О. Б. Мехед, Б. В. Яковенко, О. П. Третяк

Біоорганічна хімія

Навчальний посібник
для студентів хімічних та біологічних
спеціальностей
вищих педагогічних навчальних закладів

Чернігів
2013

УДК 577(075.8)
ББК 28.072я73
М 55

Рекомендовано Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів (Лист № 1/11-4526 від 27.02.2013)

Рецензенти:

М. В. Повстяний – доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри органічного та біохімічного синтезу Херсонського національного технічного університету

О. Б. Столяр – доктор біологічних наук, професор кафедри хімії Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка

І. М. Курмакова – кандидат хімічних наук, доцент, завідувач кафедри хімії Чернігівського національного педагогічного університету імені Т. Г. Шевченка

Мехед О. Б., Яковенко Б. В., Третяк О. П.

М 55 **Біоорганічна хімія:** Навчальний посібник. – Чернігів: Чернігівський національний педагогічний університет імені Т. Г. Шевченка, 2013. – 208 с.

ISBN 978–611–507–012–1 ББК 28.072я73
УДК 577(075.8)

Пропонований навчальний посібник містить стисло викладений теоретичний матеріал та лабораторно-практичні роботи. Останні включають мету і завдання роботи, перелік знань і умінь, які повинні отримати студенти в процесі підготовки та виконання лабораторної роботи, теоретичні викладки, необхідні для виконання експерименту, принцип методу, за яким проводиться дослідження, хід роботи та розрахунки.

Рекомендовано до друку на засіданні
вченої ради Чернігівського національного педагогічного
університету імені Т. Г. Шевченка
(протокол № 2 від 06.10.2010 р.)

ISBN 978–611–507–012–1 © Мехед О.Б., Яковенко Б.В., Третяк, О.П., 2013

ЗМІСТ

Вступ 4

Хімічний склад живого.
Методи дослідження в біоорганічній хімії 5

Білки 13

Нуклеїнові кислоти 59

Вуглеводи 80

Ліпіди 111

Ферменти, коферменти 134

Низькомолекулярні біорегулятори 152

Гормони 178

Основні терміни та поняття 191

Додатки 203

Література 206

ВСТУП

Підготовка висококваліфікованих спеціалістів у галузі хімії, біології та екології вимагає ґрунтовних знань про склад та будову основних класів сполук, що входять до складу живої матерії. Тому курс біоорганічної хімії відіграє важливу роль у системі підготовки вчителя хімії та біології, забезпечує інтеграцію знань, одержаних в процесі вивчення базових курсів хімічних та біологічних дисциплін та повинен забезпечити розвиток теоретичного мислення, формування наукового світогляду студентів для всіх освітньо-кваліфікаційних рівнів. Пропонований навчальний посібник містить стисло викладений теоретичний матеріал та лабораторно-практичні роботи. Останні включають мету і завдання роботи, перелік знань і умінь, які повинні отримати студенти в процесі підготовки та виконання лабораторної роботи, теоретичні викладки, необхідні для виконання експерименту, принцип методу, за яким проводиться дослідження, хід роботи та розрахунки.

Більшість лабораторних робіт, представлених у посібнику, відносяться до кількісних досліджень біохімічних процесів, що зумовлює мобілізацію знань та вмінь студентів для одержання числового значення показника. Теоретичний матеріал до лабораторної роботи конкретизує знання студентів з теми, що вивчається. Посібник містить апробовані лабораторні роботи, присвячені вивченню властивостей білків, вітамінів, ферментів, вуглеводів, ліпідів, адаптовані до сучасних вимог організації навчального процесу.

До опрацювання кожної роботи пропонуються завдання для самостійного вивчення студентами теоретичного матеріалу. Контрольні завдання містять як розрахункові задачі, так і різноманітні вправи.

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ЖИВОГО. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ В БІООРГАНІЧНІЙ ХІМІЇ

Біоорганічна хімія – науковий напрям, що склався на стику ряду галузей хімії і біології, розвивається в тісному зв'язку з молекулярною біологією, біохімією і іншими біологічними дисциплінами, які одночасно досліджують ряд найважливіших типів речовин. Об'єктом вивчення біоорганічної хімії є біополімери, перетворення яких складають хімічну суть біологічних процесів, і біорегулятори (*ферменти*, *вітаміни*, гормони, у тому числі і фітогормони, і ін., а також синтетичні біологічно активні сполуки, наприклад лікарські препарати, ростові речовини, пестициди і т.і.). Вивчення хімії живих організмів тісно пов'язане з бурхливим розвитком хімії та біології. Спочатку допоміжна дисципліна, біоорганічна хімія виділилась в самостійну галузь знань, яка є хімічним підґрунтям біологічних наук.

У сучасній біоорганічній хімії застосовуються численні методи дослідження. Зокрема, успішно використовуються сполуки, мічені радіоактивними та важкими природними ізотопами, різноманітні методи хроматографії з використанням електрофорезу та іонообмінних смол. Застосовуються також біологічні методи. Користування ними дозволяє визначити наявність і кількість певних сполук на основі проявів життєдіяльності багатоклітинних тварин, рослин та мікроорганізмів, коли цього не можна визначити хімічним способом.

Елементарний склад живих організмів та його біологічна роль

Хімічний склад організмів, на відміну від об'єктів неживої природи, відносно сталий. З усіх хімічних елементів та їхніх ізотопів у живих організмах виявляють майже 60. Одні з них є обов'язковими в усіх організмах без винятку, інші – лише в окремих. Разом з тим у

живих організмах не виявлено жодного з хімічних елементів, якого б не було в неживій природі. Це одне зі свідчень єдності живої і неживої природи (табл. 1).

Таблиця 1

Найбільш поширені хімічні елементи живих організмів

Основні елементи органічних молекул	*Іони*	*Мікроелементи*
H (Гідроген)	Na^+ (Натрій)	Mn (Манган)
C (Карбон)	Mg^{2+} (Магній)	Fe (Ферум)
N (Нітроген)	Cl^- (Хлор)	Co (Кобальт)
O (Оксиген)	K^+ (Калій)	Cu (Купрум)
P (Фосфор)	Ca^{2+} (Кальцій)	Zn (Цинк)
S (Сульфур)		

Найбільш поширені в живих системах чотири хімічних елементи: Гідроген, Карбон, Оксиген і Нітроген. Їхня частка у хімічному складі клітини становить майже 98 %, вони належать до макроелементів. Їх називають також *органогенними*, оскільки насамперед ці елементи входять до складу органічних сполук.

За масовою часткою хімічні елементи живих організмів поділяють на:

– *макроелементи* (більш ніж 10^{-2} %) – C, H, O, N, S, P, Na, Ca, K, Mg, Fe, Cl, які становлять основну масу органічних і неорганічних сполук живих організмів; концентрація їх коливається від 60 до 0,01 % маси тіла;

– *мікроелементи* (10^{-3} – 10^{-6} %) – B, Co, Cu, Mo, V, Zn, Br та ін., це – переважно іони важких металів, складові компоненти ферментів, гормонів та інших життєво важливих сполук;

– *ультрамікроелементи* – Au, Ra, Hg, Ag, Be та ін., їх концентрація не перевищує 0,000001 %.

Біологічну роль найбільш поширених в живих системах елементів відображено в таблицях 2 – 4.

Вода, її роль у життєдіяльності організмів

Вміст води в клітинах різних організмів неоднаковий. Наприклад, масова частка в тканинах огірків дорівнює 95 %, моркви – 90 %, яблук – 85 %. В організмі людини її вміст коливається залежно від виду тканини: найменшою кількістю характеризуються

жирова тканина і кістки (33 %), в м'язах міститься 77 %, в легенях і нирках – 80 %, в нервовій тканині – 84 %, а в сірій речовині мозку – 85 %.

Таблиця 2

Основні хімічні елементи та їх значення для життєдіяльності організмів

Елемент (символ)	*Вміст у клітині, %*	*Значення*
Оксиген (O)	62 – 75	Входить до складу молекул води, органічних і неорганічних сполук; забезпечує реакції окиснення, в ході яких виділяється необхідна організму енергія
Карбон (C)	15 – 18	Входить до складу органічних і неорганічних сполук, кісток, черепашок
Гідроген (H)	8 – 10	Входить до складу органічних і неорганічних сполук, молекул води
Нітроген (N)	1,5 – 3	Структурний компонент білків, нуклеїнових кислот, АТР та деяких інших біомолекул
Фосфор (P)	0,2 – 1,0	Входить до складу білків, нуклеїнових кислот, АТР та ін.
Калій (K)	0,15 – 0,4	Приймає участь у роботі калієво-натрієвого насосу, передачі нервового імпульсу, впливає на діяльність серця
Сульфур (S)	0,15 – 0,2	Входить до складу білків та інших біомолекул
Хлор (Cl)	0,05 – 0,1	Входить до складу хлоридної кислоти – складової частини шлункового соку
Кальцій (Ca)	0,04 – 2,0	Входить до складу кісток і черепашок, бере участь у регуляції метаболічних процесів, скороченні м'язів, діяльності серця
Магній (Mg)	0,02 – 0,03	Активізує діяльність ферментів, енергетичний обмін і синтез ДНК
Натрій (Na)	0,02 – 0,03	Приймає участь у роботі калієво-натрієвого насосу
Ферум (Fe)	0,01 – 0,015	Входить до складу багатьох біомолекул, зокрема гемоглобіну
Цинк (Zn)	0,0003	Входить до складу деяких гормонів та ферментів, сприяє розщепленню карбонатної кислоти
Йод (I)	0,0001	Входить до складу гормонів щитоподібної залози
Фтор (F)	0,0001	Входить до складу емалі зубів

Таблиця 3

Біологічне значення хімічних елементів

Біологічне значення	*Хімічні елементи*
елементи життя (складають 98-99 % маси живої речовини)	C, H, O, N, S, P
елементи, роль і значення яких для життєдіяльності організму відомі	Na, Ca, K, Mg, Fe, Cl, B, Co, Cu, Mo, V, I, Zn, Br
елементи, роль яких ще не з'ясована, токсичні елементи	Au, Ra, Hg, Ag, Be

Таблиця 4

Хімічні сполуки в організмі

Речовини		*Вміст, %*
Неорганічні:	вода	70 – 80
	мінеральні солі	1 – 1,5
Органічні:	вуглеводи	0,2 – 2
	білки	10 – 20
	ліпіди	1 – 5
	нуклеїнові кислоти	1 – 2
	АТР, вітаміни та інші речовини	0,1 – 0,5

Вода, це особлива речовина в природі, оскільки є універсальним розчинником: в ній розчиняються всі необхідні організму сполуки (органічні і мінеральні речовини, гази). Крім того, завдяки високій теплоємності і одночасно малій теплопровідності вона ідеальна для підтримання теплового балансу організму.

Полярність молекул сприяє стабілізації структури, визначає функціональну активність макромолекул залежно від товщини їх гідратної оболонки.

Вода – джерело кисню, що виділяється при фотосинтезі, є основним середовищем перебігу біохімічних і хімічних реакцій. Вона практично не стискується, отже надає форму органам і підтримує її, створює тургор і забезпечує відповідне положення органів і частин організму. Обумовлює осмотичні явища у живих клітинах. Вода є основним джерелом для переміщення речовин в організмі (кровообіг, висхідний і низхідний потік розчинів у рослин тощо).

Таким чином, значення води у життєдіяльності організмів наступне:

– визначає фізичні властивості клітини (об'єм, пружність і терморегуляцію);
– розчинник для речовин;
– середовище для перебігу хімічних реакцій;
– приймає участь у хімічних реакціях.

Мінеральні солі, їх значення для життєдіяльності організмів

Мінеральні солі – неорганічні речовини, наявність яких обумовлює в клітині стале значення pH та забезпечує її нормальне функціонування.

Мінеральні солі у великій кількості містяться в клітинах, які утворюють опорні органи та тканини – черепашки, хітиновий панцир, кістки. В живих клітинах більша частина солей знаходиться в дисоційованому стані у вигляді катіонів і аніонів – K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, $H_2PO_4^-$ та інших.

Вміст катіонів в клітині має важливе значення для її функціонування. Від концентрації солей залежить постачання води, оскільки клітинна мембрана проникна для молекул води і не проникна для багатьох великих молекул і іонів. Якщо в навколишньому середовищі міститься менша кількість іонів, ніж в цитоплазмі, то відбуваються надходження води в клітину до вирівнювання концентрації солей (*осмос*).

Наявність солей в цитоплазмі визначає її буферні властивості – здатність підтримувати стале значення pH. Від значення pH залежить структура й активність біологічних макромолекул, зокрема, активність ферментів. Так, активність пепсину шлункового соку максимальна за pH 1,5 – 2, каталази крові – pH 7,0. З властивостями води тісно пов’язані властивості кислот і основ. Розрізняють сильні кислоти і основи та слабкі. До сильних кислот відносять хлоридну, сульфатну, нітратну. До сильних основ – натрій гідроксид, калій гідроксид. У водних розчинах сильні кислоти та основи повністю іонізовані.

У біологічних системах також присутні слабкі кислоти і основи. Прикладом слабких кислот можуть бути ацетатна, карбонатна, слабких основ – амоній гідроксид. Суміші слабких кислот або основ і

спряжених з ними солей являють собою системи, що називають *буферними*. Вони мають дуже важливу властивість: при додаванні до такої суміші невеликих кількостей кислоти (H^+), або основи (OH^-), або при розведенні вони здатні підтримувати стале значення pH. Карбонатна система є головною буферною системою плазми крові. Вона являє собою спряжену кислотно-основну пару, яка складається з молекул карбонатної кислоти і гідрокарбонат-іона.

Для живого організму характерна певна ієрархія біологічних молекул (див. схему 1).

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте предмет, мету, завдання та методи біоорганічної хімії.
2. Перелічіть науки, споріднені з біоорганічною хімією.
3. Зазначте етапи розвитку біоорганічної хімії та сформулюйте завдання науки на кожному з них.
4. Аргументуйте необхідність знань з біоорганічної хімії для а) вчителя хімії; б) вчителя біології; в) спеціаліста з природничих дисциплін (хіміка, фізика, географа); в) хіміка-технолога; г) вчителя фізвиховання; д) лікаря; е) будь-якої цивілізованої людини в побуті.
5. Перелічіть методи, що використовуються у біохімічному експерименті для: а) фракціонування субклітинних структур; б) розділення сумішей; в) виділення певних біомолекул; г) з'ясування елементарного складу речовини; д) вивчення мономерного складу біополімерів; е) ідентифікації речовин; є) вивчення просторової структури макромолекул; ж) вивчення шляхів перетворення речовин.

Схема 1

Ієрархія молекулярної організації клітини

Завдання для самостійної роботи

1. Виходячи з електронної будови атомів поясніть, чому саме атоми Карбону утворюють ланцюги, що становлять кістяк біомолекул. Чому цю функцію не можуть виконувати інші атоми: а) Оксигену; б) Нітрогену; в) Гідрогену; г) Силіцію?
2. Назвіть хімічні елементи, які належать до: а) макроелементів; б) мікроелементів; в) ультрамікроелементів. Охарактеризуйте їх роль в побудові біомолекул, функціональні групи або іони, типові для них у складі живого, біологічні процеси, в яких вони беруть участь.
3. Назвіть біомолекули, на функціонуванні яких базується здійснення наступних проявів життєдіяльності: а) ріст; б) розмноження, передача ознак по спадковості; в) рух, скорочення; г) дихання; д) реагування на дію зовнішніх подразників (світло, температура, вологість тощо), пристосування до них; е) енергозабезпечення.

Задачі

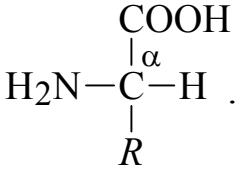
1. Обчисліть кількість атомів Магнію, які містяться в одній рибосомі *E. coli,* якщо на 1 г сухої речовини рибосом припадає 20 мг Магнію. Молекулярна маса 70S *рибосоми E. coli* дорівнює $2{,}65\times10^6$.
2. Масова концентрація глюкози ($C_6H_{12}O_6$) в крові становить 80 – 120 мг/100 см^3, а холестерину ($C_{27}H_{46}O$) – 180 – 260 мг/100 см^3. Обчисліть їх молярну концентрацію в моль/дм^3. Оцініть за хімічним складом здатність цих речовин розчинятись і транспортуватись у крові.

БІЛКИ

Амінокислоти

Органічні сполуки, що містять в молекулі карбоксильну та аміногрупу, називають амінокислотами. Амінокислоти мають надзвичайно велике значення в органічному світі, тому що з них побудовані білки клітини, які виконують ряд важливих функцій в організмі: структурні, каталітичні (ферменти), регуляторні (гормони), транспортні, захисні, запасаючі, скорочувальні, токсини.

Загальні структурні особливості амінокислот. Усі 20 амінокислот (*стандартні*, *основні* або *нормальні*), що зустрічаються у тваринних білках, характеризуються загальною структурною особливістю: наявністю аміногрупи та карбоксильної групи, які з'єднані з одним атомом Карбону, так званим α-Карбоном. Відрізняються вони тільки бічними ланцюгами (*R*-групами)

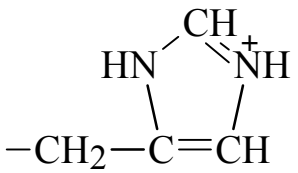


Будова. Амінокислоти, виділені з білків, являють собою похідні насичених карбонових кислот, у яких один або декілька атомів Гідрогену заміщені на аміногрупу. В залежності від положення аміногрупи у вуглеводневому ланцюгу розрізняють α-, β-, γ-амінокислоти і т.і.

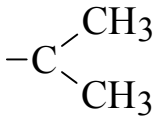
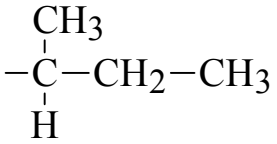
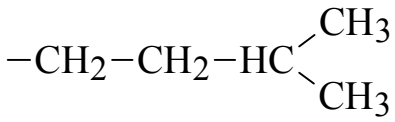
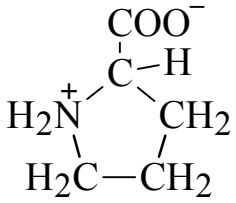
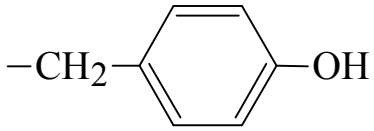
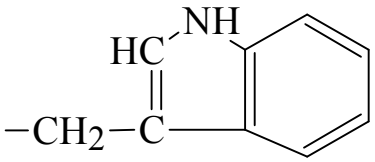
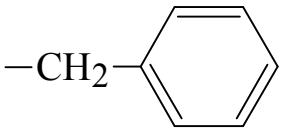
Існує багато тисяч різних тваринних білків, проте вся ця різноманітність досягається відповідним поєднанням усього лише 20 α-амінокислот, які відрізняються одна від одної своїми бічними ланцюгами (радикалами). Всі стандартні амінокислоти за будовою бічного ланцюга поділяються на нейтральну, полярні та неполярні (табл. 5).

Таблиця 5

Бічні ланцюги α-амінокислот, які зазвичай входять до складу білків

Характеристика бічного ланцюга		*Назва амінокислоти*		*Бічний ланцюг*
		повна	*скорочена*	
Нейтральний		Гліцин	*глі*	–H
Полярний	Містять –OH групу	Серин	*сер*	$-CH_2-OH$
		Треонін	*тре*	$-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-CH_3$
	Аміди	Аспарагін	*асн*	$-CH_2-C(=O)-NH_2$
		Глутамін	*глн*	$-CH_2-CH_2-C(=O)-NH_2$
	Негативно заряджені	Аспаргінова кислота	*асп*	$-CH_2-C(=O)-O^-$
		Глутамінова кислота	*глу*	$-CH_2-CH_2-C(=O)-O^-$
	Позитивно заряджені	Аргінін	*арг*	$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=\overset{+}{N}H_2)-NH_2$
		Гістидин	*гіс*	
		Лізин	*ліз*	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$

Продовження таблиці 5

Характеристика бічного ланцюга		*Назва амінокислоти*		*Бічний ланцюг*
		повна	*скорочена*	
Неполярний	Аліфатичні	Аланін	*ала*	$-CH_3$
		Валін	*вал*	
		Ізолейцин	*іле*	
		Лейцин	*лей*	
		Пролін	*про*	
	Ароматичні	Тирозин	*тир*	
		Триптофан	*три*	
		Фенілаланін	*фен*	
	Сульфурвмісні	Метіонін	*мет*	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
		Цистеїн	*цис*	$-CH_2-SH$

Номенклатура, ізомерія. Амінокислоти називають звичайно як похідні відповідних карбонових кислот, позначаючи положення аміногрупи буквами грецького алфавіту. Застосовується також систематична номенклатура, а для найпростіших – емпіричні назви:

CH_2NH_2–COOH – амінооцтова кислота, аміноетанова кислота, глікокол, гліцин; CH_3–$CHNH_2$–COOH – α-амінопропіонова кислота, 2-амінопропіонова кислота, аланін.

Ізомерія амінокислот аналогічна ізомерії оксикислот. Вона може бути обумовлена різним положенням функціональних груп та будовою карбонового скелета. Молекули амінокислот можуть містити як одну так і декілька карбоксильних груп і відповідно до цього амінокислоти відрізняються за основністю. До складу амінокислот також можуть входити декілька аміногруп.

Класифікація амінокислот. Амінокислоти поділяють на дві великі групи: ациклічні та циклічні. Залежно від кількості карбоксильних або аміногруп ациклічні амінокислоти поділяють на чотири підгрупи: моноаміномонокарбонові, моноамінодикарбонові, діаміномонокарбонові і діамінодикарбонові. Циклічні амінокислоти поділяють на дві підгрупи: карбоциклічні, цикл яких складається тільки з атомів Карбону, і гетероциклічні, до циклу яких входить ще гетероатом, частіше усього Нітроген.

Крім того, амінокислоти поділяють на *замінні* та *незамінні* (табл. 6). Замінні амінокислоти можуть синтезуватись в організмі людини і тварини з продуктів обміну речовин. Незамінні амінокислоти не можуть синтезуватись в організмі в процесі обміну і повинні надходити з їжею.

Таблиця 6

Класифікація амінокислот

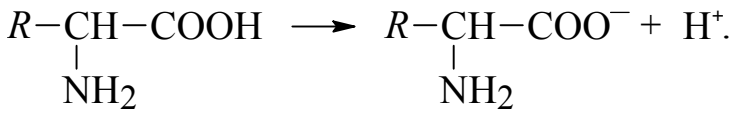
Замінні амінокислоти	*Незамінні амінокислоти*
Глі, ала, цис, глу, асп, тир, про, сер, глн, асн	Вал, лей, іле, тре, мет, фен, три, ліз, гіс, арг

Фізичні властивості амінокислот

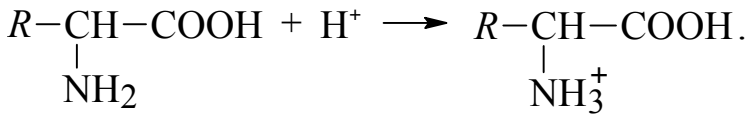
Амінокислоти – кристалічні речовини без кольору, гіркі на смак, містять асиметричний атом Карбону, що обумовлює їх оптичну активність (за винятком гліцину). Більшість амінокислот добре розчиняються у воді (за винятком сульфурвмісних), мають високу температуру плавлення (220 – 315ºС) і належать до L-ряду. Амінокислоти D-ряду виявлені останнім часом лише в складі мікроорганізмів і антибіотиків.

Хімічні властивості амінокислот

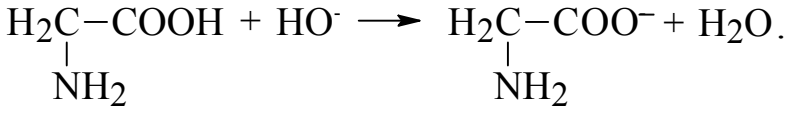
Амінокислоти мають досить високу хімічну активність. Як і карбонові кислоти, похідними яких вони є, амінокислоти дисоціюють у водному розчині. Втрачаючи один протон, *карбоксильна група* утворює аніон:



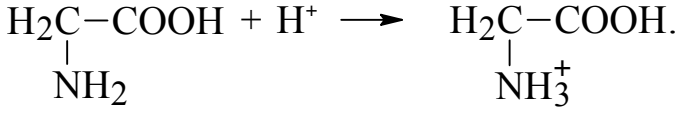
Водночас аміногрупа може приєднувати протон з утворенням катіона:



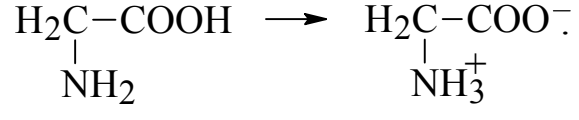
Проте характер іонізації амінокислот залежить від pH розчину. У лужному середовищі посилюється *дисоціація* карбоксильної групи, а аміногрупа практично не дисоціює:



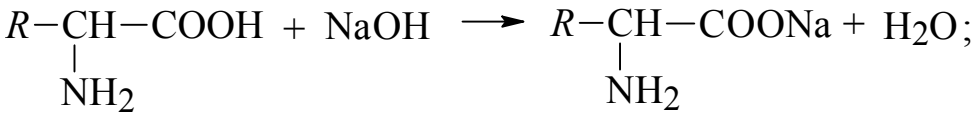
У кислому середовищі, навпаки, відбувається іонізація аміногрупи, у той час як карбоксильна група не дисоціює:

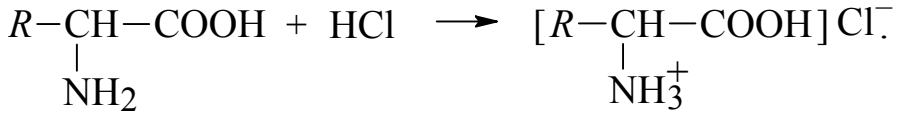


З наведених рівнянь бачимо, що в лужному середовищі амінокислота існує у вигляді аніона, у кислому – у вигляді катіона. При деякому проміжному значенні pH може відбуватися одночасна дисоціація карбоксильної і протонізація амінної груп. У результаті утворюється біполярний іон (цвіттер-іон), загальний заряд якого дорівнює нулю:

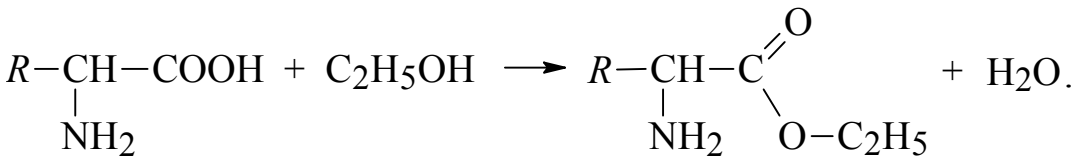


Значення pH, при якому молекула амінокислоти не має заряду, називається ізоелектричною точкою амінокислоти. Тому амінокислоти варто розглядати як амфотерні електроліти. Вони взаємодіють з лугами та з кислотами:

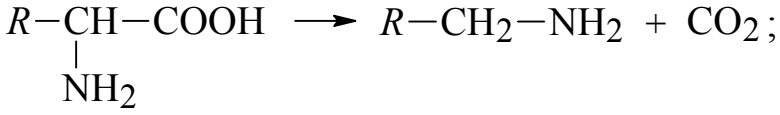


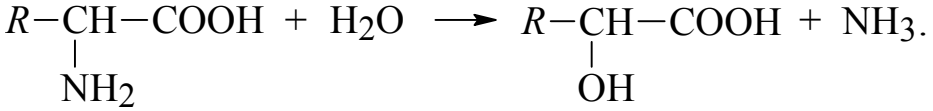


Крім того, вони можуть утворювати складні ефіри:

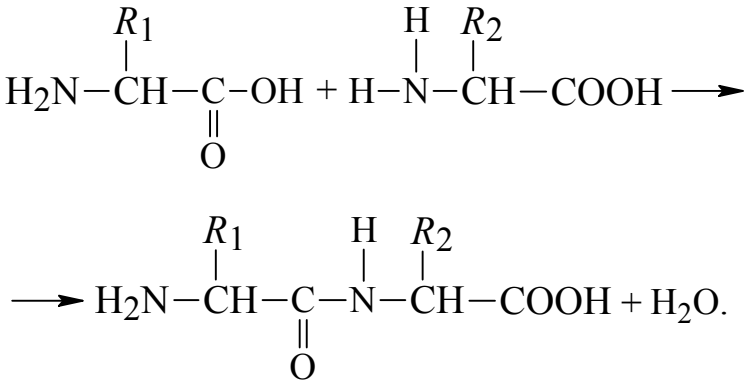


Характерними для амінокислот є реакції *декарбоксилювання* і *дезамінування*:





Таким чином, амінокислоти здатні утворювати ряд хімічних зв'язків з різними реакційно здатними групами. Вони також взаємодіють одна з одною з утворенням ди-, три- і поліпептидів. *Пептидний зв'язок* утворюється внаслідок взаємодії аміногрупи $-NH_2$ однієї молекули амінокислоти з карбоксильною –COOH іншої



Сполука, що утворилась внаслідок такої реакції, називається дипептидом. З'єднуючись таким чином між собою, амінокислоти утворюють полімерні ланцюги, які і являють собою основу будови білкової молекули. Оскільки під час реакції виділяється певна кількість молекул води, то її називають реакцією поліконденсації.

Пептидний зв’язок має деякі риси подвійного зв’язку (навколо нього неможливе вільне обертання). Усі чотири атоми пептидного зв’язку (C, O, N, H) і два α-атоми Карбону розташовані в одній площині (рис. 1).

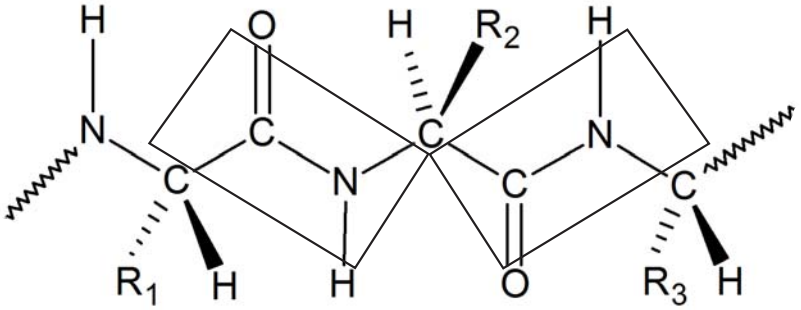
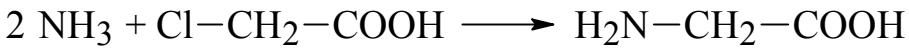


Рис. 1. Пептидний зв’язок

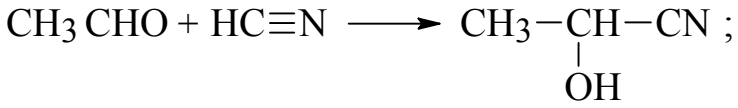
Шляхи одержання амінокислот

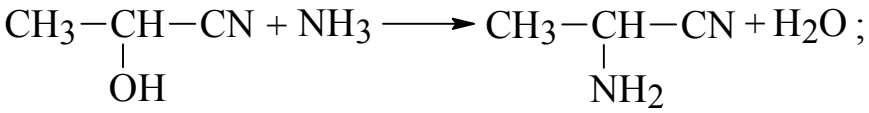
Розроблено багато шляхів одержання α-амінокислот. Найважливіші з яких наступні:

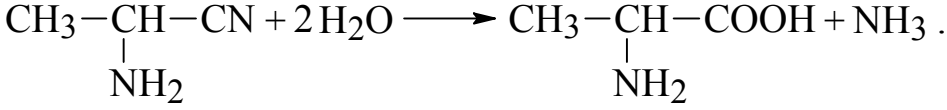
1. Дією амоніаку на солі хлорзамісних кислот



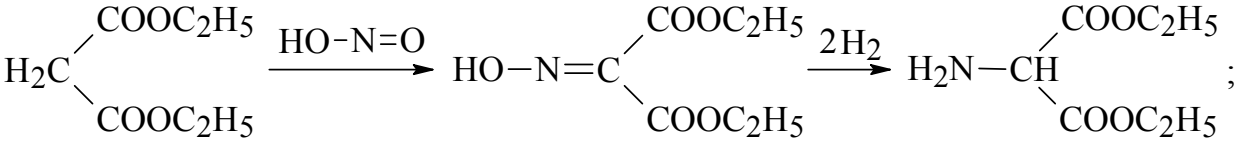
2. Дією амоніаку та ціанової кислоти на альдегіди (реакція Штрекера)

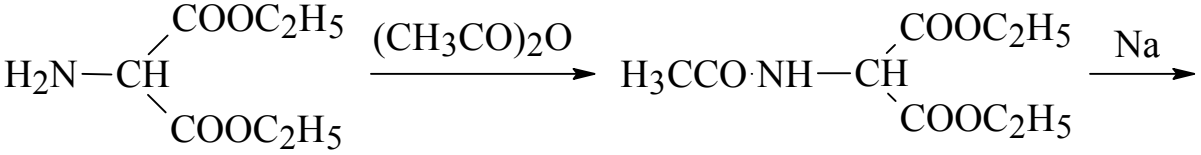


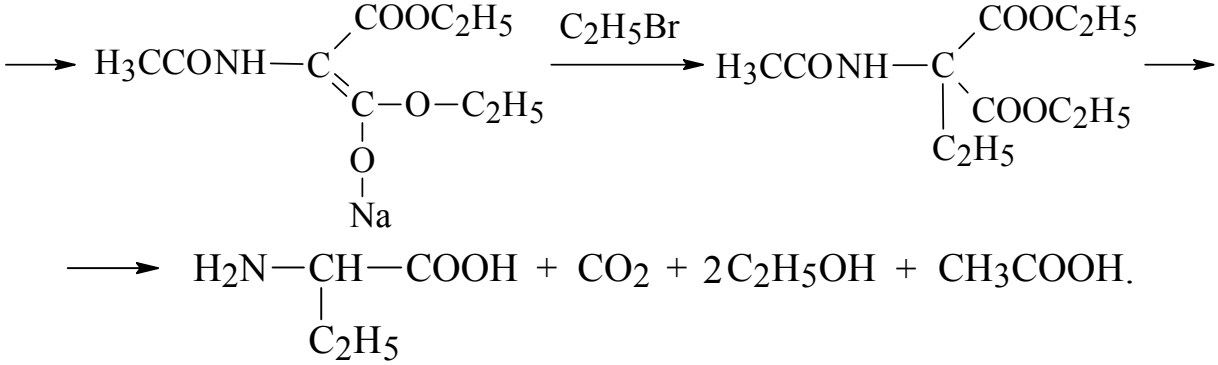




3. Синтезом з аміномалонового ефіру







В організмі людини здійснюється синтез лише замінних протеїногенних амінокислот, а в тканинах рослин синтезуються також незамінні амінокислоти. Синтез замінних амінокислот в організмі може здійснюватися із метаболітів циклу Кребса, проміжних продуктів розщеплення вуглеводів та з незамінних амінокислот. Серед метаболітів циклу Кребса джерелом утворення амінокислот є оксалоацетат і 2-оксоглутарат.

Б і л к и

Білки – високомолекулярні органічні нітрогенвмісні сполуки, молекулярна маса яких коливається у широких межах – від кількох тисяч до сотень мільйонів. Білки виконують багато різних функцій (див. табл. 7). Вміст білків в деяких органах людини наведено у таблиці 8.

Хімічний склад білків

Особливості будови молекул білка

Білки – біополімери, побудовані з амінокислотних залишків, з’єднаних між собою пептидним зв’язком (рис. 1). До білків відносять поліпептиди, що містять не менш як 50 амінокислотних залишків, менші за розмірами полімери називають *пептидами*.

