



**Національний університет
«КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»**

Кафедра біології

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
до практичних робіт з дисципліни «Біохімія»**

Освітній ступінь – бакалавр

Спеціальність – Е1 Біологія та біохімія

Освітньо-професійна програма – «Біологія та біотехнологія»

Рік підготовки, семестр – 2 рік, осінній та весняний семестри

Годин лабораторних робіт – 32

Автори методичних рекомендацій – В. В. Шпильчин, Н. І. Куниця

Київ
НаУКМА
2026

УДК 577.1(072+076.5)

Рекомендовано до друку Вченою Радою НаУКМА

(протокол № 23 від 30 грудня 2025 р.)

Рецензенти:

Маньковська О. С., кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Сенча-Глевацька К. В., кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник, старший дослідник Інституту хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України

Укладачі:

Шпильчин В. В., кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри біології НаУКМА

Куниця Н. І.

Методичні рекомендації до практичних робіт з дисципліни «Біохімія» / уклад.: В. В. Шпильчин, Н. І. Куниця. Київ : НаУКМА, 2026. 45 с.

ISBN 978-617-8640-16-3 (електронне видання)

Методичні рекомендації призначені для самостійної підготовки до практичних занять із дисципліни «Біохімія» для студентів-біологів факультету природничих наук НаУКМА. Методичні рекомендації містять необхідний теоретичний матеріал із дисципліни «Біохімія», протоколи 8 лабораторних робіт та питання для підготовки і самоконтролю здобувачів освіти.

В авторській редакції

ISBN 978-617-8640-16-3 (електронне видання)

УДК 577.1(072+076.5)

© НаУКМА, 2026

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Правила роботи в учбовій лабораторії.....	6
Довідкова інформація щодо роботи в лабораторії	8
Короткі відомості про лабораторний (хімічний) посуд	8
Практична робота №1	11
Тема: Буферні розчини	11
Теоретичні відомості.....	11
Протокол практичної роботи №1.....	14
Практична робота №2	16
Тема: Кількісне визначення вітаміну С за методом Тільманса.	16
Екстракція каротиноїдів з біологічного матеріалу.....	16
Теоретичні відомості.....	16
Протокол практичної роботи №2.....	20
Лабораторна робота №3.....	22
Тема: Кількісне визначення концентрації білків за методом Лоурі. Побудова калібрувального графіку.	22
Теоретичні відомості.....	22
Протокол практичної роботи №3.....	24
Лабораторна робота №4.....	27
Тема: Кількісне визначення концентрації білку за методом Лоурі в тканині	27
Теоретичні відомості.....	27
Протокол лабораторної роботи №4	27
Лабораторна робота №5	29
Тема: Ферменти та їхні властивості на прикладі амілази слини	29
Теоретичні відомості.....	29
Протокол практичної роботи №5.....	31
Лабораторна робота №6	34
Тема: Хімія вуглеводів.....	34
Теоретичні відомості.....	34
Протокол практичної роботи №6.....	37
Якісне визначення глюкози	37
Якісне визначення сахарози	38

Лабораторна робота №7	38
Тема: Виділення глікогену з біологічного матеріалу	38
Теоретичні відомості	39
Протокол практичної роботи №7	41
Лабораторна робота №8	42
Тема: Визначення фруктозо-1,6-бісфосфату	42
Теоретичні відомості	42
Протокол практичної роботи №8	44
Список літератури:	45

ВСТУП

В основі функціонування всіх живих систем лежать біохімічні процеси внутрішньоклітинного обміну та механізми його регуляції. Дослідження цих процесів є основним завданням біохімії, вирішенням якого нерозривно пов'язано вивчення компонентів біологічних об'єктів. Для цього компоненти необхідно виділити, всебічно дослідити їхні властивості та з'ясувати роль і функції в організмі за допомогою різноманітних методів, що застосовуються в біохімії.

Дані методичні рекомендації розраховані допомогти здобувачам освіти оволодіти найпростішими, але базовими прийомами, які лежать в основі більш складних методів, що передбачає самостійне складання плану або схеми елементарних біохімічних досліджень, приготування та перевірку необхідних робочих розчинів, проведення експериментів згідно з попередньо сформованою схемою, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків на основі цього аналізу.

До практикуму увійшли роботи, що відповідають основним розділам теоретичного курсу з біохімії і мають за мету полегшити здобувачам освіти засвоєння основних його положень і набути практичних навичок роботи в біохімічній лабораторії.

Біохімічний практикум розрахований на 32 години і включає 8 лабораторних робіт: 4 в осінньому семестрі і 4 у весняному.

Правила роботи в учбовій лабораторії

Основні вимоги до кожного студента(ки), хто працює в лабораторії, – це акуратність, уважність, спостережливість і кмітливість. Дотримання цих вимог при виконанні дослідів має ключове значення, тому що точне проведення роботи забезпечує повноцінне засвоєння методичних приписів та значний відсоток успіху завдяки впевненості в достовірності отриманих результатів.

Крім того, присутність у лабораторії вимагає дотримання спеціальних правил, а саме:

У лабораторії категорично забороняється:

- Знаходитися та виконувати роботи без халата
- Споживати їжу
- Класти на робочі столи, витяжки, прилади сумки та одяг
- Утримувати на робочому місці зайві реактиви, обладнання, інші речі
- Мобільні телефони тримати на робочих столах заборонено

Підчас роботи кожен студент повинен:

- Максимально підтримувати тишу та спокій в лабораторії
- Утримувати власне робоче місце, а також місця спільного користування (витяжки, місця біля приладів) в порядку та чистоті
- Обережно поводитися з хімічним посудом, приладами та іншими предметами лабораторного обладнання
- Слідкувати за тим, щоб всі розчини, реактиви, хімічний посуд, що знаходяться на робочому столі та використовуються для роботи, були підписані

- Працювати з непідписаним посудом, реактивами, розчинами – забороняється
- При наборі розчинів та рідких реактивів користуватися тільки піпеткою з грушою або механічним саплером
- По закінченню роботи обов’язково прибрати робоче місце
- Використаний посуд ретельно сполоснути водою, щоб змити залишки розчинів та осадів, і скласти у відведені для цього ємності – відра та кювети
- Скляні піпетки завжди складаються носиками догори

Довідкова інформація щодо роботи в лабораторії

Короткі відомості про лабораторний (хімічний) посуд

Виконання усіх без виключення практичних робіт вимагає роботи з відповідним скляним або пластиковим посудом, і успіх роботи залежить правильності вибору і акуратності поводження з ним.

Існує кілька підходів до класифікації лабораторного посуду, деякі з них наведені нижче.

Види лабораторного посуду (за призначенням):

1. **Загального призначення або немірний посуд.** Найпоширеніші вироби, що є в кожній лабораторії. Виготовляються з різних матеріалів, наприклад, скляні, порцелянові, керамічні, металеві, пластикові пробірки, колби, склянки, лійки, шпателі і т.д.
2. **Посуд спеціального призначення.** Це спеціальний функціональний посуд для специфічних дослідів. Менш поширений, створюється зі спеціальних матеріалів. Це можуть бути установки для відгону (дистиляційні колби, алонжі, дефлегматори, ексикатори).
3. **Мірний посуд.** Створений для вимірювання об'єму і густини рідких речовин. Ключова конструктивна особливість — наявність градуювання/показчики обсягу. Найчастіше нагрівати в таких ємностях не можна, вони призначені тільки для вимірювальних цілей. Це піпетки, бюретки, циліндри, колби, склянки, мензурки тощо.

При виконанні завдань лабораторної роботи для встановлення точного об'єму рідини або доведення рідини до певного об'єму вимагає використання ВИКЛЮЧНО точного мірного посуду. А саме: піпеток, бюреток, мірних колб.



Рис. 1. Мірна колба на 500 мл з міткою

Мірні колби, як правило, калібруються однією кільцевою міткою, яка відповідає її цільовому об'єму. Заповнення мірної колби розчином проводять за допомогою лійки. Коли рівень рідини буде на 0,5 см нижче мітки, лійку дістають і розчин додають піпеткою до тих пір, поки нижній меніск не буде відповідати мітці колби. При цьому око спостерігача повинно знаходитися на рівні мітки.

Для вимірювання приблизного об'єму можна використовувати мірні циліндри, мірні стакани, мірні пробірки.



a



б



в

Рис. 2. Мірний посуд для приблизного встановлення об'єму рідини: а) мірний циліндр, б) мірний стакан, в) мірна пробірка

Рівень безбарвних рідин встановлюють по нижньому меніску, забарвлених – по верхньому.

