрують через складчатий фільтр, в цих безбілкових фільтратах досліджують неорганічний фосфат.

Із кожної проби відміряють по 0,5 мл безбілкового фільтрату в пронумеровану пробірку, додають 1 мл розчину молібдату амонію і 0,5 мл розчину аскорбінової кислоти. Потім додають 8 мл дистильованої води, перемішують, залишають при кімнатній температурі до появи забарвлення. Після 15 хв. порівнюють інтенсивність синього забарвлення у всіх пробах.

Контрольні питання

1. Як відбувається перетравлення і всмоктування вуглеводів в шлунково-кишковому тракті ?
2. У чому полягає глікогенна функція печінки?
3. Як відбувається синтез глікогену з глюкози в печінці?
4. Які умови сприяють виникненню гіперглікемії і глюкозурії ?
5. Напишіть реакцію гідролізу і фосфоролізу глікогену.
6. Дайте повну схему гліколізу.
7. В яких реакціях гліколізу витрачається АТФ? Напишіть ці реакції.
8. Напишіть реакції субстратного фосфорилювання в гліколізі.
9. Дайте схему циклу трикарбонових кислот Кребса і покажіть зв’язок циклу з тканинним диханням.
10. Наведіть енергетичний баланс циклу трикарбонових кислот Кребса.

Тема 9 . ЛІПІДИ

Ліпіди (від грецької ліпос – жир) – клас різних речовин, нерозчинних у воді і добре розчинних в органічних розчинниках (бензин, спирт, ефір, хлороформ та ін.). Ця загальна властивість ліпідів зумовлена тим, що в їх молекулах переважають довгі аліфатичні вуглеводневі ланцюги або бензольні кільця, тобто неполярні, гідрофобні структури. Значення ліпідів, як продуктів харчування, полягає в тому, що вони є висококалорійними компонентами їжі. За своєю калорійністю вони в два рази перевершують вуглеводи і білки. Ліпіди виконують також інші важливі фізіологічні функції в організмі.

Ліпіди поділяють на декілька основних груп:

1. *Прості ліпіди* – це ефіри жирних кислот, до них належать жири і воски. Воски – це ефіри жирних кислот і будь-яких спиртів, крім гліцерину.

2. *Стероїди* – це сполуки, що містять циклічні ядра циклопентанпергідрофенантрену. До стероїдів належить ряд важливих для організму речовин (статеві і кортікоїдні гормони, вітамін Д, жовчні кислоти). Стероїди, що містять вільну ОН-групу, називають стеролами або стеринами. Ефіри стеринів з високомолекулярними жирними кислотами називають стеридами. Одним із найважливіших стеринів є холестерин.

3. *Складні ліпіди* – це сполуки, при гідролізі яких утворюються крім спирту та кислот й інші сполуки. До них належать фосфати (фосфоліпіди), які являють собою складні ефіри гліцерину, жирних кислот і фосфорної кислоти, яка часто буває з'єднана з азотистою основою (холіном, етаноламіном, серином). Фосфатидами є лецитини, кефаліни, ацетилфосфатиди та ін. До складних ліпідів належать також ліпіди, зв'язані з іншими класами речовин: білками (ліпопротеїни), вуглеводами (глікозідоліпіди).

Природні жири – складна суміш гліцеридів, вільних жирних кислот, вітамінів, пігментів, білків, вуглеводів, восків. Одні супутні гліцеридам речовини, наприклад, вітаміни, підвищують харчову цінність жиру, інші – погіршують (вільні жирні кислоти, воски).

Відомо більше 40 жирних кислот, чим і пояснюється різноманітність і специфічність натуральних жирів.

Жирні кислоти можуть бути насиченими і ненасиченими, тобто такими, що містять один або кілька подвійних зв'язків. Консистенція жирів залежить від природи жирних кислот, що входять до їх складу. В рослинних жирах або маслах переважають гліцериди ненасичених жирних кислот; при звичайній температурі більшість із них – рідкі. Тваринні жири (сало) за нормальних умов – тверді, тому що містять багато гліцеридів насичених жирних кислот. У процесі гідрогенізації ненасичені жирні кислоти перетворюються на насичені, що використовується при виробництві маргарину. Хімічний склад жирів залежить від виду рослин і тварин (табл.8).

Таблиця 8 – Вміст кислот у жирах, % від суми

Кислота	**Олія**				**Сало**		
	Соняшникова	**Маслинова**	**Кукурудзяна**	**Соєва**	**Коров'яче**	**Бараняче**	**Свиняче**
Пальметинова	3,5...6,4	9...12	8...10	2,5...6	24,5	20...28	26...32
Стеаринова	1,6...4,6	до 2	2,5...4,5	4,5...7,3	9,5	25...32	12..16
Олеїнова	24...40	64...85	30...49	23...29	32	36...47	41...51
Лінолева	46...62	4...12	46...56	51...57	4	3...5	3...14
Ліноленова	до 1	-	-	3...6	0,2	0...5,1	до 1

При дослідженні хімічної природи і якості жиру визначають його фізичні (температура плавлення, застигання, в'язкість) і хімічні (кислотне, йодне, перекисне числа, число омилення) константи.

Кислотне число характеризується вмістом у жирі вільних жирних кислот. Його визначають кількістю міліграмів гідроксиду калію, які потрібні для нейтралізації вільних жирних кислот в 1 г жиру. Кислотне число – важливий показник якості жирів, тому що при зберіганні жирів або багатих жиром продуктів, при їх термічній обробці воно збільшується в результаті гідролізу гліцеридів.

Йодне число – показник кількості подвійних зв'язків у молекулах жирних кислот.Його визначають кількістю грамів йоду, які ідуть на титрування 100 г жиру. Чим більше жир має ненасичених жирних кислот і чим більше в цих кислотах подвійних зв'язків, тим вище значення йодного числа. Чим вище йодне число, тим легше жир окислюється. Отже, при окисленні жирів у процесах зберігання і термічної обробки йодне число зменшується.

Число омилення характеризує вміст в 1 г жиру вільних і зв'язаних із гліцерином жирних кислот. Його виражають в міліграмах гідроксиду калію, необхідних для нейтралізації всіх жирних кислот 1 г жиру (табл.9).

Таблиця 9 – Фізико-хімічні властивості свіжих жирів

Кислота	**Олія**				**Сало**		
	Соняш-никова	**Масли-нова**	**Кукуруд-зяна**	**Соєва**	**Коро-в'яче**	**Бара-няче**	**Сви-няче**
Температура застигання , ^{0}C	(-16)...(-19)	0...(-16)	(-10)...(-20)	(-15)...(-18)	19	32...45	22...32
Температура плавлення, ^{0}C	-	-	-	-	27...34	44...55	33...48
Кислотне число, мг КОН/1 г	0,1...4	-	0,25...3,5	0,2...2,5	-	до 1	до 1
Число омилення, мг КОН/1 г	190	193	188	192	-	195	197
Йодне число, г йоду/100 г	119...136	72...89	111...133	120...141	22...48	31...46	46...66

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 19

„ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЛІПОЇДІВ"

Мета заняття: вивчити якість простих та складних ліпідів.

План заняття

1.Визначити реакції стеринів з сірчаною кислотою.
2.Провести дослідження емульгування жирів в шлунково-кишковому тракті.
3.Визначити якість ліпідів по константам жирів.
4.Визначити якість жирів по акролеїновій пробі.
5.Провести дослідження якісної реакції на лецитін.

1. Реакція стеридів з сірчаною кислотою

Водовідбираючі речовини перетворюють стерини на ненасичені вуглеводи, які утворюють забарвлені комплекси з сірчаною кислотою.

Об'єкт дослідження: 1. Холестерин, 0,3 %-й розчин в хлороформі;
2. Лецитин, 0,3 %-й розчин в хлороформі;
3. Соняшникова олія, 0,3 %-й розчин в хлороформі.
Обладнання та посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки.
Реактиви: концентрована сірчана кислота.

Техніка виконання роботи

У сухі пробірки наливають по 1 мл хлороформних розчинів, що будуть досліджуватися, і в кожну додають по стінці пробірки 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірок обережно перемішують. У присутності стеринів верхній шар рідини забарвлюється в темно-червоний колір, нижній – у жовто-червоний з зеленою флуоресценцією.

Результати усіх трьох дослідів оформлюють у вигляді таблиці, позначаючи характер реакції знаками „+", „ – " (табл.10).

Таблиця 10

Реактиви	**Характер реакції з різними видами ліпідів**		
	соняшникова олія	**лецитин**	**холестерин**

2. Проведення емульгування жирів

Емульгуванням називають розподіл однієї нерозчинної рідини в інший у вигляді краплин. Таке подріблення на краплини звичайно здійснюється при енергійному перемішуванні двох рідин. Щоб емульсія не розшаровувалася, використовують спеціальні речовини – *емульгатори* або *стабілізатори*. Емульгатор розподіляється по поверхні краплинок диспергованої рідини у вигляді тонкої плівки і перешкоджає їх злиттю. Стійкість одержаної емульсії в значній

мірі залежить від природи емульгатора. Наприклад, молочно-жирова емульсія маргарину має високу стійкість і не розшаровується при механічній і термічній діях. У вітчизняному маргариновому виробництві як емульгатори використовують суміші моно- і дигліцеридів, фосфатиди, сухе молоко. При виготовленні майонезів з цією метою використовують яєчний і гірчичний порошки.

Основними емульгаторами в шлунково-кишковому тракті є солі жовчних кислот, білки, фосфатиди, мила, гідрокарбонати лужних металів. Емульгування жирів сприяє кращому їх розщепленню та всмоктуванню в кишечнику.

Об'єкт дослідження: олія.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки;
3. Воронки;
4. Фільтри паперові;
5. Мірні циліндри.

Реактиви: 1. Жовч;
2. Лецитин;
3. Гідрокарбонат натрію, 1 % розчин;
4. Вода дистильована.