Просторова структура білків

Відомо чотири рівні структурної організації білків: первинний, вторинний, третинний і четвертинний.

Первинна структура білка – це послідовне, лінійне сполучення залишків амінокислот за допомогою пептидних зв'язків. Вона представлена у вигляді довгого ланцюга (рис. 2).

Таблиця 7

Функції білків

Функція	*Приклади білків*
Структурна (входять до складу клітинних мембран, мембран органоїдів)	Еластин (зв'язки), колаген (хрящі, сухожилки), осеїн (кістки), кератини (нігті, пір'я)
Транспортна (переносять кисень у крові і органах, переносять жирні кислоти, жири)	Гемоглобін, гемоціанін, міоглобін
Скорочувальна (скоротливі білки, забезпечують рух)	Актин і міозин (м'язи), тубулін (війки, джгутики, мікротрубочки)
Захисна (важлива частина імунної системи – антитіла, зсідання крові)	Імуноглобуліни (антитіла), фібриноген, тромбопластин, тромбін (зсідання крові)
Енергетична (розпадаються з виділенням енергії)	
Сигнальна (через білки передаються сигнали і направляються у внутрішньоклітинні центри. При цьому подразники – хімічні чи механічні – зумовлюють певні зміни в структурі білків, що є своєрідною реакцією на зовнішнє подразнення.)	Родопсин
Регуляторна	Гормони (інсулін, гормон росту)
Запасаюча	Яєчний альбумін, казеїн молока
Каталітична (прискорюють хімічні реакції в клітині)	Ферменти

Таблиця 8

Вміст білків в деяких органах людини

Орган	*%*
М'язи	80
Шкіра	63
Печінка	57
Кістки	28

Рис. 2. Первинна структура білка

Вторинна структура білка – впорядковане розташування певних ділянок основного ланцюга поліпептиду, без урахування розташування радикалів амінокислот. Основні види вторинної структури – α-спіраль та β-структура (складчасті листи) (рис. 3). Вторинна структура стабілізована *водневими зв'язками*. При цьому електропозитивні атоми Гідрогену, сполучені з атомами Нітрогену або Оксигену в групах –NH або–OH, намагаються наблизитись до електронегативних атомів, що знаходяться поруч, наприклад до Оксигену в групі =CO. Утворений таким чином водневий зв'язок є слабким, але такі зв'язки виникають досить часто і сумарний вплив на стабільність в молекулі при цьому значний.

Третинна структура білка (клубок; куля; глобула). Елементи вторинної структури упаковуються певним чином у глобулу (рис. 4) за рахунок гнучкості молекули і скріплюються *дисульфідними містками* (сульфгідрильні (–SH) групи двох молекул цистеїну, знаходячись поруч, окиснюються, утворюючи дисульфідний зв'язок; він може виникати також між різними поліпептидними ланцюгами). В результаті чого утворюється об'ємна структура з характерною чітко визначеною для кожного білка поверхнею. У стабілізації третинної структури поліпептидів також беруть участь *іонні* (взаємодія іонізованих аміно- та карбоксильних груп), водневі та *гідрофобні* зв'язки.

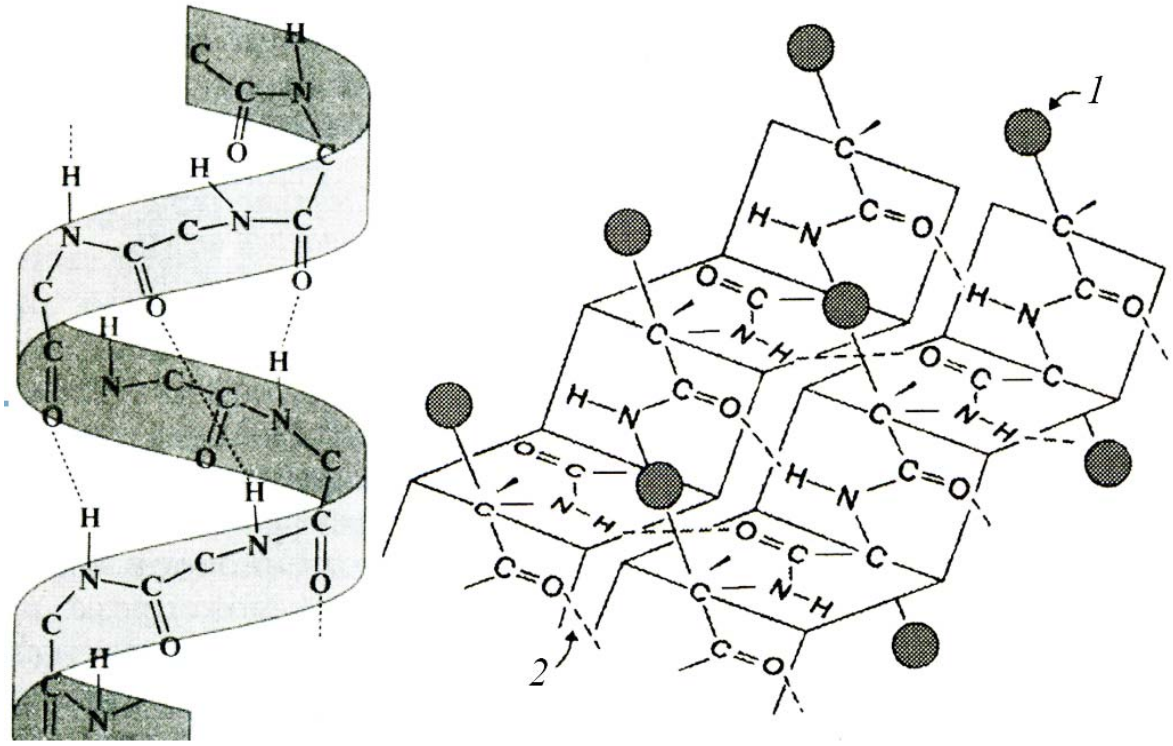


Рис. 3. Вторинна структура білка:
А – α-спіраль, *Б* – β-складчаста структура;
1 – радикали амінокислот; *2* – водневий зв'язок

Четвертинна структура білка являє собою об'єднання декількох глобул в єдине функціональне утворення. Стабілізують молекулу гідрофобні, водневі і іонні зв'язки. Четвертинна структура притаманна, зокрема, такому білку, як *гемоглобін* (рис. 5). Його молекула складається із 4-х поліпептидних ланцюгів двох різних типів: із двох α-ланцюгів (кожний зі 141 амінокислотного залишку) і двох β-ланцюгів (146 залишків відповідно).

З кожним ланцюгом з'єднана одна група гема, до якої приєднується молекула кисню. Таким чином, четвертинна структура білка – це спосіб взаємного розташування у просторі окремих поліпептидних ланцюгів в молекулі, необхідний для прояву специфічних функцій.

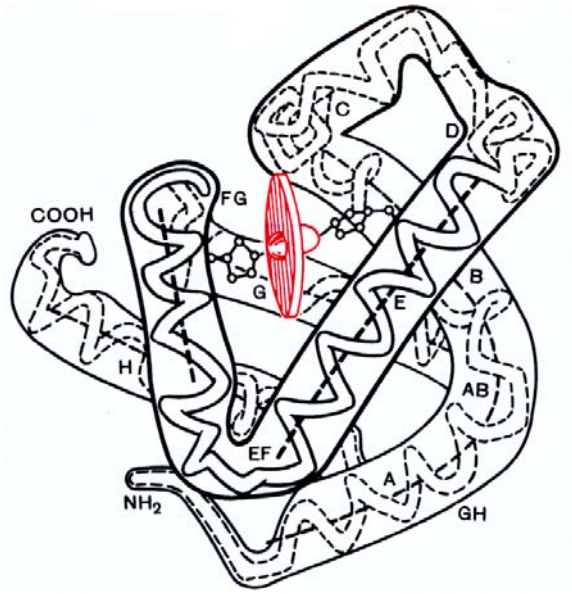


Рис. 4. Третинна структура білка

Рис. 5. Четвертинна структура гемоглобіну

Класифікація білків

За хімічною структурою компонентів усі білки поділяють на дві великі групи: прості білки, або *протеїни*, які побудовані тільки із залишків амінокислот, і складні білки, або протеїди, що складаються з простого білку і зв'язаної з ним сполуки небілкової природи.

Протеїни поділяють на групи залежно від їх розчинності в різних розчинниках (див. табл. 9).

Протеїди – це складні білки, що крім амінокислотних залишків у своєму складі містять додаткові компоненти (так звану простетичну групу). Усі протеїди поділяють на групи залежно від характеру їх небілкової частини (таблиця 10).

Таблиця 9

Основні групи протеїнів

Група	*Особливості розчинності*	*Характеристика*
Альбуміни	Добре розчиняються у воді, але не розчиняються в насиченому розчині амоній сульфату	Мають відносно невелику молекулярну масу. Характеризуються підвищеним вмістом лейцину. Ізоелектрична точка цих білків відповідає pH 5. Складові компонентами крові, м'язів, молока, цитоплазми майже всіх клітин
Глобуліни	Нерозчинні у воді і слабких кислотах, випадають в осад при 50 % концентрації амоній сульфату. Добре розчиняються у слабких розчинах нейтральних солей	Дуже поширені в організмі тварин і рослин, виконують роль захисних білків, з них утворюються антитіла. Деякі з глобулінів здійснюють перенесення іонів металів у плазмі: трансферин транспортує Ферум, церулоплазмін – Купрум
Гістони	Розчинні у воді і кислих розчинах, при додаванні амоніаку легко випадають в осад	Мають лужний характер. Локалізовані в ядрі, з'єднуючись з ДНК, вони зумовлюють її унікальну структуру. Ізоелектрична точка гістонів відповідає значенню pH 10
Протаміни	Розчинні у воді і кислих розчинах, при додаванні амоніаку легко випадають в осад	Мають лужний характер. Максимально багаті на аргінін. Локалізовані в ядрі сперматозоїдів риб і птахів, з'єднуючись з нуклеїновими кислотами, вони зумовлюють їх унікальну структуру
Проламіни	Погано розчиняються у воді, добре у 60 – 80 % етиловому спирті	Запасні білки, що містяться в насінні злаків. У їхньому складі виявлено до 10 – 15 % проліну і 20–50 % глутамінової кислоти. Цінні продукти харчування
Глутеліни	Розчиняються у розведених розчинах лугів і кислот	Містяться у насінні злаків, зелених частинах рослин. У значних кількостях виявлено глутамінову кислоту і лізин. Цінні харчові білки

Продовження таблиці 9

Група	*Особливості розчинності*	*Характеристика*
Протеноїди (склеропротеїни)	Стійкі проти різних розчинників. Не розчиняються у воді, розчинах нейтральних солей, розбавлених кислотах і лугах	Білки опірних і покривних тканин: кісток, хрящів, волосся тощо. На протеїноїди не діють ферменти. Дуже погано засвоюються у складі їжі. Представлені кератинами, колагеном, еластином та ін.

Таблиця 10

Основні групи протеїдів

Група	*Простетична група*	*Характеристика*
Хромопротеїди	Забарвлена група (вітамін B_2, каротин, порфірин, метали)	Білкова частина переважно представлена гістонами. Деякі з хромопротеїдів здійснюють перенесення газів у крові та м'язах (гемоглобін, міоглобін)
Фосфопротеїди	Фосфатна кислота	Джерело Фосфору для утворення макроергічних сполук, фосфатидів, багатьох білків, для побудови кісток (казеїн). Ферменти (пепсин). Цінні харчові речовини
Ліпопротеїди	Ліпіди	Основа біологічних мембран, мієлінових оболонок нервових волокон. Забезпечують транспортування жирів та вітамінів у тканинах і клітинах
Глікопротеїди	Вуглеводи і їх похідні	Виконують захисну функцію

Продовження таблиці 10

Група	*Простетична група*	*Характеристика*
Нуклеопротеїди	Нуклеїнові кислоти	Білкова частина переважно представлена протамінами і гістонами. Забезпечують компактну упаковку та збереження спадкової інформації
Металопротеїди	Іони одного або декількох металів	Відіграють важливу фізіологічну роль. Деякі мають ферментативну активність (металоферменти). Прикладами метало-ферментів є селен-залежна монодийодіназа і карбоангідраза

Розчинність білків залежить від заряду та наявності гідратної оболонки, що використовують у лабораторній практиці для осадження та розділення білків. Деякі способи осадження дозволяють в подальшому відновити нативні властивості білків.

Зворотність осадження білків обумовлена збереженням їх первинної структури. Відновлення фізико-хімічних і біологічних властивостей білка називається *ренатурація* (від лат. “ре” – префікс, який означає поновлення). Іноді для ренатурації достатньо видалити пошкоджуючий агент.

Денатурація білка – процес порушення вторинної, третинної або четвертинної структури. При цьому молекула втрачає здатність виконувати свою біологічну функцію.

Спричинити денатурацію білків можуть такі фактори:

– нагрівання або дія інфрачервоних або ультрафіолетових променів (кінетична енергія викликає сильну вібрацію атомів білка, внаслідок чого слабкі водневі й іонні зв'язки розриваються – білок коагулює);
– сильні кислоти, сильні луги і концентровані розчини солей (іонні зв'язки розриваються і білок коагулює, довготривала дія реагенту може викликати розрив і пептидних зв'язків);

– важкі метали (катіони утворюють міцні зв'язки з карбоксил-аніонами і часто викликають розриви іонних зв'язків, вони також знижують електричну поляризацію білка, зменшуючи його розчинність, внаслідок чого білок з розчину випадає в осад);
– органічні розчинники (порушують гідрофобні взаємодії і утворюють зв'язки з гідрофобними (неполярними) групами, в результаті розриваються і внутрішньомолекулярні водневі зв'язки. Використання спирту як дезінфікуючого засобу засноване на тому, що він викликає денатурацію білка бактерій.

На початкових стадіях денатурації за умови припинення дії факторів, що спричиняють цей процес, денатурований білок може спонтанно відновлювати свою структуру. Таке явище має назву ренатурації.

Процес порушення первинної структури білків називають *деструкцією* (від лат. “деструкціо” – руйнування). Він завжди має незворотний характер.

Висолювання – це додавання до розчину білка нейтральних солей (натрій сульфат, амоній сульфат). При взаємодії аніонів і катіонів солей з зарядженою молекулою білка, заряд зникає, різко зменшується гідратна оболонка. Зникає взаємовідштовхування молекул, що призводить до “злипання” молекул білка і осадження. У зв’язку з тим, що білки відрізняються своїми розмірами, зарядами та будовою, їх можна розділити підібравши певну кількість солі.

Осадження дегідратуючими засобами (ацетон, етанол). За їх додавання до розчину у білка віднімається гідратна оболонка, але не заряд. Розчинність дещо знижується, але денатурації не відбувається.

Зміна pH. М’яка зміна pH до ізоелектричної точки призводить до зникнення заряду, яке супроводжується зменшенням гідратної оболонки, і як наслідок, зниження розчинності молекули.

Лабораторна робота № 1
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння якісного аналізу наявності деяких вільних амінокислот і їх залишків у складі білків, виявлення пептидного зв'язку в білках і пептидах.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про механізм реакцій: біуретової, нінгідринової, ксантопротеїнової, Адамкевича, Паулі, нітропрусидної; вміння використовувати кольорові реакції на амінокислоти і білки в якісному аналізі.*

Методика приготування розчинів білків для проведення якісних реакцій

Нерозведений білок курячого яйця

Відокремлюють білок трьох курячих яєць від жовтків. Вважаючи, що маса білка в одному яйці в середньому становить 33 г, одержують біля 100 $см^3$ нерозведеного розчину білків курячого яйця, який містить 88 % води, 1 % вуглеводів, та 0,5 % мінеральних речовин; решта припадає на білок. Таким чином, одержаний нерозведений білок курячого яйця являє собою приблизно 10 % розчин білка.

Розведений розчин білку альбуміну яйця

Білок після відокремлення від жовтка добре збовтують і потім змішують з десятикратним об'ємом дистильованої води в колбі при струшуванні. Відфільтровують розчин альбуміну; в осаді залишається глобулін. Враховуючи, що вміст альбуміну в білку курячого яйця становить біля 6 %, одержаний розбавлений розчин містить приблизно 0,5 % альбуміну.

Білки м'яса

Поміщають в стакан 40 – 50 г пропущеного через м'ясорубку знежиреного м'яса, додають 80 – 100 $см^3$ 10 % розчину натрій хлориду і залишають суміш стояти 15 – 20 хв. при частому перемішуванні. Відфільтровують через паперовий складчастий фільтр чи через подвійний шар марлі забарвлену в червоний колір рідину.

Білки молока

До 50 $см^3$ свіжого молока додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату. При цьому випадають в осад глобуліни і казеїн. Відфільтровують через складчастий паперовий фільтр розчин альбумінів.

Рослинний альбумін

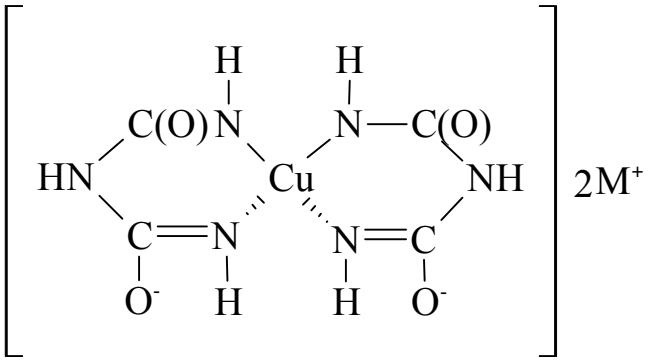
25 г пшеничної муки змішують з 100 $см^3$ дистильованої води і суміш струшують протягом 1 год. за допомогою струшувача. Після цього центрифугують і рідину, що над осадом, фільтрують через складчастий фільтр. Відфільтрований прозорий розчин містить переважно альбумін пшеничних зерен.

Білки грени тутового шовкопряда

10 г грени тутового шовкопряда розтирають в ступці, яка охолоджується сумішшю сухого льоду і ацетону, чи рідким азотом. До гомогенату додають 10 $см^3$ трис-гліцинового буфера (pH 8,6) і продовжують розтирання ще 10 хв. Екстракт переносять в охолоджені центрифужні пробірки і центрифугують за 15000 g в рефрижераторній центрифузі протягом 20 хв. в інтервалі температур від –4 до 0ºС. Рідина над осадом містить біля 0,75 % білка. При розведенні в 2 – 3 рази її можна використовувати також для постановки досліду по фракціонуванню білків тканин тварин.

Характеристика кольорових реакцій на білки і амінокислоти

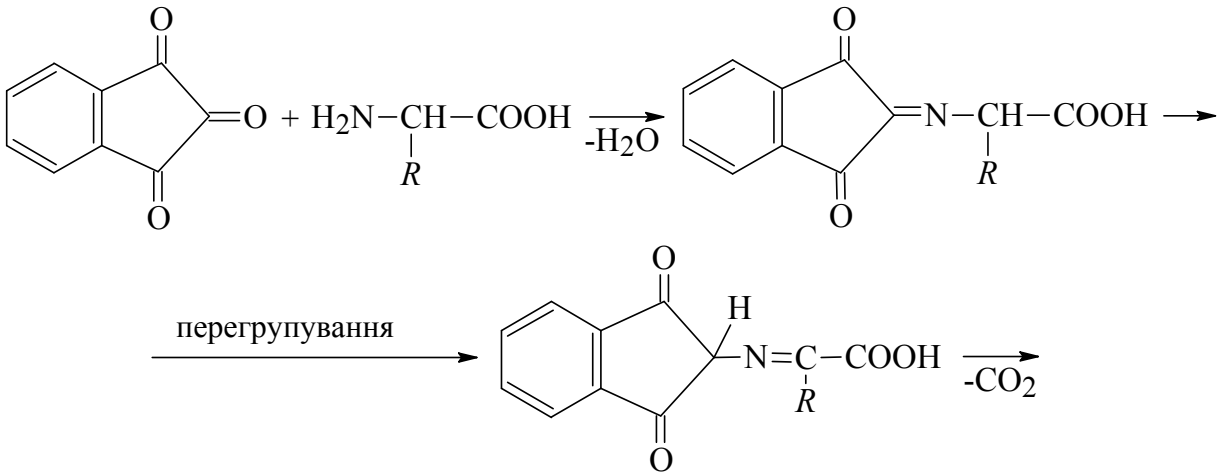
Біуретова реакція. При взаємодії пептидів і білків з купрум (II) гідроксидом у лужному середовищі утворюється комплексна сполука міді, забарвлена у рожево-фіолетовий колір (M^+ – катіон лужного металу:

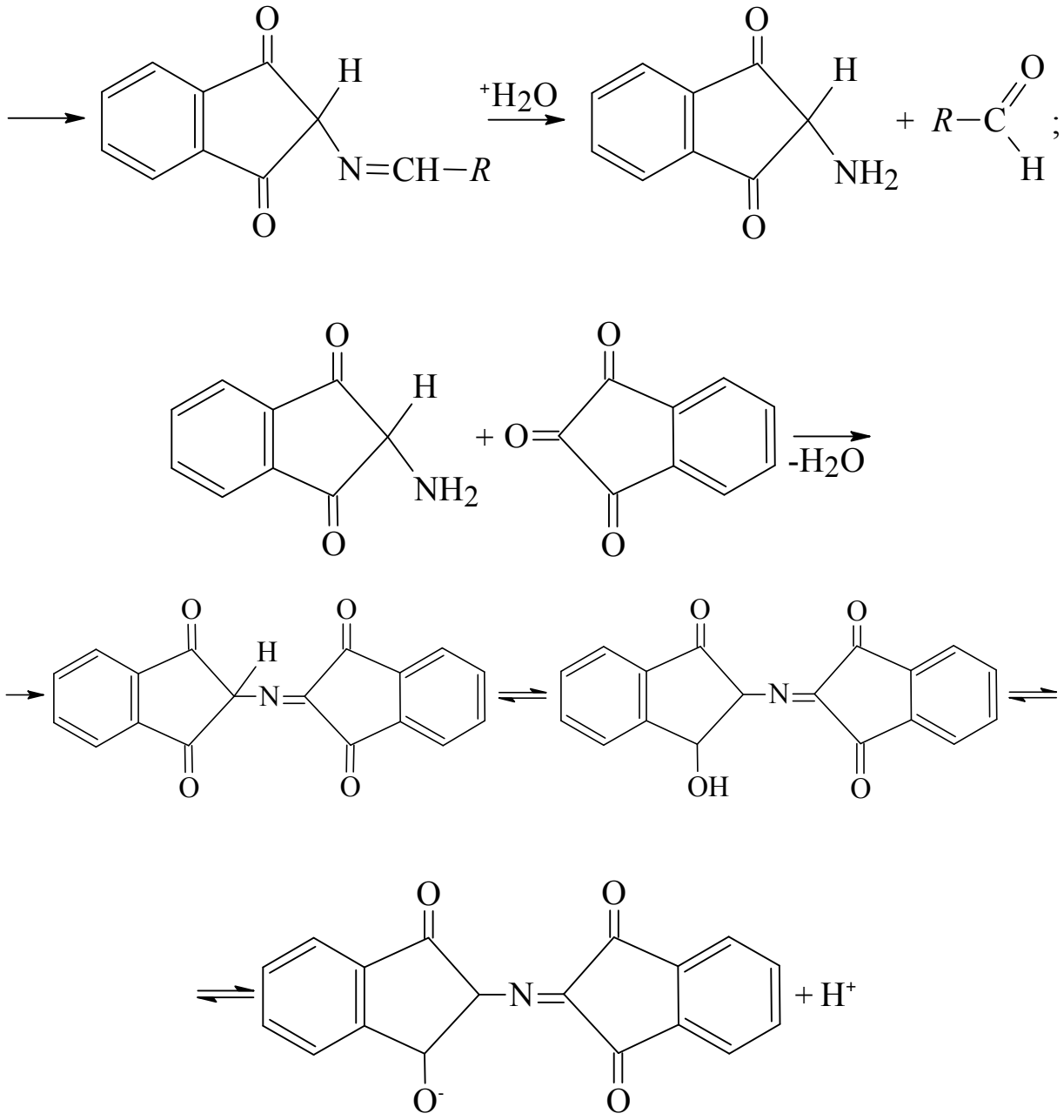


Ця реакція не є специфічною, бо подібний комплекс утворюють не тільки *пептиди* і білки, а й біурет.

Хід роботи. До $1-2\ см^3$ розчину білка додають подвійний об'єм 30 % розчину натрій гідроксиду, добре перемішують і додають 2 – 3 краплі 1 % купрум сульфату. Знову ретельно перемішують. З'являється червоно-фіолетове забарвлення. Після відстоювання на межі двох шарів з'являється фіолетове кільце.

Нінгідринова реакція – це реакція ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи. В амінокислотах, пептидах і білках присутні такі вільні групи, тому при взаємодії з нінгідрином утворюється барвник Руемана синьо-фіолетового кольору. Реакція не є специфічною на амінокислоти, пептиди і білки.



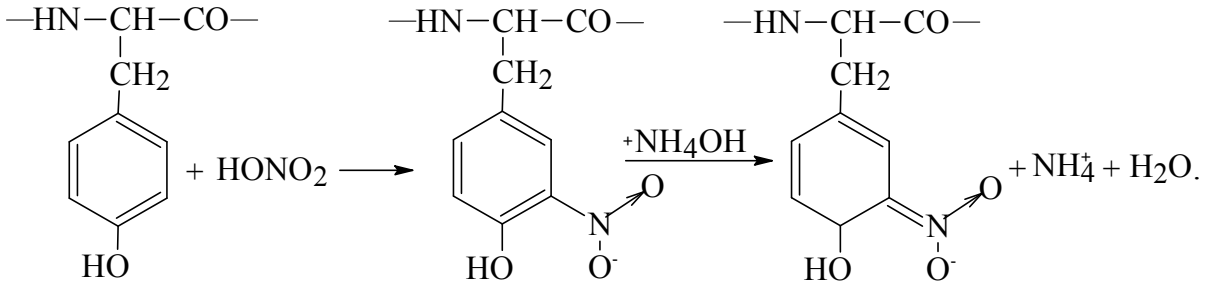


Синьо-фіолетовий барвник Руемана

Хід роботи. До 2 – 3 см^3 розбавленого розчину білка додають 3 – 4 краплі 1 % розчину нінгідрину у 95 % розчині ацетону. Перемішують і ставлять на водяну баню при 70ºС на декілька хвилин. Розвивається синьо-фіолетове забарвлення.

Ксантопротеїнова реакція – це реакція нітрування ароматичних амінокислот у складі пептидів і білків, у результаті якої утворюються нітропохідні жовтого кольору. Реакція не специфічна, бо нітропохідні вільних ароматичних вуглеводнів також мають подібне забарвлення. Ксантопротеїнова реакція характерна для

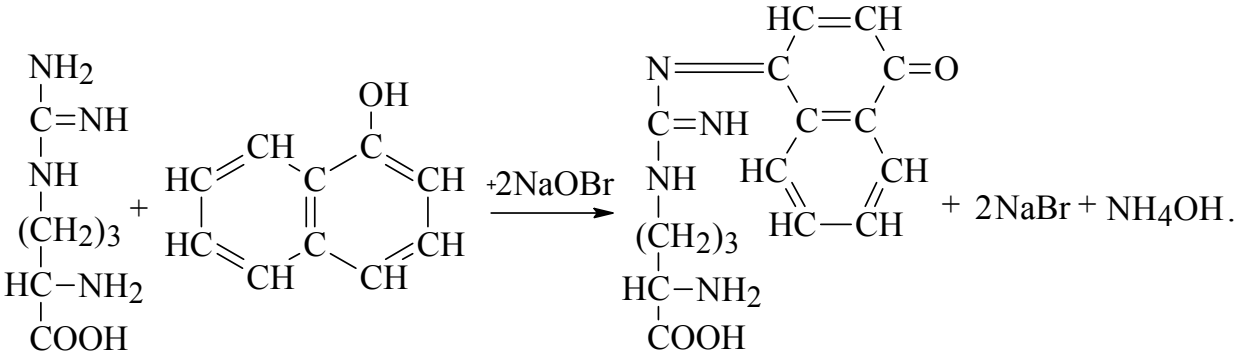
білків, що містять залишки ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину і триптофану).



Хід роботи. До 1 см^3 розчину білка додають 5 – 6 крапель концентрованої нітратної кислоти до появи білого осаду або муті від білка, що згорнувся. При нагріванні розчин і осад забарвлюються в жовтий колір, осад майже повністю розчиняється.

Охолоджують суміш і обережно додають до розчину (має кислу реакцію), по краплям без перемішування надлишок концентрованого амоній гідроксиду чи лугу до лужної реакції. Вміст забарвлюється у яскраво-жовтий колір, що обумовлено виникненням у лужному середовищі хромофорної групи.

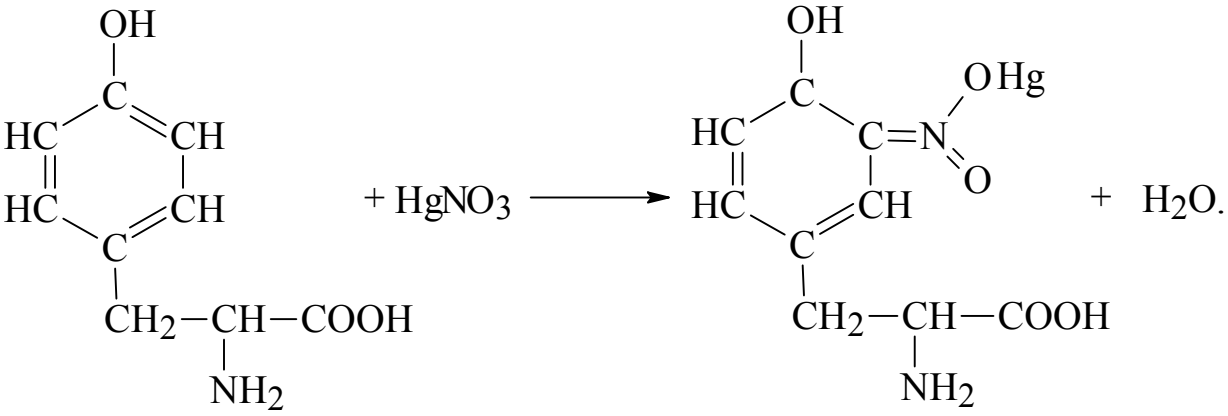
Реакція Сакагучі. Білки за наявності лугу дають червоне забарвлення з гіпобромітом і α-нафтолом. Реакція зумовлена наявністю в білках амінокислоти аргініну, яка має в своєму складі гуанідинове угруповання.



Аргінін α-Нафтол

Хід роботи. В пробірку з 2 – 3 см^3 розведеного розчину білка додають 1 см^3 10 % розчину натрій гідроксиду і негайно декілька крапель 0,2 % спиртового розчину α-нафтолу, перемішують, приливають 0,5 см^3 розчину натрій гіпоброміту і знову перемішують. Виникає оранжево-червоне забарвлення.

Реакція Міллона зумовлена наявністю в білках амінокислоти тирозину, що містить фенольне ядро, яке при взаємодії з реактивом Міллона утворює забарвлену сіль.

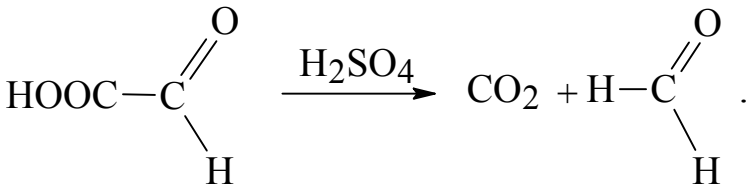


Тирозин Ртутна сіль тирозину

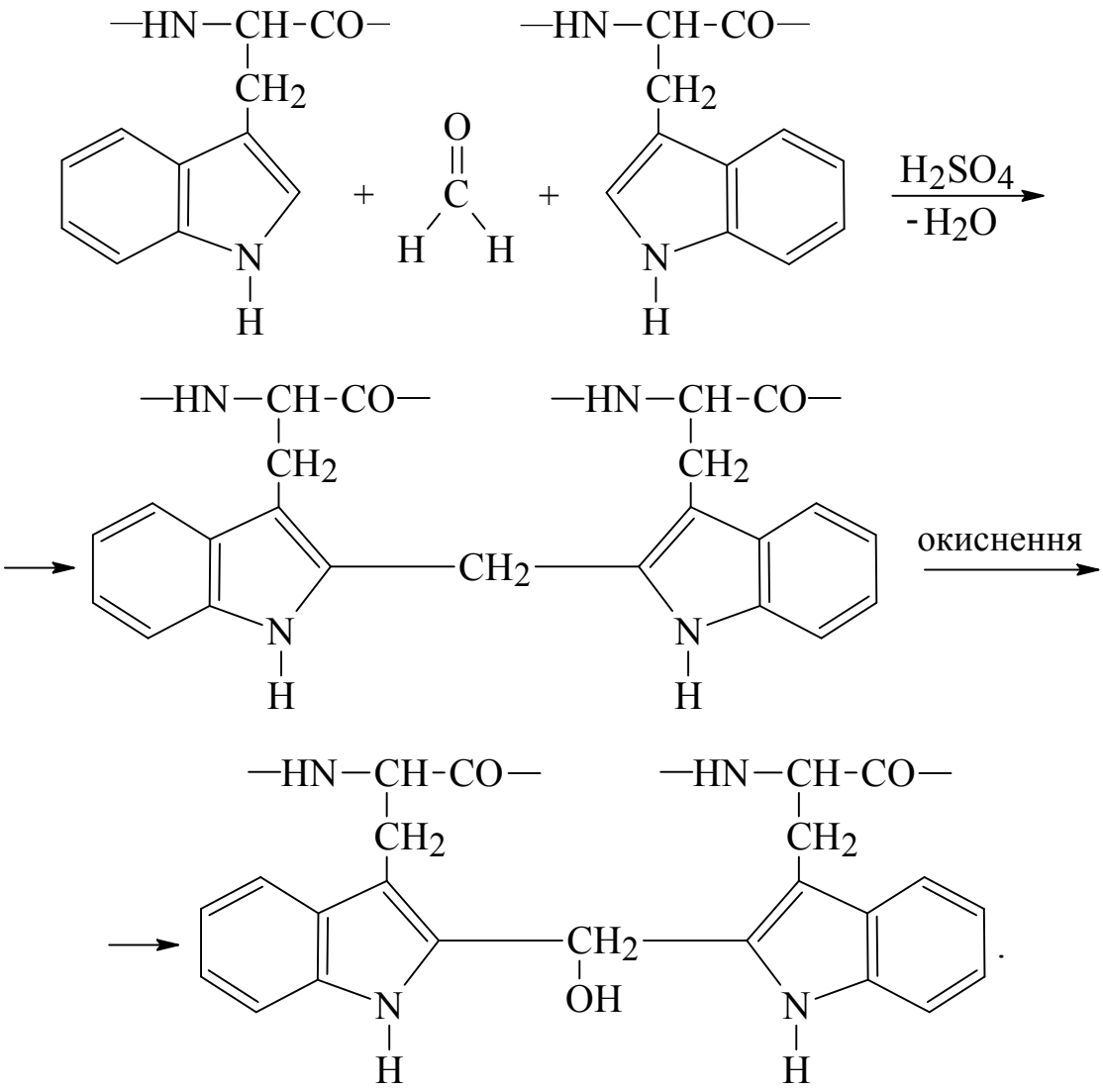
Хід роботи. До 0,5 – 1 $см^3$ нерозведеного білка курячого яйця додають подвійний об'єм реактиву Міллона. Білок згортається під дією солей Меркурію і нітратної кислоти, які входять до складу реактиву, утворюючи згусток білого кольору. При нагріванні пробірки в полум'ї спиртівки осад забарвлюється в цегляно-червоний колір.