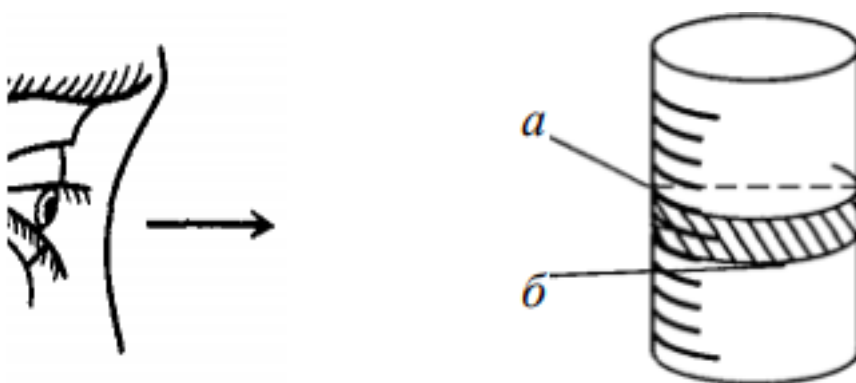


Рис. 3. Схема встановлення рівня рідини в мірному посуді по меніску: а) верхній меніск, б) нижній меніск

Практична робота №1

Тема: Буферні розчини

Мета роботи*: навчитися готувати буферні розчини

Завдання*¹:

- 1) Обрати буферний розчин з певним значення рН;
- 2) Зробити розрахунок компонентів (реактивів), необхідних для приготування буферного розчину;
- 3) Отримати необхідні компоненти (реактиви) шляхом зважування та розчинення;
- 4) Приготувати буферний розчин шляхом змішування розрахованих компонентів у пропорції, що наведена в відповідній таблиці;
- 5) Виміряти рН отриманого розчину;
- 6) Зробити висновки.

Схема роботи:

Успішне виконання лабораторної роботи вимагає самостійної підготовки і складання схеми роботи ДО її початку.

Схема – це послідовність дій, відповідно до протоколу лабораторної роботи, які необхідно буде виконати на занятті. Схема складається довільно, має передбачати усі основні кроки дослідження, має містити вільне місце для розрахунків і запису проміжних результатів. Може бути збагачена ілюстраціями, позначками, іншими візуальними елементами (стрілочки, блоки, таблиці), що будуть полегшувати ведення записів і сприйняття роботи.

Теоретичні відомості

¹ *Мета роботи і завдання в усіх наступних лабораторних роботах формулюється студентами самостійно в довільній формі, за умови, що мета повинна розкривати глобальну ціль дослідження, що проводиться, а завдання – конкретизувати кроки, які необхідно виконати, для досягнення мети

Внутрішньоклітинні процеси є дуже чутливими до зміни концентрації іонів водню і протікають у середовищі з певним рН. Більшість реакцій відбувається при нейтральних значення рН, але й існують відхилення, наприклад, лізосомальні гідролази максимально активні за рН 5.0, а пепсин – рН 1.0.

Чутливість біологічних процесів до рН підтримується за допомогою ефективних буферних систем, які за своєю хімічною природою є такими, що запобігають змінам рН, які виникають під час протікання хімічних процесів, в результаті яких утворюється кислоти або основи. Наприклад, кров містить карбонати та фосфати, які виконують роль буферного розчину.

Під час досліджень, при виділенні клітин та компонентів клітин, відбувається часткове або повне руйнування системи клітинної саморегуляції. Для того, щоб зберегти «робочий» стан об'єкту дослідження, використовують штучні буферні системи для підтримки сталості рН.

Буферним називають розчин, що перешкоджає змінам концентрації іонів водню при додаванні до нього кислоти або лугу. Буферний розчин – це, як правило, суміш слабкої кислоти та її солі від сильної основи, або слабкої основи та її солі від сильної кислоти. Такий розчин характеризується певною сталою концентрацією водневих іонів або рН.

Значення рН – це від'ємний десятковий логарифм молярної концентрації водневих йонів

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$$

Виходячи з цієї формули, зміна рН на одиницю означає 10-кратну зміну концентрації водневих іонів.

Буферні розчини повинні відповідати певним вимогам:

1. Висока буферна ємність в необхідному діапазоні значення рН.

Буферна ємність визначається зміною рН при додаванні сильних

кислот чи основ до буферного розчину. Чим більша буферна ємність розчину, тим краще він буде підтримувати сталість рН.

2. Компоненти буферного розчину повинні:

- мати високій ступінь хімічної чистоти;
- добре розчинятися у воді і не проникати через біологічні мембрани;
- бути стійкими до дії ферментів та гідролізу;
- не мати токсичної або інгібуючої дії;
- бути дешевими.

3. Не поглинати світло в УФ та (або) видимій частині спектру;

4. Властивості буферних розчинів мають бути мінімально залежними від умов навколишнього середовища;

5. Бути легкими у приготуванні.

При приготуванні буферного розчину певної концентрації, як правило, застосовується молярна концентрація. 1 М (молярний) розчин містить 1 моль речовини в 1 л розчину.

Приготування буферного розчину починають з розрахунку необхідної кількості (наважки) його компонентів. Реагенти зважують на електронних вагах (для більш точних розрахунків, використовують аналітичні ваги), дотримуючись правил роботи на цьому обладнанні:

- Зважування проводити в спеціальній тарі;
- Набирати наважки потрібно за допомогою шпателя (ложки);
- Ваги завжди повинні бути чистими.

Зважені компоненти через воронку невеликими порціями висипають в мірну колбу, дистильованою водою ополіскують воронку і той посуд, в якому зважували, доливають приблизно половину необхідного об'єму, повністю розчиняють наважку і тільки після цього доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Важливо, що при цьому використовується лише точний мірний посуд, як правило, це колби на 25, 50, 100, 250 мл.

Переважна більшість буферів складається з декількох розчинів певної молярної концентрації, що змішуються в певному співвідношенні в залежності від того значення рН, яке необхідно отримати.

Протокол практичної роботи №1

1. Приготувати Na-ацетатний буфер, рН 3,7-5,6.

Для приготування буферного розчину використовують 0,2 М розчини обох компонентів (оцтова кислота та CH_3COONa).

Склад: x мл 0,2 М оцтовокислого натрію + y мл 0,2 М оцтової кислоти

рН (18 ⁰ С)	0,2 М CH_3COONa	0,2 М CH_3COOH
3,7	10,0	90,0
4,0	18,0	82,0
4,6	49,0	51,0
5,0	70,0	30,0
5,6	91,0	9,0

2. Приготувати Na-фосфатний буфер, рН 5,8- 8,0.

Для приготування буферу використовують 0,2 М розчини $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ та $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$.

Склад: x мл 0,2 М розчину Na_2HPO_4 + y мл 0,2 М розчину NaH_2PO_4 , доводять об'єм до 100 мл дистильованою водою.

рН (25 ⁰ С)	0,2 М Na_2HPO_4	0,2 М NaH_2PO_4
5,8	4,0	46,0
6,4	13,25	36,75
7,0	30,50	19,50
7,6	43,50	6,50
8,0	47,35	2,65

3. Приготувати цитратний буфер, рН 3,0-6,2.

Для приготування буферу використовують 0,1 М розчин лимонної кислоти $C_6H_8O_7 \times H_2O$ та 0,1 М розчин дигідрату тринатрієвої солі лимонної кислоти $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$.

Склад: x мл 0,1 М лимонної кислоти + y мл 0,1 М цитрату натрію.

рН (25 ⁰ С)	0,1 М $C_6H_8O_7 \times H_2O$ x мл	0,1 М $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ y мл
4,6	44,5	55,5
5,0	35,0	65,0
5,4	25,5	74,5
5,8	16,0	84,0
6,2	8,0	92,0

4. Приготувати К-фосфатний буфер, рН 5,8-8,0 (по Кларку-Лабсу).

Для приготування буферу використовують 0,1 М KH_2PO_4 та 0,1 М NaOH.

Склад: 50 мл 0,1 М KH_2PO_4 + x мл 0,1 М NaOH, доводять до 100 мл дистильованою водою.

рН (25 ⁰ С)	0,1 М NaOH x мл
6,0	5,6
6,5	13,9
7,0	29,1
7,4	39,1
8,0	46,1

Питання для підготовки:

1. Молярна, нормальна, моляльна концентрації;
2. Загальні відомості про буферні розчини та рН;
3. Буферна ємність розчину;
4. Вимоги до компонентів буферних розчинів та самих буферних розчинів;
5. Властивості буферних розчинів.

Практична робота №2

**Тема: Кількісне визначення вітаміну С за методом Тільманса.
Екстракція каротиноїдів з біологічного матеріалу.**

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Вітамін С (хім. назва *L-аскорбінова кислота*) – це водорозчинний вітамін, потужний антиоксидант, який є життєво важливим для функціонування всіх живих організмів. Вітамін С присутній в тканинах практично всіх тварин і рослин. Лише деякі з них (люди, мавпи, морські свинки) втратили здатність до його синтезу. Мікроорганізми не містять цього вітаміну і не мають в ньому потреби. Всі інші види синтезують вітамін С з глюкози та глюкуронової кислоти за схемою:

Глюкоза – Глюкуронова кислота – L-гулоза – Аскорбінова кислота

У чистому вигляді вітамін С був виділений в 1933 році. За хімічною будовою аскорбінова кислота – це гамма-лактон 2,3-дегідро-L-гулонової кислоти.