Техніка виконання роботи

У чотири пробірки наливають по 5 мл дистильованої води. До другої пробірки вносять на кінчику ножа лецитин, до третьої – 1 мл жовчі, до четвертої – 1 мл розчину гідрокарбонату натрію. Потім до всіх пробірок додають по 0,2 мл олії. Пробірки енергійно струшують і залишають на 5 хвилин. У першій пробірці емульсія швидко розшаровується на воду і олію. У інших пробірках завдяки присутності жовчі, лецитину і соди утворюються стійкі емульсії.

Вміст пробірок фільтрують через паперові фільтри у другі пробірки. У першій пробірці через фільтр проходить прозорий розчин, а олія залишається на фільтрі. У інших пробірках фільтрується мутна рідина (емульсія). Отже, стабілізатори сприяють емульгуванню жирів і значно полегшують їхнє проходження через мембрани.

3. Визначення якості ліпідів.

При зберіганні або тепловій обробці жирів відбуваються різні хімічні перетворення (гідроліз, окислення жирних кислот), які викликають зміни фізико-хімічних і органолептичних характеристик жирів. Накопичення в продукті вільних жирних кислот, перекисів, альдегідів і кетонів призводить до погіршення харчових властивостей жирів. На практиці при оцінюванні якості жирів використовуються такі хімічні показники, як кислотне і йодне числа. Для аналізу

різних жирів (свіжих, після зберігання або після жаріння у фритюрі, тобто у великій кількості жиру при 150...190 ^{0} С) група студентів проводить спільну роботу. Кожен студент проводить дослід з одним із досліджуваних жирів.

Для одержання добрих результатів необхідно акуратно проводити титрування: об'єм розчинів у бюретці відраховувати від нуля, розчини додають краплями при постійному перемішуванні суміші в колбі.Титрування зупиняють при появі забарвлення, яке не зникає після струшування протягом 30 секунд.

А. Визначення кислотного числа

Об'єкт дослідження: олія соняшникова після зберігання

Обладнання і посуд: 1. Колби конічні на 50...100 мл з пробками;
2. Бюретки;
3. Піпетки.

Реактиви: 1. Нейтралізована спиртово-ефірна суміш;
2. Гідроокис калію, 0,1 н. розчин ;.
3. Фенолфталеїн, 0,1 % розчин.

Техніка виконання роботи

В колбу вносять наважку (близько 1 г) досліджуваного матеріалу (за різницею маси колби до і після внесення масла), приливають 10 мл нейтралізованої суміші спирту і ефіру, вміст колби перемішують до розчинення жиру. Додають у колбу 2...3 краплі розчину фенолфталеїну і титрують суміш 0,1 н. розчином КОН до появи рожевого забарвлення.

Кислотне число визначають по формулі:

$$КЧ = \frac{в \cdot к \cdot 5{,}61}{н},$$

де в – кількість 0,1 н. спиртового розчину гідроокису калію (мл), витраченого на титрування наважки жиру;

к – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 н. розчину КОН;

5,61 – титр точно 0,1 н. розчину КОН;

н – наважка жиру (г).

Б. Визначення перекисного числа

Ненасичені жирні кислоти легко піддаються окисленню під впливом кисню, вологи, світла. Цей процес каталізує фермент ліпооксигеназа.

Кількісне вимірювання перекисей олії, що утворилися, засновано на реакції виділення йоду з йодистого калію в кислому середовищі. Йод потім титрують розчином гіпосульфіту.

Перекисне число – ПЧ – це кількість г йоду, виділене перекисами, що містяться у 100 г олії.

Об’єкт дослідження: рослинна олія.

Обладнання і посуд: 1. Колби конічні на 200 мл з притертими корками;
2. Бюретки;
3. Піпетки.

Реактиви: 1. Суміш льодяної оцтової кислоти і хлороформу (2:1);
2. Йодистий калій, насичений розчин;
3. Дистильована вода;
4. Гіпосульфіт натрію, 0,002 н. розчин;
5. Крохмаль, 1 % розчин.

Техніка виконання роботи

У конічну колбу або склянку з притертою коркою вміщують 2 г рослинної олії,суміш льодяної оцтової кислоти і хлороформу – 20 мл. Додають 5 мл насиченого розчину йодистого калію. Колбу укупорюють і ставлять у темне місце на 10 хв. Потім доливають 50 мл дистильованої води, титрують йод, що виділяється, 0,002 н. розчином гіпосульфіту (індикатор – крохмаль, додають у колбу 1...2 краплини).

Паралельно проводять контрольну пробу з водою.

Перекисне число розраховують за формулою:

$$ПЧ = \frac{(O-C) \cdot 0{,}0002538 \cdot 100}{н}$$

де О – кількість 0,002 н. розчину гіпосульфіту натрію (мл), що була витрачена на титрування дослідного зразка;

С – кількість 0,002 н. розчину гіпосульфіту натрію (мл), що була витрачена на контрольне вимірювання;

0,0002538 – титр 0,002 н. розчину гіпосульфату натрію по йоду;

н – наважка олії.

В. Визначення йодного числа

Об’єкт дослідження: хлороформні розчини масел.

Обладнання і посуд: 1. Колби конічні на 50...100 мл з пробками;
2. Бюретки;
3. Піпетки.

Реактиви: 1. Хлороформ;

2. Йод, 0,1 н. спиртовий розчин;
3. Крохмаль, 1 % розчин;
4. Гіпосульфіт натрію, 0,1 н. розчин.

Техніка виконання роботи

В колбу з пробкою вносять близько 5 мл досліджуваного масла. До другої колби (контрольної) вносять рівний об'єм дистильованої води. В обидві додають по 5 мл хлороформу. Колби закривають пробками і струшують. У колби (точно) піпеткою приливають по 10 мл 0,1 н. розчину йоду, закривають пробками, струшують і ставлять у темне місце на 5 хвилин. Потім проби титрують 0,1 н. розчином гіпосульфіту натрію до світло-жовтого кольору, після чого додають 1 мл розчину крохмалю і продовжують титрувати до зникнення синього забарвлення.

Йодне число (ЙЧ, г) визначають за формулою:

$$ЙЧ = \frac{(А – Б) \cdot К \cdot 0{,}01269 \cdot 100}{С},$$

де (А-Б) – різниця об'ємів 0,1 н. гіпосульфіту натрію, що витрачається для титрування в дослідній і контрольній пробах;

К – поправочний коефіцієнт на титр емпірічного 0,1 н. розчину гіпосульфіту натрію;

0,01269 – коефіцієнт перерахунку витраченого розчину гіпосульфіту натрію (1 мл 0,1 н. розчину гіпосульфату натрію еквівалентний 0,01269 г йоду);

С – наважка жиру, г;

100 – коефіцієнт перерахунку на 100 г жиру.

4.Проба на гліцерин (акролеїнова проба)

Якісною реакцією на якість жиру є акролеїнова проба. При нагріванні гліцерин втрачає воду і утворює ненасичений альдегід – акролеїн, який легко виявляється завдяки специфічному подразливому запаху.

Акролеїнову пробу здійснюють нагріваючи жир у присутності бісульфату Na або К, $NaHSO_4$ або $KHSO_4$ (як водовіднімаючий засіб).

Об'єкт дослідження: гліцерин або рослинна олія.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із сухими пробірками;
2. Скляння паличка.

Реактиви: 1. NaCl,суха;
2. Сірчана кислота, концентрована.

Техніка виконання роботи

В суху пробірку сиплють 1 г сухої солі NaCl, капають дві краплі концентрованої H_2SO_4, накапують 1...2 краплі жиру і нагрівають. Різкий подразний запах свідчить про наявність акролеїну. Ця реакція протікає ступенево.

5.Якісна реакція на лецитін

Лецитін є фосфоліпідом,тобто жироподібною сполукою. Він відіграє велику біологічну роль: входить до складу біологічних мембран, має ліпотропну дію, тобто запобігає атеросклерозу судин, протидіє ожирінню печінки та інше.Лецитин є гарним емульгатором.Він не розчиняється у ацетоні, а з водою утворює стійку емульсію.

Об'єкт дослідження: сухий яєчний жовток.
Обладнання і реактиви: 1. Хімічні склянки;
2. Штатив із пробірками;
3. Крапельниці;
4. Воронки;
5. Піпетки;
6. Водяна баня;
7. Паперові фільтри.

Реактиви: 1. Етиловий спирт;
2. Ацетон, 5 %-розчин.

Техніка виконання роботи

В хімічну склянку кладуть 200 мг сухого розтертого яєчного жовтка, додають 3…5 мл гарячого спирту, перемішують. Через 10...15 хв. суміш охолоджують і фільтрують у суху пробірку. В другу суху пробірку вливають 2...3 мл ацетону, потім краплями додають фільтрат з першої пробірки. Спостерігають появу помутніння, а потім випадає осад лецитіну, який не розчиняється в ацетоні. При додаванні до 2...3 мл фільтрату декілька краплин дистильованої води утворюється стійка емульсія.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 20

„ОМИЛЕННЯ ТРИГЛІЦЕРИДІВ У ВОДНО-СПИРТОВОМУ РОЗЧИНІ"

Мета заняття: вивчити властивості омилення жирів як складних ефірів.

План заняття

1.Провести дослідження процесу омилення жиру в лужному середовищі

1. Дослідження процесу омилення жирів.

Оскільки жири є складними ефірами,вони мають властивість омилюватися. При омиленні жиру в лужному середовищі утворюються гліцерін і мила (солі вищих жирних кислот). Реакція відбувається повільно. При додаванні спирту омилення різко прискорюється, тому що підвищується розчинність жиру, і суміш стає однорідною. Гліцерін і спирт також розчинні у розчину хлориду натрію, мило ж не розчиняється і виділяється з розчину у вигляді твердої маси (висолювання). З рідких жирів утворюються більш м'які мила.

Об'єкт дослідження: набір тваринних і рослинних жирів (яловичий, сало, олія).
Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Водяна баня.
Реактиви: 1. Етанол;
2. NaOH або KOH,концентровані;
3. NaCl, насичений розчин.