Реакція Адамкевича. Взаємодія амінокислоти триптофану з гліоксалевою кислотою призводить до конденсації двох залишків триптофану з утворенням сполуки з довгим ланцюгом спряжених подвійних зв'язків, що зумовлює виникнення червоно-фіолетового забарвлення.

Гліоксалева кислота за участі концентрованої сульфатної кислоти декарбоксилюється:

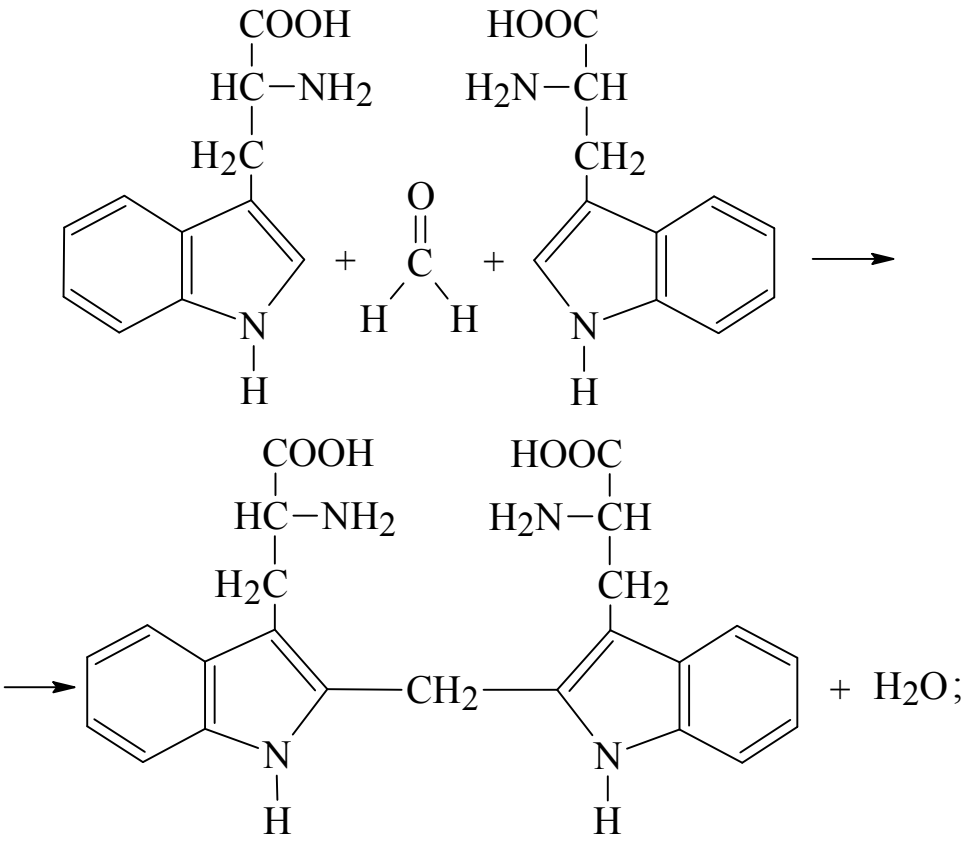


Утворений формальдегід вступає в реакцію конденсації з двома залишками триптофану у складі білка.

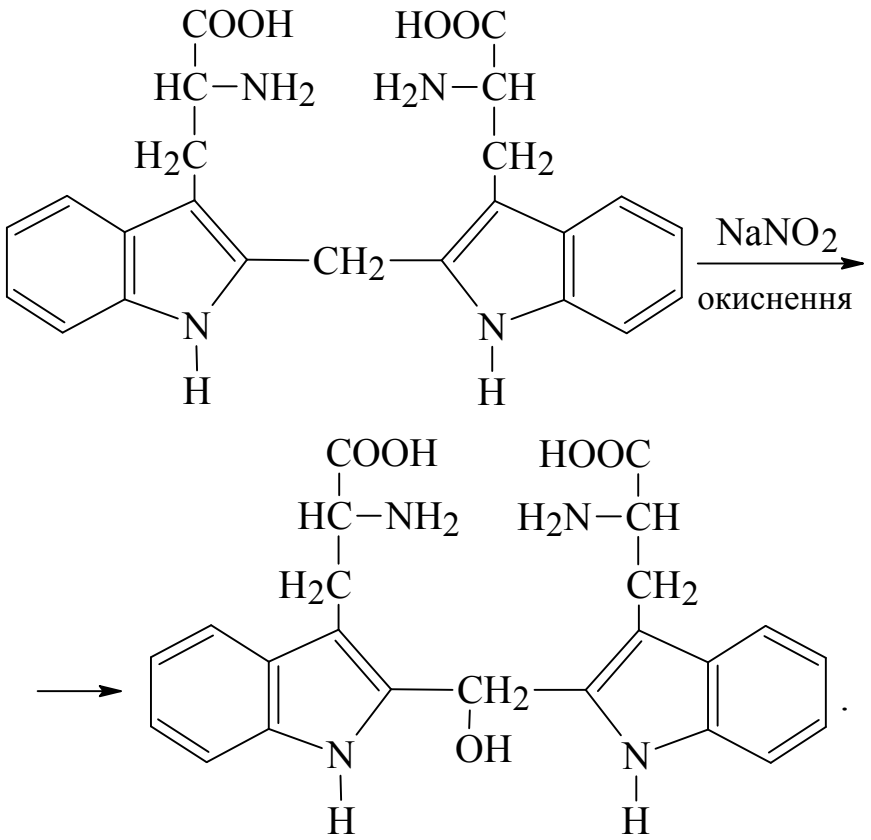


Хід роботи. Наливають в пробірку декілька крапель нерозведеного білка і приливають 2 см^3 льодяної ацетатної кислоти з додаванням невеликої кількості гліоксалевої кислоти. Утворюється осад, який розчиняють нагріванням, після чого охолоджують пробірку із сумішшю, а потім, сильно нахиливши її, обережно, по стінці, приливають 1 см^3 концентрованої сульфатної кислоти так, щоб обидві рідини не змішувались. При стоянні на межі двох рідин утворюється червоно-фіолетове кільце.

Реакція Вуазене відбувається тільки з білками, до складу яких входить амінокислота триптофан. Остання, вступаючи в конденсацію з формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації.



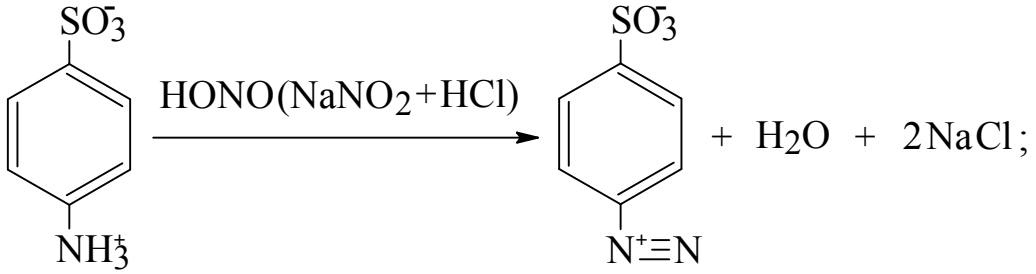
Біс-2-триптофанілметан

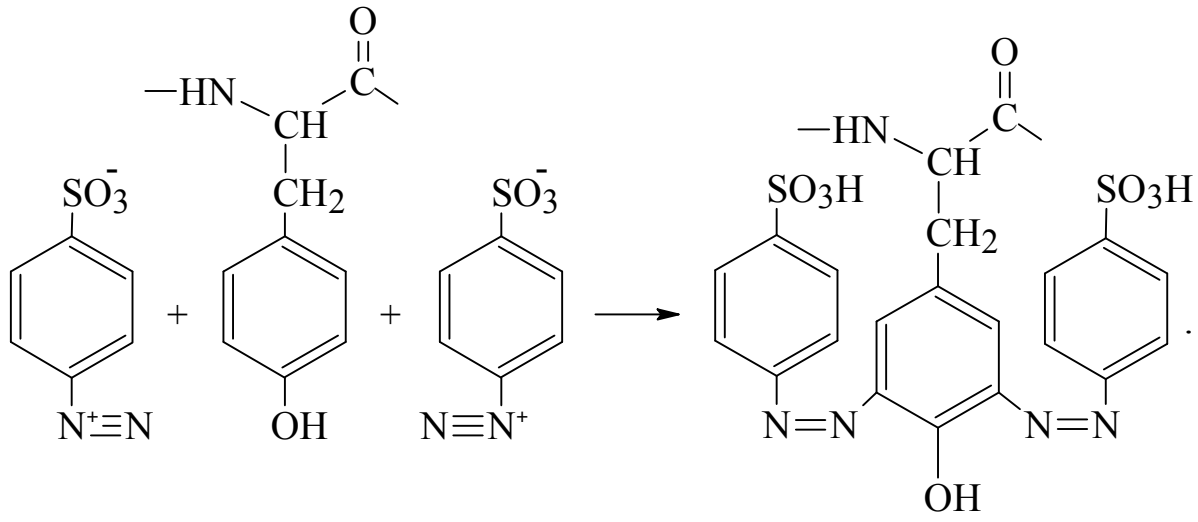


Біс-2-триптофанілкарбінол

Хід роботи. До 2 см^3 розведеного розчину білка в пробірці додають одну краплю 2,5 % розчину формальдегіду. Перемішують та додають 6 см^3 чистої концентрованої хлоридної кислоти, після чого знову перемішують. Через 10 хв. додають при перемішуванні 10 крапель 0,5 % розчину натрій нітриту. Розвивається інтенсивне синьо-фіолетове забарвлення.

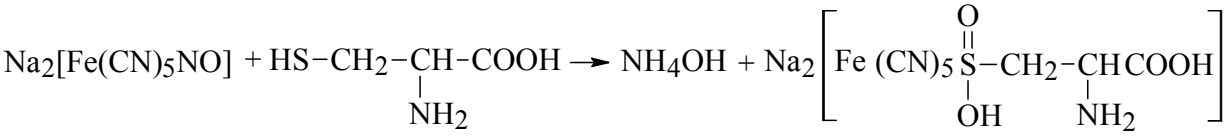
Реакція Паулі – це реакція азосполучення n-сульфофеніл-діазоній хлориду з ароматичними амінокислотами – як вільними, так і в складі пептидів і білків. Спочатку проводять на холоді діазотування сульфанілової кислоти, а потім реакцію азосполучення з ароматичними амінокислотами у складі білків. З'являється оранжево-червоне забарвлення в результаті утворення азобарвника.





Хід роботи. До 1 см^3 1 % розчину сульфанілової кислоти в 5 % розчині хлоридної кислоти доливають 2 см^3 0,5 % розчину натрій нітриту, перемішують та швидко додають спочатку 2 см^3 розбавленого розчину білка, а потім, після перемішування вмісту пробірки, 6 см^3 10 % розчину натрій карбонату. Після змішування розчинів розвивається вишнево-червоне забарвлення.

Нітропрусидна реакція – це реакція на амінокислоту цистеїн, що містить сульфгідрильну групу (–SH). При взаємодії натрій нітропрусиду зі сполуками, що містять –SH-групу або S^{2-} з'являється пурпурове забарвлення.



Хід роботи. В пробірку вносять 3 $см^3$ розбавленого розчину білка, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату та 2 – 3 краплі 5 % розчину натрій нітропрусиду. Потім розчин підлужують декількома краплями концентрованого розчину амоній гідроксиду. Якщо в білку є цистеїн, то відбувається реакція, в результаті якої розвивається пурпурове забарвлення.

Реакція на "слабко зв'язану сірку". Під дією лугів білки частково гідролізують за пептидним зв'язком і перетворюються в лужні альбумінати. Поряд з цим спостерігається відщеплення частини аміногруп у вигляді амоніаку (реакція дезамінування). При наявності в молекулі білка амінокислот, які містять Сульфур (цистину, цистеїну), від цих амінокислот поступово відщеплюється також і Сульфур у вигляді іона зі ступенем окиснення –2. Його присутність можливо виявити за допомогою іонів важких металів, наприклад іонів плюмбуму, які утворюють з іонами Сульфуру чорний нерозчинний плюмбум сульфід.

Хід роботи. В пробірку наливають 0,5 – 1,0 $см^3$ нерозведеного білку, додають подвійний об'єм концентрованого розчину лугу, кладуть кілька кип'ятильників та кип'ятять суміш. При цьому виділяється амоніак, який виявляється за запахом та посинінням вогкого лакмусового папірцю, піднесеного до отвору пробірки (не торкаючись стінки!). Одержаний незначний осад розчиняється при кип'ятінні.

Гарячу лужну рідину ділять на дві частини: до першої приливають розчин натрій плюмбіту – утворюється жовто-буре або чорне забарвлення. До другої – 2 – 3 краплі свіжоприготованого розчину натрій нітропрусиду, виникає червоно-фіолетове забарвлення.

Лабораторна робота № 2
РЕАКЦІЇ ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Мета і завдання роботи: *провести реакції осадження білків висолюванням, нагріванням, мінеральними і органічними кислотами, солями важких металів, фенолом, альдегідом, спиртом; з'ясувати механізми зворотнього і незворотного осадження білків.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів осадження білків без порушення їх нативності та при денатурації; дії на білок кислот та іонів важких металів; вміти підбирати спосіб осадження білків із біологічного матеріалу для їх подальшого розділення.*

До складу білків входять різноманітні амінокислотні радикали, тому білки вступають у взаємодію з багатьма сполуками (кислотами, іонами металів, спиртами і т. і.), а також конкурують з ними за молекули розчинника (води). У багатьох випадках це призводить до осадження білків.

Висолювання білків амоній сульфатом

Наливають в пробірки 1 – 1,5 $см^3$ 10 % розчину білка, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату і злегка струшують суміш. З'являється каламуть від осаду глобулінів.

Каламутну рідину фільтрують через сухий складчастий фільтр. Частину прозорого фільтрату нагрівають до кипіння і спостерігають зсідання альбумінів, що знаходяться у розчині. До другої частини фільтрату додають при перемішуванні надлишок амоній сульфату у порошку до припинення його розчинення. З'являється помутніння чи осад. Осадження білків солями амонію є зворотнім процесом – при додаванні води білки знову розчиняються.

У водному розчині білків їх частинки заряджені і гідратовані, що обумовлює стійкість білкових розчинів, але за високої концентрації солей, іони яких також гідратовані, відбувається руйнування водних оболонок і знімається заряд з білкової молекули, що призводить до втрати стійкості білкових розчинів, частинки білку злипаються, укрупнюються та випадають в осад.

Амоній сульфат має виражену висолюючу здатність і осаджує білки в нейтральному та слабко кислому середовищі. Інші солі, наприклад, натрій хлорид, викликають повне осадження білків тільки за умови підкислення розчину.

Для висолювання різних білків потрібна різна концентрація одних і тих же солей. Отже, білки можна висолювати фракційно: глобуліни випадають вже при напівнасиченості розчинів амоній сульфатом, а альбуміни – тільки за повного насичення.

Зсідання білків при нагріванні

В п’ять пробірок наливають по 2 $см^3$ 10 % розчину білка. Додають до вмісту другої пробірки 1 краплю 1 % розчину ацетатної кислоти, у третю приливають приблизно 0,5 $см^3$ 10 % розчину ацетатної кислоти, в четверту – 0,5 $см^3$ 10 % розчину ацетатної кислоти та декілька крапель насиченого розчину натрій хлориду, а в п’яту – 0,5 $см^3$ розчину 10 % натрій гідроксиду. Вміст всіх пробірок нагрівають.

У першій пробірці спостерігається утворення осаду ще до того, як рідина закипить. Осадження при нагріванні (зсідання) характерне майже для усіх білків (виключення складає желатин). Пластівцеподібний осад білка у другій пробірці випадає швидше і повніше через наближення pH розчину до ізоелектричної точки. В третій пробірці осад білка не утворюється навіть при кип’ятінні, оскільки у кислому середовищі пригнічується дисоціація білка по карбоксильних групах, і молекула заряджається позитивно. Спостерігають утворення осаду у четвертій пробірці – додавання до розчину білка нейтральних солей (зокрема, натрій хлориду, амоній сульфату) полегшує і прискорює зсідання білків при кип’ятінні внаслідок дегідратації. В п’ятій пробірці осад не утворюється навіть при кип’ятінні, оскільки у лужному середовищі зменшується дисоціація білка, і молекули його набувають негативного заряду, внаслідок чого залишаються у розчині. На відміну від осадження солями, зсідання білків при нагріванні – *денатурація* – незворотний процес.

Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами

В три сухі пробірки наливають по $1 – 2$ см^3 концентрованої нітратної, сульфатної і хлоридної кислот. Потім, нахиливши кожну пробірку, обережно по стінці приливають із піпетки по $0{,}5$ см^3 досліджуваного розчину білка так, щоб він не змішувався з кислотою. На межі двох рідин з'являється білий аморфний осад білка. Осад, що випав за дії хлоридної і сульфатної кислот, при струшуванні розчиняється в їх надлишку.

Концентровані мінеральні кислоти викликають незворотне осадження білків. Желатин не осаджується мінеральними кислотами.

Осадження білків органічними кислотами

У дві пробірки наливають по $2 – 3$ см^3 10 % розчину білка і додають в одну з них декілька крапель 5 % розчину трихлороцтової кислоти, в другу – декілька крапель 20 % розчину сульфосаліцилової кислоти. В обох випадках спостерігається утворення осаду білка.

Трихлороцтова кислота осаджує тільки білки і не осаджує продукти розпаду білка і амінокислоти, тому її часто використовують для повного видалення білків з біологічних рідин (наприклад, сироватки крові). За цих умов продукти розпаду білків залишаються у розчині.

Осадження білків солями важких металів

У дві пробірки наливають $1 – 1{,}5$ см^3 досліджуваного 10 % розчину білка і повільно, по краплях, при струшуванні додають в одну з них 5 % розчин купрум сульфату, а в другу – 10 % розчин плюмбум ацетату. Випадає пластівцеподібний осад внаслідок утворення малорозчинної солеподібної сполуки білка (залежно від металу блакитного або білого кольору). При надлишку реактиву осад знову розчиняється.

Солі важких металів (Hg, Ag, Cu, Pb та ін.) викликають незворотне осадження білків, утворюючи з ними нерозчинні у воді сполуки. Тому білки використовують в якості протиотрути при отруєнні, наприклад, солями Меркурію. Але деякі з таких осадів (наприклад, з солями Купруму, Плюмбуму, Цинку) розчиняються у надлишку осаджувача внаслідок адсорбції іонів поверхнею білкових частинок – в результаті чого вони набувають заряд і знову розчиняються. Розчинення осадів денатурованих білків у надлишку солей важких металів називається адсорбційною пептизацією.

Осадження білків фенолом і формаліном

У дві пробірки, що містять по 1 – 2 $см^3$ 10 % розчину білка, додають: в першу – 1 – 2 $см^3$ насиченого водного розчину фенолу, а в іншу – 1 – 2 $см^3$ формаліну. В обох пробірках випадає осад білка. За дії фенолу осад випадає швидше.

Осадження білків спиртом

В пробірку наливають 1 – 1,5 $см^3$ 10 розчину білка і додають декілька кристалів натрій хлориду. Приливають поступово в пробірку з реакційною сумішшю 5 – 6 $см^3$ етилового спирту. Випадає пластівцеподібний осад білка внаслідок дегідратації білкових молекул.

Осадження білків натрій вольфраматом

До 3 $см^3$ розчину білка додають 0,5 $см^3$ 0,66 н розчину сульфатної кислоти та після перемішування – 0,5 $см^3$ 10 % розчину натрій вольфрамату. Випадає осад. Натрій вольфрамат – один з кращих осаджувачів білка. Його часто використовують в лабораторній практиці для депротеїнізації біологічних рідин і екстрактів. Але він осаджує також деяку кількість діаміномонокарбонових кислот.

Лабораторна робота № 3
РОЗДІЛЕННЯ АЛЬБУМІНІВ І ГЛОБУЛІНІВ МЕТОДОМ ДІАЛІЗУ І ВИСОЛЮВАННЯ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння розділяти різні групи білків методом діалізу і висолювання; навчитися готувати сольову витяжку білка.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про конкретні різновидності розділення суміші речовин; суть та теоретичне обґрунтування доцільності застосування методу діалізу і висолювання; вміння готувати білки до розділення.*

Такі прості білки як альбуміни і глобуліни являються найбільш розповсюдженими в природних об'єктах. Як правило, вони зустрічаються разом, і відокремлення їх один від одного базується на різній їх розчинності у воді і здатності до висолювання мінеральними солями.

Альбуміни розчинні у воді, осаджуються при насиченні розчину амоній сульфатом, не містять гліцину. Глобуліни не розчинні у воді, але розчинні в присутності нейтральних солей середньої концентрації (8 – 15 %), осаджуються при додаванні до розчину білка рівного об'єму насиченого розчину амоній сульфату.

Одержання сольової витяжки білка. 10 г пропущеної через м'ясорубку м'язової тканини настоюють при перемішуванні в ступці протягом 10 – 15 хв. з 40 – 50 $см^3$ 10 % розчину натрій хлориду. Утворюється однорідна напіврідка маса, яку фільтрують через подвійний шар марлі. Перші мутні краплі фільтрату зливають знову на фільтр і повторно фільтрують до одержання фільтрату без муті. Одержують близько 15 – 20 $см^3$ забарвленої в рожево-червоний колір прозорої (опалесцюючої) рідини. В одержаній сольовій витяжці білка містяться глобуліни та альбуміни, які потім відокремлюють методом діалізу чи висолювання.

Діаліз сольової витяжки м'язової тканини. Метод діалізу базується на неспроможності великих білкових молекул проникати крізь пори напівпроникних мембран (штучні колоїдні і целофанові, природні тваринні і рослинні), тоді як інші молекули й іони легко проходять через них. Методом діалізу користуються для очистки розчинів високомолекулярних сполук від солей та інших речовин.

Прилади для діалізу називаються діалізаторами. Найпростішим діалізатором може бути мішечок целофану, поміщений в стакан з дистильованою водою. Для більш повного і швидкого здійснення діалізу вода в стакані повинна бути проточною або періодично замінюватись свіжою.

Виготовлення діалізатора. Вирізають з целофану коло діаметром 9 – 12 см. Складають його у формі мішечка, вставляють в отвір скляну трубку (довжиною 5 – 6 см і діаметром 0,5 – 0,8 см) так, щоб верхній кінець трубки виступав з мішечка на 2 – 3 см, а нижній знаходився в середині мішечка на 1/3. Мішечок туго зав'язують на трубці шнурком. До роботи діалізатор треба зберігати наповненим водою і поміщеним за допомогою тримача для пробірок в стакан з водою. Мішечок повинен бути підвішеним так, щоб він не торкався стінок і дна стакана. Перед роботою воду із діалізатора виливають.

За допомогою лійки з тонко відтягнутим кінцем вливають в діалізатор 10 $см^3$ (не більше ½ об'єму мішечка) одержаного фільтрату сольової витяжки і поміщають мішечок в стакан (1 $дм^3$) з дистильованою водою. Через 5 – 10 хв. відбирають піпеткою невелику кількість води із стакана і перевіряють наявність там хлорид-іонів (реакція з розчином 0,05 М аргентум нітрату) і відсутність білка (біуретова або реакція Міллона на білки). Якщо реакція на хлорид-іони яскраво виражена, то діаліз продовжують, змінивши воду в стакані. Час від часу перевіряють реакцію на хлорид-іони і білок та змінюють воду через кожні 5 – 10 хв.

Через 1,5 – 2 год. проба на хлорид-іони стає негативною або дуже слабкою. Це свідчить про закінчення діалізу, тобто про майже повну дифузію солі із діалізатора до зовнішнього розчинника. В мішечку прозорий фільтрат стає каламутним, внаслідок випадання в осад глобулінів, нерозчинних в дистильованій воді.

Мішечок виймають із стакана, вміст мішечка фільтрують через паперовий фільтр. На фільтрі залишаються глобуліни, в фільтрат переходять альбуміни. Проводять біуретову реакцію і доводять наявність обох білків в осаді і фільтраті.

Для осадження альбумінів до фільтрату додають порошкоподібний амоній сульфат до насичення розчину. За таких умов альбуміни випадають в осад. Останній відфільтровують через сухий паперовий фільтр. При повному насиченні фільтрату амоній сульфатом в розчині не залишається білка, в чому можна впевнитись, провівши біуретову реакцію з невеликою порцією фільтрату.

Висолювання м'язових білків. Розділення білків сольової витяжки також здійснюють методом висолювання, основою якого є здатність альбумінів і глобулінів осаджуватись за різної концентрації солей. До сольової витяжки, одержаної з м'язової тканини, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату. Випадає осад глобулінів. Розчин фільтрують і фільтрат насичують, додаючи амоній сульфат. Випадає осад альбумінів.

Лабораторна робота № 4
ВИДІЛЕННЯ КАЗЕЇНУ З МОЛОКА ТА ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ КАЗЕЇНУ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння виділяти білок із суміші методом ізоелектричного осадження, очищувати його, визначати Фосфор у біологічних об'єктах за методом Фіске-Суббароу.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про заряд білкової молекули, ізоелектричний стан білка; уміння осаджувати білок з молока, очищати його, мінералізувати, визначати Фосфор за методом Фіске-Суббароу; колориметрувати.*

Казеїни виділяють підкисленням молока, тобто методом, запропонованим ще Г. Я. Мульдаром на початку минулого століття. Вважають, що казеїн міститься в молоці у вигляді казеїногена, який в процесі виділення перетворюється в казеїн. 30 $см^3$ свіжого молока розбавляють чотирма об'ємами води в стакані на 200 $см^3$ і при помішуванні додають до нього по краплям 0,1 % розчин ацетатної кислоти до припинення виділення осаду казеїну. Необхідно запобігати надлишку кислоти, оскільки казеїн розчиняється в ньому. Казеїн відфільтровують, промивають водою і для очищення від тригліцеридів і інших речовин розчиняють в 0,1 % розчині натрій карбонату. Казеїн розчиняється, суміш фільтрують через вологий фільтр, при цьому жири залишаються на фільтрі. Фільтрат, що містить натрієву сіль казеїну, знову осаджують 0,1 % розчином ацетатної кислоти. Осад казеїну відфільтровують, віджимають між фільтрувальними папірцями по можливості досуха і розтирають для зневоднення в ступці з етанолом (15 – 20 $см^3$). Після чого казеїн струшують у великій пробірці для видалення жиру спочатку з ефіром, а потім з 20 $см^3$ суміші метанолу і хлороформу (1 : 1). Одержаний чистий казеїн після висушування на повітрі являє собою білий порошок.

Визначення наявності залишку фосфатної кислоти в казеїні

В 100 г казеїну міститься приблизно 0,8 г Фосфору у складі фосфатної кислоти. Виявлення Фосфору в казеїні здійснюється спалюванням казеїну в суміші концентрованих сульфатної та нітратної кислот. Наважку казеїну приблизно 0,05 г змішують в тугоплавкій пробірці з 0,3 $см^3$ концентрованої сульфатної та з 0,3 $см^3$ нітратної кислоти. Пробірку нагрівають на піщаній бані. Суміш обвуглюють, при подальшому нагріванні суміш приймає буре забарвлення. Через 10 хв., якщо суміш не знебарвиться, додають ще 2 краплі нітратної кислоти і продовжують нагрівання. Спалювання проводять до тих пір, поки суміш не знебарвиться. Після чого додають 2 $см^3$ води і продовжують нагрівання для видалення залишків нітратної кислоти. Суміш нейтралізують (по фенолфталеїновому паперу), додаючи по краплям 5 н розчин натрій гідроксиду. Якщо додано надлишок лугу, то його нейтралізують 1 – 2 краплями 5 н розчину сульфатної кислоти. Розчин ділять на 2 частини і перевіряють наявність у ньому фосфатної кислоти за допомогою амоній молібдату або магнезіальною сумішшю.

Визначення ізоелектричної точки казеїну

Білки дисоціюють з утворенням позитивно і негативно заряджених груп, оскільки являють собою амфотерні електроліти. При визначенні pH середовища можна домогтися такого відношення іонізуючих груп, при якому білкові молекули не матимуть заряду і розчин стає найменш стійким, білок випадає в осад. Досліджуючи поведінку білка за різних концентрацій іонів Гідрогену у розчині, знаходять значення pH середовища, яке відповідає ізоелектричній точці казеїну.

В 5 пробірок приливають із бюретки наступну кількість 0,1 н розчину ацетатної кислоти: 1 – 0,25 $см^3$; 2 – 0,5 $см^3$; 3 – 1,0 $см^3$; 4 – 2,0 $см^3$; 5 – 4,0 $см^3$. З другої бюретки в тій же послідовності в кожну пробірку додають 8,75 $см^3$, 8,5 $см^3$, 8,0 $см^3$, 7,0 $см^3$ і 5,0 $см^3$ води. Після додавання розчину казеїну в натрій ацетаті значення pH в одержаних сумішах становитиме відповідно 5,3; 5,0; 4,7; 4,4 і 4,1.

Готують 0,1 % розчин казеїну наступним чином: 0,2 г казеїну розчиняють при незначному нагріванні на водяній бані в 5 $см^3$ 0,1 н розчину натрій ацетату і доводять об’єм до 200 $см^3$ розчином натрій ацетату (0,1 н).

У кожну з пробірок приливають піпеткою по 1 $см^3$ розчину казеїну і спостерігають за ступенем помутніння в них. Там, де помутніння максимальне, pH розчину відповідає ізоелектричній точці білка (pH 4,7).

Лабораторна робота № 5
ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ БІЛКА. РОЗДІЛЕННЯ СУМІШІ АМІНОКИСЛОТ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння розділяти суміш амінокислот гідролізату білка методом розподільчої хроматографії на папері, навчитись підбирати систему розчинників, тип хроматографічного паперу, виявляти та ідентифікувати амінокислоти на хроматограмах.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про різновидності розділення суміші речовин; теорію розподільчої хроматографії, реагенти і апаратуру паперової хроматографії; знання про межі застосування хроматографії для розділення суміші речовин; вміння готувати суміш амінокислот для розділення, очищати їх від домішок, що заважають проведенню розділення, проявляти хроматограми, виявляти та ідентифікувати амінокислоти на хроматограмах.*

Розділення амінокислот засноване на їх різній розчинності в двох рідинах, що не змішуються. Однією з рідин слугує вода, іншою – насичений водою органічний розчинник. Водна фаза нерухома, оскільки фіксована на папері (спеціально виготовлений хроматографічний папір, поміщений у вологу камеру, утримує 20-22 % води). Рухомою фазою можуть бути різні органічні розчинники, насичені водою. Наприклад, ізопропіловий, ізобутиловий та бутиловий спирти, феноли та інші. Краплину суміші амінокислот чи гідролізату білка наносять на смужку хроматографічного паперу, кінець якого опускають в підібраний органічний розчинник. Розчинник підіймається по смужці, розчиняє нанесені на папір амінокислоти і

“тягне” їх за собою. Швидкість переміщення амінокислот залежить від ступеня їх розчинення в рухомій та нерухомій фазах. Чим більше розчинність амінокислоти у водній фазі і менша у неводній, тим повільніше молекула рухається в порівнянні з фоном органічного розчинника.

Положення окремих амінокислот на хроматографічному папері знаходять за допомогою кольорової реакції з нінгідрином.

Ідентифікація амінокислот на радіальній хроматограмі проводиться шляхом нанесення на ту ж саму хроматограму “свідків” – розчинів окремих амінокислот. Можливо також ідентифікувати амінокислоти за величиною R_f – відношенню відстані, пройденої амінокислотою від лінії старту (a) до відстані, пройденої фронтом розчинника (b) від лінії старту

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

Із хроматографічного паперу вирізають квадрат розміром 11 × 11 см. На одному з кутів квадрату роблять петлю з нитки. Простим олівцем проводять діагоналі і з точки їх перетину описують коло радіусом 10 мм. Сторони квадрату нумерують. Потім папір розміщують на чашці Петрі так, щоб він лежав на краях чашки (рис. 6).

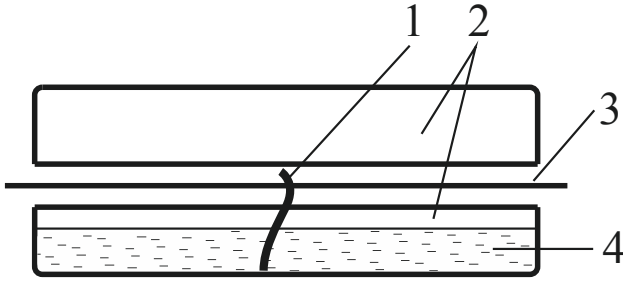


Рис. 6. Камера для радіальної хроматограми: 1 – паперовий гніт; 2 – чашка Петрі; 3 – радіальна хроматограма; 4 – розчинник

В середину кожної дуги, відокремленої діагоналями, за допомогою тонкого капіляра наносять розчини “свідків” і суміш амінокислот для аналізу.

Коли фронт розчинника доходить до країв чашки Петрі, хроматограму знімають, відмічають олівцем фронт розчинника, за петельку підвішують на штатив і сушать у сушильній шафі при температурі 105º С протягом 5 хв. (до зникнення запаху розчинника).

Висушену хроматограму проявляють – обприскують із пульверизатора розчином нінгідрину в ацетоні і знову розміщують у сушильній шафі. Через декілька хвилин на хроматограмі з'являються плями, які вказують положення амінокислот (рис. 7).

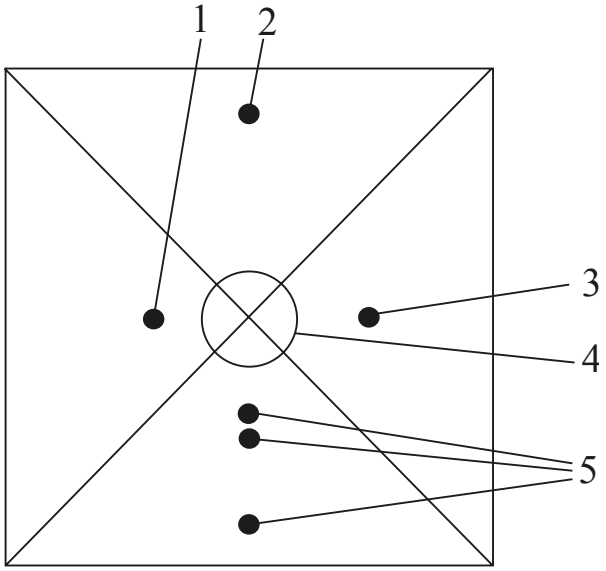


Рис. 7. Проявлена радіальна хроматограма: 1 – амінокислота-свідок 1; 2 – амінокислота-свідок 2; 3 – амінокислота-свідок 3; 4 – лінія старту; 5 – досліджувана суміш амінокислот

Для кожної амінокислоти розраховують значення R_f. Амінокислоти досліджуваної суміші ідентифікують, порівнюючи значення їх R_f з R_f амінокислот-свідків.

Лабораторна робота № 6
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА ЗА МЕТОДОМ ЛОУРІ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння кількісного експрес-визначення водорозчинних білків колориметричним методом з використанням реакції Фоліна; ознайомити студентів з іншими методами кількісного визначення білків, розкрити переваги і недоліки методу Лоурі порівняно з іншими методами; розширити знання про суть колориметричних методів визначення концентрації речовин.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *уміння визначати вміст білка в біологічних об'єктах колориметричним методом; навички роботи з фотоелектроколориметром, побудова калібрувального графіку для визначення білка за методом Лоурі, визначення вмісту білка у досліджуваній системі за калібрувальним графіком.*

За методом Лоурі вимірюють інтенсивність забарвлення розчину, яке з'являється в результаті протікання принаймні двох реакцій на білок: біуретової реакції і реакції Фоліна з залишками тирозину і цистеїну у складі білкових молекул. Реактив Фоліна являє собою суміш фосфорно-вольфрамової і фосфорно-молібденової кислот. За участі білка відбувається відновлення зазначених кислот. Відновлені форми мають інтенсивне синє забарвлення.