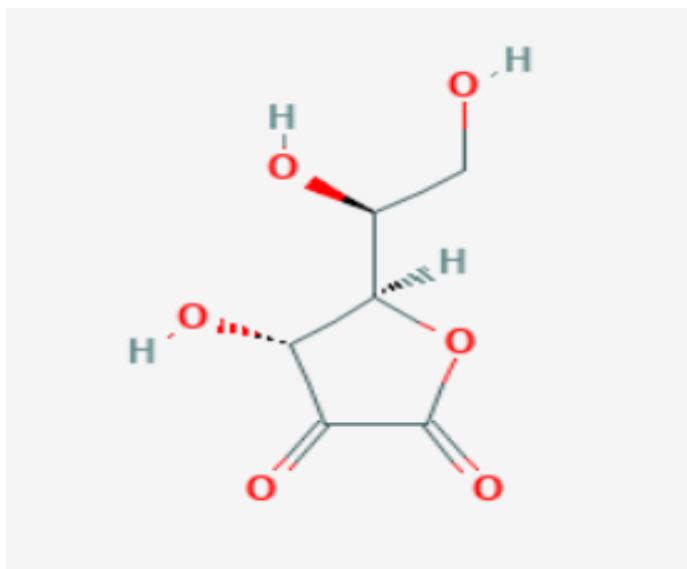
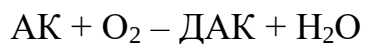


Рис. 4. Структурна формула L-аскорбінової кислоти

Вітамін С бере участь в окисно-відновних реакціях організму. Похідна – дегідроаскорбінова кислота (ДАК) здатна відщеплювати атоми водню від альфа-гідрокислот з утворенням альфа-кетокислот і відновленням ДАК в аскорбінову кислоту (АК):



В свою чергу АК віддає атоми водню на кисень, окислюючись в ДАК.



Акцептором і переносником атомів водню поряд з АК може виступати монодегідроаскорбінова кислота.

АК бере участь в процесах гідроксилювання, а саме, в присутності солей Fe^{2+} і Fe^{3+} каталізує перетворення ароматичних сполук в феноли.

АК є необхідною для нормального протікання процесу гідроксилювання проліну і його перетворення в гідроксипролін. У зв'язку з цим до типових

симптомів недостатності вітаміну С відносяться порушення утворення колагену і зміни його вмісту в сполучній тканині.

Добова потреба людини в вітаміні С складає 50-75 мг.

Метод кількісного визначення вітаміну С за методом Тільманса ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окислюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом (2,6-ДХФІФ) до дегідроаскорбінової кислоти. За кількістю 2,6-ДХФІФ, витраченого на титрування, визначають кількість аскорбінової кислоти в матеріалі, що досліджується.

АК + ДХФІФ (окислена форма) – ДАК + ДХФІФ (відновлена форма).

Для успішного виконання даної лабораторної роботи студенти обирають продукт, з якого буде виділений вітамін С, а також вивчають літературні дані щодо вмісту цього вітаміну в різних джерелах:

Рослинні (найбагатші):

А) Фрукти: шипшина (свіжа — до 1000 мг/100 г), чорна смородина, обліпиха, цитрусові (апельсини, лимони), ківі, полуниця, папая.

Б) Овочі: червоний перець, брокколі, брюссельська капуста, цвітна капуста, шпинат, помідори, картопля (вміст незначний, але завдяки споживанню значних об'ємів картоплі в нашому раціоні картопля може вважатися добрим джерелом).

Також джерелом, багатим на вітамін С є хвоя. У ході практичної роботи можна цьому переконатися.

Тваринні продукти містять значно менше аскорбінової кислоти, порівняно з рослинними, незначні кількості даного вітаміну можна знайти в печінці і нирках.

Для отримання релевантних результатів під час виконання даної практичної роботи важливо пам'ятати наступне: вітамін С руйнується при високій температурі, тривалому зберіганні, контакті з повітрям і металом, а також при довготривалому замочуванні. Тому найкраще обирати свіжі, сирі або мінімально оброблені продукти.

Каротиноїди – це велика група пігментів, що мають червоний, жовтий, і помаранчевий кольори. За хімічною будовою це тетратерпени (мають у складі молекули 40 атомів карбону). На відміну від вітаміну С, каротиноїди є ліпофільними (жиророзчинними) сполуками. У живій природі їх синтезують рослини, водорості, гриби та деякі бактерії. У тваринних клітинах відсутня машинерія для синтезу даних сполук, тому єдиним джерелом їхнього надходження є їжа. Щодо ролі в організмі людини, то найвідомішим з каротиноїдів є бета-каротин, який може перетворюватися на вітамін А, тому бета-каротини називають провітамінами А.

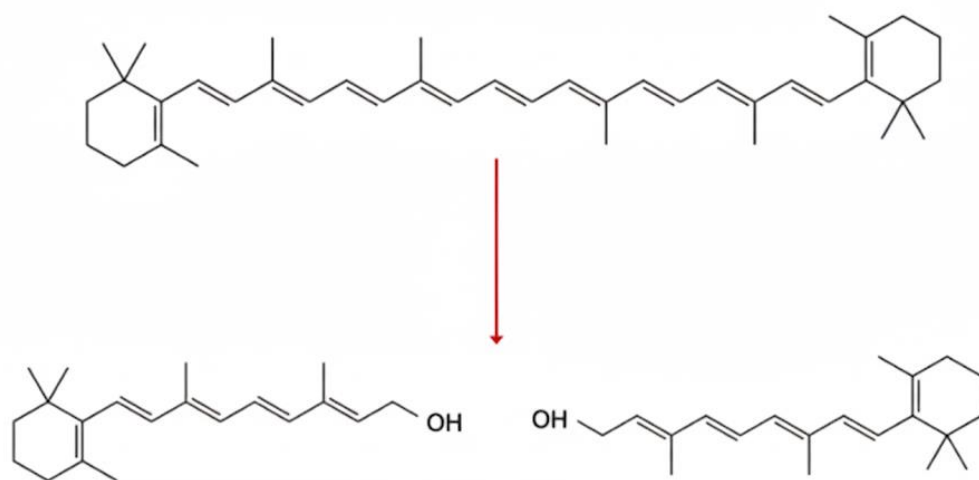


Рис. 5. Схема перетворення бета-каротину на дві молекули вітаміну А.

Існує понад 600 відомих каротиноїдів, але в раціоні людини їх близько 40. Вони поділяються на дві основні групи:

А) Каротини (вуглеводні, містять лише вуглець і водень). До цієї групи належить бета-каротин, лікопін, альфакаротин.

Б) Ксантофіли (вуглеводні, що містять також атоми кисню у своїй структурі). До них належать лютеїн та зеаксантин, атаксантин. Атаксантин – потужний антиоксидант, надає червоного кольору лососевих риб та креветкам через споживання водоростей, що синтезують даний пігмент.

Що стосується біологічної ролі цих молекул, то лише близько 10% каротиноїдів (переважно бета- та альфа-каротин, бета-криптоксантин) можуть

перетворюватися в організмі на ретинол (вітамін А), який критично важливий для зору, імунітету, росту та репродуктивного здоров'я.

Найпопулярнішими джерелами каротиноїдів є:

А) Овочі: морква, солодка картопля, гарбуз, томати (лікопін), червоний перець, шпинат, капуста кале, брокколи (лютеїн).

Б) Фрукти: абрикоси, манго, папая, мандарини, кавун, гуава.

Серед інших джерел можна окремо виділити яєчний жовток (лютеїн, зеаксантин), одноклітинні водорості (хлорелла, спіруліна), червона риба, креветки, криль (астаксантин).

На відміну від аскорбінової кислоти, більшість каротиноїдів відносно стійкі до теплової обробки, але дуже чутливі до окиснення та світла. Також варто відзначити, що для деяких з них термічна обробка підвищує біодоступність.

Протокол практичної роботи №2

Визначення вітаміну С

Матеріали та реактиви:

1. 2%-ий розчин соляної кислоти;
2. Натрієва сіль 2,6-дихлорфеноліндофенолу (0,001 н розчин);
3. Харчові продукти, що містять вітамін С.

Приблизно 1 г досліджуваного харчового продукту розтирають у фарфоровій ступці з кварцевим піском. До розтертої маси додають 9 мл соляної кислоти. Суміш центрифугують 10 хвилин при 3000 об/хв. Супернатант збирають (він повинен бути прозорим).

3 мл супернатанту вносять в конічну колбу та титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 сек. Це свідчить про те, що вся аскорбінова кислота окислена і барвник більше не відновлюється.

Процедуру титрування повторюють 3 рази для отримання достовірних даних.

1 мл 0,0005 М розчину 2,6-хлорфенолінодофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову концентрацію аскорбінової кислоти розраховують за формулою:

$$C = (Q \times A \times V_0) / (V_1 \times a),$$

Де Q – кількість аскорбінової кислоти (0,088 мг), що відновлює 1 мл 0,0005 М розчину 2,6-хлорфенолінодофенолу; A – кількість розчину 2,6-хлорфенолінодофенолу, витраченого на титрування (в мл); V_0 – загальна кількість екстракту (в мл); V_1 – об'єм екстракту, взятий на титрування (в мл); a – кількість харчового продукту (в г).

Визначення каротиноїдів

Реактиви:

1. Петролейний ефір;
2. Стандартний розчин біхромату калію;
3. Харчові продукти, що містять каротини.

Наважку досліджуваного продукту (приблизно 1 г) розтирають в ступці, змішують з петролейним ефіром та проводять екстракцію. Екстракт переносять в мірний посуд для встановлення об'єму.

Отриманий екстракт спектрофотометрують за довжини хвилі 450 нм в 1 см-кюветі проти петролейного ефіру в якості контролю. Паралельно вимірюють екстинцію стандартного розчину біхромату калію проти води в якості контролю.