Техніка виконання роботи

Дослід проводять одночасно з різними жирами. В пробірку вміщують приблизно 3 г жиру, додають 3 мл етилового спирту і 3 мл концентрованого розчину гідроксиду натрію або калію. Вміст пробірки старанно збовтують і нагрівають до початку кипіння. Суміш стає однорідною і через 5...7 хвилин омилення закінчується. До отриманої густої маси добавляють при перемішуванні гарячий насичений розчин хлориду натрію. Дають відстоятись і спостерігають за виділенням шару мила, який спливає на поверхню.

Роблять висновок про умови утворення мила при омиленні жирів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 21.

„ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АЛЬДЕГІДИ (З РЕАКТИВОМ ШИФФА)"

Мета заняття: вивчити специфічність реакцій на альдегіди і стерини.

План заняття

1.Визначити специфічну реакцію на альдегіди з реактивом Шиффа.
2.Вивчити реакцію Вітбі на наявність стеринів в олії.

1. Реакція на альдегіди з реактивом Шиффа.

Однією з найбільш специфічних є реакція з фуксинсерністою кислотою (реактивом Шиффа). Безбарвний розчин фуксинсерністої кислоти під впливом альдегідів приймає червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення.

Об'єкт дослідження: олія.
Обладнання і посуд: 1. Мірні колби на 250 мл;
Реактиви: 1. Фуксин, 1 %-й спиртовий розчин;
2. Етиловий спирт, 50 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл олії, додають 0,5 мл реактива Шиффа і перемішують. Якщо у рідині є альдегіди, то з'являється червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення. Якщо забарвлення не з'явилося через 20 хвилин після початку дослідження, то це свідчить про відсутність альдегідів в олії.

2.Реакція Вітбі на наявність стеринів в олії

Об'єкт дослідження: олія
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Крапельниці.
Реактиви: 1. Хлороформ;
2. Суміш концентрованої сірчаної кислоти з формаліном (50:1).

Техніка виконання роботи

У суху пробірку наливають 1 мл хлороформу, додають 2...3 краплі олії і легко перемішують до розчинення олії. До хлороформного розчину олії додають 20 крапель суміші концентрованої сірчаної кислоти з формаліном (50:1) і перемішують. Верхній хлороформний шар забарвлюється у вишнево-червоний колір, нижній, кислотний – у червоно-коричневий з зеленою флюоресценцією.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні групи ліпідів і охарактеризуйте їх.
2. Молекули жирів можуть містити залишки трьох різних жирних кислот. Напишіть формулу такого тригліцеріду.
3. Чому жири погано розчиняються у воді ?
4. Наведіть приклади насичених і ненасичених жирних кислот.
5. У чому схожість і різниця тваринних і рослинних жирів ?

6. Які хімічні перетворення відбуваються у жирах при зберіганні або тепловій обробці ?
7. Які хімічні константи використовуються в практиці при оцінюванні якості жирів ?
8. Що таке кислотне число ? Як пов'язана зміна цього показника з якістю жиру ?
9. Що значать такі данні: йодне число вершкового масла – 30, йодне число соєвої олії – 130 ?
10. Яка роль стероїдів в організмі ?
11. Що таке емульгатори (стабілізатори) ? Як змінюються властивості жирів під дією емульгаторів ?

Тема 10. ОБМІН ЛІПІДІВ

Розщеплення ліпідів, що надходять з їжею, здійснюється під впливом *ліпаз* шлунково-кишкового тракту, які відносяться до класу гідролаз. Ліпаза шлункового соку здійснює гідроліз у слабко-кислих умовах середовища тільки емульгованих жирів, що містяться у молоці, молочних продуктах, майонезах. Гідроліз основної кількості харчових жирів відбувається в тонкому кишечнику під дією утвореної в підшлунковій залозі ліпази. Дія ліпази можлива тільки після емульгування жирів. *Первинне емульгування* жирів здійснюється в порожнині кишечника під впливом дрібних бульбашок вуглекислого газу, що активно виділяється при нейтралізації соляної кислоти харчової кашиці бікарбонатами підшлункового і кишкового соків. Сприяють емульгуванню жирів і солі жирних кислот (мила), які з'являються в результаті дії ліпаз. Основну роль в емульгуванні жирів грають солі жовчних кислот, що виділяються з жовчю із жовчного міхура в просвіт кишечника. Вони адсорбуються на поверхні краплин жиру, утворюють на них тоненьку плівку, яка перешкоджає злипанню краплинок у крупніші краплі, разом з тим жовчні кислоти різко зменшують поверхневий натяг на поверхні двох фаз – води і жиру, що сприяє подрібленню його краплин на дрібніші, полегшуючи ферментативний гідроліз жиру. Одночасно жовчні кислоти активують ліпази. *Жовчні кислоти* – це похідні холевої кислоти. В жовчі людини містяться головним чином натрієві солі парних жовчних кислот (глікохолевої, глікодезоксихолевої, таурохолевої, тауродезоксихолевої). Вони складаються з холевої або дезоксихолевої кислоти та гликоколю і таурину, приєднаних пептидним зв'язком. Жовчні кислоти виконують також важливу роль як активатори панкреатичної ліпази. Вважають, що активуючий вплив жовчних кислот на ліпазу виражається у зміщенні оптимуму дій цього ферменту з pH 8,0 до 6,0. Розрізняють ліпазу двох типів: одна розщеплює ефірні зв'язки тригліцеридів у положеннях 1 і 3, а друга – у положенні 2. Гідроліз ліпідів йде по-стадійно. У розщепленні моногліцеридів бере участь також ліпаза, що міститься в кишковому соку.

Більша частина емульгованого жиру піддається гідролітичному розщепленню під дією ліпаз з утворенням гліцерину і вищих жирних кислот.

Частина тонкоемульгованого жиру в ненасиченому вигляді всмоктується стінками кишечника і потрапляє в лімфатичну систему.

Гідроліз є першою фазою обміну жирів. Він протікає ступенево. При цьому спочатку розщеплюються зовнішні складно ефірні зв'язки. Утворені β-моногліцеріди всмоктуються стінкою кишечника і або йдуть на ресинтез тригліцеридів у кишковій стінці, або розпадаються під дією неспецифічних естераз. Жирні кислоти, що виділилися із розщепленних гліцеридів, погано розчиняються у воді і всмоктуються ворсинками кишечника тільки після взаємодії з жовчними кислотами з утворенням розчинних комплексів – холеїнових кислот. В епітеліальних клітинах кишкових ворсинок відбувається їх розщеплення на жовчні і жирні кислоти. Вивільнені жовчні кислоти або знову безпосередньо поступають у просвіт кишечника або проходять більш складний шлях: кров – печінка – жовчний міхур – жовч.

Постійна циркуляція жовчних кислот забезпечує велику кількість жирів, що всмоктуються, при порівняно невеликій кількості вироблених печінкою жовчних кислот (5...10 г).

У клітинах печінкового епітелію відбувається частковий ресинтез жирів із жирних кислот і гліцерину.Тут же відбувається і утворення фосфатидів, зокрема лецитинів, що є транспортною формою жирних кислот. З епітеліальних клітин жири у вигляді дрібних жирових краплинок, оточених білками, (*хіломікрони*) потрапляють у лімфатичні судини. Потім хіломікрони по грудному лімфатичному протоку потрапляють у кровообіг і транспортуються в жирові депо і печінку.

За допомогою хіломікронів здійснюється транспорт із кишечника екзогенних тригліцеридів, холестерину і, частково, фосфоліпідів у кров. Через 1...2 години після прийому їжі спостерігається *аліментарна гіперліпемія*, максимального рівня вона досягає на 4...6 годину після прийому жирної їжі. Через 10...12 годин вміст тригліцеридів повертається до норми, а хіломікрони зникають із кров'яного русла. Частина жирів безпосередньо всмоктується в кров, минаючи лімфатичну систему, і надходить у печінку. Через деякий час із печінки вони переходять у периферійні депо: підкожну клітковину, сальник, брижейку. Потім жири з жирових депо надходять у інші тканини, головним чином, у печінку, де зазнають окислювального розщеплення до кінцевих продуктів обміну речовин (CO_2, H_2O).

Холестерин потрапляє в шлунково-кишковий тракт людини переважно з яєчним жовтком, м'ясом, печінкою, мозком. З їжею людина одержує кожного дня 0,1...0,3 г холестерину у вільному вигляді або у вигляді ефірів, які розщеплюються на холестерин і жирні кислоти при участі особливого ферменту панкреатичного соку.Перетравлення і всмоктування *ліпоїдів* відбувається в тонкому кишечнику. Стерини піддаються ферментативному гідролізу на стероли (циклічні спирти) і вищі жирні кислоти. Стероли, у тому числі холестерин,

погано розчиняються у воді і всмоктуються у вигляді комплексу з жовчними кислотами.

Фосфоліпіди, зокрема лецитин, під впливом відповідних гідролаз, розщеплюється на гліцерин, вищі жирні кислоти,холін і фосфорну кислоту. Компоненти фосфоліпідів всмоктуються кишковою стінкою. Фосфорна кислота всмоктується, в основному, у вигляді натрієвих і калієвих солей. Всмоктані фосфатиди переходять у кровоносні капіляри, а не в лімфу.

З продуктів гідролізу харчових ліпідів у клітинах кишкового епітелію ресинтезуються ліпіди, специфічні для даного виду тварини.

Головним ендогенним джерелом ліпідів, що використовуються як метаболічне паливо, є *резервний жир*, який міститься в протоплазмі клітин у вигляді краплинок. Для цього використовуються також фосфатиди мембран.

Початковим етапом використання жиру в тканинах є його розщеплення під впливом тканинних ліпаз з виділенням гліцерину і вищих жирних кислот, які надходять до кров'яного русла. Теорія β-окислення жирних кислот, запропонована Кноопом, не втратила свого значення і є основою сучасних уявлень щодо механізму окислення жирних кислот.

Окислення вищих жирних кислот у клітинах відбувається в мітохондріях за участю мультиферментного комплексу.

Під терміном „кетонові (ацетонові) тіла" мають на увазі ацетооцтову кислоту ($CH_3 – CO – CH_2 – COOH$), β-гідрооксимасляну кислоту ($CH_3 – CH(OH) – CH_2 – COOH$) і ацетон ($CH_3 – CO – CH_3$). Вони утворюються в печінці з ацетилКоА.