Хід роботи. Готують розчин для проведення визначення білка за методом Лоурі. Для цього спочатку змішують 49 $см^3$ розчину А з 1 $см^3$ розчину В. Розчин А являє собою 2 % розчин натрій карбонату в 0,1 М розчині натрій гідроксиду. Розчин В – 0,58 % розчин купрум сульфату в розчині 1 % натрій цитрату або в 3,33 % натрій чи калій тартрату. До 1 $см^3$ досліджуваного білкового розчину, що містить від

1 до 100 мкг білка, додають 4 $см^3$ суміші розчинів А і В, перемішують і залишають на 10 хвилин за кімнатної температури. Потім швидко додають із піпетки 0,4 $см^3$ реактиву Фоліна, енергійно перемішують і залишають на 30 – 90 хвилин до появи забарвлення. При цьому жовте забарвлення реактиву Фоліна поступово переходить у синє. Оптичну густину розчину визначають на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 750 нм у кюветі з робочою довжиною 10 мм. Вміст білка у досліджуваній пробі визначають за калібрувальним графіком, який будують за розчином будь-якого чистого білка відомої концентрації.

Перевагами використання методу Лоурі є короткий час визначення порівняно з іншими методами і надзвичайно велика чутливість, що надає можливість визначати слідові кількості білка. Недоліками методу є: можливість визначати лише водорозчинні білки, не досить стійке забарвлення розчину, що зменшує точність вимірювання.

Контрольні питання

1. Надайте класифікацію білків, зазначте основні групи простих білків та охарактеризуйте їх. Опишіть основні методи фракціонування і очистки білків.
2. Перелічіть форми і конформації білкових молекул та охарактеризуйте методи їх визначення.
3. Охарактеризуйте складні білки: склад та будова, функції, приклади.
4. Опишіть третинну структуру білкової молекули, перелічіть методи її дослідження, типи зв'язків, що її стабілізують. Наведіть приклади.
5. Охарактеризуйте методи кількісного визначення білків.
6. Назвіть види хімічних зв'язків у білковій молекулі та їх роль у стабілізації просторової структури білків.
7. Дайте характеристику олігомерної структури білків. Її будова та типи зв'язку. Наведіть приклади.
8. Перелічіть фізико-хімічні властивості білків. Зазначте методи визначення відносної молекулярної маси білків.
9. Зазначте, завдяки якій особливості електронної будови пептидної групи забезпечується максимальна кількість водневих зв'язків у вторинній структурі.
10. Перелічіть функціональні групи, що зустрічаються у радикалах амінокислотних залишків. Яке структурне і функціональне значення: а) гідрофобних груп; б) кислих та основних груп; в) сульфгідрильних груп; г) полярних незаряджених груп? Які з цих груп утворюють в структурі білка слабкі зв'язки, а які – сильніші?
11. Поясніть механізм порушення ферментативної функції білків травного тракту при вживанні алкоголю.
12. Перерахуйте зв'язки, що руйнуються в молекулі білка при а) денатурації; б) гідролізі. Чи дає денатурований білок біуретову реакцію? Чому?
13. Покажіть специфіку будови і складу структурних білків біологічних мембран.

14. Поясніть на конкретних прикладах види зв'язку між білковою складовою і небілковим компонентом в ліпо- і глікопротеїдах. Яка біологічна роль білків зазначених класів?
15. Поясніть, чим відрізняється спорідненість до кисню гемоглобіну та *міоглобіну*. Яка доцільність цієї відмінності? Чи є коректним вислів, що гемоглобін є тетрамером міоглобіну?
16. Поясніть функціональне значення кооперативності субодиниць білків. За рахунок яких взаємодій вона забезпечується? Наведіть приклади.
17. Охарактеризуйте методи якісного і кількісного визначення амінокислот та амінокислотного складу білків.
18. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості амінокислот.
19. Надайте загальні уявлення про білки. Охарактеризуйте функції білків в організмі. Наведіть приклади.
20. Опишіть просторову будову та параметри пептидного зв'язку. Зазначте методи доказу його структури.
21. Наведіть класифікацію, загальні принципи будови та хімічні властивості амінокислот, які входять до складу тваринних білків.

Завдання для самостійної роботи

1. При яких значеннях pH 0,1 М розчин аланіну існує у формі $CH_3–CH(NH_3^+)–COOH$; аміногрупи іонізовані у половині молекул аланіну; середній сумарний заряд аланіну дорівнює нулю; більшість молекул аланіну перебуває у вигляді $CH_3–CH(NH_2)–COO^–$?
2. Тетрапептид складається з *ала, ліз, про* і *вал*. В реакції з 2,4-ДНФБ і наступним гідролізом одержано 2,4-ДНФБ-ала. При гідролізі тетрапептиду трипсином утворюється дві сполуки, одна з яких забарвлюється нінгідрином у синьо-фіолетовий колір, друга – в жовтий. Яка послідовність амінокислот в тетрапептиді?
3. Визначити загальний заряд молекули поліпептиду такого складу: *асп-гіс-три-сер-тир-лей-глі-арг-про-глі* за pH = 11, напрям його руху в електричному полі та I_t.
4. Побудувати криву титрування 0,1 М розчину гліцину (в 0,1 н HCl) 0,1 н розчином NaOH. Вказати, при якому значенні pH гліцин знаходиться в формі позитивно зарядженого іону.

5. За яких значень pH амінокислота гліцин у 0,1 М розчині: а) існує у формі $^{+}NH_3–CH_2–COOH$; б) аміногрупи іонізовані у половини молекул гліцину; в) середній сумарний заряд гліцину дорівнює нулю; г) більшість молекул гліцину перебуває у вигляді $NH_2–CH_2–COO^{-}$?
6. Який поліпептид краще розчиняється у воді: а) *(глі)$_{20}$* чи *(глу)$_{20}$* за pH 7; б) *(ала-асп-глі)$_5$* чи *(асп-сер-гіс)$_5$* за pH 9?
7. Один з білків людини має наступну амінокислотну послідовність: *сер-тир-сер-мет-глу-гіс-фен-арг-три-глі-ліз-про-вал-глі-ліз-арг-арг-про-вал-ліз-вал-тир-про-асп-ала-глі-глу-асп-глн-сер-ала-глу-ала-фен- про-мет-глу-фен*. Який сумарний заряд молекули при pH 7, якщо прийняти до уваги pK радикалів амінокислот загальноприйнятими? Скільки пептидів можна одержати при обробці білку бромціаном?
8. Визначте pI для а) лейцину; б) серину; в) лізину; г) глутамінової кислоти.
9. Визначте сумарний заряд (“+”, “–” або 0) для а) серину; б) треоніну; в) цистеїну; г) аспарагінової кислоти; д) аргініну за таких значень pH: а) 1,5; б) 6,0; в) 8,5; г) 11,0.
10. Суміш гліцину, аланіну, глутамінової кислоти, лізину, гістидину та серину розділили методом електрофорезу на папері з pH 6,0. Які амінокислоти рухались до аноду, які – до катоду, а які залишились на лінії старту?
11. Які пептиди утворюються під час обробки а) трипсином; б) хімотрипсином; в) пепсином; г) бромціаном; д) карбоксипептидазою поліпептиду: 1) *вал-ліз-глу-фен-ала-ліз-арг-лей-про*; 2) *сер-ліз-ала-вал-цис-асн-три-мет-фен*; 3) *ілей-тир-мет-про-глі-глі-гіс-глу-сер*?
12. З нормальної мозкової тканини було виділено групу поліпептидів, що впливають на передачу нервового імпульсу в певних ділянках мозку. Ці поліпептиди відомі під назвою опіоїдів, оскільки вони приєднуються до специфічних рецепторів, які зв’язують опіати (алкалоїди опіуму), наприклад морфін. Таким чином ці пептиди мають деякі властивості опіатів і вважаються власними засобами знеболення, що виробляються в мозку. Використовуючи наведені нижче відомості, визначте амінокислотну послідовність опіоїду лей-енкефаліну. Після обробки поліпептиду 2,4-динітрофторбензолом з наступним повним гідролізом і хроматографічним розділенням продуктів була виявлена присутність 2,4-динітрофенільного похідного тирозину. Вільний тирозин при цьому не знайдений. Частковий гідроліз поліпептиду хімотрипсином з

наступним хроматографічним розділенням продуктів дали *лей*, *тир* і більш короткий пептид. Повний гідроліз останнього і наступний амінокислотний аналіз виявив присутність *глі* і *фен* у співвідношенні 1 : 1.

13. Хвороба серповидноклітинна анемія зумовлена генетичним дефектом у структурі гемоглобіну людини: в двох з чотирьох ланцюгів молекули в шостому положенні замість залишку глутамінової кислоти міститься залишок валіну. Як ця заміна впливає на розчинність гемоглобіну у воді?
14. За яких значень pH найбільш ефективно розділити білкові суміші методом електрофорезу: а) сироватковий альбумін (pI 4,9) і гемоглобін (pI 6,8); б) міоглобін (pI 7,0) і хімотрипсиноген (pI 9,5); в) яєчний альбумін (pI 4,5), сироватковий альбумін (pI 4,9) та уреаза (pI 5,0)?

Задачі

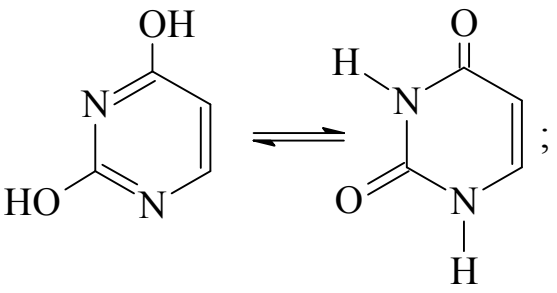
1. До 1 дм^3 1,0 М розчину гліцину в ізоелектричній точці додали 0,3 моль HCl. Наскільки змінилось значення pH одержаного розчину? Яким було б значення pH, якщо замість HCl додали б 0,3 моль NaOH?
2. За даними кількісного амінокислотного аналізу в альбуміні бика міститься 0,58 % триптофану. Розрахувати: а) мінімальну молекулярну масу білка; б) скільки залишків триптофану міститься в молекулі альбуміну, якщо за даними гель-фільтрації молекулярна маса його становить 70000.
3. Розрахувати довжину (нм) поліпептидного ланцюга, який складається з 105 амінокислотних залишків, якщо спіралізовано тільки 20 % поліпептиду.
4. Скільки молекул β-галактозидази міститься в одній молекулі *E.coli*? Клітина довжиною 2 мкм, діаметром 1 мкм. Молекулярна маса β-галактозидази – 450000. Середня густина клітини – 1,2 г/см^3. 14 % всієї маси клітини припадає на долю розчинних білків, серед яких β-галактозидаза становить 1 %.
5. До 0,5 М розчину лейцину в ізоелектричній точці додали 0,1 дм^3 хлоридної кислоти з титром 0,012 г/см^3. Визначити pH розчину.

6. Скільки КОН слід додати до 200 $см^3$ 0,01 М розчину лізину в повністю протонізованій формі, щоб одержати буферний розчин з pH 8,0?
7. Розрахувати загальну довжину усіх поліпептидних ланцюгів однієї клітини, що містить 10^6 молекул білку, які мають молекулярну масу 40000. Вважати, що всі білкові молекули знаходяться в конформації α-спіралі.
8. Скільки лугу (NaOH) слід додати до 350 $см^3$ 0,02 М розчину повністю протонізованої глутамінової кислоти, щоб одержати буферний розчин з pH 4?
9. Молекулярна маса пептиду дорівнює 1050 ± 25. Під час аналізу було встановлено, що вміст гліцину в пептиді становить 0,3 г, аланіну – 0,18 г, фенілаланіну – 0,33 г. Розрахуйте емпіричну і молекулярну формулу пептиду.
10. Розрахуйте загальну довжину всіх поліпептидних ланцюгів однієї молекули білка, що складається з 10^6 ланцюгів, кожний молекулярною масою 40000. Вважайте, що всі ланцюги перебувають у конфігурації α-спіралі, середня молекулярна маса одного амінокислотного залишку – 120 Да.
11. Яка маса (г) і кількість (моль, молекули) гемоглобіну міститься в одному еритроциті і яка частка об'єму еритроциту припадає на гемоглобін? Для розрахунків використайте наступні відомості: в крові людини міститься близько 120 г гемоглобіну на 1 $дм^3$, а на 1 $см^3$ крові припадає близько $5{,}0\times10^9$ еритроцитів. Для простоти розрахунків прийміть, що еритроцит – це циліндр висотою 1,8 мкм і діаметром 8,0 мкм. Діаметр глобулярної молекули гемоглобіну – 6,8 нм, його молекулярна маса 64000 Да. На підставі здійснених розрахунків оцініть, чи розташовані молекули гемоглобіну в еритроцитах достатньо близько одна від одної, щоб взаємодіяти між собою. Якщо так, то чи може взаємодія між молекулами мутантного гемоглобіну S в серповидних еритроцитах вплинути на форму еритроциту?
12. Обчисліть мінімальну молекулярну масу білка, якщо 1 г його містить $0{,}025\times10^{-3}$ мкмоль кінцевих α-аміногруп. За допомогою яких реакцій визначають α-аміногрупи?
13. Вміст лізину в рибонуклеазі становить 10,5 % за масою. Обчисліть мінімальну молекулярну масу рибонуклеази. Яка молекулярна маса молекули, якщо в ній міститься 10 залишків лізину?

НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

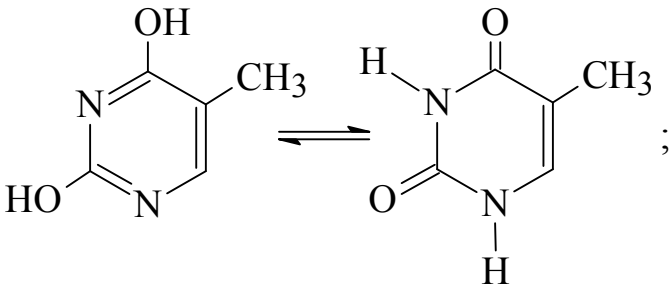
Нуклеїнові кислоти – високомолекулярні органічні біополімери, які побудовані з великої кількості мононуклеотидів, зв'язаних між собою фосфодіефірними зв'язками. Структурною частиною нуклеїнової кислоти є нуклеотид, до складу якого входять азотиста основа, вуглевод і фосфатна кислота, тому при гідролізі нуклеїнові кислоти розкладаються до азотистих основ, пентоз (рибози або дезоксирибози) і фосфатної кислоти.

Азотисті основи. Виходячи із структури молекул, основи, що входять до складу нуклеотидів, розділяють на дві групи: *пуринові* (аденін [A] і гуанін [G]), утворені сполученими п'яти- і шестичленним гетероциклами і *піримідинові* (цитозин [C] і тимін [T], урацил [U]) – утворені одним шестичленним гетероциклом.



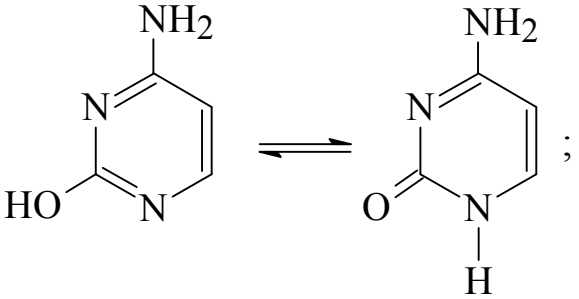
Енольна форма Кетоформа

Урацил



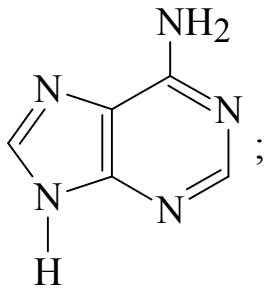
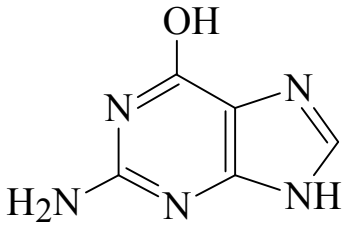
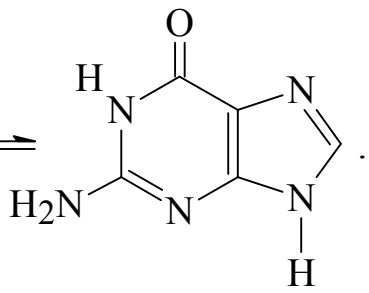
Енольна форма Кетоформа

Тимін



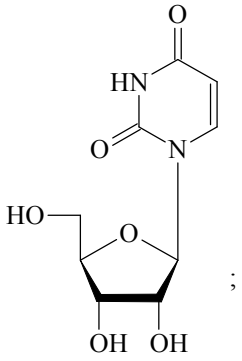
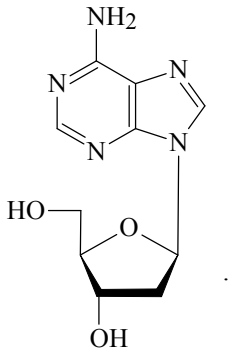
Енольна форма Кетоформа

Цитозин

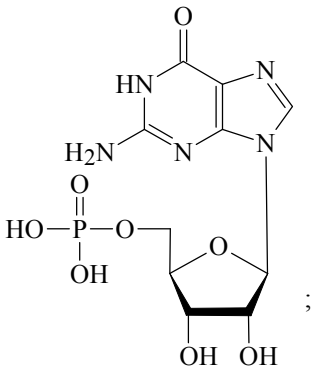
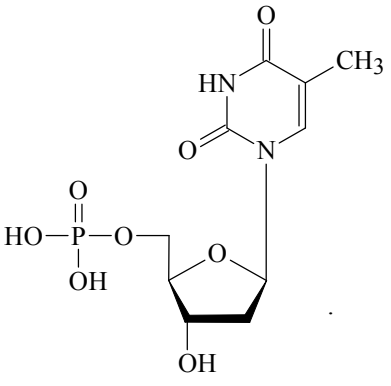
Аденін Гуанін

В результаті взаємодії гідроксилу вуглеводу (рибози чи дезоксирибози), який знаходиться біля першого атома Карбону з атомом Гідрогену біля дев'ятого атома Нітрогену азотистої основи з утворенням нового β-глікозидного зв'язку N–H (в результаті відщеплення молекули води), утворюється *нуклеозид*.

Рибонуклеозид Уридин Дезоксирибонуклеозид Дезоксиаденозин

Нуклеотиди – це фосфатні етери нуклеозидів.

Рибонуклеотид Гуанілат (GMP) Дезоксирибонуклеотид Дезокситимідилат (dTMP)

Розрізняють два види нуклеїнових кислот: дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК) та рибонуклеїнові кислоти (РНК). Основні властивості нуклеїнових кислот показано в таблиці 11.

Таблиця 11

Характеристика нуклеїнових кислот

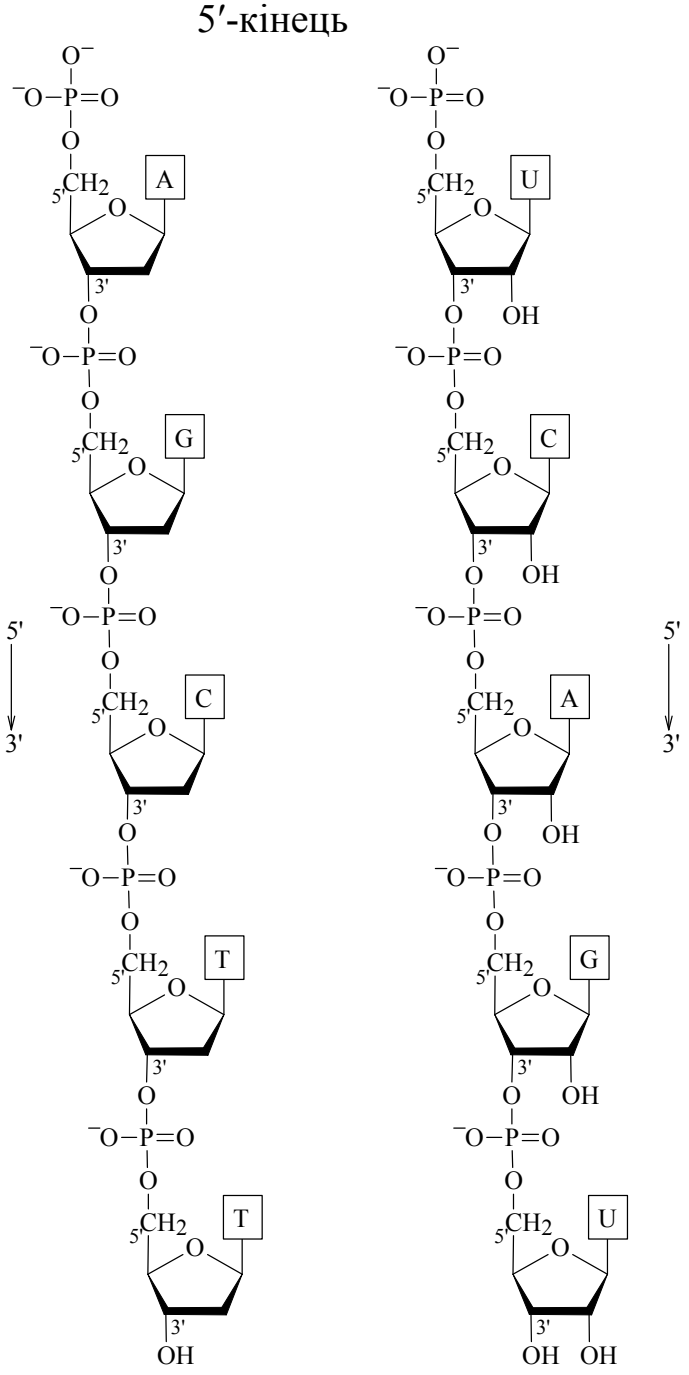
Ознаки	*Нуклеїнова кислота*	
Види нуклеїнових кислот	ДНК	РНК
Місцезнаходження в клітині	Ядро, мітохондрії, пластиди	Ядро, рибосоми, цитоплазма, мітохондрії, пластиди
Мономери	Дезоксирибонуклеотиди (до складу нуклеотиду ДНК входить вуглевод – дезоксирибоза)	Рибонуклеотиди (до складу нуклеотиду РНК входить вуглевод – рибоза)
Будова молекули	Подвійна нерозгалуджена правозакручена спіраль	Одинарний полінуклеотидний ланцюг
Склад мононуклеотидів	Азотисті основи – аденін (A), гуанін (G), тимін (T), цитозин (C); дезоксирибоза; залишок фосфатної кислоти	Азотисті основи – аденін (A), гуанін (G), урацил (U); цитозин (C); рибоза, залишок фосфатної кислоти
Типи мононуклеотидів	Аденіловий (A), гуаніловий (G), тимідиловий (T), цитидиловий (C)	Аденіловий (A), гуаніловий (G), уридиловий (U), цитидиловий (C)
Функції	Хімічна основа хромосомного генетичного матеріалу (гену); бере участь у процесах зберігання, передачі, реалізації і зміни спадкової інформації	Бере участь у процесах реалізації спадкової інформації, тобто в процесах синтезу білка

Для нуклеїнових кислот властивий високий рівень організації.

Первинна структура нуклеїнових кислот – певна послідовність розташування нуклеотидів у полінуклеотидних ланцюгах. Для кожної

нуклеїнової кислоти характерна своя первинна структура, яка і визначає видову специфічність живих організмів. Це обумовлює велику різноманітність індивідуальних молекул ДНК і РНК.

Ланцюгам ДНК і РНК характерна полярність, або напрямок, оскільки всі міжнуклеотидні 3' – 5' фосфодіефірні зв'язки мають однакову орієнтацію вздовж ланцюга. Розрізнять 5′- та 3′-кінці ланцюга.



Будова ДНК

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) характеризуються великими значеннями молекулярних мас (100000 – 3000000) та великою кількістю мононуклеотидів (80 – 100000).

Досліджуючи будову молекули ДНК за допомогою рентгеноструктурного та інших видів аналізу, було встановлено, що:

– молекула ДНК складається з двох антипаралельних ланцюгів. *Азотисті основи* обох полінуклеотидних ланцюгів знаходяться всередині уявного просторового циліндру, *пентози* та залишки фосфатної кислоти – ззовні;

– виток спіралі (крок) містить 10 пар нуклеотидів і складає 3,4 нм, атоми Фосфору розташовані на відстані 1 нм від осі молекули. Діаметр спіралі ДНК складає 20 нм, довжина в середньому – 1500–2000 нм, а іноді 100000 нм і більше;

– азотисті основи полінуклеотидних ланцюгів розміщені по принципу *комплементарності* (взаємодоповнення). Ця закономірність відома під назвою правил Чаргаффа:

- пуринові азотисті основи одного полінуклеотиднго ланцюга розміщуються проти піримідинових основ другого полінуклеотидного ланцюга: аденін проти тиміну (стабілізується двома водневими зв’язками); гуанін проти цитозину (стабілізується трьома водневими зв’язками);
- в молекулі ДНК сума пуринових основ дорівнює сумі піримідинових: A+G=T+C, або $\frac{A+G}{T+C}=1$;
- кількість аденіну дорівнює кількості тиміну (A = T), гуаніну дорівнює цитозину (G = C).

Співвідношення сум пар A+T і G+C носить назву *коефіцієнта специфічності* і є однією з найважливіших характеристик ДНК. Коефіцієнт специфічності був відкритий у 1962 році Білозерським і Спіріним і суть його полягає у наступному, якщо:

1) $\frac{G+C}{A+T}<1$, то молекула ДНК відноситься до АТ-типу і є характерною для організмів вищих тварин та рослин;

2) $\frac{G+C}{A+T} > 1$, то молекула ДНК відноситься до GC-типу і є характерною для мікроорганізмів.

Структура подвійної спіралі ДНК (рис. 8) була запропонована Френсісом Кріком і Джеймсом Уотсоном у 1953 році на основі рентгеноструктурних даних, отриманих Морісом Вілкінсом і Розаліндою Франклін, і "правил Чаргаффа", згідно з якими в кожній молекулі ДНК дотримуються чіткі співвідношення, що зв'язують між собою кількість азотистих основ різних типів.

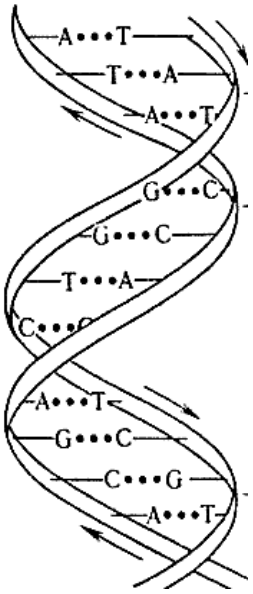
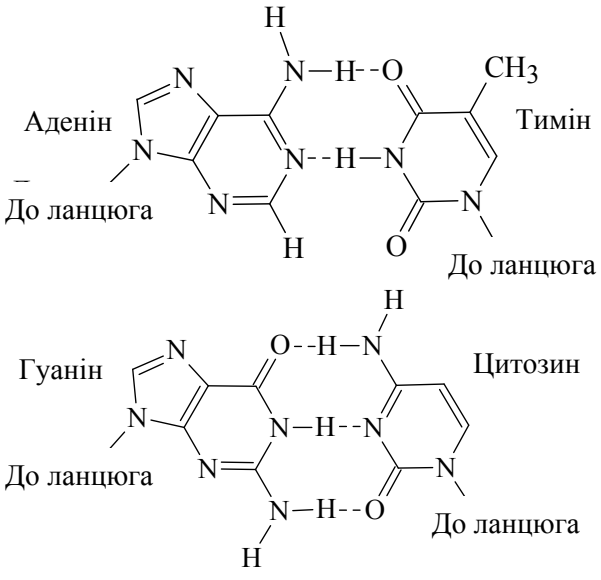


Рис. 8. Схема подвійної спіралі ДНК

Кожна основа одного з ланцюгів зв'язується з певною основою іншого, утворюючи пару за принципом *комплементарності.*



Аденін утворює пару з тиміном за допомогою двох водневих зв’язків, а гуанін з цитозином – трьох водневих зв’язків. Тому інформація одного ланцюга доповнюється інформацією з другого. Окрім водневих зв’язків, подвійну спіраль також стабілізують стекінг-взаємодії, які не залежать від послідовності основ. Специфічність взаємодії між комплементарними парами основ важлива для реплікації ДНК і функціонування в живих організмах.

Денатурація та ренатурація ДНК

Найважливішою особливістю внутрішньомолекулярних взаємодій, що стабілізують макромолекулярну структуру ДНК, є їх кооперативність. Тобто, при денатурації подвійної спіралі, побудованої з комплементарних гомополінуклеотидів, за нагрівання або в лужному середовищі відбувається одночасне руйнування всіх ланок спіральної структури та утворення ізольованих полінуклеотидних ланцюгів. Такий процес називають плавленням подвійної спіралі (рис. 9). Його описують кривою плавлення, яка, у свою чергу, характеризується температурою плавлення $T_{пл}$ і шириною температурного інтервалу, в якому відбувається руйнування подвійної спіралі. На розрив водневих зв’язків у GC-парі потрібно більше енергії, ніж у парі AT, і температура плавлення подвійних спіралей, побудованих лише з AT і лише з GC-пар, відрізняються на 40°C.

Відсоток GC-пар і довжина молекули ДНК визначають кількість енергії, необхідної для дисоціації ланцюжків: довгі молекули ДНК з великим вмістом GC більш “тугоплавкі”, тобто мають більш високу температуру плавлення, ніж ті, що містять більшу кількість AT-пар.

При денатурації ДНК відбувається одночасне (кооперативне) плавлення окремих сегментів ДНК. Температура плавлення ДНК сильно залежить від концентрації катіонів (металів) в розчині, що екранують негативні заряди її фосфатних груп. Денатурація ДНК супроводжується збільшенням оптичної густини розчину в ультрафіолетовій ділянці спектра (близько 260 нм). Таке явище носить назву *гіперхромного* ефекту.

Денатуровані ДНК здатні до відновлення вихідної двоспіральної структури (реакція ренатурації). Водневі зв'язки між комплементарними азотистими основами можуть розриватись і

відновлюватись, тому ланцюги подвійної спіралі можуть розходитися і сходитися як замок-змійка за дії ферментів (хелікази) або високої температури (плавлення ДНК).

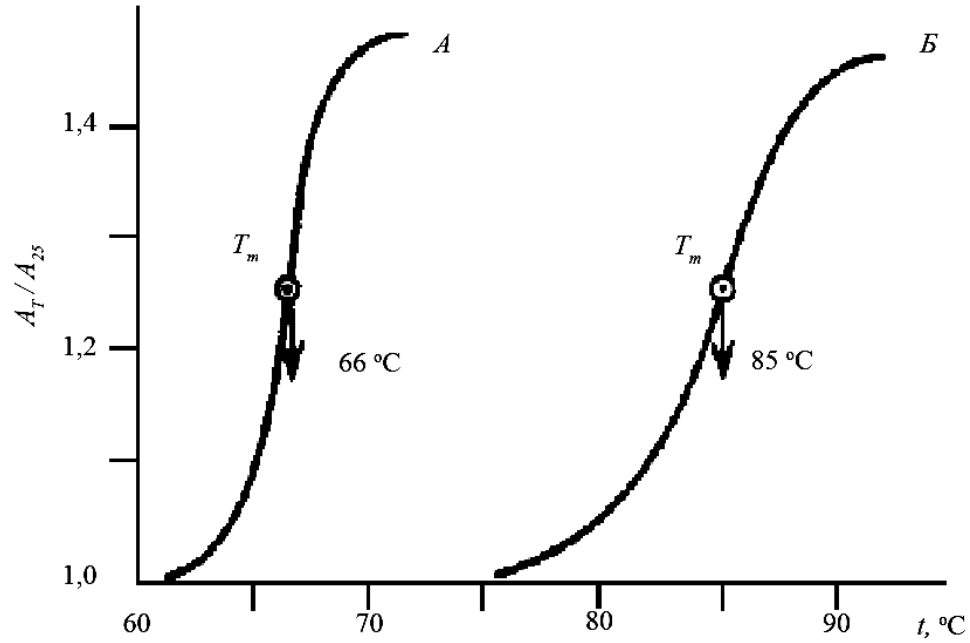


Рис. 9. Криві плавлення двоспірального комплексу: *А* – полі(dT) – полі(dA), *Б* – ДНК бактерії *Proteus vulgaris*; A_T/A_{25} – відношення оптичної густини ДНК за даної температури до оптичної густина нативної ДНК (25°С)

У реакції ренатурації можна виділити дві окремі стадії (рис. 10).

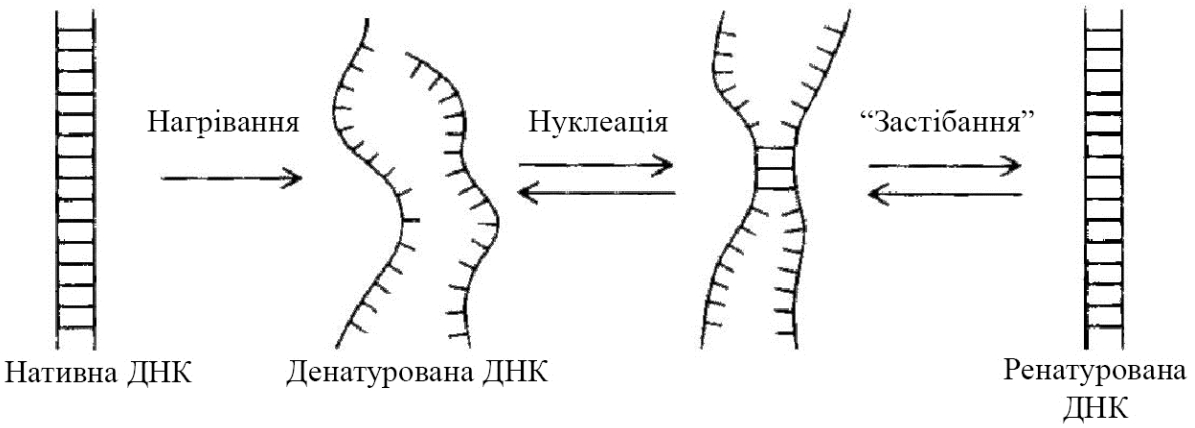


Рис. 10. Послідовні етапи денатурації та ренатурації фрагментів ДНК

Перша стадія – *нуклеація* – полягає в утворенні водневих зв'язків між кількома комплементарними основами, що належать двом різним ланцюгам. Решта взаємно комплементарних основ шикуються одна проти одної, відбувається утворення зв'язку між двома різними одноланцюговими молекулами. Друга стадія – реакція "застібання блискавки", при якій встановлюються водневі зв'язки між вишикуваними один проти одного комплементарними нуклеотидами. Лімітуючою є стадія утворення перших зв'язків між ланцюгами.

Поліморфізм подвійної спіралі

В залежності від концентрації іонів і нуклеотидного складу молекули, подвійна спіраль ДНК у живих організмах існує в різних формах, тобто в кількох можливих конформаціях. Наразі у біологічних системах ідентифіковані та описані наступні конформації: A-, B-, C- та Z-форми ДНК. Конформація ДНК залежить від послідовності нуклеотидів в молекулі, величини суперспіралізації, хімічної модифікації основ і концентрації хімічних речовин у розчині. Нативна ДНК в клітині знаходиться в B-формі.