Приклад розрахунків вмісту суми каротиноїдів:

$$C = (0,00208 \times D_1 \times V) / (D_0 \times a),$$

Де 0,00208 – кількість β -каротину в 1 мл розчину, що відповідає забарвленню стандартного розчину біхромату калію (в мг/мл); V – кількість екстракту (в мл); D_1 – екстинція досліджуваного зразка; D_0 – екстинція стандартного розчину біхромату калію; a – наважка продукту (в г).

Стандартний розчин біхромату – 0,36 г (дуже точна наважка) біхромату калію на 1 л води. Розчин за забарвленням відповідає розчину β -каротину з концентрацією 0,00208 мг/мл.

Питання для підготовки:

1. Хімічні властивості вітаміна С;
2. Біологічна дія вітаміна С;
3. Титрування. Загальні принципи методу;
4. Будова і властивості каротиноїдів;
5. Фотоколориметрія. Загальні принципи методу.

Лабораторна робота №3

**Тема: Кількісне визначення концентрації білків за методом Лоурі.
Побудова калібрувального графіку.**

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Для кількісного визначення білка найбільш широке розповсюдження мають колориметричні та спектрофотометричні методи. В основі всіх колориметричних методів лежить вимірювання інтенсивності кольорових реакцій при взаємодії білків зі специфічним реагентом. Спектрофотометричні методи базуються на здатності ароматичних амінокислот білків поглинати ультрафіолетове світло.

Серед методів кількісного визначення білків, в основі яких лежать кольорові реакції, метод Лоурі є одним з найбільш розповсюджених завдяки своїй високій чутливості. Як і всі аналогічні методи, він дає абсолютні значення лише в тому випадку, коли калібрувальний графік побудовано з використанням того ж білку, визначення якого проводять а цією реакцією.

В основі методу Лоурі лежить реакція (взаємодія) тирозинових та цистеїнових радикалів білкової молекули з реактивом Фоліна-Чокальтеу (Folin–Chocalteu), в результаті якої утворюється комплексна сполука синього кольору. Під час реакції відбувається відновлення суміші фосфорновольфрамової та фосфорномолібденової кислот, що входять до складу реактиву Фоліна-Чокальтеу. Дана реакція відновлення ініціюється комплексними сполуками міді, що утворюються при взаємодії білків з лужним розчином сульфату міді.

Дана реакція не дуже специфічна, але має достатньо високу чутливість, яка дає можливість визначити концентрацію білка навіть в дуже розведених розчинах (10-100 мг білка в пробі).

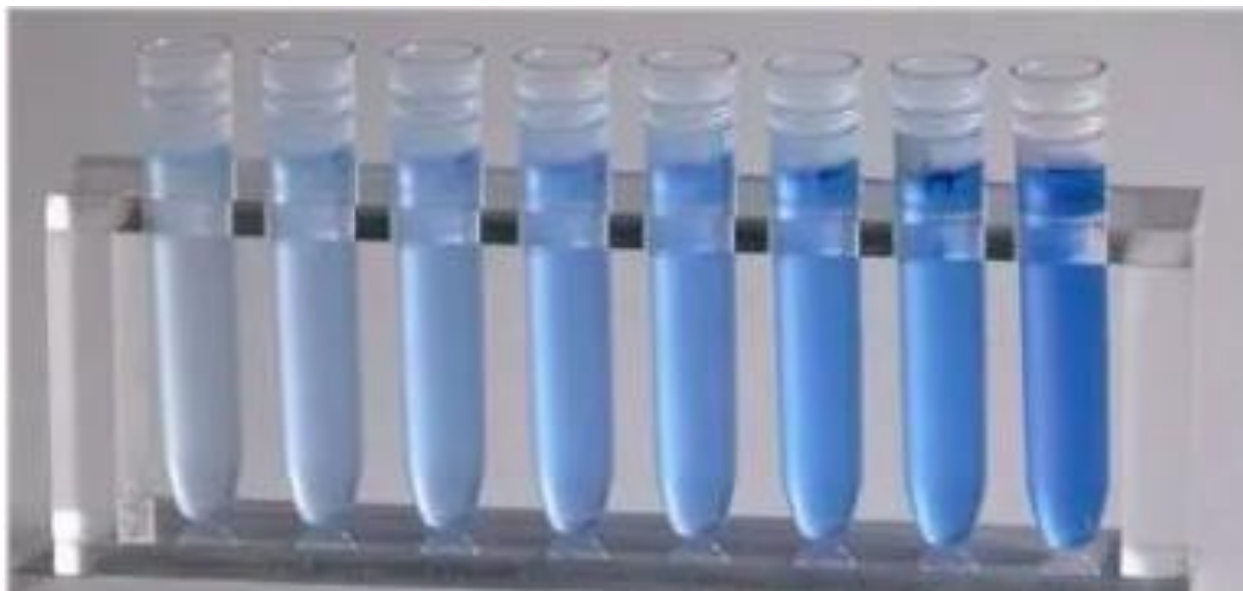


Рис. 6. Приклад фарбування білкових розчинів різних концентрацій за методом Лоурі.

Недоліком цього методу є те, що значна кількість сполук впливає на розвиток забарвлення, наприклад, компоненти буферних систем, відновлюючі реагенти, детергенти, сахароза (10%) та ін. У зв'язку з цим необхідно, щоб при побудові калібрувального графіку розчинник стандартного білку містив ті ж компоненти, що і проби. В деяких випадках, доцільно проводити попереднє осадження білків з розчину трихлороцтовою кислотою з подальшим розчиненням осаду в лужному розчині. Краще за все для калібрувального

графіку використовувати розчин того білка або суміш білків, визначення яких проводять за методом Лоурі.

Для визначення концентрації білка за цим методом необхідно побудувати калібрувальний графік – залежність інтенсивності забарвлення білкового розчину від концентрації білка.

Окрім метода Лоурі є три інші колориметричні методи кількісного визначення білка. Це метод Бредфорда, метод ВСА та біуретовий метод.

В основі методу Бредфорда лежить зв'язуванні білка з барвником Кумасі діамантовий блакитний G-250 у кислому середовищі. Це зв'язування викликає зміну кольору барвника з коричневого на синій, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації білка. Метод дуже швидкий і чутливий, але його точність може залежати від амінокислотного складу конкретного білка чи наявності детергентів у буферах.

Метод ВСА (Bicinchoninic Acid Assay) схожий на метод Лоурі, оскільки починається з біуретової реакції, де пептидні зв'язки відновлюють іони міді. Потім ці відновлені іони реагують зі спеціальним реагентом – біцінхоніновою кислотою, утворюючи стабільний фіолетово-синій комплекс. Він є високочутливим і сумісний з детергентами, але несумісний із відновниками.

І нарешті біуретовий метод – найпростіший метод, заснований виключно на біуретовій реакції. У лужному середовищі пептидні зв'язки білка утворюють фіолетовий комплекс з іонами міді. Його головна перевага в тому, що він найменше залежить від складу амінокислот, але він має доволі низьку чутливість, тому вимагає зразків із високою концентрацією білка.

Протокол практичної роботи №3

Реактиви:

1. Стандартний розчин білка (1 мг/мл)
2. Реактив А (2%-ий розчин Na_2CO_3 в 0,1 М розчині NaOH)

3. Реактив В (0,5%-ий розчин CuSO_4 в 1%-ому розчині натрій-калію виннокислого)
4. Реактив С – перед роботою змішують 50 частин реактиву А з 1 частиною реактиву В.
5. Реактив Фоліна-Чокальтеу. Цей реактив готується заздалегідь. 20 г фосфорновольфрамового натрію та 15 г фосфорномолібденового натрію розчиняють в 140 мл води. Додавають 10 мл 80% фосфорної кислоти на 20 мл концентрованої соляної кислоти. Суміш кип'ятять в колбі зі зворотнім холодильником Лібіха протягом 10 годин. Після цього додавають 30 г сульфату літія, 10 мл дистильованої води, 2-3 краплі бромів і знову кип'ятять без холодильника для видалення залишків бромів. Розчин охолоджують. Його об'єм доводять до 200 мл дистильованою водою і фільтрують. Перед роботою реактив Фоліна розводять, щоб отримати 1н розчин кислоти, тобто приблизно в 2 рази. Для цього кислотність визначають, титруючи розведений в 10 разів реактив 0,1 н лугом в присутності фенолфталеїну.

Методом послідовного розведення готують ряд концентрацій білка, за якими буде будуватись калібрувальний графік. Для цього з основного розчину білка отримують не менше 4-5 розчинів з різними, але точно визначеними концентраціями.

Для кожної концентрації (точки калібрувального графіку) проводять реакцію Лоурі мінімум в трьох повторностях.

Реакція Лоурі. До 0,5 мл білкового розчину додають 2,5 мл реактиву С, перемішують і залишають на 10 хвилин. Потім в такому ж темпі додають 0,25 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу, перемішують і залишають на 30 хвилин для розвитку забарвлення.

Інтенсивність забарвлення вимірюють на спектрофотометрі чи фотоколориметрі при довжині хвилі 750 нм проти контрольної проби, яка містить замість білкового розчину 0,5 мл води.

Використовуючи отримані цифри, будують графік залежності інтенсивності забарвлення (екстинції) від концентрації білка.

Графік будується або на калібрувальному папері або в MS EXCEL.