У крові здорової людини кетонові тіла присутні лише в невеликих кількостях. При тяжких формах діабету та голодуванні концентрація кетонових тіл у крові збільшується і може досягти 20 ммоль,тобто розвивається кетоз. При цьому швидкість утворення кетонових тіл перевищує здатність периферійних тканин їх утилізувати. На сьогодні доведено важливу роль кетонових тіл у підтримці енергетичного гомеостазу. Вони є джерелами палива для м'язів, мозку, нирок і діють як частина регуляторного механізму зі зворотним зв'язком, запобігаючи надзвичайній мобілізації жирних кислот з жирових депо. Винятком є печінка, яка не використовує кетонових тіл як джерело енергетичного матеріалу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 22

„ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ ОБМІНУ ЛІПІДІВ"

Мета заняття: вивчити розщеплення ліпідів у продуктах, що надходять з їжею.

План заняття

1.Визначити фурфуролову пробу на жовчні кислоти.

2.Виявити кетонові тіла за пробою Лібена.
3.Визначити йодоформну реакцію на аміак.
4.Визначити реакцію на ацетон з нітропрусидом натрію за пробою Люголя.

1.Фурфуролова проба на жовчні кислоти

В тонкій кишці відбувається гідроліз жирів. Попереднім етапом є емульгування ліпідів. Основний емульгатор – жовчні кислоти. Для їх визначення використовують їхню здатність при взаємодії з оксиметілфурфуролом давати червоне забарвлення. Оксиметілфурфурол утворюється при взаємодії сахарози або фруктози з концентрованою сірчаною або соляною кислотою.

Об'єкт дослідження: жовч.

Обладнання та реактиви: штатив з пробірками.

Реактиви: 1. Жовч, водний розчин (1:2);
2. Сахароза або фруктоза, 3 %-й розчин;
3. Сірчана кислота, концентрована.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 10 крапель жовчі, розбавленої у 2 рази, додають 1 краплю 3 %-го розчину сахарози і обережно (!) по стінці пробірки додають 1 мл концентрованої H_2SO_4. На лінії розділу двох рідин визначають появу забарвленого кільця.

2. Виявлення кетонових тіл. Проба Лібена

Ацетон є цінним розчинником і вихідною сполукою в синтезі різноманітних органічних сполук. При деяких захворюваннях, а також при інтенсивному фізичному навантаженні ацетон перетворюється в організмі в ацетооцтову кислоту і виділяється з сечею разом з ацетооцтовою і β-гідрооксимасляною кислотами (так званими кетоновими тілами). Реакції на визначення кетонових тіл використовуються в клінічній та біохімічній практиці і мають певне діагностичне значення.

Ацетон визначають при взаємодії з реактивом Люголя (розчин йоду у водному розчині йодистого калію) у лужному середовищі. Під час реакції виникає йодоформ.

Мурашиний альдегід не містить у молекулі необхідні для перетворення йодоформу групи атомів і в умовах досліду окислюється до мурашиної кислоти.

Об'єкт дослідження: ацетон.

Обладнання і посуд: штатив із пробірками.

Реактиви: 1. Мурашиний альдегід;
2. Гідрооксид натрію, 10 %-й розчин;

3. Розчин Люголя (розчин йоду в йодному натрію).

Техніка виконання роботи

В одну пробірку наливають 1 мл водного розчину мурашиного альдегіду, в другу – такий самий об'єм водного розчину ацетону. В обидві пробірки додають по 1 мл реактиву Люголя і кілька краплин розчину гідроокису натрію.У пробірці з ацетоном спостерігають жовтуватий осад йодоформу з характерним запахом.

3. Йодоформна реакція на ацетон

Об'єкт дослідження: 1. Ацетон, 5 %-й розчин;
2. Сеча.
Обладнання і посуд: штатив із пробірками.
Реактиви: 1. Ацетон, 5 %-й розчин;
2. Гідроокис натрію, 10 %-й розчин;
3. Розчин Люголя (розчин йоду в йодному калію).

Техніка виконання роботи

До 1 мл ацетону приливають 1 мл 10-%-го розчину NaOH та декілька крапель р-ру Люголя. Випадає жовтий кристаличний осад йодоформу. Наявність йодоформу определяють також по характерному запаху. Роблять ту ж саму реакцію з сечею, до якої добавлено ацетон.

4.Реакція на ацетон з нітропрусидом натрію (проба Люголя)

Ацетон з нітропрусидом натрію у лужному середовищі дає червоне забарвлення. При додаванні оцтової кислоти забарвлення підсилюється, приймаючи вишнево-червоний відтінок. Ця реакція дуже чутлива і аналогічно йодоформній пробі використовується для визначення „кетонових тіл" у сечі.

Об'єкт дослідження: сеча з ацетоном.
Обладнання і посуд: штатив з пробірками.
Реактиви: 1. Нітропрусид натрію ($Na_2Fe(CN)_5 \cdot No \cdot 5H_2O$), 3 %-розчин;
2. Гідроокис натрію, 10 %-й розчин;
3. Оцтова кислота концентрована;
4. Ацетон, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У дві пробірки наливають 1 мл розчину нітропрусиду натрію. У першу додають декілька краплин водного розчину ацетону. В обидві додають 5...6 краплин розчину гідроокису натрію. Потім додають 2...3 краплини

концентрованої оцтової кислоти. Спостерігають за появою червоно-бурого забарвлення.

Роблять висновок щодо можливості використання цієї реакції для визначення ацетону.

Контрольні запитання

1. Як відбувається розщеплення жирів у шлунково-кишковому тракті?
2. Якою є роль жовчі в розщепленні жирів?
3. Що таке жовчні кислоти?
4. Опишіть процеси розщеплення жирів у дванадцятипалій кишці та тонкій кишці.
5. Як відбувається розщеплення жирів у тканинах?
6. Напишіть β-окислення вищих жирних кислот у тканинах.
7. Який енергетичний ефект має β-окислення вищих жирних кислот?
8. Що таке „ацетонові тіла”?
9. Які порушення ліпідного обміну ви знаєте?

Тема 11. ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ ПО ВУГЛЕВОДАМ І ЛІПІДАМ

Питання для обговорення

1. Біологічна роль вуглеводів.
2. Класифікація вуглеводів.
3. Добові норми вживання вуглеводів.
4. Наслідки надмірного та недостатнього вживання вуглеводів.
5. Харчові джерела різних вуглеводів
6. Розщеплення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті людини.
7. Регуляція рівня глюкози в крові.
8. Що таке аліментарна гіперглікемія, коли вона виникає ?
9. Крохмаль, будова, харчові джерела.
10. Моносахариди, будова, роль, харчові джерела.
11. Дисахариди, будова, роль, харчові джерела.
12. Баластні вуглеводи, характеристика, роль в організмі, добова потреба, харчові джерела.
13. Глікоген,будова,роль в організмі.
14. Розщеплення крохмалю в шлунково-кишковому тракті людини.
15. Гліколітичні ферменти шлунково-кишкового тракту людини.
16. Синтез глікогену в печінці.
17. Анаеробне розщеплення вуглеводів.
18. Енергетичний ефект анаеробного розщеплення вуглеводів.

19. Аеробне окислення вуглеводів.
20. Енергетичний ефект аеробного окислення вуглеводів.
21. Ліпіди, біологічна роль, харчові джерела, добова потреба.
22. Класифікація ліпідів.
23. Нейтральні жири, будова, роль.
24. Фосфоліпіди,будова,роль, добова потреба, харчові джерела.
25. Поліненасичені жирні кислоти, біологічна роль, будова, добова потреба, харчові джерела.
26. Резервні і структурні жири організму.
27. Стерини і стериди, біологічна роль, будова, харчові джерела.
28. Холестерин, біологічна роль, будова, харчові джерела.
29. Наслідки недостатнього і надлишкового вживання ліпідів.
30. Розщеплення ліпідів у шлунково-кишковому тракті людини.
31. Роль жовчі у розщепленні жирів у шлунково-кишковому тракті людини.
32. Розщеплення ліпідів у тканинах.
33. Енергетичний ефект β-окислення висших жирних кислот.
34. Регуляція обміну ліпідів.
35. Порушення обміну ліпідів.

Тема 12. ВИВЧЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ПРОДУКТІВ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

У цей розділ було включено вивчення хімічного складу продуктів рослинного походження, у т.ч. пектину, органічних кислот.

Пектини (від грец. pectos – драглеподібний) – природні високомолекулярні сполуки рослинного походження, молекули яких складаються із залишків ά-D-галактуронової кислоти, частково або повністю етерифікованих метиловим спиртом або фосфорною кислотою. Неетерифіковані пектини мають назву *пектинових кислот*. Залежно від ступеня етерифікації, а також довжини полігалактурованих ланцюгів розрізняють різні види пектинів. Пектини разом з супутними сполуками, такими як арабан, галактан, целюлоза, крохмаль, утворюють нерозчинний у воді природний пектин рослин – *протопектин*, який складається з сітки пектинових ланцюгів. Залишки ά-D-галактуронової кислоти в полігалактуронових ланцюгах сполучені 1,4-глікозидними зв'язками, бічні ланцюги містять залишки L-арабінози, D-ксилози, L-рамнози тощо. *Пектинові речовини* (суміш пектинів з різними речовинами) входять до складу клітинних стінок рослин, міжклітинної речовини, клітинного соку. Велика кількість пектинових речовин нагромаджується в плодах, овочах, фруктах, корнеплодах.Добувають пектини з вичавок яблук, цитрусових, а також з екстрактів продуктів переробки цукрових буряків, корзинок соняшника. Використовують їх у харчовій промисловості для виготовлення желе, мармеладу. Пектинові речовини є досить цінними компонентами їжі – сприяють розвитку мікрофлори кишок, яка є джерелом надходження деяких водорозчинних

вітамінів, забезпечують зв'язування та видалення з організму токсичних сполук, іонів важких металів, радіонуклідів.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 23

„ВІЗУАЛЬНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ"

Мета заняття: вивчити присутність органічних кислот у продуктах рослинного походження.