Альтернативні конформації подвійної спіралі відрізняються своєю геометрією та розмірами. *A-форма* – ширша правостороння спіраль, з дрібнішою і ширшою малою борозенкою і вужчою і глибшою великою борозенкою. Ця форма зустрічається *in vitro* в зневоднених зразках ДНК, крім того вона, ймовірно, зустрічається в живих клітинах у гібридних дуплексах ДНК і РНК та в комплексах ферментної ДНК. Вважається, що A-форма ДНК приймає участь в процесі транскрипції, B-форма – в реплікації, а *C-форма* використовується для зберігання хроматину в надмолекулярних структурах. Сегменти ДНК із модифікованими (метильованими) основами можуть проходити через більші конформаційні зміни і приймають *Z-форму*. Ланцюжки закручуються в ліву подвійну спіраль, на відміну від правої спіралі B-форми. Також вважається, що Z-форма ДНК приймає участь у кросинговері.

Суперспіралізація ДНК

У звичайному стані подвійна спіраль ДНК робить один оберт на кожні 10,4 пар основ, але в суперспіралізованому стані може бути згорнута тугіше. Виділяють два типи суперскрученості: позитивну – у напрямі ходу витків, при якому основи розташовані ближче одна до одної; і негативну – в протилежному напрямку. У природі молекули

ДНК зазвичай перебувають в стані негативної суперспіралізації, який вноситься ферментами топоізомеразами. Ці ферменти створюють та знімають суперспіралізацію, що виникає в процесі функціонування молекули в клітині. Суперспіральна конформація ДНК характерна для хромосом вищих організмів. Подібна структура стабілізується за рахунок ковалентних зв'язків із залишками амінокислот, що входять до складу білків, які утворюють нуклеопротеїдний комплекс (хроматин). Отже, ДНК еукаріотичних клітин асоційована з білками переважно лужного характеру – гістонами, а також кислими білками та фосфопротеїдами.

Наведемо основні характеристики ДНК:

1. Молекула ДНК має первинний (послідовність розташування нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюгу), вторинний (подвійна спіраль – хелікс) і третинний (упаковка вторинної структури у надмолекулярні комплекси з білками) рівні організації.
2. Локалізована в клітинних еукаріот у ядрах, мітохондріях та пластидах, а у прокаріот – складає основу нуклеоїду.
3. Зв'язана з білками основного характеру (у еукаріот – гістони).
4. Здатна до самовідтворення в клітинах шляхом реплікації (процес подвоєння батьківських молекул ДНК).
5. Основний носій інформації щодо будови і структури білків організму, його розвитку і функціонування. Реалізація генетичної інформації відбувається під час транскрипції, коли на певних ділянках нуклеотидної послідовності (генах) синтезуються одноланцюгові молекули РНК за принципом комплементарності.

Еукаріотичні клітини містять більшу кількість молекул ДНК, яку нерівномірно розподілено по декількох хромосомах у вигляді комплексів з багаточисельними білками.

Хромосома прокаріотичної клітини являє собою одну довгу дволанцюгову молекулу ДНК, зібрану в компактну структуру – нуклеоїд. Молекулярна маса хромосоми прокаріот більш ніж 2×10^9 Да.

Послідовність нуклеотидів "кодує" інформацію про різні типи РНК: кодуючі – матричні або інформаційні (мРНК або іРНК) – та некодуючі – рибосомальні (рРНК), транспортні (тРНК), каталітичні та інші. Всі ці типи РНК синтезуються на матриці ДНК у процесі транскрипції. Їх роль у біосинтезі білків та інших процесах життєдіяльності клітини різна.

Будова РНК

Полінуклеотидний ланцюг РНК містить від 2 до 3000000 мононуклеотидів. Молекулярна маса РНК коливається в межах 700 – 16000000. У результаті досліджень структури РНК було встановлено, що:

1. До складу нуклеотидів РНК входить пентоза – рибоза.
2. Нуклеотиди зв’язані між собою 3′–5′ фосфодіефірними зв’язками.
3. Одноланцюгова РНК спіралізована лише на коротких ділянках за рахунок спарювання комплементарних основ, і вони нагадують дволанцюгові (рис. 11). Молекула РНК може, скручуючись, утворювати петлі та створювати вузлики за принципом комплементарності між петлями і одноланцюговими ділянками (тРНК, рис. 12).

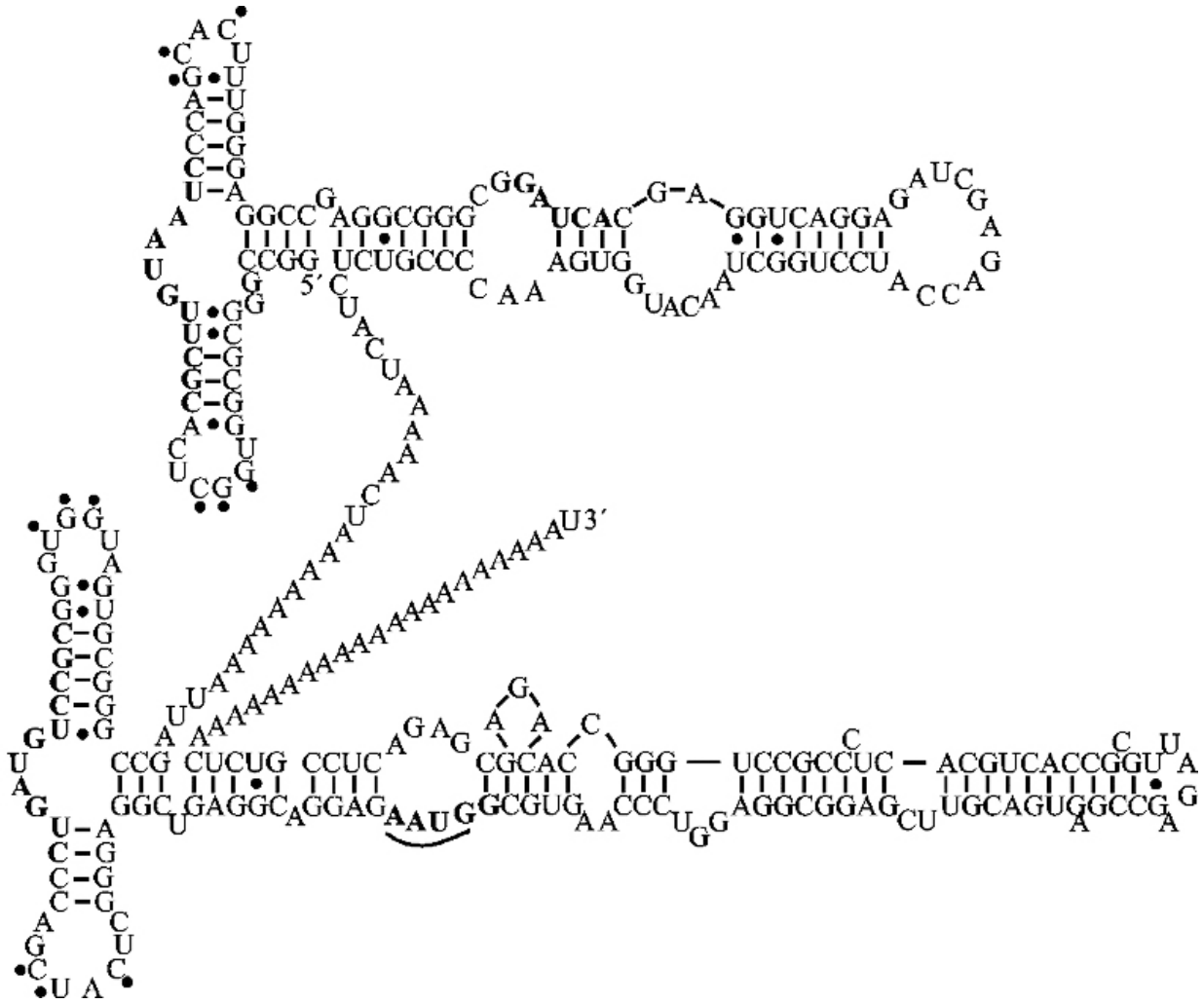
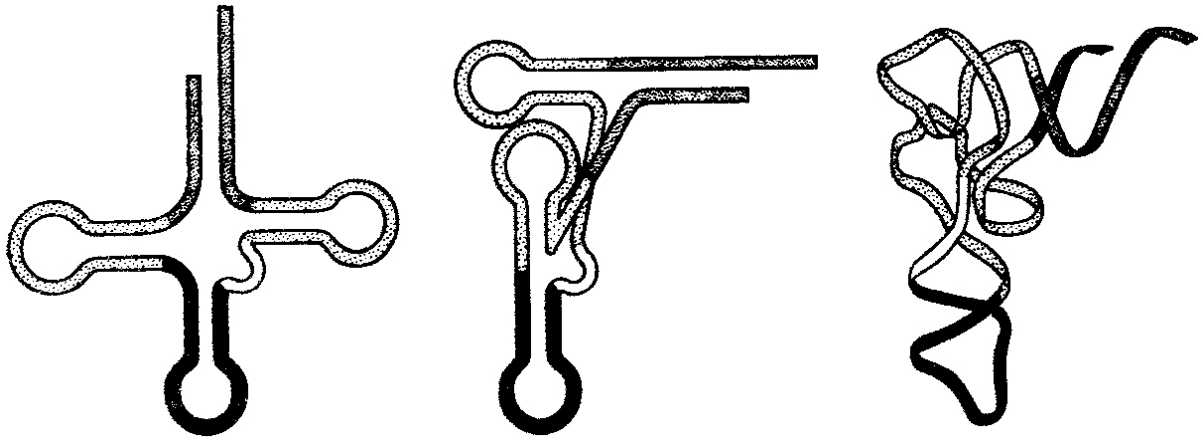


Рис. 11. Вторинна структура *Alu*-РНК

4. Основне місце локалізації в клітині – внутрішньоклітинний простір, а також ядро, пластиди та мітохондрії у еукаріот.
5. Кількість РНК постійно змінюється і залежить від інтенсивності обмінних процесів в клітині.



А *Б* *В*

Рис. 12. Просторова організація тРНК: А – вторинна структура у вигляді "листа конюшини", яка визначається її первинною структурою; Б – двовимірна проекція третинної структури; В – схема упаковки молекули тРНК в просторі

Існує декілька видів РНК, які відрізняються за певними ознаками (табл. 12).

Таблиця 12

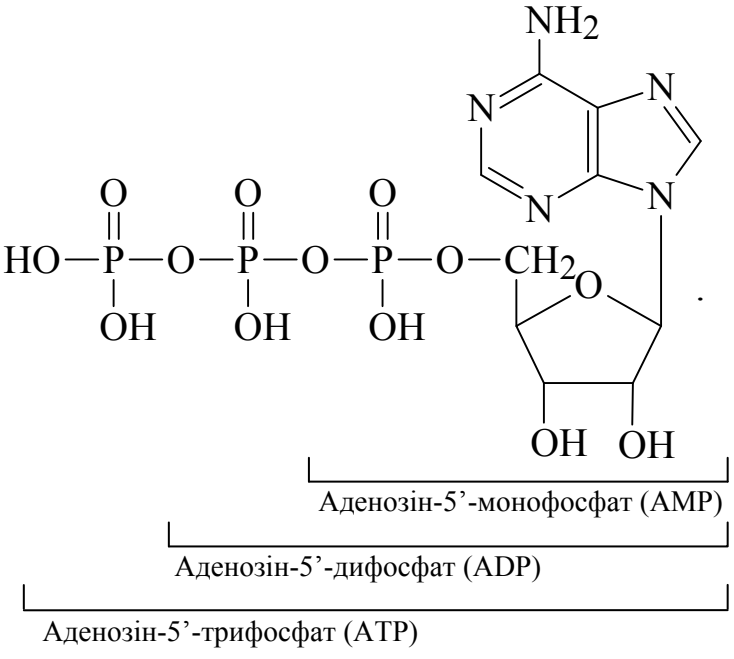
Види РНК

Ознаки	*іРНК (інформаційна РНК)*	*тРНК (транспортна РНК)*	*рРНК (рибосомальна РНК)*
Кількість мономерів у ланцюгу	300-30 тисяч	70-90 тисяч	3-5 тисяч
Вміст (%) у клітині	5	10	85
Локалізація у клітині	Ядро, цитоплазма	Цитоплазма	Рибосоми
Функції	Транскрипція, трансляція	Транспорт амінокислот до місця синтезу білка	Структурна, входять до складу рибосом

АТР, її будова та функції

Нуклеотиди у клітині зустрічаються не тільки як структурні елементи нуклеїнових кислот, але і як самостійні функціональні молекули. Найбільше значення в життєдіяльності клітини мають аденілові нуклеотиди – моно-, ди- і трифосфатні ефіри аденозина, які містять аденін, рибозу і один (аденозинмонофосфатна, AMP), два (аденозиндифосфатна, ADP) або три (*аденозинтрифосфатна*, ATP) залишки фосфатної кислоти, з'єднані макроергічним зв'язком. Ці сполуки містяться у всіх живих організмах і відіграють важливу роль в обміні речовин. Приєднання фосфатних залишків до AMP супроводжується акумуляцією енергії, а їх гідролітичне відщеплення – її виділенням. Енергія, яка вивільнилась, використовується в процесі життєдіяльності клітин.

AMP є універсальною макроергічною сполукою, в якій із трьох залишків фосфатної кислоти два – високоенергетичні (макроергічні). Один із них або два легко відщеплюються під впливом ферментів, що супроводжується виділенням енергії, яка використовується для різноманітних процесів клітини. Відщеплення однієї молекули фосфатної кислоти супроводжується виділенням приблизно 42 кДж енергії:



Ці процеси відбуваються в клітинах постійно, в результаті чого ATP швидко оновлюється. Так, наприклад, у людини кожна молекула ATP розщеплюється і знову утворюється приблизно 2400 раз за добу.

Лабораторна робота № 7
ВИДІЛЕННЯ РИБОНУКЛЕОПРОТЕЇДІВ З ДРІЖДЖІВ І ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОДУКТІВ ЇХ ГІДРОЛІЗУ

Мета і завдання роботи: *провести реакції виділення рибонуклеопротеїдів (РНП) з дріжджів; навчитись виявляти продукти гідролізу РНП за допомогою якісних реакцій.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів виділення нуклеопротеїдів із біологічного матеріалу; особливостей проведення гідролізу нуклеопротеїдів; вміти підбирати метод якісного визначення білків, рибози, пуринових основ і фосфатної кислоти.*

Для одержання РНП можна використовувати пекарські пресовані дріжджі, але краще взяти пивні, які спочатку довго відмивають від сусла водою, а потім відфільтровують на воронці Бюхнера.

10 г дріжджів змішують в ступці із сумішшю з 2 $см^3$ ефіру та 2 $см^3$ води, додають 5 г піску і розтирають, приливаючи до розтертої маси невеликими порціями 40 – 50 $см^3$ 0,4 % розчину NaOH, після чого розтирання продовжують ще протягом 15 – 20 хв. Осад або відфільтровують, або, що краще, відокремлюють центрифугуванням. Центрифугат зливають в стакан і до нього додають порціями (по 5 $см^3$) 10 % ацетатну кислоту до слабкокислої реакції по лакмусу (5 – 6 $см^3$). Одержаний осад РНП відокремлюють центрифугуванням.

Гідроліз нуклеопротеїдів. Одним із найпростіших способів розщеплення РНП є нагрівання їх протягом години при 100°С в 10 % розчині сульфатної кислоти. Перш за все проходить відокремлення білка від нуклеїнової кислоти. Потім білки гідролізують до амінокислот. Але за цих умов гідроліз білка буде незначним. РНК

розщеплюється з утворенням піримідинових нуклеотидів, пуринові ж нуклеотиди гідролізують до пуринів, рибози і фосфатної кислоти.

В колбу для гідролізу поміщають осад нуклеопротеїдів і 20 $см^3$ 10 % розчину сульфатної кислоти. Колбу закривають пробкою зі зворотним повітряним холодильником і суміш нагрівають протягом години, дотримуючись слабкого кипіння. Гідролізат відфільтровують, у фільтраті визначають вміст білків, пентоз, пуринових основ та фосфатної кислоти.

Білки визначають за допомогою біуретової або нінгідринової реакцій.

Пентозу (рибозу) визначають за реакцією з орцином або флороглюцином (чи шляхом відновлення міді у розчині фелінгової рідини). До 1 $см^3$ реактиву (орцину чи флороглюцину) додають половинний об'єм гідролізату, 1 $см^3$ конц. хлоридної кислоти та нагрівають до кипіння. В першому випадку з'являється зелене забарвлення, в другому – рожево-червоне.

При нагріванні з 20 % хлоридною кислотою рибоза дегідратує та перетворюється в фурфурол. Останній конденсується з орцином чи флороглюцином з утворенням забарвлених сполук. Дезоксирибоза не дає такої реакції.

Пуринові основи визначають за їх реакцією з амоніачним розчином аргентум оксиду. До 2 $см^3$ гідролізату додають по краплям насичений розчин амоній гідроксиду до лужної реакції за лакмусом і рівний об'єм заздалегідь приготованого амоніачного розчину аргентум оксиду. Поступово утворюється осад солей пуринових основ.

Фосфатну кислоту визначають за допомогою амоній молібдату чи магнезіальної суміші:

1) до 2 $см^3$ розчину амоній молібдату в нітратній кислоті додають 1 $см^3$ досліджуваного розчину. Суміш трохи підігрівають. Утворюється жовто-зелений осад амоній фосфоромолібдату $(NH_4)_3PO_4 \times 12MoO_3$;
2) до 2 $см^3$ гідролізату поступово додають концентрований розчин амоній гідроксиду до різкого запаху, після чого додають рівний об'єм магнезіальної суміші. Утворюється кристалічний осад (потирання скляною паличкою) магній-амонію фосфату $MgNH_4PO_4$.

Лабораторна робота № 8
ЯКІСНЕ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВОЇ КИСЛОТИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ. МІКРОДИФУЗІЙНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНОГО АМОНІАКУ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення сечової кислоти в біологічному матеріалі; визначити фізіологічні межі її вмісту в досліджуваному об'єкті; розширити знання про метаболізм сечової кислоти та її біологічне значення; оволодіти методикою визначення вільного амоніаку мікродифузійним методом.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *уміння кількісно визначати сечову кислоту та вільний амоніак.*

Якісне та кількісне визначення сечової кислоти в біологічних рідинах

Метод заснований на здатності сечової кислоти відновлювати фосфорно-вольфрамовий реактив у фосфорно-вольфрамову синь. Кількість фосфорно-вольфрамової сині визначається шляхом титрування калій гексаціано-(III) фератом. За цим методом сечову кислоту можна визначити у зразках, які не містять білку.

Хід роботи. Для одержання безбілкового зразка до 5 $см^3$ біологічної рідини додають рівний об'єм 20 % розчину трихлороцтової кислоти, перемішують і осад білків відділяють центрифугуванням (3000 g, 10 – 15 хв.).

До 5 $см^3$ безбілкового супернатанту додають 2 $см^3$ фосфорно-вольфрамового реактиву і 10 $см^3$ 20 % розчину натрій карбонату.

Суміш ретельно перемішують. При цьому з'являється синє забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості сечової кислоти. Із бюретки обережно, по краплинах, титрують дану пробу розчином калій гексаціано – (III) ферату до знебарвлення.

Аналогічні операції проводять зі стандартним розчином сечової кислоти.

Вміст сечової кислоти розраховують за формулою

$$C = \frac{m \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times V_3 \times mM},$$

де C – вміст сечової кислоти в біологічній рідині, ммоль/дм^3; m – маса сечової кислоти в 1 см^3 стандартного розчину, мг; V – об'єм стандартного розчину сечової кислоти, взятий для титрування, см^3; V_1 – об'єм розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, який витрачено на титрування стандартного розчину сечової кислоти, см^3; V_2 – об'єм розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, який витрачено на титрування біологічної рідини, см^3; V_3 – об'єм біологічної рідини, взятої для дослідження, см^3; mM – кількість сечової кислоти в стандарті, ммоль.

Мікродифузійний метод визначення вільного амоніаку у біологічному матеріалі

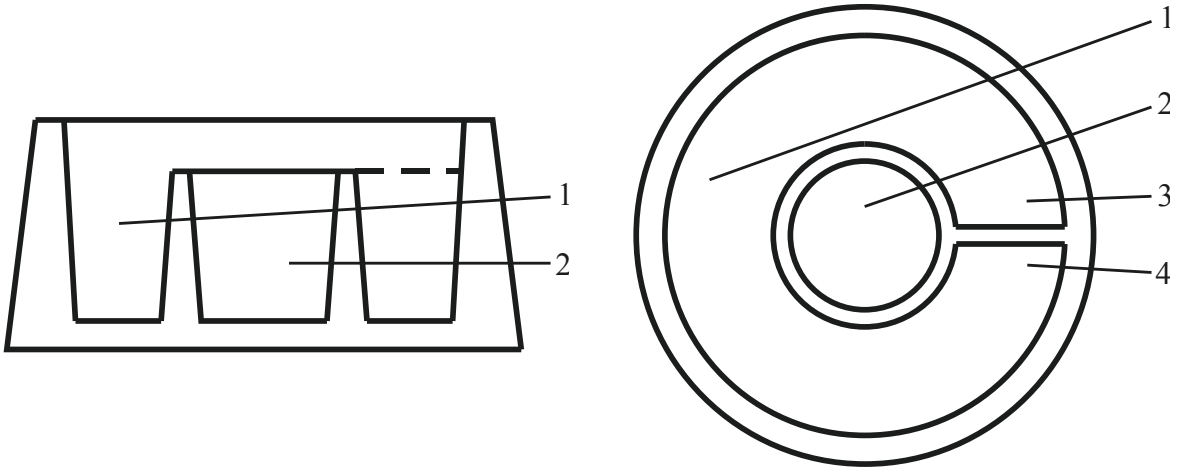
Надлишок вільних амінокислот, відносно тієї кількості, що потрібна для синтезу білків та інших біомолекул, на відміну від жирних кислот та глюкози, не відкладається у запас і не виділяється з організму. Тому надлишкові амінокислоти використовуються як метаболічне паливо. Після дезамінування карбоновий амінокислотний скелет перетворюється на основні проміжні продукти обміну речовин. Більшість аміногруп надлишкових амінокислот витрачається на утворення сечовини, а їх карбонові скелети трансформуються в ацетил-КоА, ацетоацетил-КоА, *піруват* або у проміжні продукти циклу Кребса. Внаслідок цього жирні кислоти, кетонові тіла та *глюкоза* можуть бути утворені з карбонових скелетів амінокислот. Аміногрупи в подальшому перетворюються на іон амонію NH_4^+ при окиснювальному дезамінуванні глутамату:

$$\text{Глутамат} + NAD^+ (NADP^+) + H_2O =$$
$$\alpha\text{-кетоглутарат} + NH_4^+ + NADH\ (NADPH) + H^+.$$

У більшості наземних хребетних NH_4^+ перетворюється на сечовину (уреотелічні тварини). У птахів і плазунів NH_4^+ перетворюється на сечову кислоту (урикотелічні тварини). У більшості ж

водних тварин NH_4^+ виділяється у вигляді іону (амоніотелічні тварини). Тому визначення вільного амоніаку в тканинах є деякою мірою відображенням інтенсивності амінотрансферазної та глутаматдегідрогеназної активності.

Хід роботи. Для кількісного визначення амоніаку мікродифузійним способом використовуються чашки Конвея, що мають дві камери, одна з яких розділена перегородкою (рис. 13).



А Б

Рис. 13. Чашка Конвея з парафіну: А – розріз, Б – вигляд зверху; 1 – зовнішня камера, 2 – внутрішня камера, 3 – розчин K_2CO_3, 4 – досліджувана проба

У внутрішню камеру відміряють 2 $см^3$ 1 н розчину сульфатної кислоти. У зовнішню з однієї сторони перегородки відміряють 1 $см^3$ досліджуваної проби, а з другої сторони – 1 $см^3$ насиченого розчину калій карбонату. Чашку Конвея накривають нагрітим склом. Суміш зовнішньої камери перемішують і залишають на 4 години. Протягом цього часу, внаслідок лужного середовища у зовнішній камері, амоніак звільняється і поглинається розчином сульфатної кислоти. Після поглинання амоніаку чашки Конвея відкривають і надлишок кислоти у внутрішній камері відтитровують 0,01 н розчином натрій гідроксиду за присутності індикатора Таширо. По кількості сульфатної кислоти, зв’язаної з амоніаком, розраховують кількість останнього у досліджуваному розчині.

Контрольні питання

1. Перелічіть та охарактеризуйте структурні елементи нуклеїнових кислот. Покажіть їх будову.
2. Охарактеризуйте номенклатуру нуклеозидів, рибо- та дезоксирибонуклеотидів. Наведіть приклади.
3. Чим відрізняються нуклеозиди від нуклеотидів? Наведіть приклади.
4. Перелічіть особливості будови, властивості та біологічну роль рибосомальної РНК. Рибосоми.
5. Охарактеризуйте форми РНК у прокаріотичних та еукаріотичних клітинах, опишіть їх властивості та біологічну роль.
6. Покажіть схему утворення водневих зв'язків всіх можливих комплементарних пар азотистих основ.
7. Опишіть особливості будови, властивості та біологічну роль іРНК, тРНК.
8. Надайте характеристику рівнів будови ДНК та зазначте їх біологічну роль.
9. Охарактеризуйте будову та біологічну роль АТР, наведіть інші відомі вам макроергічні сполуки.
10. Наведіть правила Чаргаффа. Що вони ілюструють?
11. Який заряд зосереджений на зовнішній поверхні молекули ДНК за фізіологічних значень pH? Яку роль відіграє pH в утворенні третинної структури молекули?
12. Поясніть значення терміну "температура плавлення препарату ДНК". Як вона залежить від нуклеотидного складу і чим це можна пояснити?

Завдання для самостійної роботи

1. Напишіть фрагмент молекули ДНК з відомими для неї азотистими основами.
2. Напишіть структурну формулу фрагменту ДНК (РНК): а) GCT(U); б) T(U)T(U)A; в) GCAC і виконайте для нього наступні завдання:
   – покажіть, які зв'язки утворить цей фрагмент у вторинній структурі молекули; які взаємодії може він утворювати у третинній структурі (при компактній укладці молекули)?

– за допомогою яких реакцій можна довести хімічну природу нуклеотиду?
– який заряд цього фрагменту за pH 7,4; pH 1,0?
– чи можуть виникнути в ньому якісь зміни при дії нітритів і до яких наслідків це призведе?
– які зміни можуть виникнути у фрагменті при дії ультрафіолетового опромінення і які наслідки це викличе?

3. Порівняйте нуклеїнові кислоти: а) ДНК і тРНК; б) ДНК і рРНК; в) тРНК і іРНК за наступними параметрами:
   – локалізація і кількість в клітині;
   – відносна молекулярна маса;
   – хімічний склад, наявність мінорних основ;
   – структура (первинна, вторинна, третинна);
   – біологічна роль.
4. Зобразіть структурні формули мононуклеотидів, дайте їх повні назви: а) 5'-GDP; б) 3'-AMP; в) 5'-dCTP; г) 3'-dTDP; д) 3',5'-цAMP. В якому випадку вони несуть негативний заряд?
5. Зобразіть структурні формули мінорних основ: а) 5-оксиметилурацилу; б) 5-метилцитозину; в) 1-метилурацилу; г) N_6-метилцитозину; д) N_2-метилгуаніну. Яка їх біологічна роль?
6. Наведіть приклади мононуклеотидів, що виконують певні біологічні функції: а) регуляторну; б) універсального акумулятора енергії в біологічних процесах; в) активатора в синтезі полісахаридів і гліколіпідів; г) активатора в біосинтезі фосфоліпідів; д) джерела енергії в біосинтезі білка; е) джерела енергії для м'язового скорочення; є) коферменту.
7. Кислотний гідроліз препарату ДНК дав наступний склад основ (в %): аденін – 24,0; тимін – 33,0; гуанін – 23,0; цитозин – 20,0. Назвіть дві особливості цього незвичного результату і поясніть їх, виходячи із відомостей про структуру ДНК.
8. Два зразки ДНК відрізняються вмістом основ. Перший містить 15 % тиміну, а другий – 22 %. Які відмінності електронних фотографій можна очікувати для цих двох зразків, витриманих попередньо 30 хв. при 60°С?

Задачі

1. Розрахуйте середню довжину (в нанометрах) і середню молекулярну масу генів, які кодують т-РНК з 90 мононуклеотидних залишків.
2. У скільки разів двохланцюгова молекула ДНК птахів довша за ДНК молюсків, якщо кількість нуклеотидних пар в них складає, млн.: птахи – 2000; молюски – 1100?
3. Розрахуйте об'єм молекули ДНК з молекулярною масою 500000, якщо вона має форму циліндра.
4. У скільки разів зміниться довжина ДНК при переході з В-форми в А-форму, якщо її молекулярна маса становить 1 млн.?
5. Довжина молекули ДНК бактеріофагу Т3 становить 14 мкм. Розрахуйте її молекулярну масу.
6. Розрахуйте нуклеотидний склад двохланцюгової ДНК, якщо у відповідній молекулі іРНК, синтезованій на одному з ланцюгів, масова частка азотистих основ буде наступною: аденіну – 20 %, цитозину – 26 %, гуаніну – 26 %, урацилу – 28 %.
7. Розрахуйте кількість нуклеотидних пар у відрізку подвійної спіралі ДНК довжиною 1 мкм, якщо ДНК знаходиться в В-формі.
8. Обчисліть повний склад основ ДНК для двох видів бактерій, в яких вміст аденіну становить відповідно 20 % і 25 %. Який з цих видів краще пристосований для життя у гарячих водоймах?
9. Молекулярна маса ДНК бактеріофага Т2 дорівнює 130×10^6. Головка фага має довжину 100 нм. Визначте довжину ДНК у вигляді подвійної спіралі.
10. Обчисліть коефіцієнт упакування (зменшення лінійних розмірів) подвійної спіралі ДНК а) яка обернута навколо одної нуклеосоми (146 нуклеотидних пар), якщо діаметр нуклеосоми становить біля 10 – 11 нм; б) всієї ДНК в клітині людини (1,8 м), якщо діаметр клітинного ядра біля 5 мкм. Завдяки яким факторам досягається такий ступінь компактності?

ВУГЛЕВОДИ

Вуглеводи – це органічні сполуки, до складу яких входять Карбон, Гідроген і Оксиген, загальна формула відповідає $C_n(H_2O)_m$. Гідроген і Оксиген знаходяться в тому ж співвідношенні, що й у воді. Звідси походить назва "вуглеводи", яку Міжнародною комісією по реформі хімічної номенклатури було замінено терміном *глюциди.* Проте терміном "вуглеводи" користуються і тепер.

Зелені рослини утворюють вуглеводи з вуглекислого газу і води в процесі фотосинтезу. *Фотосинтез* – це перетворення зеленими рослинами енергії Сонця в енергію хімічних зв'язків органічних речовин. Проходить за участю поглинаючих світло пігментів (хлорофіл і ін.).

Сумарне рівняння фотосинтезу:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow[\text{хлорофіл}]{\text{світло}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2.$$

Фотосинтез – єдиний біологічний процес, що забезпечує доступною хімічною енергією всі земні організми. В результаті фотосинтетичної діяльності рослин в первинній атмосфері Землі з'явився кисень, утворилися умови для біологічної еволюції.

Живі істоти не створюють жодні інші органічні сполуки з неорганічних в помітних кількостях. Отже, практично всі органічні речовини на нашій планеті походять з вуглеводів в результаті життєдіяльності організмів. Тому не буде перебільшенням назвати їх основою життя на Землі.

Однак є речовини, склад яких також можна виразити вищезазначеною формулою, але вони належать до інших класів речовин (ацетатна кислота $C_2H_4O_2$, формальдегід CH_2O, *молочна кислота* $C_3H_6O_3$).

Класифікація вуглеводів

Вуглеводи поділяють на три основні класи: *моносахариди*, *олігосахариди* і *полісахариди*. Моносахариди містять у молекулі від трьох до дев'яти атомів Карбону. Вони є первинними продуктами фотосинтезу зелених рослин. Залежно від кількості атомів Карбону у молекулі моносахариду розрізняють відповідно тріози, тетрози, пентози, гексози, гептози, октози і нанози.

Олігосахариди – це олігомери моносахаридів. Вони утворюються шляхом з'єднання невеликої кількості моносахаридів (від двох до десяти). Велике значення мають такі *дисахариди*, як *сахароза*, мальтоза, *лактоза*, целобіоза і трегалоза, із трисахаридів – рафіноза, генціаноза і трифруктозан.

Полісахариди – високополімерні сполуки, побудовані з декількох десятків і навіть тисяч залишків моносахаридів. До них належать *крохмаль*, *глікоген*, *целюлоза* та ін.

Фізіологічна роль вуглеводів

Вуглеводи входять до складу тіла людини і тварин у значно менших кількостях, ніж білки і жири (усього близько 2 % у перерахунку на суху масу), проте вони є важливою складовою частиною всіх живих організмів.

В організмі людини вуглеводи є одним з основних джерел енергії. Добова норма для дорослої людини складає близько 450 – 500 г вуглеводів, які окиснюючись до вуглекислого газу і води, утворюють приблизно 10 кДж енергії. Вуглеводи виконують також структурну функцію, а проміжні продукти їх окиснення використовуються як вихідні речовини для синтезу багатьох інших органічних сполук.

Вуглеводи входять до складу нуклеїнових кислот, деяких ферментів, складних білків, гормонів, беруть участь у процесах зсідання крові.

Важливу роль у живому організмі відіграють вуглеводи глікозаміноглікани (мукополісахариди), які є складовими частинами слизів, шлункового соку, слини, міжклітинних рідин та ін. Мукополісахариди захищають органи і тканини від механічних і

хімічних ушкоджень. Вуглеводи широко використовуються в харчовій, кондитерській промисловості та медицині.

Моносахариди, їх фізичні та хімічні властивості

Моносахариди, або монози – прості вуглеводи, що містять гідроксильні і альдегідну (*альдози*) або кетонну (*кетози*) групи. По числу атомів Карбону розрізняють біози, тріози, тетрози, пентози і т.і. Молекули більшості моносахаридів (від грецьк. "монос" – один) містять від трьох до дев'яти атомів Карбону, але найчастіше складаються з п'яти – шести атомів, сполучених разом. Три найбільш важливих простих вуглеводи з шестичленним карбоновим скелетом – глюкоза, відома як виноградний цукор, фруктоза (або фруктовий цукор) і галактоза, – мають одну і ту ж узагальнену формулу $C_6H_{12}O_6$. Проте їх атоми розташовані у всіх трьох вуглеводах по-різному. З цим пов'язані відмінності даних моносахаридів. У організмі молекули моносахаридів зазвичай замикаються в кільце. Це характерно не лише для з'єднань з шестичленним вуглецевим скелетом. П'ятичленні монози – рибоза і дезоксирибоза, – що зустрічаються майже у всіх клітинах, існують лише у вигляді кілець. У клітині вони завжди знаходяться в зв'язаному стані – як складова частина молекул нуклеїнових кислот.

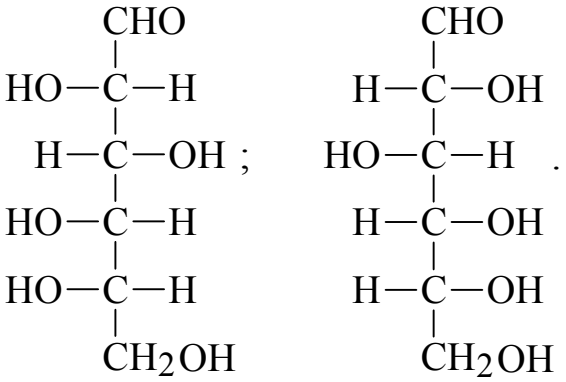
Класифікація моносахаридів

За характером положення карбонільної групи виділяють: альдози – містять альдегідну групу, і кетози – кетонну групу.