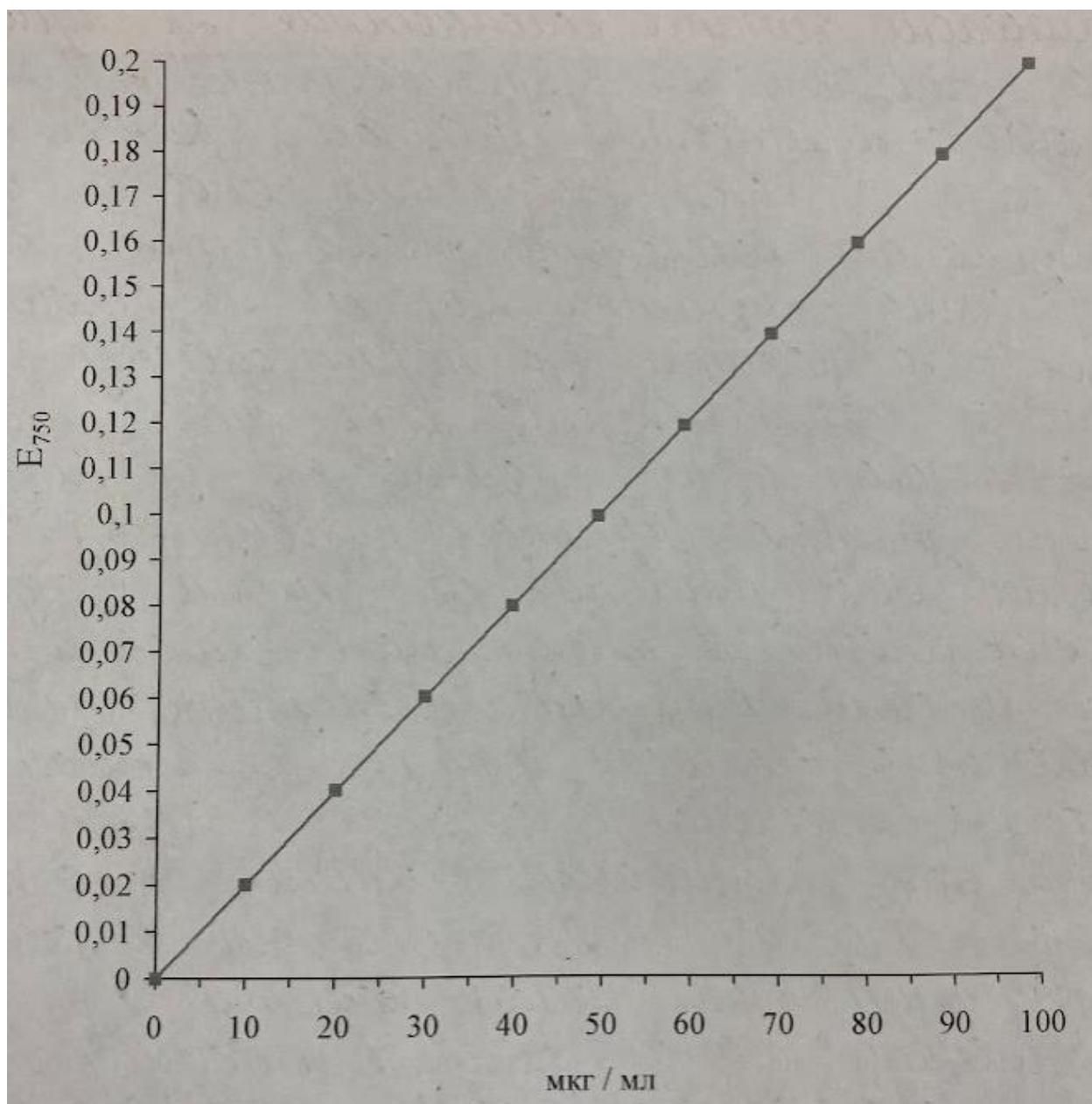


Рис. 6. Зразок калібрувального графіку для визначення концентрації білка за методом Лоурі

Питання для підготовки:

- 1) Фізичні та хімічні властивості білків;
- 2) Денатурація і деструкція білків;
- 3) Принцип методу послідовного розведення;

- 4) Порівняння методів кількісного визначення білків;
- 5) Застосування і призначення калібрувальних графіків.

Лабораторна робота №4
Тема: Кількісне визначення концентрації білку за методом Лоурі в тканині

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Дана лабораторна робота є логічним продовженням лабораторної роботи №3. Напрацювання і результати якої використовуються для виконання мети поточної роботи.

Протокол лабораторної роботи №4

Реактиви обладнання та матеріали:

1. 5% розчин ТХО;
2. 40% розчин NaOH;
3. реактив А (2%-ий розчин Na_2CO_3 в 0,1 М розчині NaOH);
4. реактив В (0,5%-ий розчин CuSO_4 в 1%-ому розчині натрій-калію виннокислого);
5. реактив С – перед роботою змішують 50 частин реактиву А з 1 частиною реактиву В;
6. реактив Фоліна-Чокальтеу;
7. тканина печінки;
8. хімічні пробірки (4 шт.);
9. циліндр (на 25 мл);
10. хімічний стаканчик (на 25 мл);

11. центрифужні пробірки (пластикові та скляні, по 2 шт.);
12. мірні колби;
13. піпетки;
14. центрифуга;
15. водяна баня;
16. спектрофотометр;
17. терези для врівноважування центрифужних пробірок;
18. ступка з пестиком;
19. електронні терези

Для того, щоб визначити кількість білка в тканині, печінку зважують (приблизно 1-1,5 г), подрібнюють і розтирають у ступці з трихлороцтовою кислотою. Отриману суміш переносять в скляну центрифужну пробірку та центрифугують 10 хвилин при 3000 об/хв.

Надосадову рідину зливають, до осаду додають 1-2 мл концентрованого лугу (відповідно до маси тканини), ставлять на водяну баню (100°C) і витримують до повного гідролізу тканини.

Отриманий концентрований гідролізат кількісно переносять в мірну колбу, об'єм якої залежить від кількості взятої для дослідження тканини, доводять водою до мітки, ретельно перемішують і проводять визначення білка за методом Лоурі.

Для визначення кількості білка з отриманого білкового розчину відбирають по 0,5 мл, додають 2,5 мл реактиву С, перемішують і залишають на 10 хвилин. Потім додають 0,25 мл реактиву Фоліна. Через 30 хвилин проби спектрофотометрують при довжині хвилі 750 нм проти контролю.

Концентрацію білка визначають за калібрувальним графіком, а потім проводять розрахунок концентрації білка в грамі тканини.

Питання для підготовки:

- 1) Метод Лоурі, принцип і альтернативи;
- 2) Методи екстракції білків;

З) Фотоколориметрія білкових розчинів

Лабораторна робота №5

Тема: Ферменти та їхні властивості на прикладі амілази слини

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом. При складанні схеми потрібно звернути особливу увагу на порядок виконання дослідів.

Теоретичні відомості

Ферменти – це високоспеціалізовані білкові молекули, які мають каталітичні властивості. Вони входять до складу всіх клітин і тканин живих організмів і каталізують хімічні реакції клітинного обміну.

У порівнянні з хімічними каталізаторами ферменти, по-перше, прискорюють реакції за нормальних умов існування клітини (водне середовище, температура тіла, тиск). По-друге, ферментам властива надзвичайно висока специфічність відносно субстратів та типу реакцій, що каталізуються. Кожен фермент каталізує один тип реакції, але з дуже високою ефективністю, на відміну від хімічних каталізаторів, які діють на широке коло субстратів та прискорюють різні типи реакцій. По-третє, в ферментних реакціях не утворюються побічні продукти та суміші стереоізомерів, а самі біологічні каталізатори не витрачаються.

Амілаза – це фермент, що гідролізує крохмаль та глікоген. Відомо три типи амілаз. Альфа-амілаза гідролізує альфа-1,4-зв'язки в полісахаридах без певного порядку. При цьому утворюються декстрини, що є порівняно низькомолекулярними сполуками. Альфа-амілаза міститься в слині, виділяється підшлунковою залозою.

Бета-амілаза – фермент рослинного походження, що гідролізує альфа-1,4-глікозидні зв'язки в полісахаридах, послідовно відщеплюючи залишки мальтози від нередукуючого кінця ланцюга.

Гамма-амілаза (глюкоамілаза) послідовного відщеплює залишки глюкози від нередукуючого кінця.

Характерною особливістю альфа-амілази є наявність міцно зв'язаного кальцію, роль якого полягає в стабілізації вторинної і третинної структури молекули.

На швидкість протікання ферментативної реакції (на рівень ферментативної активності) мають вплив ряд факторів:

- рН
- Температура
- Наявність активаторів чи інгібіторів

Вплив температури на рівень ферментативної активності

Для кожної ферментативної реакції існує оптимальне значення температури, при якому реакція протікає якнайшвидше. Відхилення від цього значення у будь-який бік веде до зниження швидкості реакції.

Вплив температури на швидкість ферментативної реакції завжди має місце і пояснюється змінами стабільності структури ферменту, спорідненості ферменту до субстрату, швидкості дисоціації фермент-субстратного комплексу, спорідненості ферменту до активаторів і інгібіторів. Так, наприклад, при зниженні температури підвищується стабільність ферменту, але зменшується ферментативна активність. Підвищення температури вище певного (оптимального) значення може призвести до теплової інактивації білкової молекули ферменту, а більшість ферментів швидко і незворотно денатурують вже при температурі 60-70° С.