План заняття

1.Визначити органічні кислоти у продуктах рослинного походження.

Метод ґрунтується на титруванні досліджуємого об'єкту розчином 0,1 моль/дм^3 NaOH у присутності фенолфталеїну.

1.Візуальний метод визначення органічних кислот у продуктах рослинного походження.

Об'єкт дослідження: овочі та фрукти.
Обладнання та матеріали: 1. Конічна колба на 250 мл;
2. Воронка;
3. Крапельниці;
4. Бюретки;
5. Фільтрувальний папір;
6. Ступка з товкачиком.
Реактиви: 1. Гідроксид натрію, 0,1 н розчин;
2. Дистильована вода;
3. Фенолфталеїн, 0,1 %-й розчин;
4. Кварцевий пісок.

Техніка виконання роботи

Наважку продукту масою 25 г розтирають у ступці з кварцевим піском за допомогою товкачика, а потім переносять у конічну колбу на 250 см^3 через воронку за допомогою гарячої води. Потім у колбу до половини об'єму приливають воду з t=80...85^{o}C, добре перемішують і витримують 30 хвилин, перемішуючи час від часу. Після охолодження зміст колби кількісно переносять у колбу ємкістю 250 см^3 і доливають водою до риски, перемішують зміст і фільтрують через фільтр або вату.

Якщо продукт рідкий, наважку масою 50 г кількісно переносять водою у мірну колбу ємкістю 250 $см^3$, доводять до риски, перемішують та фільтрують.

У конічну колбу відбирають пипеткою 24 $см^3$ фільтрату, добавляють 3 краплі фенолфталеїну і титрують розчином NaOH до рожевого забарвлення, не зникаючого на протязі 30 сек.

Обробка результатів: титруєму кислотність у розрахунку на кислоту, яка має перевагу у %, розраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot C \cdot M}{m} \cdot \frac{V_o}{V_1} \cdot 0,1$$

Де V – об'єм розчину NaOH, який пішов на титрування, $см^3$;

C – молярна концентрація титрованого розчину NaOH, моль/$дм^3$ (0,1);

m – маса наважки, г;

M – молярна маса, г/моль, для: яблочної кислоти – 67,0; лимонної кислоти – 64,0; оцтової кислоти – 60,0; щавелевої кислоти – 45,0; молочної кислоти – 91,0; винної кислоти – 75,0.

V_o – об'єм, до якого доведена наважка, $см^3$;

V_1 – об'єм фільтрату, який взяли на титрування.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 24

„ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЧИСТОГО ПЕКТИНУ УНІВЕРСАЛЬНИМ МЕТОДОМ"

Мета заняття: визначити вміст чистого пектину у продуктах рослинного походження.

План заняття

1.Визначити вміст чистого пектину у продуктах рослинного походження універсальним методом.

1.Вивчення вмісту чистого пектину універсальним методом.

Об'єкт дослідження : овочі і фрукти.

Обладнання і посуд : 1. Аналітичні терези;
2. Пипетки;
3. Бюретки;
4. Воронки;
5. Фільтровальний папір;
6. Вимірювальний циліндр;

7. Ступка з товкачиком.

Реактиви : 1. Етиловий спирт;
2. Гідроксид натрію, 0,1 н розчин;
3. Соляна кислота, 0,1 н розчин;
4. Кварцовий пісок;
5. Фенолфталеїн, 0,1 %-розчин.

Техніка виконання роботи

Визначення змісту чистого пектину у овочах і фруктах визначається таким чином: 0,5 г порошку або 5 г продукту зважують на аналітичних терезах, змочують декількома краплями спирту, приливають пипеткою 10...20 мл води і добре перемішують (або розтирають). Потім до полученої суміші додають 1...2 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію і залишають для омилення на 20 хвилин.Після цього проводять осадження пектової кислоти 2...3 мл 0,1 н розчину соляної кислоти, а потім приливають ще 50 мл 0,1 н розчину соляної кислоти. Фіксують загальну масу розчину (G) складанням окремих компонентів.

Фільтрують осад через паперовий фільтр. В фільтрат додають декілька краплин фенолфталеїну. Потім титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію 10 або 20 мл фільтрата. Залишок фільтрату, осад на фільтрі разом з фільтром, а також промивні води з'єднують у колбі, де проводилось омилення і осадження пектинової кислоти і також титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію (наприклад, фактично на титрування пішло 57,0 мл 0,1 н NaOH).

Приклад розрахунку:

$$G = \underset{\text{(нава-жка)}}{0,5} + \underset{\text{(вода)}}{10} + \underset{\text{(луг)}}{1} + \underset{\text{(к-та)}}{2} + \underset{\text{(к-та)}}{50} = 63,5 \text{ г}$$

На титрування 10 мл (г) фільтрату пішло 9,6 мл 0,1 н NaOH. На титрування залишку (63,5 – 10 = 53,5) повинно піти - X мл.

$$X = \frac{53,5 \cdot 9,6}{10} = 51,1 \text{ мл 0,1 н NaOH}$$

51,1 мл 0,1 н NaOH повинно було піти на титрування соляної кислоти, яка є в залишку.

Фактично на титрування залишка пішло 57,0 мл 0,1 н NaOH, тоді на титрування пектової кислоти в залишку пішло 57,0 – 51,1 = 5,9 мл 0,1 н NaOH.

Зміст пектової кислоти у пробі :

$$C = \frac{5,9 \cdot 176 \cdot 0,1}{1000} = 0,111 \text{ г, де}$$

176 – еквівалент пектової кислоти ;
0,1 – нормальність лугу.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 25

„ВИЗНАЧЕННЯ ЛУЖНОСТІ”

Мета заняття: визначити лужність у продуктах рослинного походження.

План заняття

1.Провести дослідження лужності у продуктах рослинного походження.
1.Вивчення лужності продуктів рослинного походження.

Об’єкт дослідження : овочі і фрукти.
Обладнання і посуд : 1. Штатив з пробірками;
2. Колби на 250 см^3 з пробками;
3. Воронки;
4. Фільтровальний папір;
5. Бюретки;
6. Крапельниці;
7. Ступка з товкачиком.
Реактиви : 1. Хлористоводородна кислота, 0,1 н розчин;
2. Бромтимоловий синій, 0,1 %-й спиртовий розчин;
3. Кварцевий пісок.

Техніка виконання роботи

У колбу переносять 25 г продукту, який розтерто піском, додають до 250 см^3 дистильованої води, закривають пробкою і залишають на 30 хвилин, перемішуючи час від часу. Потім все фільтрують, відбирають 50 см^3 фільтрату, додають до нього 2...3 краплі бромтимолового синього і титрують 0,1 н розчином хлористоводородної кислоти до появи жовтого забарвлення.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{V \cdot C}{m} \cdot \frac{V_0}{V_1}, \text{ де}$$

V – об’єм 0,1 н розчину HCl, який пішов на титрування, $см^3$;
C – молярна концентрація 0,1 н розчину HCl, 0,1 моль/$дм^3$;
V_o – об’єм, до якого доведена наважка, $см^3$;
V_1 – об’єм фільтрату, який взяли на титрування;
m– маса наважки.

Контрольні запитання

1. Які органічні кислоти входять до складу харчових продуктів, яку роль вони відіграють ?
2. Що таке пектинові речовини ?
3. У чому полягає роль пектинових речовин ?

Тема 13. ВІТАМІНИ

Вітаміни – низькомолекулярні органічні сполуки різноманітної хімічної природи. Більшість вітамінів не синтезується в організмі людини, тому вони є *незамінними факторами* харчування. До основних джерел вітамінів для людини належать рослинні та тваринні продукти. Деякі вітаміни (К, $В_2$) синтезуються міклофлорою кишечника. Від найважливіших органічних компонентів їжі – білків, жирів, вуглеводів – вітаміни відрізняються тим, що необхідні організму в дуже малих кількостях. При відсутності вітамінів в їжі або при порушеннях засвоєння їх розвиваються тяжкі захворювання – *авітамінози*, а при недостатньому вмісті вітамінів в їжі – *гіповітамінози.* Завдяки раціональному харчуванню зменшується кількість захворювань, пов’язаних з недостатнім вживанням вітамінів.

Вперше на вміст у харчових продуктах речовин, що оберігають організм від деяких захворювань, звернув увагу російський лікар М.І.Лунін. Він виявив, що крім білків, жирів і вуглеводів, солей і води необхідна ще невелика кількість якихось невідомих речовин. Першою такою речовиною, яку було виділено польским вченим К.Функом з оболонок рису,що вилікувала голубів від поліневриту, була органічна сполука, яка містила аміногрупу. К.Функ запропонував називати такі речовини *вітамінами*, тобто *амінами* життя (від лат. віта – життя). Цей термін використовується до цього часу без огляду на те, що багато з вітамінів не мають у своєму складі аміногрупи.

Таким чином, вітаміни – харчові фактори, без яких неможливе протікання нормального обміну речовин в організмі. Важливі функції вітамінів для організму пов’язані з тим, що багато вітамінів є складовою частиною ферментів. Доведено, що водорозчинні вітаміни і ряд вітаміноподібних речовин – це коферменти більш ніж 100 відповідних ферментів, де вони виконують головну роль у прискоренні протікання процесу данної хімічної реакції. В зв’язку з цим, ряд захворювань організму, зумовлених недостатністю вітамінів, розглядають як наслідок зменшення активності ферментів, у побудові яких беруть участь

вітаміни. Припускають, що водорозчинні вітаміни беруть участь в окислювально-відновних реакціях завдяки наявності подвійних зв'язків в їх молекулах. Проте конкретний механізм дії цієї групи вітамінів поки не з'ясований. Класифікація найбільш важливих і добре вивчених вітамінів, їх хімічна природа, властивості, біологічна роль і джерела надходження наведено в таблиці 11.Необхідність повніше задовольняти потреби людини у вітамінах примушує виробляти продукти підвищеної біологічної цінності з додаванням вітамінів, наприклад, здійснюється вітамінізація борошна (B_1, A_2, РР), молока і фруктових соків (С), масла і маргарину (А, Д). У процесі приготування їжі руйнується частина вітамінів. Наприклад, зберігання у воді нарізанної картоплі протягом 30 хв. призводить до зниження вмісту вітаміну С на 40 %; квашена капуста при віджиманні росолу і промиванні втрачає 60 % вітаміну С; при тепловій обробці м'яса знижується вміст вітаміну B_1 до 60 %, B_2 – до 30 %, РР – до 35 %. Отже, при складанні щоденних раціонів слід ширше використовувати багаті вітамінами продукти.