За кількістю атомів Карбону моносахариди розділяють на тетрози (наприклад, треоза $C_4H_8O_4$), пентози (наприклад, рибоза $C_5H_{10}O_5$), гексози (наприклад, глюкоза, фруктоза $C_6H_{12}O_6$); відомі також гептози, октози і т.д.

У природі в основному поширені пентози і гексози.

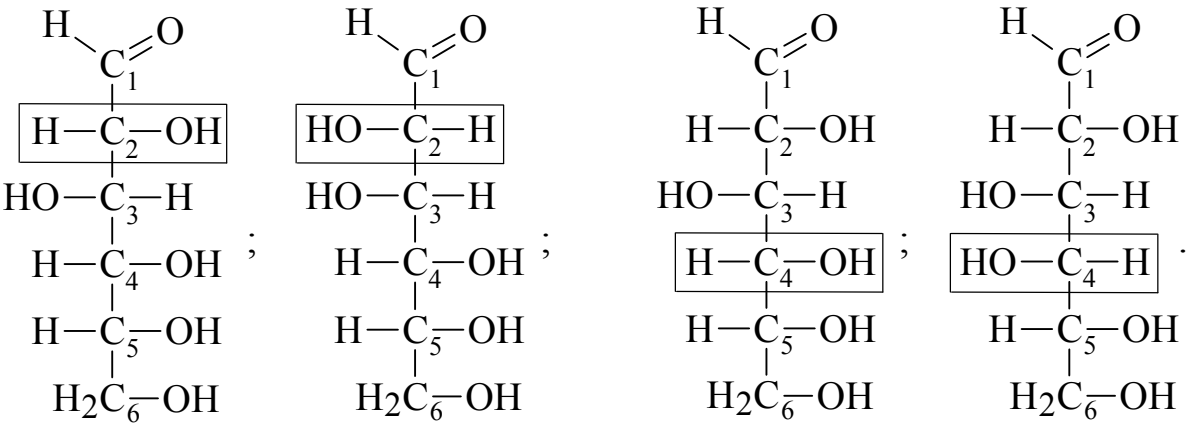
Належність цукрів до D- або L-ряду встановлюють, порівнюючи розташування атомів Гідрогену і гідроксильних груп біля останнього асиметричного атома Карбону в молекулі моносахариду з розташуванням їх у D- або L-гліцеринового альдегіду. Наприклад, D- та L-форми глюкози мають таку будову:



L-Глюкоза D-Глюкоза

У рослинах міститься, як правило, тільки D-форма цукрів (на відміну від амінокислот).

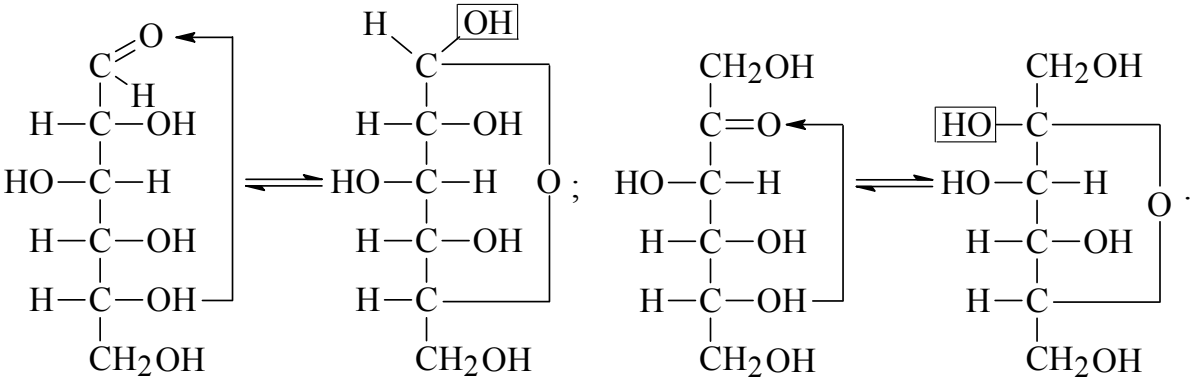
Пара моносахаридів, яку розрізняють по конфігурації відносно тільки одного атома Карбону, являють собою *епімери* по відношенню один до одногою. Так, D-глюкоза і D-маноза – епімери відносно 2 атома Карбону, а D-глюкоза і D-галактоза – епімери відносно 4 атома:



D-глюкоза D-маноза D-глюкоза D-галактоза

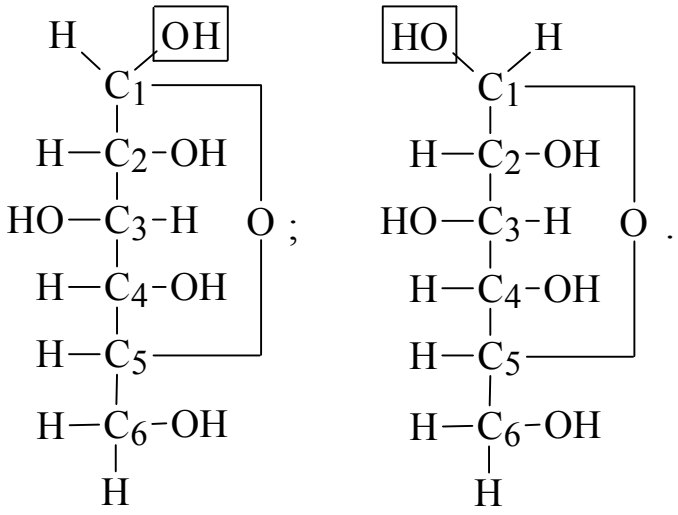
Вуглеводи можуть існувати в циклічній формі, що зумовлено внутрішньомолекулярною взаємодією карбонільної групи з однією із гідроксильних груп (найчастіше біля п'ятого атома Карбону), у результаті чого утворюються циклічні напівацеталі.

Розглянемо циклічні напівацеталі глюкози і фруктози – моносахаридів, які мають найбільш важливе біологічне значення. У результаті взаємодії атома Гідрогену п'ятої гідроксильної групи з атомом Оксигену карбонілу утворюється гідроксил, який одержав шифр напівацетального (позначеного у рамці):



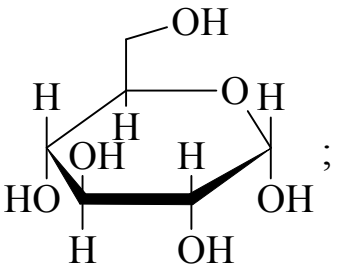
Глюкоза Фруктоза

У результаті такої взаємодії перший атом Карбону стає асиметричним, у зв'язку з чим можливе різне розташування напівацетального гідроксилу в просторі. Якщо він розташований з того самого боку вуглецевого скелета, що й гідроксил, який визначає належність глюкози до D- або L-ряду, така циклічна форма глюкози називається α-формою, якщо ж з іншого боку – β-формою:

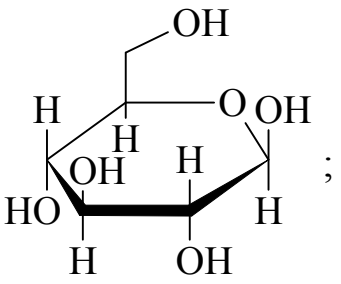


α-D-Глюкоза β-D-Глюкоза

Для зображення циклічних форм моносахаридів зазвичай користуються *проекційними формулами Хеуорса,* які дозволяють на площині показати просторову структуру. Наприклад,

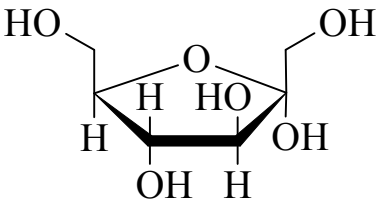


;

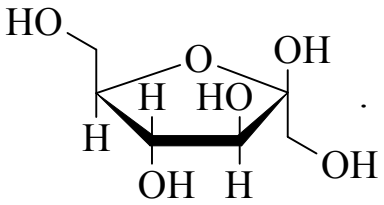


;

α-D-Глюкопіраноза β-D-Глюкопіраноза



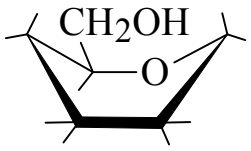
;



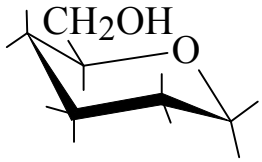
.

α-D-Фруктофураноза β-D-Фруктофураноза

В дійсності шестичленне піранозне кільце не розташовано в одній площині, як це уявляється при використанні проекції Хеуорса. У більшості цукрів воно має форму *крісла*, в у деяких – форму *човна,* що зображується за допомогою конформаційних формул



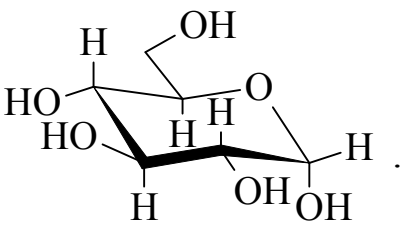
;



.

Ізомерні форми піранозного кільця (човен і крісло)

Конформаційна формула α-D-Глюкопіранози, яка має конформацію крісла



.

Встановлено, що у твердому стані моносахариди знаходяться тільки в циклічній формі, тобто мають структуру напівацеталей. У водних розчинах вони можуть існувати в різних формах: альдегідній, α- і β-формах, між якими встановлюється стан динамічної рівноваги.

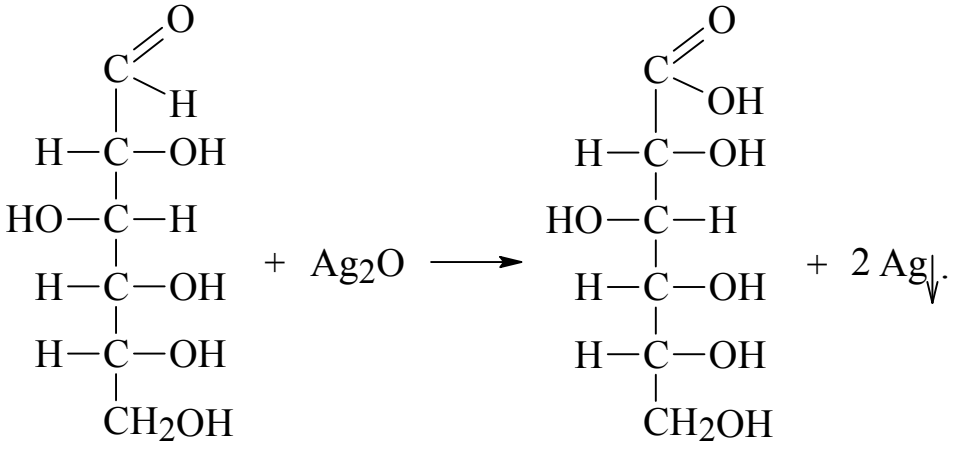
Наявність асиметричних атомів Карбону в молекулах цукрів зумовлює їх оптичні властивості. Правообертаючі прості вуглеводи позначаються знаком “+”, лівообертаючі – знаком “–”.

Назви окремих представників вуглеводів у більшості випадків емпіричні, пов'язані зі способом їх одержання, якоюсь характерною ознакою даного цукру тощо, проте для всіх них характерне закінчення -оза, що вказує на належність їх до групи цукрів.

Хімічні властивості

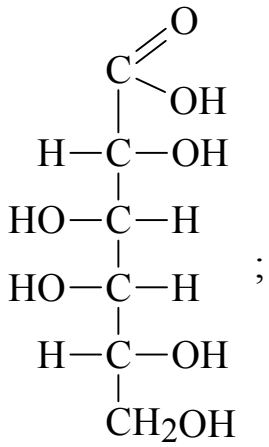
У більшість хімічних реакцій моносахариди вступають, знаходячись в альдегідній формі, незважаючи на те, що у розчинах ациклічні моносахариди містяться за дуже малих кількостей. Це пояснюється тим, що альдегідна форма вуглеводів є найбільш реакційноздатною.

Однією з основних хімічних властивостей моносахаридів є їх здатність легко окиснюватись. При цьому вони відновлюють навіть такі дуже слабкі окиснювачі, як Ag_2O і $Cu(OH)_2$. При окисненні альдегідної групи моносахаридів утворюються альдонові кислоти:

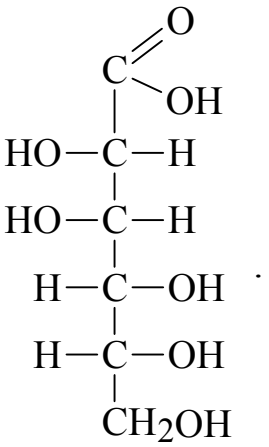


D(+)-Глюкоза Глюконова кислота

Альдонові кислоти галактози і манози називаються відповідно галактоновою і маноновою:

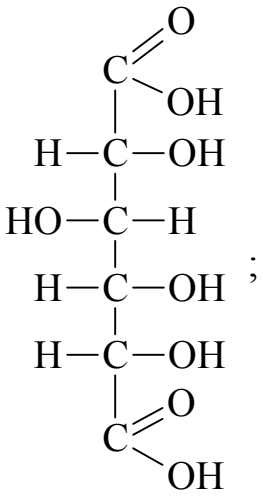


D(+)-Галактонова кислота

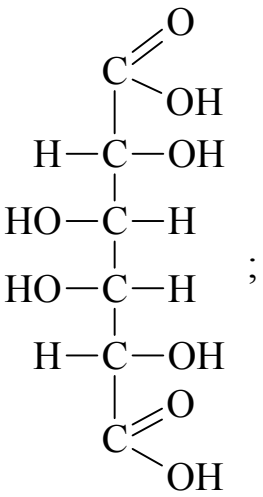


D(+)-Манонова кислота

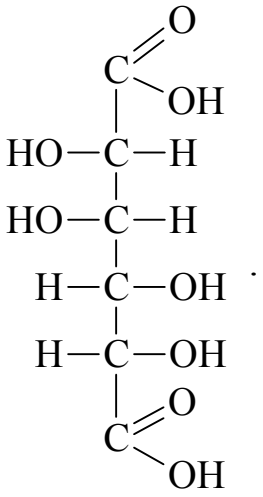
При більш енергійному окисненні, коли окиснюється і первинна спиртова група, утворюються двохосновні оксикислоти, які мають загальну назву альдарових кислот. При такому окисненні глюкоза перетворюється в глюкарову, галактоза – у галактарову і маноза – у манарову кислоти:



Глюкарова (цукрова) кислота

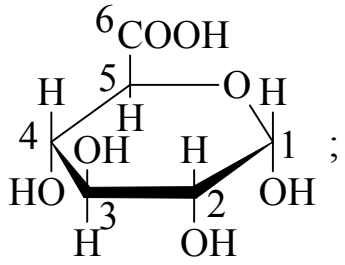


Галактарова (слизева) кислота

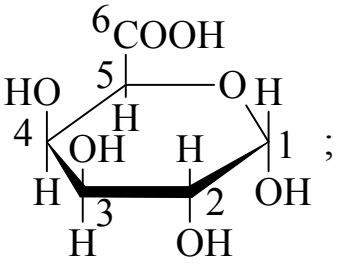


Манарова (маносахарна) кислота

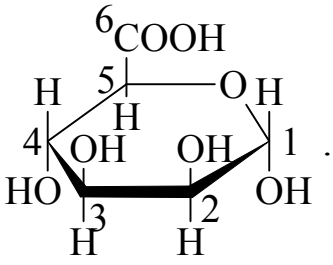
Найбільше біологічне значення мають уронові кислоти, які утворюються з моносахаридів при окисненні тільки первинної спиртової групи до карбоксильної. Уронова кислота, яка утворюється з глюкози, називається глюкуроновою, з галактози – галактуроновою, з манози – манууроновою:



Глюкуронова кислота

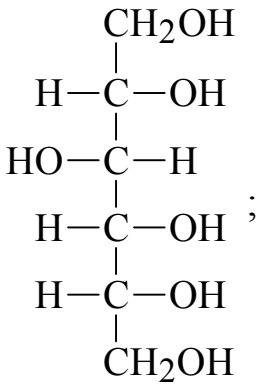


Галактуронова кислота

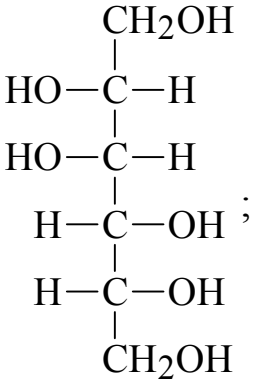


Мануронова кислота

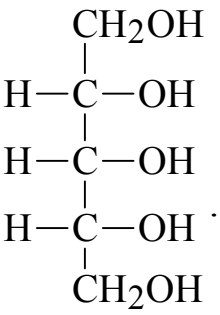
При відновленні моносахаридів утворюються відповідні багатоатомні спирти. У рослинах найчастіше зустрічаються сорбіт, який утворюється при відновленні глюкози або фруктози, маніт – манози, рибіт – рибози:



Сорбіт



Маніт

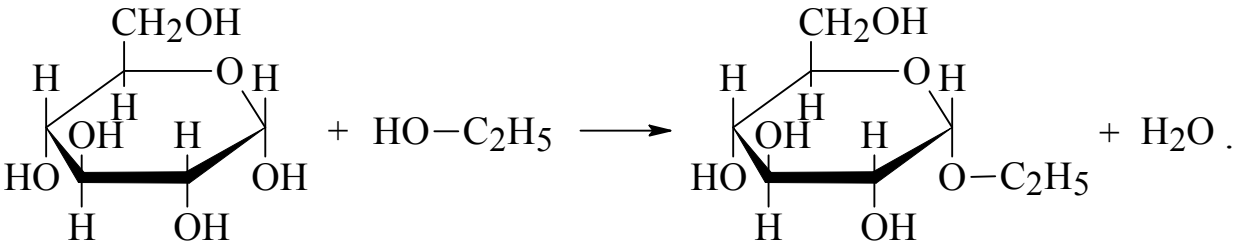


Рибіт

Моносахариди вступають у реакцію з кислотами, утворюючи складні ефіри. Деякі з них відіграють дуже важливу роль в обміні речовин. Особливо велике значення мають ефіри цукрів із фосфатною кислотою, так звані сахарофосфати, або фосфатні ефіри цукрів. Такі найважливіші процеси обміну речовин, як дихання,

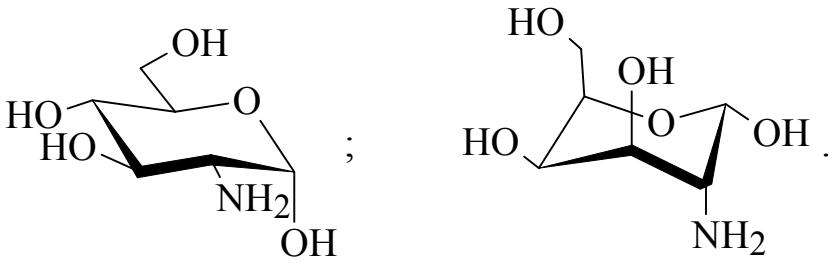
бродіння, синтез глікогену, крохмалю і багато інших, відбуваються за обов'язкової участі фосфатних ефірів цукрів. Найбільше значення мають фосфатні ефіри глюкози, фруктози і рибози.

Найважливішою властивістю моносахаридів є їх здатність до утворення глікозидів. Вони утворюються шляхом заміщення атома Гідрогену в напівацетальному гідроксилі (тому його називають ще глікозидним гідроксилом), який відрізняється підвищеною реакційною здатністю. Одними з найпростіших глікозидів є етилглікозиди, які утворюються при взаємодії циклічних форм сахарів з етиловим спиртом:



α-D-Глюкоза α-Етилглікозид

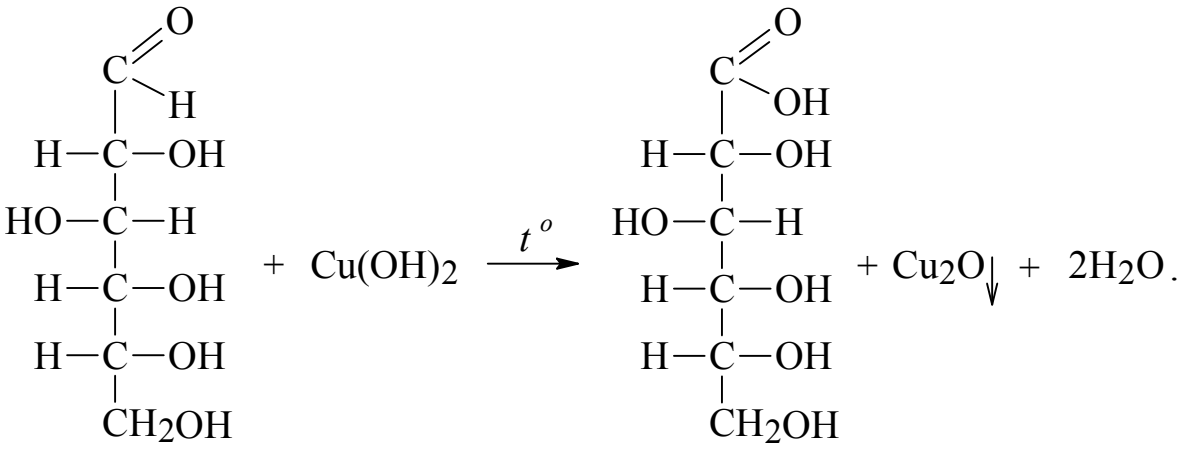
Шляхом заміщення в молекулі моносахариду одного з гідроксилів групою $-NH_2$ утворюються амінопохідні сахарів. З яких найбільш важливе біологічне значення в організмі людини мають амінопохідні глюкози і галактози – відповідно *глюкозамін* та галактозамін (хондрозамін):



Глюкозамін Галактозамін

Зазначені гексозаміни відіграють важливу роль у життєдіяльності організму. Вони виконують специфічні функції, входячи до складу слизистих речовин, синовіальної рідини суглобів, регулюють зсідання крові і виконують захисну функцію при інфекційних захворюваннях.

Якісною реакцією на моносахариди є їх взаємодія з свіжоосадженим купрум (II) гідроксидом. При цьому утвориться червоний оксид міді (I):

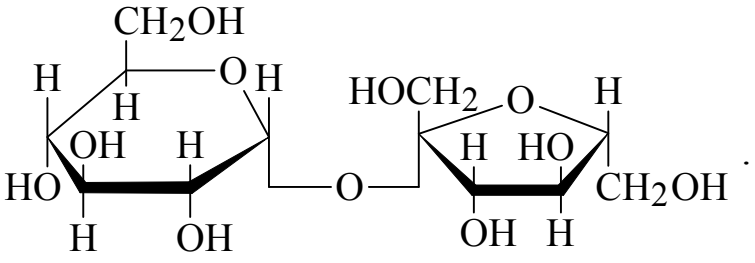


Глюконова кислота

Дисахариди

Дисахариди – це найбільш поширені олігосахариди, що мають емпіричну формулу $C_{12}H_{22}O_{11}$. Їх молекули складаються як з однакових, так і з різних моносахаридів. Перш, ніж дисахариди зможуть прийняти участь в обміні речовин у клітинах, їх молекули повинні розщеплюватися на відповідні моносахариди.

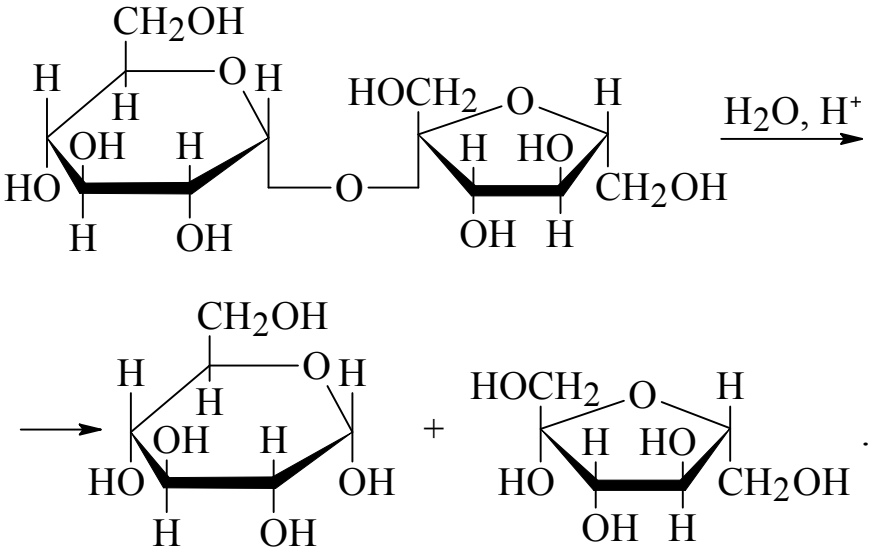
Найвідоміший дисахарид – *сахароза* (харчовий або столовий цукор) – складається з однієї молекули α-D-глюкози і однієї молекули β-D-фруктози:



Тому солодкість сахарози проміжна між солодкістю глюкози і фруктози. Звичайні джерела промислової сахарози – цукровий буряк і очерет. Солодовий цукор – мальтоза, що утворюється при фермен-

тативному гідролізі крохмалю, складається лише із залишків α-D-глюкози.

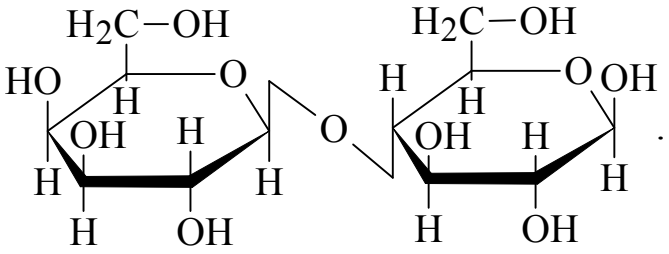
Властивості сахарози. Біла, кристалічна, добре розчинна у воді, солодка на смак речовина; при кислотному або ферментативному гідролізі розкладається з утворенням глюкози і фруктози:



Глюкоза Фруктоза

Використовують сахарозу у харчовій промисловості та виробництві етанолу.

Лактоза (молочний цукор) — складається із залишків молекул β-D-галактози та α-D-глюкози глюкози:



Лактозу отримують з сироватки молока.

Властивості лактози. При кип'ятінні з розбавленими розчинами кислот піддається гідролізу, при взаємодії з розчином лугу лактоза окислюється до сахаринових кислот.

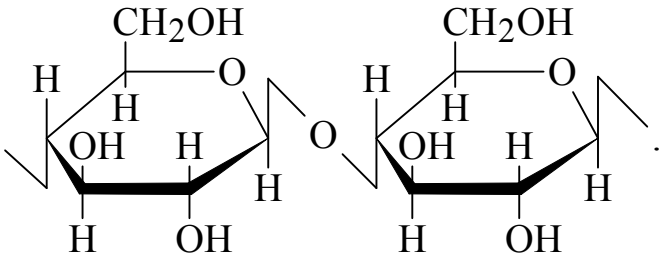
Застосовують для приготування живильних середовищ. Важливу роль відіграє у виробництві молочних продуктів. Під дією різних мікроорганізмів та їхніх ферментів, що вводяться в молоко у вигляді заквасок, молочний цукор збродженується, утворюючи в залежності від виду бактерій молочну кислоту, спирт, вуглекислоту, масляну чи лимонну кислоти і інші сполуки.

Полісахариди

Гігантські полімерні молекули полісахаридів (від грецької "полі" – "багато") можуть складатися більш ніж з 10 тис. моносахаридних ланок, зв'язаних разом. Полісахариди розрізняються за величиною, структурною складністю і вмістом різних моносахаридів. Їх можна поділити на два типа: *гомополісахариди*, які складаються із залишків одного й того ж моносахариду, і *гетерополісахариди*, які містять залишки двох або більшого числа моносахаридів. Відомо декілька сотень різних типів полісахаридів. Вони є важливими структурними компонентами, а також речовинами запасу, перш за все у рослин. Найбільш поширені і відомі полімери глюкози, що мають формулу $(C_6H_{10}O_5)_x$.

Гомополісахариди

Целюлоза – полісахарид клітинних стінок рослин, що додає їм пружність і міцність. Тисячі ланок глюкози зв'язані разом в довге нерозгалуджене "намисто". Вона являє собою лінійний полімер – продукт поліконденсації β-D-глюкози:



β-Глюкоза β-Глюкоза

Фрагмент макромолекули целюлози

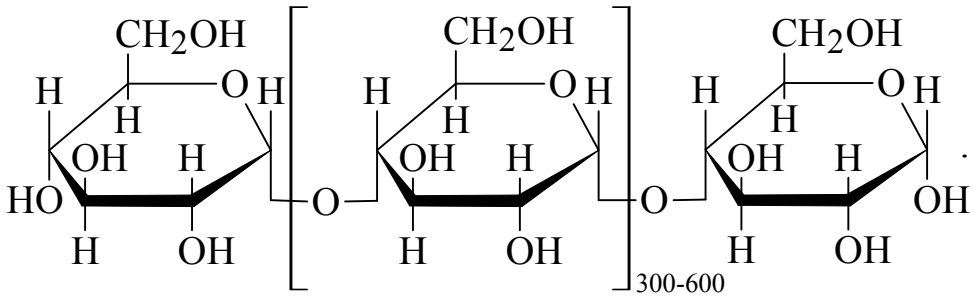
Властивості целюлози. Біла волокниста речовина, без смаку і запаху. Нерозчинна у воді, органічних розчинниках і розбавлених водних розчинах лугів і кислот; одним з небагатьох реагентів, в яких целюлоза розчиняється, є реактив Швейцера – водний розчин $[Cu(NH_3)_4](OH)_2$. За нагрівання з неорганічними кислотами целюлоза повністю гідролізується з утворенням глюкози:

$$(C_6H_{10}O_5)n \xrightarrow{H_2O,\ H^+} n\ C_6H_{12}O_6\,.$$

Використовується целюлоза у виробництві паперу і картону; штучних волокон: ацетатного, віскозного і мідноамоніачного; одержанні глюкози.

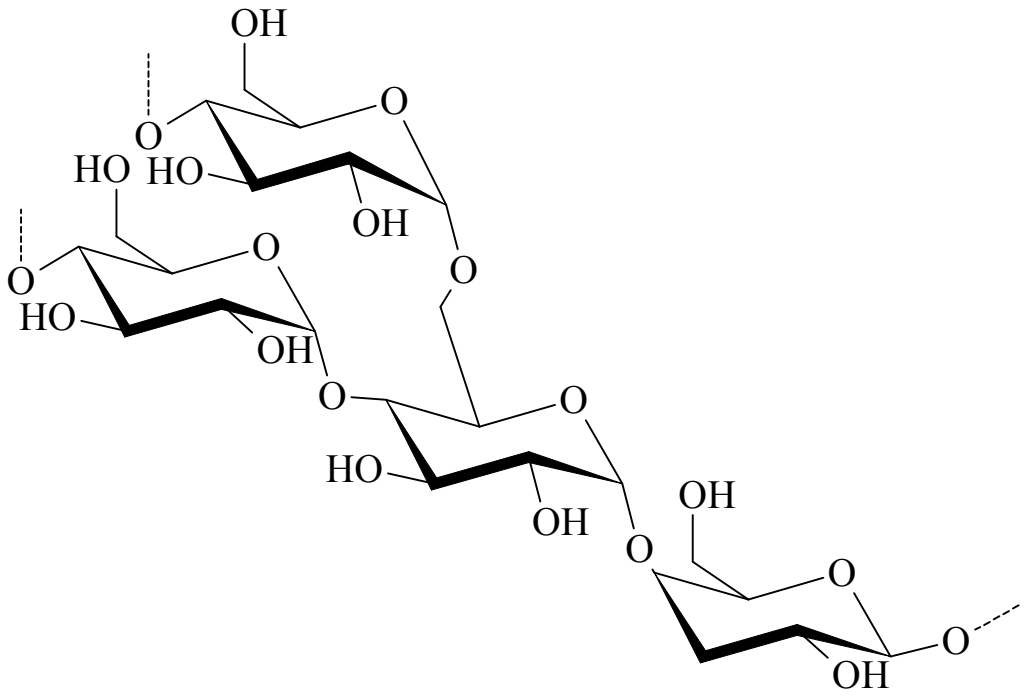
Крохмаль являє собою резервне джерело енергії у рослинних клітинах. Найбільше крохмалю вміщують зерна рису (62 – 82 %), кукурудзи (65 – 82 %), пшениці (57 – 75 %) і бульби картоплі (12 – 24 %). У промисловості крохмаль отримують екстракцією з рослинної сировини, наприклад, картоплі.

До складу крохмалю входять два основних полісахариди – амілоза (близько 20 %) і амілопектин (близько 80 %), які є продуктами поліконденсації α-D-глюкози. Молекула амілози має лінійну будову і включає приблизно до 300-600 моносахаридних фрагментів:



Фрагмент молекули амілози

Амілопектин являє собою розгалужений полімер, який вміщує приблизно до 200 моносахаридних фрагментів. Розгалуження виникає за рахунок утворення зв'язків між атомами Карбону C_1 і C_6.



Фрагмент молекули амілопектину

Властивості крохмалю. Має вигляд білого аморфного порошку. При взаємодії з йодом дає характерне темно-синє забарвлення. Гідролізується кислотами і ферментами до глюкози.

Крохмаль використовується у харчовій промисловості, при одержанні глюкози, виготовленні клеїв та лікарських препаратів.

Глікоген відіграє роль запасаючої речовини у вищих тварин, утворюючись і накопичуючись в печінці та м'язах. У його молекулах ланки глюкози сполучені між собою, як в крохмалі, але утворюють ще більш розгалужені ланцюги. Глікоген є одним із найважливіших джерел енергії у тварин. Найбільше глікогену міститься в печінці (до 20 %) і м'язах (до 4 %). Глікоген містять також деякі гриби.

За хімічною будовою глікоген є подібним до амілопектину, але молекули глікогену більш розгалужені.

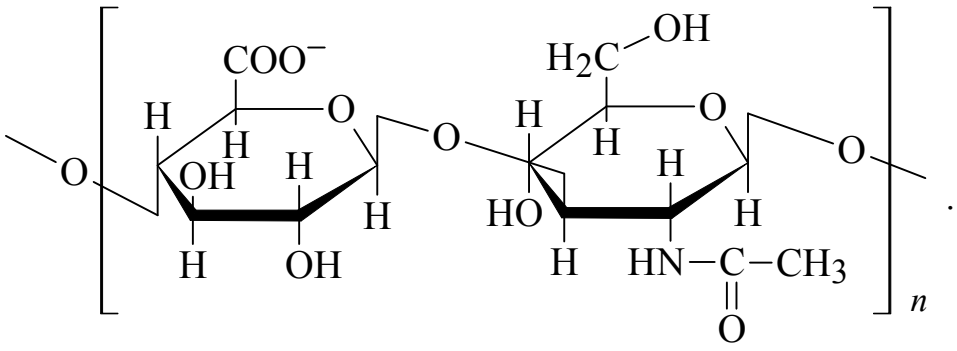
Властивості глікогену. Являє собою білий аморфний порошок добре розчинний у гарячій воді; кислотами і ферментами гідролізується до глюкози. На відміну від крохмалю, з молекулярним йодом глікоген дає червоне або червоно-фіолетове забарвлення.

Полісахариди не можуть брати участь в обміні речовин у незмінному вигляді – подібно до дисахаридів, вони повинні спочатку розщепитися до моносахаридів.

Гетерополісахариди

Гіалуронова кислота являє собою несульфатований гліко-заміноглікан, що входить до складу сполучної, епітеліальної і нервової тканин. Є одним з головних компонентів міжклітинного матриксу сполучної тканини хребетних.