Бета-амілаза є менш термостабільною за альфа-амілазу.

Вплив рН на активність ферментів

Більшість ферментів характерним чином змінює свою активність в залежності від рН. Оптимальній активності відповідає певна область рН, причому, як і у випадку з температурним впливом, зменшення або збільшення рН викликає зниження активності ферменту. Для різних реакцій значення

оптимуму рН коливається в широких межах (від сильного кислого до сильно лужного середовища).

Залежність ферментативної активності від рН пояснюється іонізацією функціональних груп білкової молекули, особливо тих, що знаходяться в активному центрі або поблизу нього, а також тих, що відповідають за зміну конформації ферменту.

Альфа- і бета-амілази відрізняються своїми властивостями щодо рН середовища: бета-амілаза може працювати при більш кислому рН.

Вплив активаторів та інгібіторів

Активатори – це сполуки, що підвищують активність ферментів або переводять ферменти в активний стан.

Деякі ферменти, наприклад, пепсин, трипсин, хімотрипсин, синтезуються в неактивній формі у вигляді проферментів (зимогенів) і лише після активації переходять в активний стан. Механізм даної активації полягає в розщепленні певних пептидних зв'язків молекули проферменту і відщеплення від таких молекул пептидів різного розміру. При цьому змінюється просторова конформація ферменту, що сприяє утворенню активного центру.

Протокол практичної роботи №5

Реактиви:

1. 1%-ий розчин крохмалю
2. 0,3%-ий розчин йоду в 3%-ому розчині йодиду калію
3. К-фосфатний буфер з різними значеннями рН (6.0; 7.2; 8.0)
4. 1%-ий розчин хлориду натрію
5. 1%-ий розчин сульфату натрію
6. 1%-ий розчин сульфату міді
7. 1%-ий розчин хлориду міді

Дослідження впливу температури на активність амілази слини

В чотири пронумеровані пробірки наливають по 2 мл 1%-ого розчину крохмалю. Пробірку №1 вміщують в термостат за температури 37⁰С. Пробірку №2 залишають при кімнатній температурі або вміщують в термостат (якщо в кімнаті холодно) за температури 20⁰С. Пробірку №3 вміщують в льодяну баню – 0⁰С. Пробірку №4 вміщують в киплячу водяну баню (100⁰С).

Через 5-10 хвилин, коли вміст пробірок набуде заданої температури, в усі пробірки додають по 2 мл **оптимально розведеної** слини відповідно до активності амілази. Перемішують та залишають їх за тих же умов.

Спостереження за ходом гідролізу крохмалю ведуть за реакцією з йодом. Для цього на скляну пластинку наносять 1-2 краплини йоду та змішують їх з краплинами суміші, яку беруть з кожної пробірки через 2, 5, 8 та 10 хвилин від початку ферментативної реакції. За зміною забарвлення розчину крохмалю з йодом судять про ступінь гідролізу у кожній пробірці.

Через 10 хвилин усі пробірки виймають, охолоджують за потреби та додають в кожную по 3 краплі розчину йоду.

Результати спостереження заносять в таблицю.

Номер пробірки	Температура в пробірці	Реакція з йодом			
		2 хв.	5 хв.	8 хв.	10 хв.
1	37 ⁰ С				
2	20 ⁰ С				
3	0 ⁰ С				
4	100 ⁰ С				

Дослідження впливу рН на активність амілази

У три пробірки наливають по 5 мл буферного розчину з різними рН (6.0, 7.2, 8.0). Пробірки ставлять на 5-10 хвилин в термостат за оптимальної для даного ферменту температури. Потім в кожную пробірку наливають по 1 мл розчину крохмалю та по 1мл **оптимально розведеної** слини відповідно до активності амілази. Вміст пробірок ретельно перемішують і ставлять в

термостат за тієї ж температури. Через 10 хвилин проводять реакцію на ступінь гідролізу. Якщо спостерігається різниця в забарвленні між трьома пробірками, то пробірки виймають з термостату і в кожен додають по 3 краплі розчину йоду.

Дослідження впливу активаторів та інгібіторів на активність амілази.

Готують 5 пробірок. В пробірку №1 наливають 1 мл дистильованої води; в пробірку №2 – 0.5 мл води та 0.5 мл хлориду натрію; в пробірку №3 – 0.5 мл води та сульфату натрію; в пробірку №4 – 0,5 мл води та 0,5 мл сульфату міді; в пробірку №5 – 0.5 мл води та 0.5 мл хлориду міді. Вміст пробірок ретельно перемішують і ставлять в термостат за оптимальної для ферменту температури на 5-10 хвилин.

Потім в усі пробірки додають по 1 мл крохмалю та по 1 мл **оптимально розведеної** слини відповідно до активності амілази і знову ставлять в термостат на 10 хвилин.

Через 10 хвилин в сі пробірки додають по 3 краплі розчину йоду.

Визначення активності амілази слини (за методом Вольгемута)

У 10 пробірок наливають по 1 мл дистильованої води. У першу пробірку додають 1 мл розведеної в 10 разів слини, перемішують і 1 мл суміші переносять в другу пробірку. Вміст другої пробірки перемішують, 1 мл суміші переносять в третю пробірку, і так – до десятої пробірки. З останньої (десятої) пробірки відбирають 1 мл суміші та виливають.

Таким чином, в кожній наступній пробірці вміст ферменту вдвічі менший, ніж у кожній попередній. Розведення слини в пробірках становить 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120.

Далі в усі пробірки наливають по 2 мл розчину крохмалю, перемішують та ставлять в термостат за температури 37⁰С на 30 хвилин.

Після інкубації пробірки охолоджують в льодяній бані для припинення дії ферменту, додають по 2 краплини розчину йоду, перемішують та спостерігають різницю в забарвленні.

Відмічають, при якому розведенні відбувся повний гідроліз крохмалю, тобто знаходять пробірку з жовтим забарвленням, після якої знаходяться пробірки з червоно-фіолетовим забарвленням (неповний гідроліз).

Якщо, наприклад, знайдена межа знаходиться між пробірками 3 та 4 (тобто пробірка 3 має жовте забарвлення, а пробірка 4 – червоне), то величину розведення (80) множимо на 2 (кількість мл розчину крохмалю). Отримуємо амілазне число для даного розчину – 160, тобто під впливом 1 мл нерозведеного розчину слини відбудеться повне розщеплення 160 мл 1%-ого розчину крохмалю.

Питання для підготовки:

1. Залежність активності ферментів від температури та рН;
2. Активатори та інгібітори активності ферментів;
3. Специфічність ферментів;
4. Характеристика амілази

Лабораторна робота №6 **Тема: Хімія вуглеводів**

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Вуглеводи – це сполуки, що мають загальну формулу $(\text{CH}_2\text{O})_n$. В організмі вони виконують функції:

- Енергетичну (вуглеводи є джерелом енергії для клітинних реакцій);

- Запасаючу (у вигляді запасуються поживні речовини в багатьох організмах);
- Структурну (вуглеводи є структурними елементами у формуванні мембран і клітинних стінок);
- Захисну (завдяки антигенним, захисним властивостям вуглеводи здатні брати участь у імунній відповіді);
- Сигнальну (беруть участь в розпізнаванні та рецепції молекул та клітин);

Вуглеводи поділяються на прості (моносахариди), складні (ди-, оліго- та полісахариди), котрі гідролізуються з утворенням простих вуглеводів або моносахаридів та похідних вуглеводів.

У залежності від кількості вуглецевих атомів в ланцюгу вуглеводи поділяються на триози, тетрози, пентози гексози і т.д. Частіше за все в природі зустрічаються пентози і гексози.

Прості вуглеводи (моносахариди) мають нерозгалужений ланцюг вуглецевих атомів, зв'язаних з гідроксильними групами, за виключенням одного С-атому, який утворює карбонільну групу. Якщо ця група знаходиться в кінці ланцюга, то моносахарид являє собою альдегід і носить назву альдоза (наприклад, глюкоза). При будь-якому іншому положенні карбонільної групи моносахарид є кетоном і називається кетозою (наприклад, фруктоза).

Хімічні властивості вуглеводів

Для вуглеводів характерні всі типові реакції на карбонільну групу та спиртову групу. Моносахариди здатні відновлювати такі сполуки, як фериціанід, перекис водню, іони міді Cu^{2+} тощо. При цьому карбонільна група окислюється з утворенням альдонових кислот. Такі вуглеводи називаються відновлюючими або редукуючими (від англ. reduction – відновлення).

Карбонільна група вуглеводів здатна вступати в реакції зі спиртами, карбоновими кислотами, фенолами з утворенням О-глікозидів.

Гідроксильні групи моносахаридів можуть ацетилюватися та метилюватися. Також вони можуть вступати в реакцію з утворенням ефірів. Найважливішими є ефіри фосфорної кислоти.

При заміщенні гідроксильної групи при С₂-атомі на аміногрупу утворюється N-глікозиди.