Вітаміни С і Е використовуються як антиоксиданти для стабілізації продуктів харчування. Вони зв'язують кисень, самі при цьому руйнуються, але запобігають окисленню продуктів. З цією метою вітамін С використовують при виробництві пива, вина, фруктових соків, а вітамін Е – жирів і масел.

Недостатнє надходження вітамінів викликає в організмі людини серйозні порушення обміну речовин.

Вітамін А. Гіповітаміноз А супроводжується зупинкою росту, ороговінням епітеліальних клітин, ксерофтальмією (сухість очей), частковою втратою зору. Вітамін А – це ненасичений циклічний спирт.

В організмі людини вітамін А легко піддається окислювально-відновним перетворенням і знаходиться у вигляді спирту та альдегіду.

Вітамін А міститься тільки у продуктах тваринного походження. Найбільш багаті ним вершкове масло, молоко, сир, яєчний жовток, ікра риб і риб'ячий жир, печінка. В рослинних продуктах вітамін А міститься у формі пігментних речовин – каротинів або провітамінів А. Потрапляючи в печінку, каротини під дією ферментів розщеплюються, утворюючи вітамін А. Найбільш багаті каротинами морква, червоний перець, абрикоси, горобина, листя петрушки, гарбузи.

*Вітамін D.*Основна фізіологічна роль вітаміну D – регуляція фосфорно-кальцієвого обміну в організмі. При нестачі вітаміну D у дітей порушуються процеси кісткоутворення, що призводить до захворювання рахітом.

Вітаміни групи D відносяться до похідних стеринів, зокрема ергостерину і 7-дегідрохолестерину. Відомо 5 вітамінів цієї групи, але найбільшу активність і практичне значення мають вітаміни D_2 і D_3.

Вітаміни групи D стійкі до лужного середовища і до високих температур, але руйнуються під дією світла, мінеральних кислот і окислювачів. Вони містяться у тих самих продуктах, що і вітамін А.

Вітамін Е. До групи вітамінів Е належить кілька сполук, в основі будови яких лежить біциклічне ядро хроману, зв'язане із залишком спирту фітолу. Вітаміни групи Е – речовини достатньо стійкі до дії високої температури і кисню, але легко окислюються азотною кислотою та іншими енергійними окислювачами. Руйнуються також під дією світла, мінеральних кислот і окислювачів. Вони містяться у тих самих продуктах, що і вітамін А.

Вітамін К. Вітаміни цієї групи називають факторами згортання крові. Вони синтезуються в хлоропластах зелених рослин. Велика кількість вітаміну К міститься в білокачанній капусті, томатах, шпінаті, гарбузах, шипшині, листях кропиви. Вітамін К знайдено також у тваринних продуктах – телятині, свинині, нирках, печінці.

Таблиця11

Класифікація та властивості вітамінів

Класифікація,назва вітамінів	**Біологічна роль**	**Добова потреба,мг**	**Джерела надходження**	**Властивості вітамінів**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
I. Водорозчинні вітаміни				
B_1 (тіамін)	Антиневритний. Авітаміноз віт.B_1 призводить до розладнання нервової, серцево-судинної та травної систем. Віт. B_1 входить до складу ряда ферментів (декарбоксилази), регулюючих обмін вуглеводів, жирів, білків і води.	1,3...1,9	Хліб, крупи, соя, горіхи, дріжджі, овочі, фрукти, свинина, нирки, печінка, мозок, яловичина, яйця, жовток, молоко.	Віт. B_1 розчинний у воді, стійкий до кислого середовища навіть при температурі 100...120^0 С, у лужному середовищі при нагріванні руйнується під час випікання борошняних виробів із додаванням соди
B_2 (рибофлавін)	Авітаміноз B_2 призводить до зупинки росту, ураження нервової системи, шкіряних покровів.Вітамін B_2 у формі ФМН і ФАД входить до складу флавінових ферментів, що каталізують багато окислювально-відновних реакцій.	2,0...4,0	Дріжджі, жовток яйця, мед, чай, молоко, печінка, нирки, м’ясо, риба, серце, овочі, хліб, крупи, горох.	Вітамін B_2 розчинний у воді, стійкий до нагрівання до 100^{0}С, кислого середовища, але чутливий до світла та лужного середовища при нагріванні. Заморожування та розморожу-вання продуктів призводить до втрати вітаміну B_2.
B_6 (піридоксин)	Антидерматичний. Нестача віт. B_6 веде до враження шкіряних покровів. Входить до складу ферментів, що регулюють азотистий обмін. Наприклад, обмін амінокислот, їх переамінування і декарбоксилування.	2,0...3,0	Хліб, горох, ква-соля, картопля, м’ясо, нирки, сир, печінка, оселедці, яйця, дріжджі, овочі.	Розчинний у воді та спирті, стійкий до кислот, лугів і нагрівання, але чутливий до світла. Дуже руйнується під впливом світла при pH 6,8.

Продовження таблиці 11

1	2	3	4	5
B_5,PP (ніацин, нікотинова кислота)	Антипелагричний (запобігає захворювання пелагрою – шершава шкіра). Вітамін РР у формі НАД і НАДФ входить до складу ферментів дегідрогеназ, що каталізують окислювально-відновні реакції.	15,0...25,0	Рис, хліб, гречана і вівсяна крупи, картопля, яйця, молоко, дріжджі, м'ясо, печінка,нирки, овочі, фрукти, гриби.	Малорозчинний у воді, добре розчинний у лужних розчинах, Серед усіх вітамінів найбільш стійкий при зберіганні, консервуванні, звичайній кулінарній обробці.
B_{12} (ціанкобаламін,коринаїди)	Антианемічний (запобігає виникненню злоякісної анемії). Вітамін B_{12} бере участь у багатьох метаболічних реакціях організму – синтезі метильних груп, відновлені дисульфідних груп в сульфгідрильні, синтезі білків і нуклеїнових кислот, в реакціях ізомеризації та ін.; забезпечення нормального гемопоезу активацією дозрівання еритроцитів.	10,0...15,0	Продукти тваринного походження: Печінка, нирки, м'язи, молоко, яйця.	Голчасті кристали рубіново-червоного кольору, без запаху і смаку. Добре розчинний у воді і спирті, не розчинний в жирових розчинниках – бензолі, ефірі, хлороформі. В сухому виді стійкий до дії зовнішніх факторів. Витримує автоклавування при 120^0С. Добре зберігається в темному сухому місці. На світлі швидко втрачає біологічну активність.
С (аскорбінова кислота)	Антицинготний (запобігає захворюванню цингою). Нестача вітаміну С призводить до зниження опору організму різним інфекційним захворюванням. Вітамін С бере участь в окислювально-відновних процесах, синтезі стероїдних гормонів надниркових залоз.	75,0...100,0	Плоди, ягоди, лимони, овочі, чорна смородина, обліпиха, шипшина, помідори, капуста, картопля, перець, цибуля, хрін, кріп, чай.	Вітамін С розчинний у воді, стійкий у кислих середовищах і витримує кип'ятіння при відсутності кисню, легко руйнується при нагріванні в лужному середовищі і при доступі кисню повітря, на сонці.
Р (рутин, катехіни, біофлавоноїди)	Антигеморагійний (запобігає порушенням Проникності капілярів, розвитку геморагій)	50,0...60,0	Поширений в рослинних продуктах, особливо в смородині,шипшині,цитрусових,чорноплідній горобині,зеленому чаї.	Жовті кристалічні речовини без запаху і смаку, погано розчинні в холодній воді (краще в киплячій воді або в спирті). Не розчинні в жирових розчинниках. Стійкі до дії кислот і лугів.

Продовження таблиці 11

II Жиророзчинні вітаміни				
Група А (ретинол)	Антиксерофтальмічний (запобігає захворюванню ксерофтальмією – сухістю очей). Вітамін А бере участь у процесах росту організму і регулює світовідчуття в складі зорового пігменту – родопсину.	1,0...2,5	Печінка, молоко, вершкове і росли-нне масло, сир, яйця, фрукти, овочі. В овочах і фруктах – у вигляді кароти-ноїдів (провітамін А).	Вітамін А розчинний в жирах і жиророзчинниках, стійкий до теплової обробки, але чутливий до світла; руйнується при окис-ленні і згіркнені жирів. Втрати вітаміну А при кулінарній обробці досягають 40%.
Група D (кальциферо-ли)	Антирахітичний (запобігає порушенню фосфорно-кальцієвого обміну) регулює всмоктування кальцію та фосфору в кишечнику та відкладання фосфату кальцію в кістковій тканині.	0,012...0,025	Жир, печінка, риба, яєчний жовток, вершкове масло, сир, дріжджі, молоко, олії.	Розчинний у жирах і жиророз-чинниках. Утворюється в орга-нізмі під дією УФ променів. Стійкий до кулінарної обробки та консервування. Руйнується тільки при тривалому смажен-ні во фритюрі.
Група Е (токофе – роли)	Антистерильний (нестача вітаміну Е викликає безпліддя, порушує діяльність залоз внутрішньої секреції). Вітамін Е, зв'я - заний з диханням організму і окисленням ліпідів, регулює синтез коензиму Q.	20,0...30,0	Олії, салат, капуста, злаки, горох, м'ясо, вершкове масло, жовток яйця, молоко.	Розчинний у жирах і жи-ророзчинниках.Стійкий до нагрівання і кислот. Чутливий до УФ-променів.Кулінарна обробка значно знижує вміст вітаміну Е в оліях.
Група К (філохінони)	Антигеморагічний (нестача вітаміну К приз-водить до крововиливів, тому що знижується здатність крові до згортання. Віт. К приймає участь у синтезі білку – протромбіну, що приймає участь у згортанні крові.	0,2...0,3	Листові овочі, цві-тна та білокачанна капуста, томати, картопля, печінка, яйця	Не розчинний у воді. Дуже чутливий до нагрівання у лужному середовищі та дії світла.
F (ненасичені жирні кислоти)	Антидерматичний (нестача ненасичених Жирних кислот призводить до припинення Росту, дерматитам, екзем, сухісті кожі, випадінню волосся, крихкісті і розшаруван-ню кісток, ураженню нирок). Підвищує еластичність і стійкість кровоносних судин, підвищує резистентність організму.	2,0...10,0	Рослинні олії, сало	Оліїсті рідини, добре розчинні в жирових розчинниках і не розчинні у воді. Легко окислю-ються киснем повітря.