До складу гіалуронової кислоти входять залишки D-глюкуронової кислоти та D-N-ацетилглюкозаміну, сполучених почергово β-1,4- і β-1,3-глікозидними зв'язками. Молекула гіалуронової кислоти може містити до 25000 таких дисахаридних ланок. Молекулярна маса природної гіалуронової кислоти від 5000 до 20000000 Да.

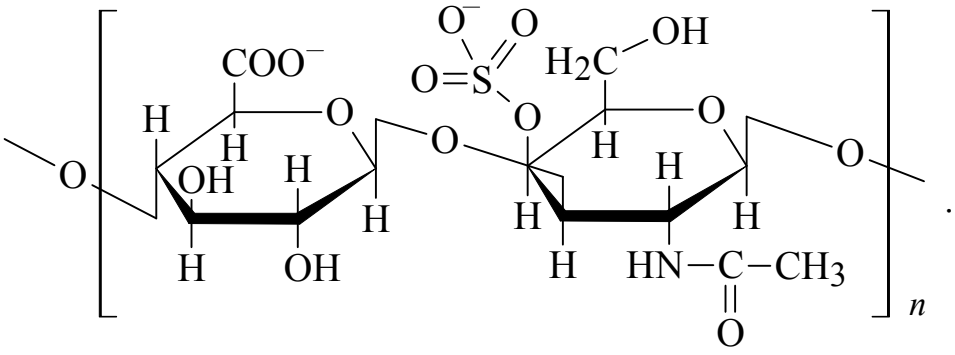


β-Глюкуронова кислота N-Ацетилглюкозамін

Властивості гіалуронової кислоти. Вона має здатність зв'язувати дуже велику кількість води. Наприклад, скловидне тіло людського ока складається на 98 % з води, яка зв'язана 2 % гіалуронової кислоти. Велика кількість груп COO^- формує негативний заряд молекули, що обумовлює утримання води і катіонів натрію. Гіалуронова кислота – головна складова синовіальної рідини (суглобова рідина) і відграє роль мастила при всіх рухах суглобів, що досягається за рахунок псевдопластичних властивостей синовіальної рідини. Її в'язкість змінюється відповідно до величини діючої сили. Точніше, чим більше навантаження, тим менша в'язкість рідини.

Гіалуронова кислота використовується у репродуктивній медицині при проведенні так званого тесту HBA: експрес-аналізу зв'язування сперматозоїдів з гіалуроновою кислотою в нативному еякуляті, який дозволяє відібрати зрілі сперматозоїди, які мають якості, необхідні для запліднення і подальшого розвитку ембріона (гіалуронат є основним компонентом комплексу, що присутній в оболонці яйцеклітини). Гіалуронову кислоту використовують в косметології для збільшення та корекції форми губ.

Хондроітин-4-сульфат побудований з фрагментів глюкуронової кислоти і N-ацетилгалактозамінсульфату, сполучених між собою 1,3-глікозидними зв'язками. Обов'язкова складова частина хрящів (до 40 % у перерахунку на суху масу), кісток, основної речовини сполучної тканини, серцевих клапанів, стінок кровоносних судин, шкіри й ін., тобто виконує опорні функції. Крім того, хондроітин-сульфат бере участь в іонному обміні і регуляції надходження до клітини поживних речовин. Природний хондроітинсульфат має молекулярну масу від 50000 до 100000 Да.



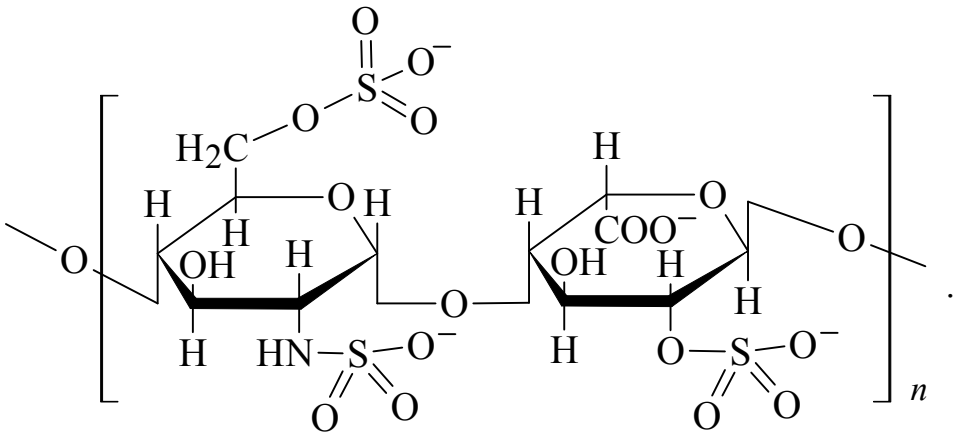
β-Глюкуронова кислота N-Ацетилгалактозамінсульфат

Властивості хондроітинсульфату. Сприяє відкладенню кальцію в кістках, стимулює синтез гіалуронової кислоти, має аналгетичну та протизапальну дію, сприяє регенерації хрящової тканини.

Хондроітинсульфат використовується у медицині (уповільнює резорбцію кісткової тканини і знижує втрату Ca^{2+}). Поліпшує фосфорно-кальцієвий обмін у хрящовій тканині, прискорює процеси

її відновлення, гальмує процеси дегенерації хрящової і сполучної тканини. Стимулює синтез глікозаміногліканів, сприяє регенерації суглобної сумки та хрящових поверхонь суглобів, збільшує продукцію внутрішньосуглобової рідини. Зменшує болючість і збільшує рухливість уражених суглобів, потенційно може перешкоджати утворенню фібринових тромбів в мікроциркуляторному руслі.

Гепарин сульфатований глікозаміноглікан змішаної полісахаридної природи, з різною молекулярною масою. До його складу входять полімери, похідні D-глікозаміну і L-ідуронової кислоти або D-глюкуронової кислоти.



Сульфатований глюкозамін — Сульфатована ідуронова кислота

Гепарин використовується у медицині як антикоагулянт, застосовується для профілактики і терапії тромбоемболічних ускладнень, при операціях на серці та кровоносних судинах, в апаратах штучного кровообігу та гемодіалізу.

Лабораторна робота № 9
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТОЗИ В МОЛОЦІ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення лактози в молоці, з'ясувати фізіологічні межі дисахариду в молоці, біологічну роль лактози.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про біологічну роль лактози в організмі тварин; уміння кількісно визначати лактозу в молоці, закріпити навички йодометричного аналізу.*

Будова, властивості, біологічна роль лактози

Лактóза (молочний цукор) – вуглевод групи дисахаридів, міститься у молоці. Молекула утворена залишками β-D-галактози і α-D-глюкози і є галактозидом: 1-(β-D-галактозидо)-α-D-глюкопіраноза, 4-(β-D-галактопіранозил)-α-D-глюкопіраноза. За положенням напівацетального гідроксилу залишку глюкози існують α- і β-аномери.

Лактоза є складовою частиною молока ссавців, знайдена також у пильниках деяких рослин. Входить до складу глікопротеїдів і гліколіпідів. Отримують лактозу упарюванням молочної сироватки. Слід зазначити, що лактоза є єдиним вуглеводом молока майже всіх ссавців. У 100 $см^3$ молока корови міститься в середньому 4,5 г лактози. Найбільший вміст молочного цукру в жіночому молоці – 7,5 г/ $см^3$. Чим більше в молоці жиру, тим менше лактози.

Основна функція лактози, як і молочного жиру, – забезпечення організму енергією. Особливість цукру полягає в тому, що він міститься практично тільки в молоці і гідролізується за участі ферменту лактази (β-галактозидази), який синтезується в клітинах, що розташовані на внутрішній поверхні середньої частини тонкого

кишечнику. Саме тут відбувається розщеплення лактози і всмоктування продуктів її гідролізу – галактози і глюкози.

Принцип методу

Лактоза в лужному середовищі окиснюється молекулярним йодом в лактобіонову кислоту:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + I_2 + 2NaOH = C_{12}H_{22}O_{12} + 2NaI + H_2O.$$

Надлишок йоду, що не вступив до реакції, визначають титруванням розчином натрій триоксотіосульфату, використовуючи індикатор крохмаль.

Хід роботи. У дві мірні колби вносять по 5 см^3 7 % розчину купрум (II) сульфату, по 5 см^3 2 % розчину натрій гідроксиду, по 2,5 см^3 5 % розчину натрій фториду. В одну з колб додають 5 см^3 молока, в другу – 5 см^3 дистильованої води (контроль), перемішують і доводять дистильованою водою до об'єму 50 см^3. Через 30 хв. фільтрують, переносять по 20 см^3 фільтрату дослідної проби і контролю у конічні колби, додають по 20 см^3 розчину йоду (С=0,05 моль/дм^3) і, постійно перемішуючи, додають по 10 см^3 2 % розчину натрію гідроксиду. Колби ретельно закривають. Через 20 хв. до вмісту колб додають по 10 см^3 розчину 5 % хлоридної кислоти, по 1 см^3 крапель 1 % розчину крохмалю і титрують розчином натрій триоксотіосульфату до знебарвлення розчину. Вміст лактози в молоці розраховують за формулою

$$C = \frac{(V_1 - V_2) \times T \times V}{V_3 \times V_4 \times mM},$$

де C – вміст лактози в молоці, ммоль/дм^3; V_1 – об'єм розчину натрій триоксотіосульфату, витраченого на титрування контролю, см^3; V_2 – об'єм розчину натрій триоксотіосульфату, витраченого на титрування проби, см^3; V_3 – об'єм молока, взятий для дослідження, дм^3; V_4 – аліквотний об'єм проби, взятий для титрування, см^3; T – титр розчину натрій триоксотіосульфату за лактозою – 18,01 мг/см^3; mM – молярна маса лактози, мг/моль.

Лабораторна робота № 10
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В ПЛАЗМІ КРОВІ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення глюкози в сироватці крові непрямим способом із застосуванням зворотного йодометричного титрування та за допомогою ортотолуїдинового реактиву; визначити фізіологічну величину вмісту глюкози в крові; закріпити навички редоксиметричного титрування та колориметричного визначення речовин.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів кількісного визначення глюкози в біологічних рідинах; знання про рівень глюкози в крові людини за нормою та при патології; знання про метаболізм глюкози в організмі.*

Показником вуглеводного обміну організму є вміст цукру (глюкози) в крові, який знаходиться під контролем багаточисельних нейроендокринних впливів, внаслідок чого в здоровому організмі кров завжди містить досить сталу кількість цукру – 0,8 – 1,2 мг/см^3 (в нормі).

Принцип методу заснований на властивості глюкози вступати в окисно-відновні реакції: окисненні глюкози та інших вуглеводів калій гексаціано-(III)-фератом у слабко лужному середовищі за певних умов, які повинні кожного разу точно витримуватись для одержання відтворюваних результатів.

Глюкоза окиснюється до солі глюконової кислоти, калій гексаціано-(III)-ферат відновлюється до гексаціано-(II)-ферату. Калій гексаціано-(III)-ферат беруть у надлишку, але точно визначену кількість. Частку, яка залишилася після окиснення глюкози, знаходять за допомогою йодометричного методу:

$$2\ K_3[Fe(CN)_6] + 2KI = 2K_4[Fe(CN)_6] + I_2.$$

Вільний йод, що утворився, відтитровують натрій триоксотіосульфатом:

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 = 2\ NaI + Na_2S_4O_6.$$

Хід роботи. Для проведення аналізу готують 2 пробірки з цинк гідроксидом. Для цього в кожну пробірку приливають 5 $см^3$ 0,45 % розчину цинк сульфату, 1 $см^3$ 0,1 н розчину натрій гідроксиду. Набирають мікропіпеткою 0,1 $см^3$ крові, випускають її в одну пробірку з цинк гідроксидом, промиваючи піпетку цим же розчином.

Дві пробірки: першу з кров'ю, другу контрольну (тільки з розчином цинк гідроксиду) поміщають в киплячу водяну баню рівно на 3 хв. для осадження білків крові. Після цього вміст пробірок фільтрують через попередньо промиту гарячою дистильованою водою (по 2 $см^3$) вату. Пробірки промивають двічі двома мілілітрами гарячої дистильованої води і фільтрують через ту ж вату у ті ж самі стаканчики (після фільтрування вату віджимати не потрібно). Потім в ті ж два стаканчики відмірюють по 2 $см^3$ титрованого розчину калій гексаціано-(III)-ферату 0,005 н, після чого ставлять їх в киплячу водяну баню на 15 хв., доливають по 3 $см^3$ потрійного розчину, який містить йодистий калій, і по 2 $см^3$ 3 % розчину ацетатної кислоти. Рідина жовтіє від йоду, що виділився. В кожний стаканчик додають по 2 краплини крохмалю, титрують натрій триоксотіосульфатом до зникнення синього забарвлення.

Вміст цукру в 0,1 $см^3$ крові обчислюють за таблицею 13, яка складена для 0,005 н розчину натрій триоксотіосульфату. По таблиці знаходять кількість цукру в міліграмах, який міститься в пробі, що титрується; кількість цукру знаходиться в залежності від об'єму розчину натрій триоксотіосульфату, який витрачено на титрування. В першій графі таблиці вказані цілі і десяті долі $см^3$ розчину натрій триоксотіосульфату; продовжуючи відповідно горизонтальну графу, знаходять кількість міліграмів цукру, еквівалентну об'єму натрій триоксотіосульфату, витраченого на титрування, з врахуванням сотих долей $см^3$.

Приклад розрахунку. Якщо на титрування досліджуваної проби пішло 1,43 $см^3$ натрій триоксотіосульфату, знаходимо по таблиці в першому вертикальному стовпчику число 1,4 і у верхньому горизонтальному – 0,03. На місці перетину буде число 0,101, що відповідає вмісту цукру в 0,1 $см^3$ крові.

Припустимо, що на титрування вмісту контрольного розчину пішло 1,97 $см^3$ натрій триоксотіосульфату, що відповідає 0,005 мг цукру.

Таблиця 13

Вміст цукру в крові при визначенні по Хагедорну - Ієнсену

Гіпосульфіт, мг	*0,00*	*0,01*	*0,02*	*0,03*	*0,04*	*0,05*	*0,06*	*0,07*	*0,08*	*0,09*
0,0	0,385	0,382	0,370	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,260	0,266	0,264	0,6262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,I9I	0,190	0,188	0,186	0,184	0,184	0,182	0,181
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,2	0,141	0,139	0,130	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,093	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Від кількості цукру, знайденого для крові (0,101), віднімають знайдене для контрольної проби (0,005), одержують 0,096 мг. Отже, в 0,1 $см^3$ крові міститься 0,096 мг цукру.

Кількісне визначення глюкози в крові ортотолуїдиновим методом

В сучасній клінічній біохімічній практиці дедалі частіше використовують ортотолуїдиновий метод кількісного визначення глюкози в крові. Ортотолуїдин $CH_3–C_6H_5–NH_2$ в розчині ацетатної кислоти при нагріванні з глюкозою утворює сполуки зеленого кольору. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації глюкози; її визначають за допомогою фотоелектроколориметра. Для розрахунку концентрації глюкози треба побудувати калібрувальний графік.

Роботу прискорюють, використовуючи замість калібрувального графіка стандартний розчин глюкози з відомою концентрацією. Визначають оптичну густину (екстинкцію, Е) досліджуваного і стандартного розчинів і порівнюють їх між собою.

Хід роботи. В дві пробірки наливають по 0,9 $см^3$ 3 % розчину трихлороцтової кислоти. В одну з них додають мікропіпеткою 0,1 $см^3$ крові (досліджувана проба), а в другу – 0,1 $см^3$ стандартного розчину глюкози. Суміші центрифугують протягом 10 хв. за 1500 об/хв., або 5 хв. за 3000 об/хв. З кожної проби відбирають по 0,5 $см^3$ центрифугату і переносять їх відповідно в інші пробірки. В кожну пробірку додають по 2 $см^3$ ортотолуїдинового реактиву і вміщують їх у киплячу водяну баню на 8 хв. Пробірки охолоджують і колориметрують при червоному світлофільтрі в кюветах з робочою довжиною 10 мм.

Вміст глюкози x в досліджуваній пробі розраховують за формулою

$$x = \frac{c \times E_1}{E_2},$$

де c – вміст глюкози в стандартній пробі, ммоль/$дм^3$ (дорівнює 5,55 ммоль/$дм^3$); E_1 – екстинкція досліджуваної проби; E_2 – екстинкція стандартної проби.

Лабораторна робота № 11
ВИЯВЛЕННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ РЕАКТИВОМ УФФЕЛЬМАНА

Мета і завдання роботи: *освоїти методику колориметричного визначення молочної кислоти в тканинах тварин і людини; поглибити знання про участь молочної кислоти в процесах метаболізму.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про метаболічні процеси в організмі людини і тварин за участю молочної кислоти; вміння визначати кількісний вміст молочної кислоти в сироватці крові колориметричним методом, оцінювати за рівнем молочної кислоти в крові фізіологічний стан організму.*

М'язову тканину пропускають через м'ясорубку, потім 2 – 3 г її розтирають з 5 – 7 $см^3$ води у фарфоровій ступці. Отриману м'язову кашку фільтрують через подвійний шар марлі. Фільтрат кип'ятять протягом 1 хв., охолоджують, фільтрують через вологий складчастий фільтр. У три пробірки наливають по 5 $см^3$ 1 % розчину фенолу і в кожну з них додають по краплях 1 % розчин ферум (III) хлориду до появи інтенсивного фіолетового кольору (реактив Уффельмана). Потім в одну пробірку додають 1 $см^3$ 0,5 % розчину молочної кислоти, в другу – витяжку з м'язової тканини, а в третю – 1 $см^3$ води. Вміст пробірок перемішують. Комплексний фенолят заліза фіолетового кольору за присутності молочної кислоти перетворюється на молочнокисле залізо жовтувато-зеленого кольору. У першій і другій пробірці фіолетовий колір переходить в зеленувато-жовтий, що свідчить про наявність молочної кислоти; у третій пробірці колір розчину не змінюється.

Утворення молочної кислоти в процесі гліколізу

Для виявлення молочної кислоти як кінцевого продукту гліколізу її переводять в ацетатний альдегід за допомогою концентрованої сульфатної кислоти. Ацетатний альдегід відкривають реакцією з вератролом (ефіром диметил пірокатехіну).

Приготування інкубаційної суміші. М'язи щойно убитої жаби, або щура, або кролика швидко подрібнюють ножицями при охолодженні, і отриману м'язову кашку поміщають в дві пробірки по 0,5 г в кожну. У контрольну пробірку негайно додають 1 $см^3$ 20 % розчину трихлороцтової кислоти. У дві пробірки вносять по 6 $см^3$ 0,5 % розчину глікогену (або глюкози), приготовленого на 0,5 М розчині натрій гідрокарбонату. Для створення анаеробних умов в обидві пробірки нашаровують по 10 крапель вазелінової олії і ставлять в термостат при 37º С на 2 год.

Після інкубації в дослідну пробірку додають 1 $см^3$ 20 % розчину трихлороцтової кислоти, перемішують вміст обох пробірок і фільтрують.

Для осадження вуглеводів відбирають по 3 $см^3$ фільтрату, додають по 1 $см^3$ 20 % розчину купрум сульфату і по 1 г кальцій гідроксиду. Проби ретельно перемішують і залишають на 15 хв., час від часу помішуючи скляною паличкою. Потім проби фільтрують через сухий фільтр, обережно відбирають від кожної по 5 крапель прозорого фільтрату і вносять до чистих сухих пробірок. Пробірки поміщають в льодяну баню і по краплям (15), обережно струшуючи, додають концентровану сульфатну кислоту. Проби ставлять на 4 хв. в киплячу водяну баню і негайно після цього занурюють у воду з льодом. Після охолоджування до проб додають по 2 краплі розчину вератролу, вміст пробірок перемішують. Через деякий час в дослідній пробірці, де під впливом ферментів м'язової тканини пройшов гліколіз, з'являється яскраво-рожеве забарвлення. У контрольній пробі з'являється слабо-рожеве забарвлення, обумовлене присутністю в самій м'язовій кашці слідів молочної кислоти.

Лабораторна робота № 12
СПИРТОВЕ БРОДІННЯ

Мета і завдання роботи: *одержати мікробіологічним способом етиловий спирт, видалити його з бродильного середовища, очистити і ідентифікувати; зробити розрахунки процесу за виходом вуглекислого газу.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про механізм спиртового бродіння та інші види бродіння; вміння проводити процес спиртового бродіння, виділяти етиловий спирт із середовища перегонкою, ідентифікувати його за допомогою хімічних реакцій.*

У 1860 році Луї Пастер встановив, що бродіння не спонтанний процес, а результат життя за відсутності повітря. Він помітив, що в анаеробних умовах дріжджі зброджують значно більше цукру, ніж в аеробних, що анаеробне бродіння необхідне для їх життя. Існує багато типів бродіння. Як свідчать сучасні теорії розвитку, життя виникло в ті часи, коли кисню в атмосфері Землі було надзвичайно мало, внаслідок чого найбільш примітивні організми повинні були існувати за рахунок бродіння, яке являє собою найдавніший і найпростіший шлях одержання енергії клітинами.

Бродіння має важливе значення для організму людини. Хоча за звичайних умов м’язи отримують необхідну кількість кисню, і відбувається аеробне окиснення субстратів з виділенням великої кількості енергії, все ж інколи буває, що забезпечення киснем м’язів виявляється недостатнім. При крайньому напруженні зусиль, коли вже весь запас кисню використаний, м’язові клітини утворюють *лактат* шляхом бродіння. Частина лактату, що утворюється в м’язах і інших тканинах, надходить у кров і переноситься в печінку, де він знову окиснюється в піруват. Менша частина піровату потім окиснюється в циклі три- і дикарбонових кислот (Кребса), але більша

частина знову перетворюється в глюкозу, яка може надходити в кров і повертатися в м'язи. Весь цей процес називається циклом Корі.

Хід роботи. У конічну колбу на 250 $см^3$ вносять 20 г сахарози, додають близько 150 $см^3$ теплої дистильованої води, розчиняють цукор. Після розчинення цукру в колбу вносять 10 – 15 г хлібопекарських дріжджів і енергійно перемішують до утворення гомогенату. Сюди ж додають близько 1 г натрій гідрогенфосфату або калій дигідрогенфосфату. Після розчинення всіх компонентів суміші колбу із вмістом зважують і записують масу. Колбу закривають пробкою із газовідвідною трубкою, кінець якої занурюють у посудину з водою (гідравлічний замок).

У процесі бродіння сахарози виділяється вуглекислий газ, який по газовідвідній трубці через гідравлічний замок виходить в атмосферу, і у бродильній колбі тиск не підвищується. Разом з тим, кисень повітря не проникає в колбу, тобто в бродильному середовищі забезпечуються обов'язкові для цього процесу анаеробні умови.

Після закінчення бродіння (через декілька днів) колбу зі вмістом знову зважують (без пробки). Маса буде меншою унаслідок виділення вуглекислого газу. За масою виділеного вуглекислого газу розраховують коефіцієнт корисної дії процесу:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 4C_2H_5OH + 4CO_2.$$

Не змучуючи шар дріжджів на дні колби, зливають надосадову рідину, у якій міститься етанол, і переносять у колбу для перегонки. Для уникнення піноутворення за рахунок білків дріжджів, що були в розчині, у колбу додають декілька крапель олії. Збирають фракцію, яка кипить при температурі 90 – 95ºС. Отриманий дистилят переганяють ще кілька разів і при останній перегонці збирають фракцію з температурою кипіння 82 – 85ºС. В останній фракції якісно визначають наявність етилового спирту, окиснюючи його калій дихроматом до оцтового альдегіду, який має характерний запах прілих яблук:

$$3CH_3–CH_2OH + K_2Cr_2O_7 + 4H_2SO_4 =$$
$$= 3CH_3–CHO + +Cr_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 7H_2O.$$

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте хімічні властивості гексоз, напишіть відповідні рівняння реакцій (окиснення, відновлення, метилювання, альдольної конденсації та ін.).
2. Наведіть будову та біологічну роль мукополісахаридів.
3. Перелічіть найбільш важливі гетерополісахариди. Зазначте їх будову та біологічну роль.
4. Покажіть будову, властивості, біологічну роль та номенклатуру найбільш важливих дисахаридів.
5. Охарактеризуйте будову, розповсюдження в природі альгінової та пектинової кислот, арабінанів.
6. Наведіть будову кетоз: ксилулози, рибулози, фруктози. Охарактеризуйте утворення напівацеталів та фуранозні форми.
7. Покажіть будову гомополісахаридів та їх біологічну роль.
8. Перелічіть найважливіші альдози. Запропонуйте для них формули Толленса, Хеуорса, охарактеризуйте різні конформації молекул.
9. Покажіть будову та біологічну роль аміносахарів та їх похідних. Зазначте їх знаходження в природі.
10. Опишіть будову та вкажіть біологічну роль агар-агару, інуліну, меліцитози, мелітріози.
11. Перелічіть найбільш важливі альдонові, уронові та альдарові кислоти. Зазначте їх будову та біологічну роль.
12. Охарактеризуйте будову та біологічну роль найбільш поширених трисахаридів, вкажіть їх знаходження в природі.

Завдання для самостійної роботи

1. Напишіть структурні формули: α-D-галактопіранозил – (1-6)-α-D-глюкопіранозил – (1-6)-β-D-фруктофуранозиду; α-D-глюкопіранозил – (1-6)-α-D-маннопіранозил – (1-4)-β-D-галактопіранозиду; N-ацетил-D-глюкозамін – (1-4)-β-N-ацетилмурамової кислоти.
2. Запропонуйте спосіб доведення наявності моносахаридів у бджолиному меді. Запишіть відповідні рівняння реакцій. Вкажіть їх ознаки і умови протікання.
3. Чому, на вашу думку, для визначення глюкози використовується саме молекулярний йод у лужному середовищі, а не інший окисник?

4. Поясніть, чому лактоза може утворювати дві аномерні форми, а сахароза – ні.
5. Визначте дисахарид за його характеристикою та зобразіть перспективну формулу: не має відновлюючих властивостей, при обробці диметилсульфатом та лугом дає октаметильне похідне. Кислотний гідроліз цього похідного призводить до утворення 2,3,4,6-тетраметил-D-глюкози і 2,3,4,6-тетраметил-D-галактози у співвідношенні 1:1.
6. Майже 30 % ваги кокона жука-паразита *Larinus maculatus* припадає на вуглевод, при кислотному гідролізі якого утворюється лише D-глюкоза. Якщо піддати вуглевод вичерпному метилюванню, а потім провести кислотний гідроліз, то утвориться лише один продукт – 2,3,4,6-тетраметилглюкоза. Яка будова цього вуглеводу? До якої групи вуглеводів (моно-, ди-, полісахаридів) він належить? Охарактеризуйте його відновні властивості.
7. Зобразіть перспективні та конформаційні формули фрагментів молекул а) целюлози; б) амілози. Яку просторову форму має кожний з цих полімерів? Покажіть, як утворюються зв'язки, що її стабілізують. Поясніть відмінності у властивостях і біологічних функціях цих речовин на підставі особливостей будови.
8. Целюлозу повністю метилювали. Які продукти гідролізу утворює одержане похідне? Зобразіть перетворення речовин за допомогою перспективних формул.
9. Знайдіть спільні і відмінні риси у характеристиках двох полісахаридів: а) амілопектин і глікоген; б) амілоза і целюлоза; в) целюлоза і хітин; г) гіалуронова кислота і гепарин (1 – будова мономерної ланки, 2 – тип зв'язку між ланками (основний і в точках галуження), 3 – лінійний чи розгалужений ланцюг, 4 – ймовірна конформація мономерної ланки (крісло, човен), 5 – просторова форма молекули (компактна або нитчаста), 6 – спорідненість до води, 7 – біологічна функція).

Задачі

1. 2,71 г сахарози прокип'ятили з 10 % розчином хлоридної кислоти. Розчин охолодили, нейтралізували содою і додали надлишок аргентум оксиду. В результаті утворилось 0,8 г металічного срібла. Визначте ступінь гідролізу сахарози.
2. Вуглекислий газ, утворений в результаті згоряння 18 г глюкози, пропустили через 60 $см^3$ 1 М розчину натрій гідроксиду. Які продукти і в якій кількості утворились при цьому?
3. Вуглекислий газ, що виділився в результаті згоряння глюкози, утворив з повітрям 45 $дм^3$ (н.у.) суміші, густина якої за воднем 19,75. Яку кількість глюкози спалили?
4. При окисненні 2,25 г суміші глюкози і арабінози реактивом Феллінга утворилось 2,0 г купрум (I) оксиду. Визначте масові частки речовин у суміші.
5. Скільки грамів галактози та ацетатного ангідриду необхідно для одержання 200,8 г пентаацетилгалактози? Відомо, що вихід продукту становить 62 % .
6. На розчинення срібла, що утворилось за дії на 3 г суміші глюкози та сахарози амоніачного розчину аргентум нітрату, витратили 11,95 $см^3$ 10 % розчину нітратної кислоти густиною 1,054 г/$см^3$. Розрахуйте масову частку речовин у суміші.
7. Який об'єм 25 % нітратної кислоти густиною 1,33 г/$см^3$ буде витрачено на розчинення срібла, яке утвориться в результаті взаємодії 1,8 г галактози з аргентум оксидом?
8. На окиснення 5,7 г суміші глюкози і арабінози витрачено 1,78 $см^3$ брому густиною 3,14 г/$см^3$. Визначте масову частку речовин у суміші.
9. Обчисліть об'єм молекули глюкози ($нм^3$), якщо її густина 1,56 г/$см^3$. Який об'єм припадає на глюкозу в 1 $дм^3$ крові за концентрації 5 мМ?
10. Обчисліть концентрацію фруктози у крові дорослої людини, якщо її вміст становить 0,4 % середнього вмісту глюкози.
11. В результаті вичерпного метилювання 258 мг амілопектину і кислотного гідролізу утвореного похідного одержали 12,4 мг 2,3-диметилглюкози. Визначте скільки глюкози (%) в амілопектині знаходиться в точках галуження. Скільки залишків глюкози (в середньому) знаходиться між точками галуження? Які продукти гідролізу утворюють кінцеві (відновлюючий і невідновлюючий) залишки ланцюга?

ЛІПІДИ

Ліпідами називаються органічні сполуки, до складу яких входять жири і жироподібні речовини, що мають спільну фізичну властивість – вони нерозчинні у воді, але розчинні в органічних розчинниках (ефірі, хлороформі, бензолі, толуолі, спиртах, диметилкетоні та ін.). Молекули різноманітних ліпідів містяться в клітинах тварин, рослин і мікроорганізмів. У організмі тварин багато ліпідів міститься в головному мозку, печінці, нирках та серці. *Ліпіди* – це структурні компоненти мембран, їх вміст у різноманітних структурних органелах становить від 20 до 60 % в перерахунку на суху масу.

У складі ліпідів виявлені стерини, насичені й ненасичені вищі жирні кислоти, альдегіди, *кетони*, холестерин, азотисті основи, амінокислоти, вуглеводи, фосфатна кислота, *гліцерин*. Ці різноманітні компоненти сполучені в молекулах складних ліпідів різними зв'язками – простими ефірними, складноефірними, фосфодіефірними й ін.

Ліпіди відіграють важливу роль у забезпеченні організму енергією. Відомо, що при окисненні жирів виділяється вдвічі більше енергії, ніж при окисненні такої ж кількості білків або вуглеводів. Будучи високоенергетичними сполуками, ліпіди використовуються організмом як резервний матеріал. Надлишок енергії спричиняє посилення їх синтезу і накопичення, а за умови дефіциту – починається використання їх організмом.

Основні функції ліпідів наведено у таблиці 14.

Класифікація ліпідів дуже складна у зв'язку зі складністю будови молекул цих речовин та їх різноманітністю. Розрізняють резервні (запасні) і конституційні (цитоплазматичні) ліпіди. Резервні ліпіди являють собою енергетичний резерв організму і відкладаються переважно в підшкірній жировій тканині, сальнику, брижі, печінці, м’язовій тканині (у людини складають близько 10 – 15 % маси тіла).

Таблиця 14

Основні функції ліпідів

Функція	*Приклад*
Енергетична	У разі повного окиснення 1 г жирів до вуглекислого газу і води виділяється 38,9 кДж енергії
Будівельна	Характерна для фосфоліпідів – є основою клітинних мембран, входять до складу нервових волокон і т.і.
Захисна	Захищають внутрішні органи людини від механічних пошкоджень
Теплоізоляційна	Запобігають переохолодженню
Видільна	У жировому тілі комах можуть накопичуватися кінцеві продукти обміну речовин
Регуляція життєвих функцій	Беруть участь у обміні речовин хребетних тварин
Запасна	Використовуються організмом як резервний матеріал

Організм використовує його по мірі необхідності. Конституційні ліпіди є структурними компонентами цитоплазми і змінюються в процесі життєдіяльності дуже мало, навіть у випадках крайнього виснаження організму.

За хімічним складом і фізико-хімічними властивостями ліпіди поділяють на прості і складні. До простих ліпідів належать складні ефіри різних спиртів і вищих жирних кислот: жири, стериди, воски. Складні ліпіди крім залишків спиртів і вищих жирних кислот, містять і інші речовини: фосфатну і сульфатну кислоту, азотисті основи, вуглеводи й ін. До складних ліпідів належать *фосфоліпіди*, гліколіпіди, сульфоліпіди.

Прості ліпіди

Жири – органічні речовини, які є сполукою складних ефірів трьохатомного спирту (гліцерину) і жирних кислот, інша назва – *тригліцериди*. Як і вуглеводи, жири використовуються як джерело енергії: під час розщеплення одного грама жиру виділяється 38,9 кДж енергії. Підшкірний жир виконує важливу теплоізоляційну функцію,

а також сприяє зменшенню впливу ударів та поштовхів, є джерелом ендогенної води в організмі, є розчинником вітамінів. Для тварин, які впадають у сплячку, жири забезпечують організм необхідною енергією, оскільки поживні речовини ззовні в цей час не надходять. Жири становлять запас поживних речовин і в насінні багатьох рослин.

Класифікацію жирів за походженням наведено у табл. 15.

Таблиця 15

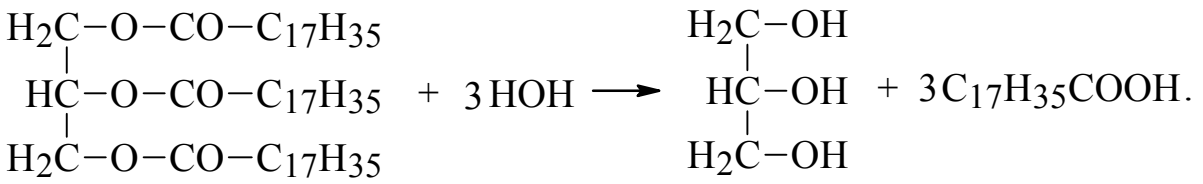
Класифікація жирів за походженням

Тваринні жири	*Комбіновані жири*	*Рослинні жири*
тверді; жири, в їх молекулах переважають залишки ***насичених вищих жирних кислот*** *пальмітинової* і *стеаринової* (яловичий, баранячий, свинячий жир)	тверді; гідрогенізовані ***рослинні жири*** (маргарин, кондитерські жири)	рідкі; олії містять переважно залишки ***ненасичених вищих жирних кислот*** *(олеїнової, лінолевої і ліноленової* та деяких інших). Пальмове і кокосове масло відносяться до групи рослинних олій, що містять у великій кількості насичені кислоти

Фізичні властивості. За звичайної температури можуть бути в різному агрегатному стані (бараняче і яловиче сало – тверді речовини; олії – рідкі). Температура плавлення жирів залежить від того, які вищі жирні кислоти входять до їх складу, тому визначення температури плавлення жирів дає певне уявлення про їх склад. Жири добре розчиняються в діетиловому ефірі, бензолі, толуолі і бензині і не розчиняються у воді, утворюючи емульсії, якщо є емульгатори (білок, рослинні слизи, жироподібні речовини). Якщо емульгаторів немає, то через деякий час жир на поверхні води знову з'являється. Прикладом природних емульсій є жовток яйця, молоко.