Відомо, що карбонільній групі властива висока реакційна здатність, і якщо С-ланцюг є достатньої довжини, карбонільна група може реагувати з однією з гідроксильних груп тієї ж молекули, з утворенням циклічної сполуки – внутрішнього циклічного напівацеталю.

Моносахариди стійки до дії розбавлених неорганічних кислот, що дає можливість виділити їх після гідролізу полісахаридів.

У концентрованих кислотах сахариди піддаються дегідратації з утворенням фурфуролів, які в свою чергу вступають в реакцію конденсації з фенолами, утворюючи забарвлений продукт, що використовується для визначення вуглеводів.

При дії розбавлених основ (лугів) при кімнатній температурі відбувається перегрупування атомів водню відносно анамерного та сусіднього з ним атомів вуглецю.

При взаємодії напівацетального гідроксилу моносахариду зі спиртовою групою іншого моносахариду утворюється глікозидний зв'язок, який зв'язує два або більше залишки моносахаридів з утворенням дисахариду або полісахариду. Цей зв'язок дуже міцний, гідролізується лише при кип'ятінні з кислотою. У тому випадку, коли в утворенні глікозидного зв'язку беруть участь напівацетальні гідроксильні групи обох моносахаридів, дисахарид не має в своїй структурі вільного глікозидного гідроксилу. Такі вуглеводи не мають відновлюючих властивостей і називаються нередукуючими або невідновлюючими (наприклад, сахароза).

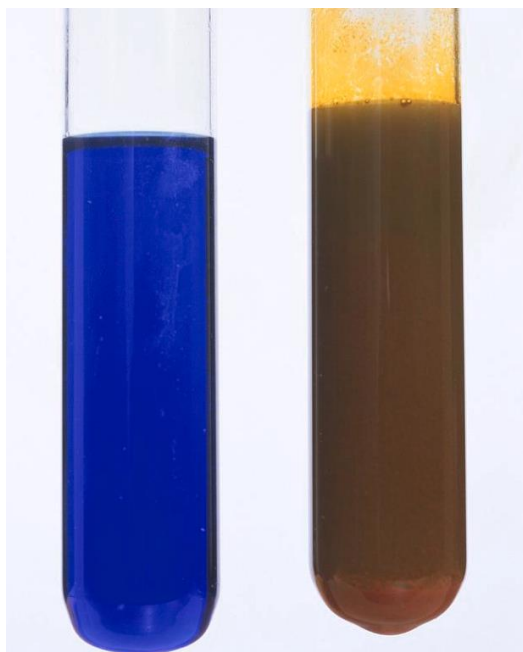


Рис.7. Реакція за участі реактиву Фелінга з невідновлюючими (ліворуч) і відновлюючими (праворуч) вуглеводами.

Протокол практичної роботи №6

Реактиви:

1. 5% розчин глюкози
2. 5% розчин фруктози
3. 5% розчин трегалози
4. 5% розчин сахарози
5. Реактив Фелінга (Реактив Фелінга складається з розчинів сірчаноокислої міді, сенетової солі та їдкого натрію)
6. Кристалічний резорцин
7. 25% розчин соляної кислоти

Якісне визначення глюкози

У пробірки внести по 1 мл досліджуваних розчинів та по 1 мл реактиву Фелінга. Суміш перемішати та нагріти на киплячій водяній бані.

Якісне визначення фруктози (реакція Селіванова)

У пробірки налити по 5 мл досліджуваних розчинів, по 1 мл розчину соляної кислоти та додати декілька кристаликів резорцину. Суміш нагріти на водяній бані (за температури 80⁰) протягом 8 хвилин.

Якісне визначення сахарози

У пробірки налити по 5 мл досліджуваних розчинів та додати по 0,5 мл соляної кислоти. Суміш перемішати та нагріти на киплячій водяній бані (100⁰С) протягом 10 хвилин. Після цього проби охолодити. Вміст кожної пробірки розділити на дві пробірки. В одній пробірці провести якісну реакцію на глюкозу (з реактивом Фелінга), а в другій – якісну реакцію на фруктозу (за методом Селіванова).

Для виконання даної роботи пропонуються непозначені розчини вуглеводів (глюкоза, фруктоза, трегалоза, сахароза). Задача студентів – за допомогою запропонованих методів та знань щодо хімічних властивостей вуглеводів визначити, в якій пляшечці – яка речовина.

У висновку на підставі проведених дослідів теоретично обґрунтувати зроблений вибір та поміркувати чи можна вважати запропоновані реакції – якісними.

Питання для підготовки:

- 1) Хімічні властивості моносахаридів;
- 2) Хімічні властивості дисахаридів;
- 3) Реакції на визначення моно- і дисахаридів.

Лабораторна робота №7

Тема: Виділення глікогену з біологічного матеріалу

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Глікоген є гомополімером α -глюкози, залишки якої з'єднані між собою ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-глікозидними зв'язками. Кожні 8—10 мономерних залишків відбувається галуження, бічні гілки приєднані ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-зв'язками. Молекула глікогену більш компактна і розгалужена, ніж крохмалю. Всі розгалуження глікогену мають нередукуючі кінці. Коли відбувається гідроліз глікоген з метою використання його як джерела енергії, залишки глюкози по одному відщеплюються від нередукуючих кінців. Найбільш стабільною є конформація молекули із ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-зв'язками. Вона являє собою щільну спіраль із шістьма залишками глюкози на оберт. Глікоген є формою запасання енергії (глюкози) у тварин, грибів, деяких бактерій та архей.

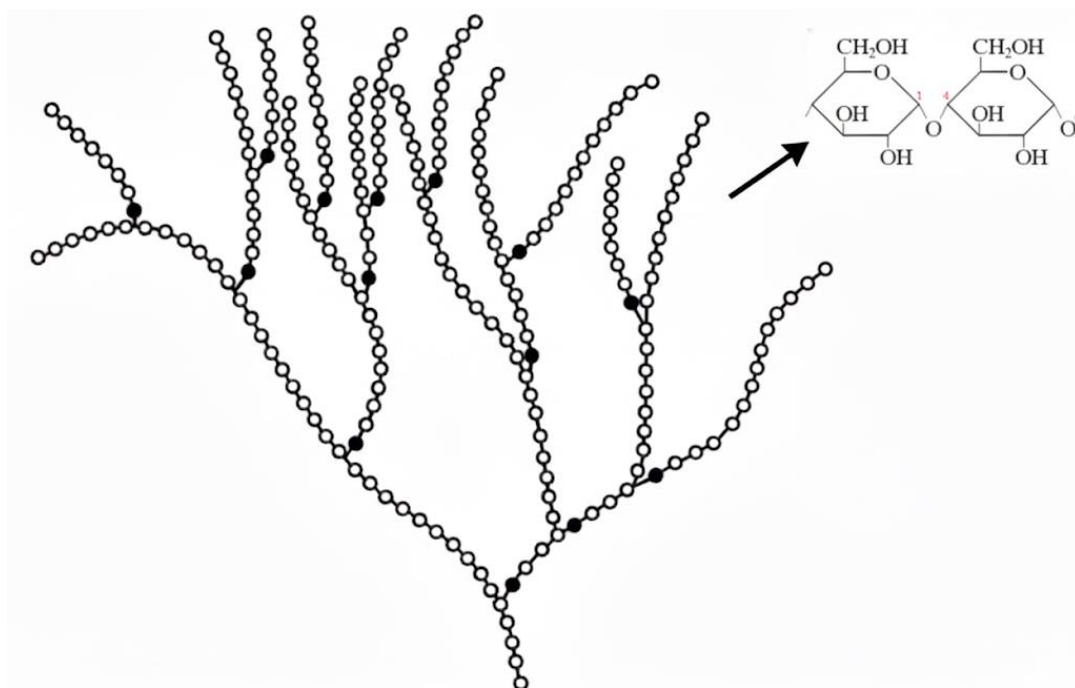


Рис. 8. Схематичне зображення молекули глікогену: мономери глюкози основного ланцюга поєднані $\alpha 1 \rightarrow 4$ -глікозидними зв'язками.

Хімічна стійкість глікогену визначається особливостями його будови як розгалуженого полісахариду. Прикметною є його висока стійкість до концентрованих лугів. Глікоген витримує тривале кип'ятіння в 30% розчині гідроксиду калію, тоді як білки та нуклеїнові кислоти в таких умовах повністю

руйнуються. Цю властивість використовують для виділення чистого глікогену з печінки або м'язів: тканину розчиняють у гарячому лузі, а неушкоджений глікоген потім осаджують.

До дії кислот глікоген є набагато менш стійким. При нагріванні з мінеральними кислотами, такими як соляна або сірчана, відбувається розрив зв'язків між молекулами глюкози. Цей процес називається кислотним гідролізом. Спочатку довгі ланцюги розпадаються на менші фрагменти – декстрини, потім на дисахарид мальтозу, і кінцевим продуктом є вільна глюкоза.

Логічним є те, що ферментативна стійкість глікогену низька, оскільки його природна функція – бути джерелом енергії. Специфічні ферменти, амілази, легко розщеплюють його в травному тракті (процес розщеплення починається ще в ротовій порожнині), а при внутрішньоклітинному метаболізмі ферменти швидко перетворюють його або на вільну глюкозу (печінковий глікоген) для забезпечення потреб головного мозку або на глюкозо-6-фосфат (м'язовий глікоген), коли організму потрібна енергія для забезпечення м'язової активності.