III Вітаміноподібні речовини				
Вітамін U	Противиразковий фактор шлунка і дванадцятипалої кишки.	Не встановлено	Сирі овочі, молоко, печінка, сік капусти, зелень петрушки, зелений чай, фрукти.	Розчинний у воді, стійкий до кислого середовища, але руйнується при 100^0 С, особливо в нейтральному і лужному середовищі.
Ліпоєва кислота	Регулює обмін ліпідів і вуглеводів у складі ферментних комплексів.Бере участь в окисленні і переносі ацильних груп.	500,0	Печінка, нирки, серце, м’ясо, молоко, капуста, рис.	

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 26

„ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ”

Мета заняття: визначити наявність водорозчинних вітамінів.

План заняття

1.Провести якісну реакцію на аскорбінову кислоту.
2.Провести дослідження окислення вітаміну С.
3.Виявити наявність вітаміну Р.
4.Провести якісну реакцію на вітамін B_1.
5.Вивчити якісну реакцію на вітамін B_6.
6.Визначити вітамін РР з постановкою проби на мідь.

1. Якісна реакція на аскорбінову кислоту

Аскорбінова кислота – вітамін С – широко розповсюджена в рослинних продуктах. Особливо багаті на вміст цього вітаміну свіжі овочі і ягоди, цитрусові, чорна смородина, гілки хвої, болгарський перець та ін.

Відсутність вітаміну С призводить до тяжкого захворювання – *цинги* або *скорбуту*.

Виявлення аскорбінової кислоти відбувається за допомогою розчину 2,6 діхлорфеноліндофенолята натрію синього кольору (краска Тільманса). Ця сполука є слабким окислювачем, який швидко реагує з сильними відновлювачами, до яких відносять вітамін С. В кислому середовищі краска стає червоною, а при відновленні – втрачає забарвлення.

Об’єкт дослідження: 1. Сік картоплі;
2. Сік моркви;
3. Сік капусти.

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Крапельниці;
3. Піпетки;
4. Колби мірні, вогнетривкі;
5. Нагрівальний прилад.

Реактиви: 1. H_2O_2, 3 %-й розчин;
2. HC1, 10 %-й розчин;
3. Діхлофеноліндофенолят натрію (краска Тільманса), 0,001 н розчин.

Техніка виконання роботи

Виявляють вітамін С в соках, які вироблено з картоплі, моркви або капусти. Для одержання соку матеріал, який досліджують, пропускають через тертушку і одержану масу віджимають через полотно. Потім сік повторно фільтрують крізь марлю. В дві пробірки наливають по 2 мл розчину, який досліджують. До однієї з них додають кілька крапель 3 %-го розчину перекису водню, вміст пробірки нагрівають. За цих умов вітамін С руйнується.

Далі в обидві пробірки додають по 2 краплі 10 %-го розчину НС1 та по одній краплі натрієвої солі 2,6 діхлорфенліндофенолята. У кислому середовищі барвник набуває рожевого кольору, але в присутності аскорбінової кислоти розчин знебарвлюється внаслідок відновлення барвника. У тій пробірці, де вітамін С був зруйнований, рожеве забарвлення зберігається.

2 .Дослідження окислення вітаміну С

Об'єкт дослідження: 1. Аскорбінова кислота;
2. Глюкоза, 1 %- розчин.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки.
Реактиви: 1. НС1, 10 %-й розчин;
2. $CuSO_4$, 5 %-й розчин;
3. NaOH, 10 %-й розчин;
4. 2,6 – ДХФІФ, 0,001 н розчин (краска Тільманса).

Техніка виконання роботи

В першу пробірку вливають 5 крапель краски Тільманса та 5 крапель соляної кислоти, а в другу – 10 крапель NaOH та 5 крапель сірчанокислої міді. Потім додають по 5 крапель аскорбінової кислоти. В третю і четверту пробірки вливають тіж самі реактиви, але замість аскорбінової кислоти додають глюкозу. Спостерігають зміну забарвлення.

3.Виявлення наявності вітаміну Р

Наявність речовин з Р-вітамінною дією визначають по реакції цих речовин з хлорним залізом. При цьому утворюється комплексна сполука, що має зелене забарвлення.

Об'єкт дослідження: 1. Чай чорний;
2. Чай зелений.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Мірні циліндри.
Реактиви: 1. Етиловий спирт;
2. Трихлористе залізо, 10 %-розчин.

Техніка виконання роботи

В першу пробірку насипають 1 г зеленого чаю, в другу – 1 г чорного чаю. В обидві додають по 10 мл етилового спирту, енергійно перемішують. Через 15 хвилин суміш фільтрують. Від фільтратів відбирають у дві пробірки по 10 краплин розчину, в кожну додають по 1 мл трихлористого заліза. Спостерігають появу зеленого забарвлення у пробірці з зеленим чаєм.

4. Якісна реакція на вітамін B_1.

Вітамін B_1 виявляють по створенню в лужному середовищі червоної речовини з діазореактивом.

Об'єкт дослідження: тіамін (вітамін B_1).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Флюориметр.
Реактиви: 1. Сульфанілова кислота, 10 %-й розчин;
2. Нітрат натрію, 10 %-й розчин;
3. Їдкий натр, 30 %-й розчин;
4. Na_2CO_3, 30 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл сульфанілової кислоти і 1 мл нітрата натрію, при цьому утворюється діазореактив. Потім додають по 1 мл тіаміну, NaOH і Na_2CO_3. Відзначають появу оранжевого забарвлення.

При окисленні тіаміну, при його зберіганні, може утворюватися тіохром, який дає синю флюорисценцію у ультрофіолетовому промені. Тобто, якщо помістити ампулу з тіаміном у флюориметр, то можна спостерігати флюорисценцію.

5. Якісна реакція на вітамін B_6

Наявність вітаміну B_6 можливо виявити по утворенню комплексної сполуки червоного кольору з трихлористим залізом.

Об'єкт дослідження: піридоксин (вітамін B_6).
Обладнання і посуд: штатив із пробірками.
Реактиви: трихлористе залізо,10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1 мл піридоксину і 1 краплю трихлорного заліза. Перемішують і спостерігають появу червоного забарвлення.

6.Проба з міддю на вітамін РР (нікотинова кислота)

Об’єкт дослідження: нікотинова кислота (вітамін РР).

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Нагрівальний прилад;
3. Піпетки.

Реактиви: 1. Оцтова кислота, 10 %-й розчин;
2. Оцтовокисла мідь, насичений розчин.

Техніка виконання роботи

5...10 г нікотинової кислоти розчиняють при нагріванні в 5 мл 10 %-го розчину оцтової кислоти. До нагрітого до кипіння розчину додають рівний об’єм оцтовокислої міді. Рідина забарвлюється у голубий колір і випадає в осад мідна сіль нікотинової кислоти.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 27

„ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ У ПРОДУКТАХ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ”

Мета заняття: вивчити наявність аскорбінової кислоти у продуктах рослинного походження.

План заняття

1.Визначити кількість аскорбінової кислоти у продуктах рослинного походження.

1.Визначення кількості аскорбінової кислоти у продуктах рослинного походження.

Об’єкт дослідження: рослинні продукти (картопля,яблуко,капуста, лимон, шипшина).

Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки;
3. Порцелянові ступки з товкачиком;
4. Бюретки;
5. Лабораторні терези;
6. Кварцовий пісок.

Реактиви: 1. Соляна кислота, 2 %-й розчин;
2.2,6-Діхлорфеноліндофенолят натрію (краска Тільманса), 0,001н розчин.

Техніка виконання роботи

На лабораторних терезах роблять наважку картоплі чи іншої рослинної сировини по 5 г, шипшини – 1 г. Наважку переносять до парцелянової ступки, додають 5 мл соляної кислоти, розтирають з кварцовим піском. Додають 15 мл дистильованої води. Суміш фільтрують, вимірюють кількість фільтрату. В колбу вливають 10 мл фільтрату і відтитровують 2,6-Діхлофеноліндофенолятом натрію до появи рожевого забарвлення.

Розрахунки кількості аскорбінової кислоти виконують по формулі:

$$X = \frac{0{,}149 \cdot а \cdot г \cdot 100}{б \cdot в},$$

де: Х – кількість аскорбінової кислоти, мг в 100 г продукту;
0,149 – титр краски Тільманса;
а – кількість краски Тільманса, що було витрачено на титрування проби, мл;
г – загальна кількість фільтрату, мл;
б – кількість фільтрату, що було взято на титрування, мл;
в – кількість продукту, яку було взято для дослідження, г;
100 – перерахунок на 100 г продукту.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 28

„ДОСЛІДЖЕННЯ ЖИРОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ”

Мета заняття: визначити наявність жиророзчинних вітамінів.

План заняття

1.Провести дослідження якісної реакції на вітамін А.
2.Виділити каротиноїди з зелених частин рослин.
3.Провести дослідження якісної реакції на вітамін Е.
4.Провести дослідження якісної реакції на вітамін Д.
5.Провести дослідження якісної реакції на вітамін К.

1. Якісна реакція на вітамін А

Об’єкт дослідження: ретінол (вітамін А).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки або крапельниці.

Реактиви: 1. Хлороформ;
2. Концентрована сірчана кислота.

Техніка виконання роботи

В пробірку наливають 1 мл вітаміну А і 1 мл хлороформу. Перемішують і додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Спостерігають появу синього забарвлення.