Щодо фізичних властивостей, глікоген є гідрофільною молекулою. Однак через величезний розмір молекул він не утворює істинного розчину, а формує опалесцюючий (каламутний) колоїдний розчин, який можна спостерігати в пробірці на одному з етапів лабораторної роботи. При цьому він зовсім не розчиняється у спирті та ефірі. Якщо до водного розчину глікогену додати етанол, він зневоднюється і випадає в білий пластівчастий осад.

Таким чином більшість відомих лабораторних методів екстракції глікогену з біологічної тканини ґрунтується на тому, що цільова тканина розщеплюється гарячим лугом, гарячою кислотою або холодною кислотою. Потім глікоген екстрагують із супернатанту тканинного гомогенату етанолом. Глікоген лабільний у гарячій кислоті і піддається гідролізу, тому його не можна екстрагувати етанолом при обробці гарячою кислотою. У подальшому,

глікоген можна гідролізувати до глюкози та виміряти за допомогою хімічних або ферментативних методів.

Протокол практичної роботи №7

Реактиви:

1. Трихлороцтова кислота, 5%-ний розчин.
2. Етиловий спирт, 96%-ний.

Виділення глікогену з печінки включає:

1. осадження білків та екстракція глікогену 5%-ним розчином трихлороцтової кислоти;
2. осадження глікогену етиловим спиртом;
3. очищення глікогену розбавленим спиртом.

Печінку (приблизно 2 г) старанно розтирають в ступці з півторакратним по відношенню до ваги тканини об'ємом 5%-ного розчину холодної (0°C) трихлороцтової кислоти і невеликою кількістю скляного піску (для більш повного руйнування клітин).

Отриманий гомогенат центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину (супернатант) зливають в скляну мірну пробірку. Осад ще раз розтирають з півторакратним об'ємом ТХО і процедуру центрифугування повторюють ще раз. Другу порцію супернатанту додають до першої, заміряють сумарний об'єм.

Якщо вміст глікогену в печінці досить великий, то супернатант являє собою рідину молочного кольору. Якщо глікогену мало, то супернатант являє собою опалесцючий розчин.

До супернатанту доливають рівний об'єм 96%-ного етанолу. Старанно перемішують і спостерігають утворення осаду глікогену.

Для осадження глікогену розчин центрифугують при 5000 об/хв 15 хвилин.

Після цього супернатант зливають, а осад глікогену гомогенізують в 2 об'ємах води (по відношенню до кількості взятої для дослідження тканини), доливають такий же об'єм спирту, перемішують і центрифугують при 5000 об/хв 15 хвилин. Цю процедуру проводять двічі.

Осад глікогену суспендують в мінімальній кількості спирту (не більше 1 мл) і вишують в ексікаторі над свіжепросушеним силікагелем або в сушильній шафі при 80° С.

Для того, щоб визначити концентрацію глікогену у тканині печінки, висушений глікоген необхідно зважити на аналітичних вагах та провести необхідні розрахунки.

Проаналізуйте, чи відповідає визначена Вами концентрація наведеним в літературі даним. Якщо ні, які можливі причини такої невідповідності?

Питання для підготовки:

- 1) Хімічні та фізичні властивості глікогену;
- 2) Альтернативні методи екстракції глікогену;
- 3) Правила роботи з аналітичними вагами;
- 4) Вміст глікогену в біологічних тканинах.

Лабораторна робота №8 **Тема: Визначення фруктозо-1,6-бісфосфату**

Мета, завдання та схема роботи формулюються і оформлюються самостійно студентами в довільній формі згідно з протоколом.

Теоретичні відомості

Фруктозо-1,6-бісфосфат (Ф-1,6-БФ) є ключовою молекулою в метаболізмі всіх кожної клітини. Це не кінцевий продукт, а важливий проміжний метаболіт у процесах розпаду глюкози для отримання енергії. Відповідно Ф-1,6-БФ є ключовою ланкою саме в гліколізі. Ф-1,6-БФ синтезується з фруктозо-6-фосфату під дією ферменту фосфофруктокінази-1. Ця реакція вимагає витрати АТФ і є основним регуляторним кроком усього гліколізу. Дана реакція майже незворотна і визначає швидкість всього

процесу. У подальшому Ф-1,6-БФ розщеплюється ферментом альдолазою на дві тріози: гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксіацетонфосфат, він же гліцеролфосфат. Ці дві молекули далі легко ізомеризуються і продовжують шлях гліколізу, генеруючи АТФ.

Також фруктозо-1,6-бісфосфат є важливою регуляторною молекулою. Ф-1,6-БФ активує фосфоглюкокіназу, ключовий фермент гліколізу, але інгібує фруктозо-1,6-бісфосфатазу, ключовий фермент глюконеогенезу.

Існують різні способи визначення цієї молекули. Наприклад, ферментативний метод. Він є високоспецифічним, оскільки він передбачає використання специфічних до субстрату ферментів. Даний метод поєднує фотометричне дослідження з використанням ферменту альдолази. У його основі лежить принцип зчеплених ферментативних реакцій (coupled enzyme assay), де зміна концентрації ФБФ пов'язана зі зміною концентрації НАДН: ФБФ розщеплюється ферментом альдолазою на два тріозофосфати, які потім послідовно перетворюються, що призводить до використання НАДН і зменшення його кількості в середовищі, що досліджується. Таку зміну кількості можна прослідкувати спектрофотометрично: НАДН активно поглинає світло при довжині хвилі 340 нм, тоді НАД не поглинає. Таким чином, швидкість зменшення поглинання при 340 нм прямо пропорційна вихідній концентрації ФБФ. Цей метод є дуже точним і чутливим.

Також можна використовувати хроматографічні та мас-спектрометричні методи. Особливо доцільно це робити, коли потрібен аналіз ФБФ у дуже складних біологічних сумішах (наприклад, у зразках тканин або клітинних екстрактах). Вони забезпечують високу роздільну здатність та специфічність. Зразок спочатку розділяється за допомогою високопродуктивної рідинної хроматографії, відокремлюючи ФБФ від інших метаболітів та фосфатних сполук. Потім чиста сполука ідентифікується та кількісно вимірюється за допомогою тандемної мас-спектрометрії, яка забезпечує високу чутливість і точність, навіть за дуже низьких концентрацій.

Недоліком таких методів є їхня висока вартість і складність виконання. А запропонований нижче метод визначення ФБФ хоча і є менш точним, проте є простішим і менш вартісним.

Протокол практичної роботи №8

Реактиви:

1. Резорцин - 0,1%-ий розчин на 95%-ому спирті.
2. Соляна кислота - 15%-ий розчин.
3. Фруктоза – стандартний розчин, що містить в 1 мл 1 мкмоль фруктози.

До 1 мл досліджуваного розчину, що не містить білку, додають 1 мл розчину резорцину та 3 мл розчину HCl. Все ретельно перемішують і вміщують проби у водяний термостат при 80⁰C на 8 хв. Одночасно в тих же умовах проводять дослідження з різними кількостями стандартного розчину фруктози для побудови калібрувального графіку. Необхідно слідкувати за рівномірним прогріванням проб у термостаті, тому що нерівномірне прогрівання є одним з джерел похибки визначення. Проби виймають з термостату, охолоджують в холодній воді і фотометрують при 490 нм.

Забарвлення, що утворюється з фруктозофосфатом, менш інтенсивне і складає 52% від забарвлення вільної фруктози. Тому для того, щоб визначити кількість фруктозо-1,6-дифосфату, кількість фруктози за калібрувальним графіком множать на коефіцієнт 1,9 ($100:52,5=1,9$).

Для виконання даної лабораторної необхідно дуже ретельно спланувати виконання роботи, тобто скласти детальну схему досліду.

Крім того, необхідно продумати та скласти список необхідного для виконання роботи посуду та обладнання.

Питання для підготовки:

- 1) Гліколіз, послідовність реакцій;
- 2) Калібрувальні графіки, побудова і використання;
- 3) Метод послідовного розведення;
- 4) Фотометрія забарвлених розчинів.

Список літератури:

1. Біологічна хімія: підручник. / Ф.Ф. Боєчко – Київ: Вища школа, 1995. – 536 с.
2. Біологічна хімія: підручник. / Ю.І.Губський, І.В.Ніженковська, М.М.Корда [та ін.] – Вінниця: Нова книга, 2021. – 648 с.
3. Основи біохімії за Ленінджером / Дейвід Л. Нельсон, Майкл М. Коке ; [пер. з англ. О. Матишевська та ін. ; наук. ред. пер. С. Комісаренка та ін. ; ред. М. Мартиняк]. Львів : БаК, 2015. – 1280 с.
4. The molecules of life: physical and chemical principles / J. Kuriyan, B. Konforti, D. Wemmer. . Garland Science, New York, 2014, 1008 p.
5. Harper`s Illustrated Biochemistry / Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kenelly P.J., Weil P.A. – 31st ed. –USA: The Mc-Graw-Hill Companies Inc.- 2018/ - 800 p.
6. Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry. 7th edition. D.R.Ferrier; Wolters Kluwer, 2017. 565 p.
7. Satyanarayana U., Chakrapani U. Biochemistry. Fifth edition, N.Delhy: Elsevier, copublished with Book and Allied, 2017. 788 p.