2. Виділення каротиноїдів з зелених частин рослин.

Каротиноїди виявляють у зелених частинах рослин шляхом відділення від хлорофілу, який маскує оранжеве забарвлення провітаміну А. З цією метою використовують хроматографічний метод.

Об'єкт дослідження: 1. Зелена цибуля;
2. Листя петрушки.
Обладнання і посуд: 1.Парцелянові ступки з товкачиком;
2. Хроматографічний папір;
3. Воронки;
4. Мірний циліндр.
Реактиви: 1. Хлороформ;
2. Сірчанокислий натрій (Na_2SO_4), сухий;
3. Етанол.

Техніка виконання роботи

Готують наважку (3...5 г) зеленої цибулі або іншого джерела каротиноїдів, яку поміщають у парцелянову ступку. Ретельно розтирають з 2 г сірчанокислого натрію, який зневожує суміш. Додають 5 мл етанолу, перемішують та фільтрують. У фільтрат занурюють кінчик хроматографічного паперу і залишають на деякий час. Після того, як фронт розчинника підніметься на 10...12 см, полоску паперу просушують на повітрі. Фіксують забарвлення окремих ділянок паперу.

3. Якісна реакція на вітамін Е

Об'єкт дослідження: токоферол (вітамін Е).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Крапельниці.
Реактиви: азотна кислота, концентрована.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 2 краплі розчину вітаміну Є, додають 4 краплі азотної кислоти. Залишають на 30 хвилин. Спостерігають появу забарвлення, що свідчить про наявність вітаміну Е.

4. Якісна реакція на вітамін D

Об'єкт дослідження: кальциферол (вітамін D).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки або крапельниці.
Реактиви: 1. Хлороформ;
2. Аніліновий реактив.

Техніка виконання роботи

У пробірку наливають 1...2 краплі розчину вітаміну D, додають 5 крапель хлороформу і перемішують. Потім додають 1 краплю анілінового реактиву. Спостерігають появу забарвлення.

5. Якісна реакція на вітамін К

Об'єкт дослідження: філлохінон (вітамін К) або вікасол (водорозчинний аналог вітаміну К).
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки або крапельниці.
Реактиви: 1. Хлороформ;
2. Аніліновий реактив.

Техніка виконання роботи

В пробірку вливають 1 мл розчину філлохінону або вікасолу. Додають 2 краплі анілінового реактиву і перемішують. Відзначають появу забарвлення.

Контрольні запитання

1. Що таке вітаміни ?
2. Класифікація вітамінів.
3. Фізіологічна роль вітамінів.
4. Вітаміни групи В. Джерела надходження, зв'язок з ферментами (B_1,B_2,B_6,B_{12}), добова потреба.
5. Вітамін РР, будова, зв'язок з ферментами, участь в обміні речовин, джерела надходження, добова потреба.
6. Пантотенова кислота (B_{15}),будова, зв'язок з коферментом А.

7. Вітамін С, будова, властивості, стійкість при переробці і зберіганні рослинної сировини, джерела надходження, добова потреба.
8. Способи зберігання вітаміну С в рослинній сировині.
9. Які прояви свідчать про наявність гіповітамінозу А ?
10. Які ознаки гіповітамінозу Д ?
11. У чому полягає фізіологічна дія вітамінів К і Е ?
12. Наведіть приклади авітамінозів.
13. Назвіть харчові джерела жиророзчинних вітамінів та укажіть їх участь у обміні речовин.

Тема 14. РЕГУЛЯЦІЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН

Важливим фактором регуляції обміну речовин є гормони. Вони утворюються в залозах внутрішньої секреції, потім потрапляють у кров чи інші рідини організму. З ними досягають усіх клітин живих організмів, виконуючи регулюючу функцію, тобто вони регулюють обмін речовин в органах і тканинах. Однією з ендокринних залоз є надниркові залози. В них розрізняють внутрішній і зовнішній шари. Клітини внутрішнього шару виділяють два гормона – адреналін та норадреналін. Обидва є продуктом ферментативного перетворення тирозіну (або фенілаланіну) при участі метіоніну.

Адреналін – нестійка сполука. Він легко окислюється, а також є сам гарним відновлювачем. Він відновлює металеве срібло з розчину азотнокислого срібла, мідь із закису міді. Ці реакції легко протікають у нейтральному та лужному середовищах. Продукти, що утворюються в цих реакціях (дегідроадреналін, адренохром), приймають участь в окислювальних реакціях у організмі.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 29

„ДОСЛІДЖЕННЯ ГОРМОНІВ”

Мета заняття: визначити наявність гормонів.

План заняття

1. Провести дослідження адреналіну з хлорним залізом.
2. Вивчити реакції адреналіну з йодноватокислим калієм.
3. Вивчити реакції на інсулін.

1. Дослідження адреналіну

Розчини адреналіну з хлорним залізом дають смарагдово-зелене забарвлення, яке є характерним для оксигруп, що знаходяться в ортоположенні.

Об’єкт дослідження: адреналін, розчин 1:1000.
Обладнання і посуд: 1. Штатив з пробірками;
2. Піпетки.
Реактиви: 1. Трихлористе залізо, 3 %-й розчин;
2. Аміак, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В пробірку наливають 0,5 мл розчину адреналіну, додають 2 мл дистильованої води та 1 краплю хлорного заліза. Спостерігають появу зеленого забарвлення. Потім додають одну краплю розчину амміаку. Спостерігають зміну забарвлення на красне, потім коричньове, яке утворюється тому, що пірокатехінове ядро адреналіну утворює з іонами заліза сполуки типа фенолятів.

2. Реакція адреналіну з йодноватокислим калієм

Об’єкт дослідження: адреналін, розчин 1:1000.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки;
3. Нагрівальний прилад.
Реактиви: 1. Йодноватокислий калій (йодат калію KIO_3), 1 %-й розчин;
2. Оцтова або ортофосфорна кислота, 10 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В пробірку наливають 0,5 мл розчину адреналіну, 1 мл розчину йодату калію, 10 крапель розчину оцтової або ортофосфорної кислоти і нагрівають до 60…65^0 С. Спостерігають появу червоно-фіолетового забарвлення.

3. Реакція на інсулін

Інсулін – гормон підшлункової залози за хімічним складом є білком, а його молекула складається з двох поліпептидних ланцюгів, об’єднаних двома дісульфідними містками. Інсуліну притаманні усі кольорові реакції, що є характерними для білків.

Об’єкт дослідження: інсулін.
Обладнання і посуд: 1. Штатив із пробірками;
2. Піпетки.
Реактиви: 1. Гідроокис натрію, 10 %-й розчин;
2. Сульфат міді, 5 %-й розчин.

Техніка виконання роботи

В пробірку наливають 1 мл інсуліну, додають 2...3 мл гідрооксиду натрію і 1 мл розчину сульфату міді. Спостерігають появу рожево-фіолетового кольору. Осад, що випав, при додаванні розчину оцтової кислоти (до pH 2,5...3,5) розчиняється.

Контрольні запитання

1. Назвіть залози внутрішньої секреції.
2. Які гормони виділяє щитовидна залоза, в яких процесах вони приймають участь?
3. Назвіть гормони, що утворюються в гіпофізі.
4. Яку біологічну роль виконують гормони надниркових залоз ?
5. Яку біологічну дію виконують гормони підшлункової залози ?

Тема 15. ПІДСУМКОВЕ ЗАНЯТТЯ ПО ВІТАМІНАМ І ГОРМОНАМ

Питання для обговорення

1. Класифікація вітамінів.
2. Поняття про авітаміноз, гіповітаміноз, гіпервітаміноз.
3. Вітамін B_1, будова, властивості, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
4. Вітамін B_2, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
5. Вітамін B_6, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
6. Вітамін PP, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
7. Вітамін C, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
8. Вітамін A, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
9. Вітамін D, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
10. Вітамін E, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
11. Вітамін K, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
12. Вітамін F, ознаки гіповітамінозу, участь в обміні речовин, добова потреба, джерела в їжі.
13. Участь вітамінів у процесах обміну речовин. Вітаміноподібні речовини.
14. Шляхи підвищення вітамінної цінності їжі.
15. Дайте перелік ендокринних залоз та їх гормонів.

16.Стероїдні гормони.
17.Гормони, що утворюються з амінокислот.
18.Гормони, що утворюються з пептидів.

Список літератури

1. Дуденко Н.В., Павлоцкая Л.Ф. и др. Биологическая химия – Х.: Прапор, 1999. – 316 с.

2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1990. – 543 с.

3. Боєчко Ф.Ф. Біологічна хімія. – К.: „Вища школа”, 1989 – 405 с.

4. Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О. Основні біологічні поняття, визначення і терміни. - К.: „Вища школа”, 1993. – 527 с.

5. Кучеренко М.Е., Віноградов Р.П. Біохімія. – К.: Либідь, 1995. – 462 с.

6. Кучеренко М.Є. и др. Биохимия. Практикум для ВУЗов – К.: Вища школа, 1988. – 126 с.

7. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1983. – 272 с.

8. Павлоцька Л.Ф., Дуденко Н.В., Артеменко В.С., Герус Л.Д. Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з курсу „Біологічна хімія”. – Х.: ХДАТОХ, 2001. – 51 с.

Навчальне видання

Укладачі

Павлоцька Лариса Федорівна
Дуденко Ніна Василівна
Артеменко Віктор Станіславович
Горбань Віктор Григорович
Серік Максим Леонідович
Цибань Лілія Степанівна

ПРАКТИКУМ З БІОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК
для студентів технологічних факультетів (спеціальності ТХ 8.091711;ТХК 8.091702; ТК 7.091706; ТМ 7.091709)

Редактор М.О.Середенко

Здано на складання
Формат 60 84 1/16
Умовн. друк. арк.
Обл.- видавн.арк.

Підписано до друку
Папір газетний. Друк. офс.
Умовн. фарб.- відб.
Тираж 500 прим. Зам. №

Харківський державний університет харчування і торговлі

61051, Харків – 51, вул. Клочківська, 333.

ДОД ХДУХТ, Харків – 51, вул. Клочківська, 333