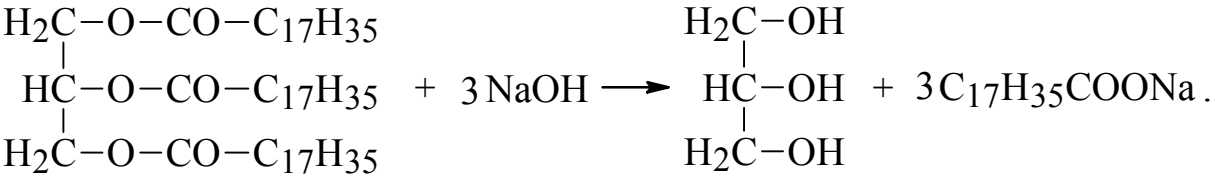
Хімічні властивості. При нагріванні жири розпадаються утворюючи дим. Молекули жиру руйнуються, гліцерин частково перетворюється на шкідливий для здоров'я акролеїн з різким запахом. Температура розкладання жиру залежить від його хімічного складу.

Найважливішою властивістю жирів є їх *гідроліз*, який відбувається за наявності води під впливом кислот, лугів або ферментів з розщепленням на гліцерин і вищі жирні кислоти:

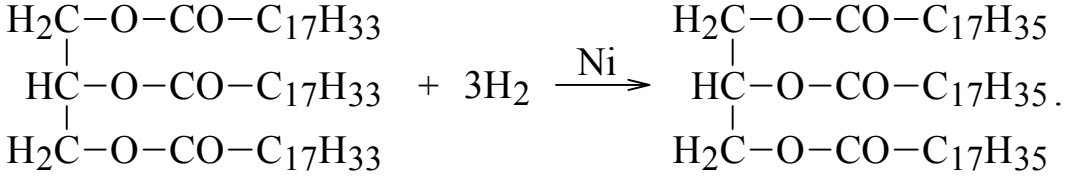


Тристеарат Гліцерин Стеаринова кислота

При гідролізі жирів у *лужному середовищі*, крім гліцерину, утворюються солі вищих карбонових кислот – *мила*. Звідси і пішла назва реакцій взаємодії складних ефірів з водою – *реакції омилення:*

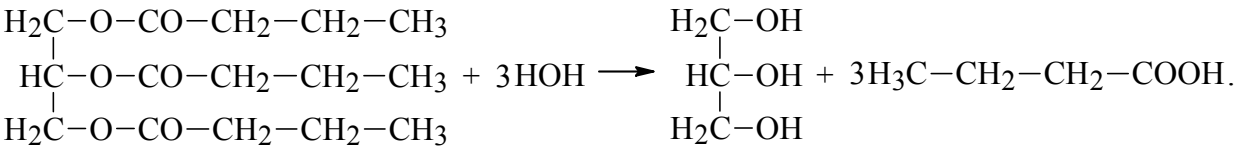


Рідкі жири перетворюються на тверді шляхом реакції *гідрогенізації.* Водень приєднується по місцю розриву подвійного зв'язку у вуглеводневих радикалах молекул жирів:



При зберіганні жири під впливом світла, кисню повітря і вологи набувають неприємного смаку і запаху. Цей процес, що полягає в окисненні і гідролізі жирів, називається згіркнення.

Гідроліз жирів – це зміни в жирі, що відбуваються під впливом ферментів або мікроорганізмів, внаслідок чого утворюються вільні вищі жирні кислоти, гіркі на смак і з неприємним запахом. Цей процес характерний для коров'ячого масла, в якому міститься гліцерид масляної кислоти – трибутират. При доступі повітря коров'яче масло згіркає, відбувається гідроліз і вивільнюється масляна кислота.

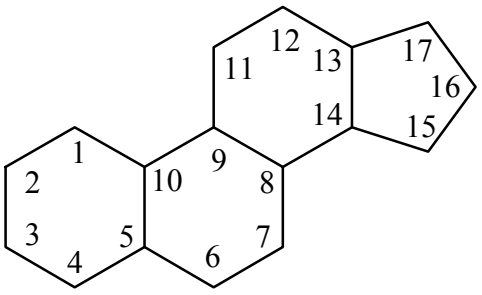


Трибутерин Масляна кислота

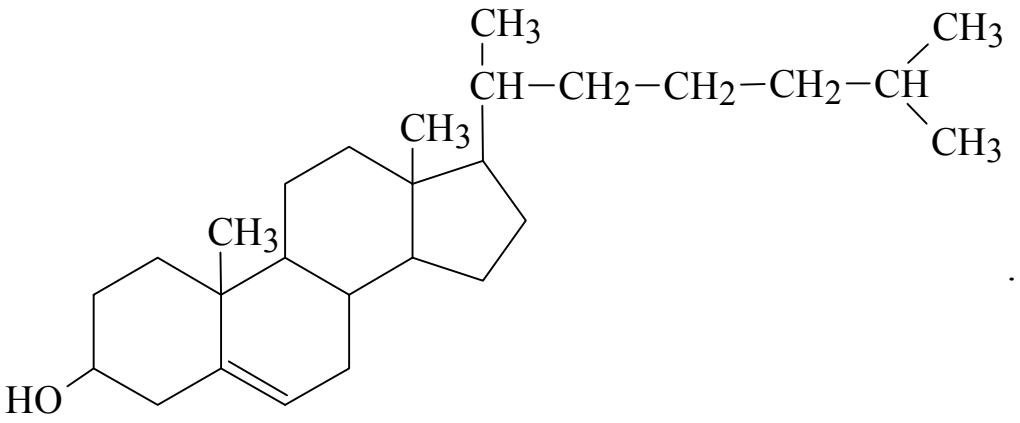
Промиваючи згіркле коров'яче масло у соді, можна видалити масляну кислоту.

Окиснення жирів призводить до утворення альдегідів і кетонів з коротким вуглецевим ланцюгом у молекулі, які також мають неприємний запах і смак. Для того, щоб запобігти згіркненню рослинного комбіжиру, застосовують антиоксиданти, які зменшують процес згіркнення. До антиоксидантів належать хінони, катехіни.

Стериди – це продукти реакції естерифікації, що відбувається між гідроксильною групою циклічних спиртів стеролів (стеринів) і карбоксильною групою вищих жирних кислот. В організмі переважно поширені вільні стероли (близько 90 %), а не їх естери. Стерини, або стероли, похідні циклопентапергідрофенантрену, який можна розглядати як продукт конденсації гідрованого фенантрену і циклопентану:



Основним представником стеринів є холестерин, який є ненасиченим одноатомним циклічним спиртом. На зовнішній вигляд – це біла кристалічна речовина, яка розчиняється лише в органічних розчинниках. Із жирними кислотами *холестерин* утворює складні ефіри – холестериди:



Із вищих жирних кислот, виявлених у складі стеридів є переважно пальмітинова, стеаринова та олеїнова кислоти. Більша частина холестерину в організмі існує у вільному (неетерифікованому) стані.

Стерини є основою для утворення в організмі біологічно активних сполук – жовчних кислот, статевих гормонів, гормонів кори надниркових залоз та вітамінів групи D. Основна кількість стеринів і стеридів утворює в організмі комплекси з білками.

Віск – органічна речовина рослинного або тваринного походження, утворена зі складних ефірів – вищих жирних кислот і вищих, переважно одноатомних, спиртів. Сьогодні відомо близько 300 видів твердих і рідких восків. Вони належать до дуже стійких складових частин рослин, хоча, як і жири, здатні піддаватися гідролізу. Біологічне призначення восків – покривати тонким шаром стебла, листя й оболонки плодів наземних рослин, охороняючи їх від зовнішніх впливів. У нижчих рослинах воски зосереджені в оболонках клітин. У порівнянні з жирами воски більш багаті Карбоном (80 – 82 %) і Гідрогеном (13 – 14 %) і, отже, містять менше Оксигену (4 – 7 %).

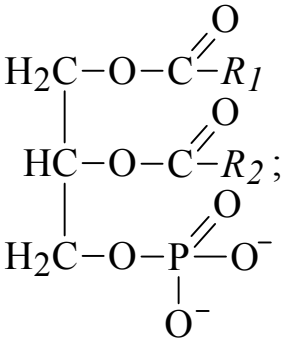
Складні ліпіди

Молекули складних ліпідів крім залишків жирних кислот і спиртів містять також похідні ортофосфатної кислоти (фосфоліпіди), залишки вуглеводів (гліколіпіди), азотисті сполуки холін, коламін, серин. Їхні сліди є в кожній клітині, переважно у клітинних мембранах, особливо у мозкових і нервових тканинах. Містяться складні ліпіди в усіх природних оліях, маслі, вершках. Серед складних ліпідів виділяють:

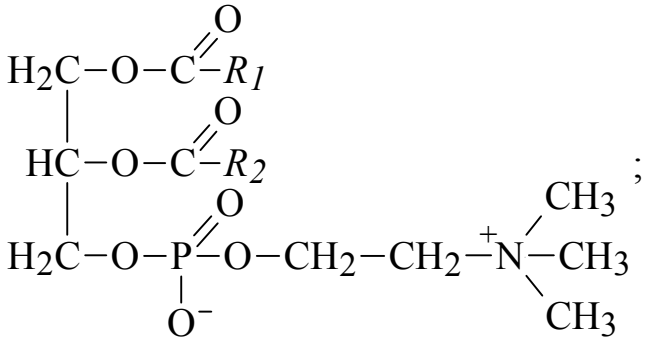
– фосфатиди;
– гліколіпіди;
– *ліпопротеїди*.

Фосфоліпіди – складні ліпіди, що містять в своєму складі багатоатомний спирт, залишок фосфатної кислоти та залишки жирних кислот. Є основними складовими біологічних мембран.

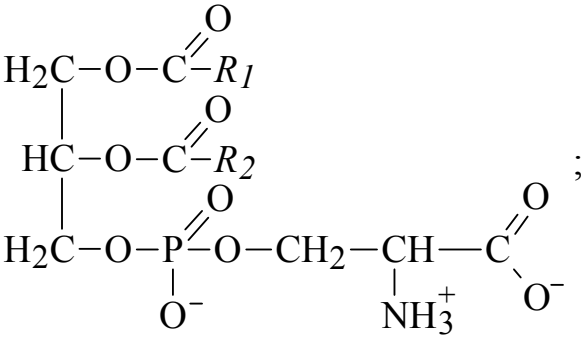
Залежно від природи спирту, сполученого із залишками вищих жирних кислот, фосфоліпіди поділяються на фосфогліцериди і сфінголіпіди. Фосфогліцериди складаються із залишку гліцерину, з'єднаного по C_1 і C_2 із залишками вищих жирних кислот (по C_2, як правило, ненасиченої) і по C_3 – із залишком фосфатної кислоти. Утворена сполука називається фосфатидною кислотою. Через залишок фосфату вона з'єднується з азотистою основою (найчастіше холіном, етаноламіном або серином) або циклічним спиртом інозитолом.



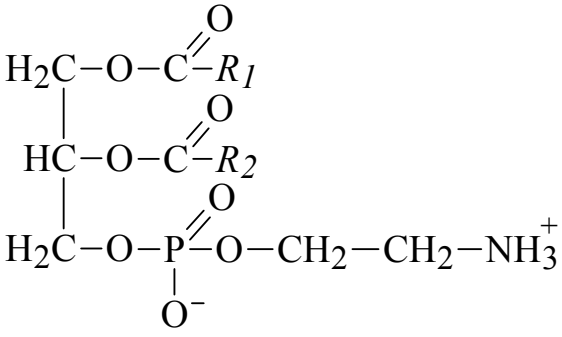
L-Фосфатидна кислота



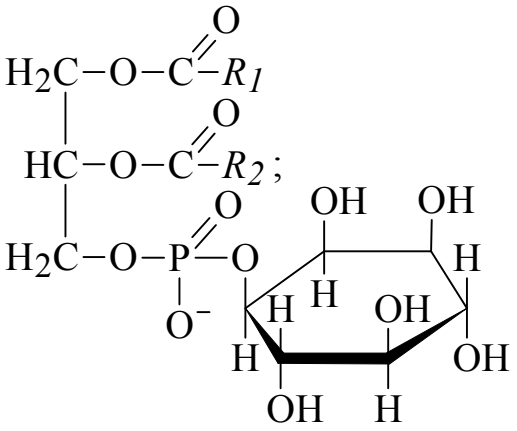
Фосфатидилхолін



Фосфатидилсерин

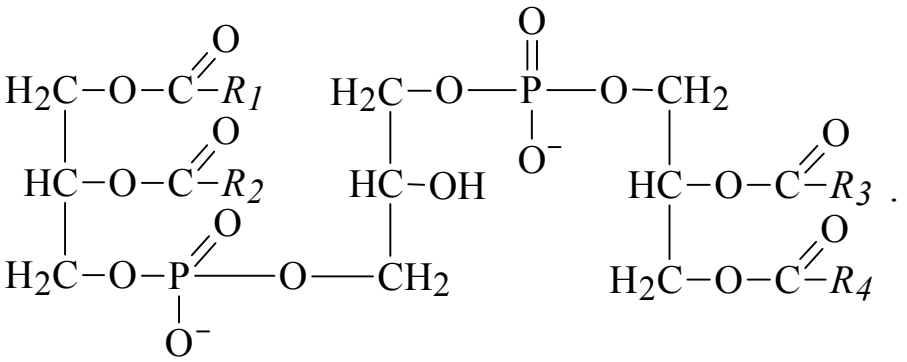


Фосфатидилетаноламін



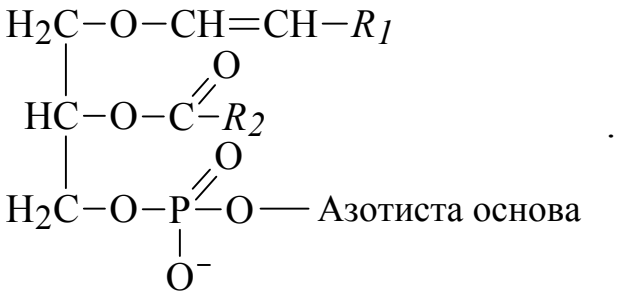
Фосфатидилінозит

Кардіоліпіни є “подвійними” фосфогліцеридами. У них два залишки фосфатидної кислоти об’єднуються гліцероловим “містком”:



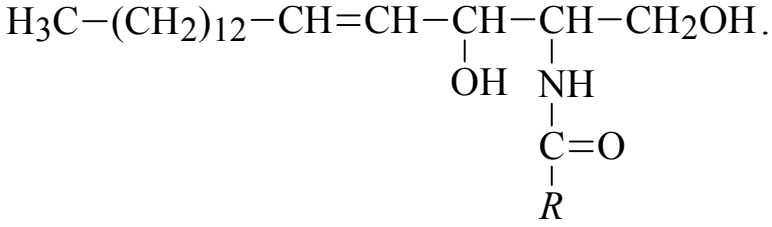
Кардіоліпін

До фосфогліцеридів належать також ацетальфосфатиди (плазмалогени), які відрізняються від розглянутих вище представників тим, що замість одного із залишків вищої жирної кислоти містять α-, β-ненасичений спирт, який утворює етер із залишком гліцерину. В розбавлених кислотах вони гідролізують з утворенням альдегіду відповідного ненасиченого спирту.



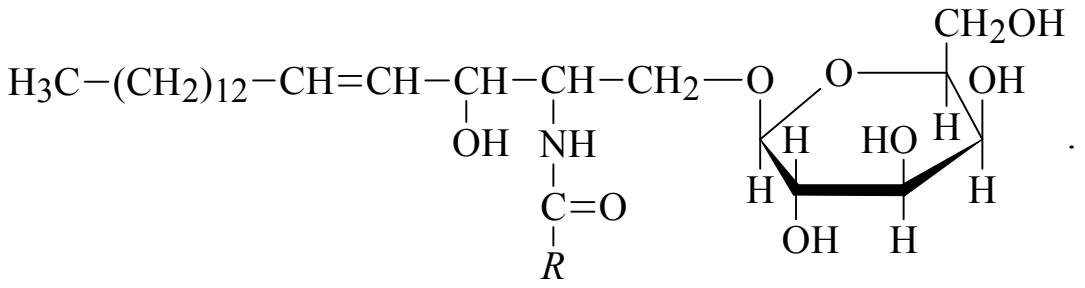
Ацетальфосфатид (плазмалоген)

Сфінголіпіди містять залишок ненасиченого аміноспирту сфінгозину. Він з’єднується із залишком вищої жирної кислоти амідним зв’язком. Утворене похідне носить назву цераміду:



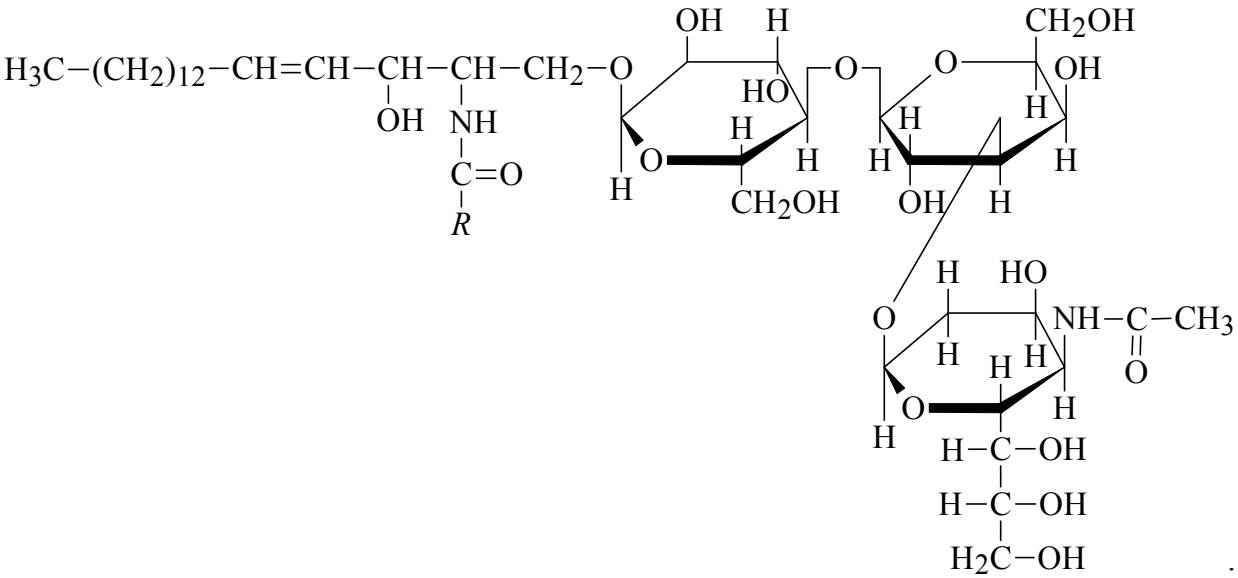
За фізіологічних умов (pH біля 7,0) залишки фосфату, аміно- і карбоксильні групи полярних голів іонізовані. Фосфоліпіди є структурними компонентами біомембран. На їх частку припадає до 50 % всіх мембранних ліпідів.

Гліколіпіди та сульфоліпіди. В молекулах гліколіпідів полярним компонентом служить не фосфат, а залишок вуглеводу (галактози, глюкози, манози або олігосахариду), з'єднаний зі сфінгозином ефірним зв'язком. Центральною ланкою може бути гліцерин (виявлені в бактеріях та зелених рослинах), або сфінгозин (у цереброзидах та гангліозидах). Цереброзиди містять залишок моно- або дисахариду:



Цереброзид

До складу гангліозидів входять дуже складні розгалужені олігосахариди, що містять хоча б один залишок N-ацетил-нейрамінової (сіалової) кислоти:



N-Ацетилнейрамінова кислота

Вища жирна кислота гангліозидів містить, як правило, 24 атоми Карбону. В клітинних мембранах виявлено більш ніж 15 класів гангліозидів. Сульфоліпіди можна розглядати як похідні гліколіпідів, в яких залишок сульфату утворює ефірний зв'язок з гідроксилом вуглеводного компоненту.

Гліколіпіди знаходяться у великих кількостях в нервовій тканині – мієлінових оболонках нервів, сірій речовині мозку, однак досить поширені і в інших тканинах. Гангліозиди входять до складу рецепторних ділянок мембран. При деяких хворобах гліколіпіди накопичуються в аномально великих кількостях у зв'язку з порушенням обміну речовин.

Природні ліпіди утворюють надзвичайно складні суміші, в яких компоненти зустрічаються в різноманітних поєднаннях. Ліпіди утворюють комплекси з білками за рахунок гідрофобних взаємодій з їх неполярними групами, що є формою транспорту ліпідів в крові і характерні для клітинних мембран.

Методи виділення ліпідів з сировини, перетворення ліпідів при виготовленні продуктів харчування

Під час аналізу ліпідів та продуктів їх перетворення використовують класичні хімічні методи, сучасні фізико-хімічні (хроматографія, спектроскопія, рентгеноструктурний аналіз). В практиці харчової хімії склад та кількісне визначення жирів та олій

виражають різноманітними аналітичними числами, виходячи з кількості певних реагентів, яка витрачається на реакцію з жирами.

Кислотне число (КЧ) – характеризує кількість вільних жирних кислот у жирі. Виражається в мг КОН, який витрачено на нейтралізацію вільних жирних кислот у 1 г жиру. Враховуючи, що зберігання харчових продуктів завжди супроводжується гідролізом жирів, то за величиною КЧ можна визначити якість жирів. У заводській практиці КЧ використовують для розрахунку кількості лугу, необхідного для рафінування жирів та олій. *Число омилення* (ЧО) – відповідає кількості мг КОН, необхідного для омилення гліцеридів та нейтралізації вільних жирних кислот в 1 г жиру. *Йодне число* (ІЧ) – показник, який характеризує ненасиченість жирних кислот. Виражається у г йоду, який було використано для насичення жирних кислот в 100 г жиру. ІЧ використовують для визначення виду жиру, здатності його до "висихання", розрахунку потрібної кількості водню для його гідрогенізації. Вміст вільних жирних кислот в олії характеризується кислотним числом, а вміст їх у вигляді ефірних кислот – ефірним числом, тобто числом міліграмів калій гідроксиду, необхідного для нейтралізації ефірних зв'язків жирних кислот, які звільняються при омиленні 1 г олії. Експериментально ефірне число визначається по різниці між числом омилення та кислотним числом. Вище вказані аналітичні числа для певних жирів коливаються в незначний мірі і характеризують вид жиру та його якість.

Біологічні мембрани

Біологічні мембрани – (від лат. "мембрана" – шкірочка, перетинка) – складні, високоорганізовані надмолекулярні структури, що обмежують клітину (клітинні, або плазматичні мембрани) та внутрішньоклітинні органоїди – мітохондрії, хлоропласти, лізосоми та ін. Являють собою рідинно-кристалічний розчин білків у ліпідах – плівки товщиною 5 – 10 нм, що складаються головним чином із подвійного шару ліпідів із включенням білків (рис. 14). Відношення ліпіди : білки (за масою) коливається від 4 : 1 (мембрана мієліну) до 1 : 3 (внутрішня мембрана мітохондрій). Мембрани містять також вуглеводи (до 10 % сухої речовини за масою), які, як правило, входять до складу глікопротеїдів та гліколіпідів. Головні функції мембран – бар'єр для дифузії, регуляція обміну речовин між клітиною і середовищем, а також між компартментами самої клітини.

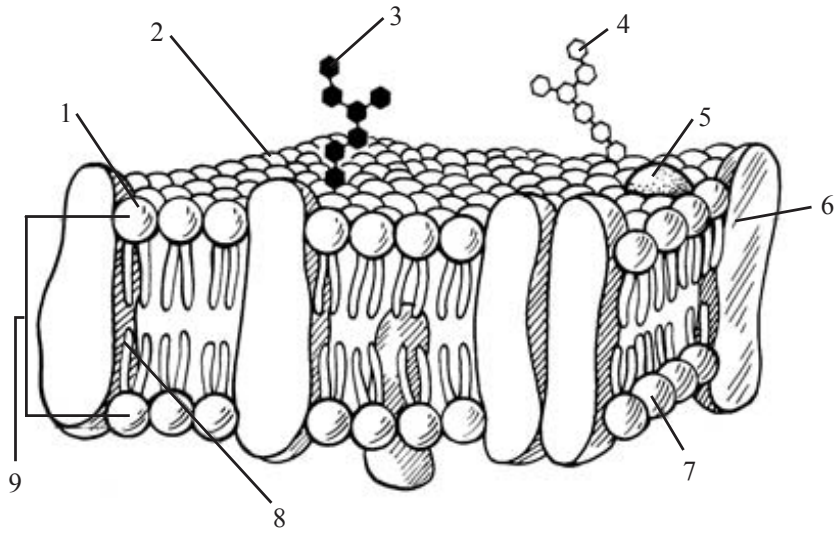


Рис. 14. Схема мозаїчної моделі клітинної мембрани: 1 – гідрофільна голівка молекули ліпіда; 2 – зовнішня поверхня мембрани; 3 – вуглеводний ланцюг; 4 – гліколіпід; 5 – глікопротеін; 6 – інтегральний білок; 7 – внутрішня поверхня мембрани; 8 – гідрофобний хвіст молекули ліпіда; 9 – подвійний шар ліпідів

Ліпіди мембран. Основні ліпідні компоненти мембран – фосфоліпіди, гліколіпіди і стерини. У клітинах ссавців плазматичні мембрани збагачені холестерином і глікосфінголіпідами, в той час як мембрани органоїдів містять ці ліпіди у малих кількостях. Взагалі фосфоліпіди завдяки своїй унікальній структурі здатні утворювати міцели, моношари або бішари – основний будівельний матеріал, з якого формуються клітинні мембрани. Складність, різноманітність та мінливість ліпідного складу мембран дозволяє припустити, що вони приймають участь також в регуляції найважливіших мембранних процесів.

Мембранні білки значно різняться між собою за щільністю зв’язування з мембраною. Периферичні білки порівняно слабко зв’язані з мембраною і відділяються від неї за “м’яких умов”, наприклад у розчинах, що мають високу іонну силу або містять комплексони. Набагато щільніше пов’язані з мембраною інтегральні білки – щоб їх виділити, потрібно, як правило, попередньо зруйнувати мембрану за допомогою поверхнево-активних речовин або органічних розчинників. Характерна особливість інтегральних білків – погана розчинність у воді і здатність до утворення асоціатів.

Лабораторна робота № 13
ВИЗНАЧЕННЯ КОНСТАНТ ЖИРІВ

Мета і завдання роботи: *провести реакції для визначення основних констант жирів різного походження.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів визначення кислотного, йодного числа жирів, числа омилення жирів та ненасиченості; знати константи жирів різного походження; вміти порівнювати різні жири за їхніми константами.*

Визначення ненасиченості жирів

Ненасиченість жирів залежить від наявності в їх складі ненасичених жирних кислот. Ненасичені сполуки легко приєднують по два атоми галогена за подвійними зв'язками. Ступінь ненасиченості визначають йодним числом.

За подвійними зв'язками реагують і інші галогени – Хлор і Бром. Проте вони не тільки приєднуються по подвійним зв'язкам, але й заміщують атоми Гідрогену в радикалі. В той час як Йод в умовах визначення реагує переважно по подвійних зв'язках.

Порівняння ненасиченості різних жирів

Зважують в пробірки по 0,5 г різних жирів (свиняче сало, коров'яче масло, маргарин, олія). Розчиняють кожний жир в 3 $см^3$ хлороформу і титрують із мікробюретки 0,001 н розчином йоду в хлороформі до рожевого забарвлення. Записують об'єм розчину йоду, який витрачено на насичення кожного виду жиру. Розміщують досліджувані жири по зменшенню ступеня їх ненасиченості.

Визначення йодного числа

В суху конічну колбу вмістом 250 $см^3$ з пришліфованою скляною пробкою поміщують досліджуване масло. Наважку беруть на аналітичних терезах наступним чином: зважують склянку (з-під пеніциліну) з олією і крапельницею в пробці, відміряють крапель-

ницею в колбу 3 – 4 краплі олії і знову зважують склянку. По різниці ваги визначають масу наважки. В колбу додають 25 $см^3$ етанолу. Якщо олія погано розчиняється, треба підігріти колбу на водяній бані. У другій колбі ставлять "сліпий дослід" (контроль), тобто відміряють 25 $см^3$ етанолу. В кожну колбу (дослід і контроль) додають по 12,5 $см^3$ 0,2 н спиртового розчину йоду (із бюретки), змішують, приливають по 100 $см^3$ дистильованої води і струшують, закривши пробкою. Через 5 хв. вміст колб титрують 0,1 н розчином натрій триоксотіосульфату: спочатку до появи слабо-жовтого забарвлення, а потім, додавши 1 $см^3$ розчину крохмалю, титрують до зникнення синього забарвлення.

Різниця між кількістю 0,1 н розчину натрій триоксотіосульфату, витраченого на титрування досліду і контролю, є показником кількості йоду, зв'язаного олією. Йодне число (в г) визначають за формулою

$$Йодне\ число = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,0127 \times 100}{a},$$

де V_1 – об'єм 0,1 н розчину $Na_2S_2O_3$, витрачений на титрування контролю, $см^3$; V_2 – об'єм 0,1 н розчину $Na_2S_2O_3$, витрачений на титрування досліду, $см^3$; 0,0127 – титр триоксотіосульфату по йоду, a – наважка жиру, г.

Розходження в значеннях йодних чисел в паралельних дослідах допускається лише в десятих частках.

Визначення кислотного числа жирів

Кислотне число поряд з іншими фізико-хімічними показниками характеризує якість олії. Наприклад, якщо олію добули із зрілого насіння, то вільних жирних кислот в ній мало, а в олії незрілого насіння їх вміст значний. При зберіганні олії спостерігається гідроліз гліцеридів, який призводить до накопичення вільних жирних кислот, тобто до підвищення кислотності, що свідчить про зниження якості продукту.

Визначення кислотного числа базується на методі кислотно-основного титрування. При цьому вільні жирні кислоти, які містяться в олії, відтитровують 0,1 н розчином КОН. Взагалі для титрування використовують калій гідроксид, оскільки калієві мила, які утворюються, краще розчинні в умовах досліду порівняно з натрієвими.

На аналітичних терезах беруть наважку олії (2 – 3 г) по різниці, переносять її в конічну колбу ємністю 50 – 100 $см^3$ і розчиняють в 10 – 15 $см^3$ нейтральної суміші етанолу і ефіру (1 : 1). Після

розчинення жиру додають 1 – 2 краплі розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н спиртовим розчином калій гідроксиду до слабо-рожевого забарвлення. Колір після збовтування не повинен зникати протягом 0,5 – 1 хв.

Кислотне число визначають за формулою

$$Кислотне\ число = \frac{V \times T}{a},$$

де V – кількість 0,1 н розчину КОН, витрачене на титрування наважки жиру, см^3; T – титр 0,1 н розчину калій гідроксиду, мг; a – наважка жиру (г).

Визначення числа омилення жирів

Числом омилення називають число міліграмів калій гідроксиду, необхідне для нейтралізації як вільних, так і зв'язаних (у формі гліцеридів) жирних кислот, що містяться в 1 г олії.

В одну колбу ємністю 50 см^3 вносять 0,5 г жиру, зваженого на аналітичних терезах, а в другу – 0,5 см^3 води. Потім в обидві колби додають із бюретки по 15 см^3 0,5 н спиртового розчину калій гідроксиду. Колби закривають пробками зі зворотними повітряними холодильниками і нагрівають на киплячій водяній бані упродовж 30 – 40 хв. при періодичному струшуванні. Слідкують, щоб рідина в колбі слабо кипіла і щоб верхня частина трубки не нагрівалась. По закінченню омилення в кожну колбу додають 15 – 20 см^3 води, по 3 – 4 краплі фенолфталеїну і титрують 0,5 н розчином хлоридної кислоти до зникнення рожевого забарвлення (визначають кількість лугу, що не вступив в реакцію). Виходячи з того, що 1 см^3 0,5 н розчину калій гідроксиду відповідає 28 мг КОН, розрахунок числа омилення ведуть за формулою

$$Число\ омилення = \frac{(V_1 - V_2) \times 28}{a},$$

де V_1 – об'єм 0,5 н розчину HCl, витрачений на титрування контролю (колба з водою), см^3; V_2 – об'єм 0,5 н розчину HCl, витрачений на титрування досліду (проба з жиром), см^3; a – маса жиру, г.

Лабораторна робота № 14
ВИДІЛЕННЯ ФОСФАТИДІВ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Мета і завдання роботи: *провести виділення лецитину із вареного жовтка і з'ясувати його розчинність у різних розчинниках.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів виділення фосфатидів із біологічного матеріалу; знати розчинність лецитину в розчинниках різної природи.*

Виділення лецитину з вареного жовтка і розчинність його в різних розчинниках

Жовток вареного яйця розтирають в ступці з 40 $см^3$ ефіру. (Обережно! Усі пальники в лабораторії повинні бути погашені). Рідину відфільтровують через складчастий фільтр. Залишок в ступці двічі промивають порціями ефіру по 5 $см^3$, зливаючи їх на фільтр. Фільтрат переливають з колби у випарювальну чашку і випарюють досуха на водяній бані (у витяжній шафі, вогонь під банею повинен бути погашений). Сухий залишок містить суміш жирів і ліпоїдів. Його двічі (порціями по 8 $см^3$) обробляють киплячим етиловим спиртом. Спиртові витяжки після охолодження відфільтровують через сухий фільтр у випарювальну чашку. Фільтрат повинен бути прозорим. 2 $см^3$ фільтрату переносять у пробірку, решту спирту випарюють на водяній бані. Залишок представляє собою сирий (неочищений) лецитин. Обробка спиртом проводиться для відокремлення лецитину від жиру; лецитин розчинний у спирті, а жир в холодному спирті помітно не розчиняється. Лецитин знову розчиняють в 10 $см^3$ ефіру і одержаний розчин при помішуванні доливають до 30 $см^3$ сухого ацетону. Лецитин випадає в осад і збирається на дні стакану. Рідину із стакану обережно зливають, 2 – 3 краплі осаду лецитину переносять на предметне скло, дають ацетону випаритись, наносять в теж саме місце ще 2 – 3 краплі і після

випарювання додають краплю води. Поклавши покривне скло, спостерігають під мікроскопом утворення мієлінових фігур у вигляді довгих закручених ниток з потовщеннями на кінцях.

Залишок лецитину переносять на сухий фільтрувальний папір і використовують для якісних реакцій.

До 2 $см^3$ спиртового розчину лецитину додають по краплям воду і суміш сильно збовтують. Спостерігають утворення стійкої емульсії лецитину. Перевіряють розчинність у різних розчинниках. Зводять в таблицю дані про розчинність, набухання, колір осаду та ін.

Лабораторна робота №15
ВИЗНАЧЕННЯ ЖИРІВ ЧЕРЕЗ ОКИСНЕННЯ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення жирів непрямим способом; закріпити навички редоксиметричного титрування.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про методику визначення жирів через окиснення.*

В пробірку насипають 3 – 5 мг подрібненого соняшникового насіння або 5 мг м'язової кашиці. Наливають туди ж 3 $см^3$ спиртово-ефірної суміші і екстрагують впродовж 20 хв. Фільтрують і промивають 2 $см^3$ спиртово-ефірної суміші. Фільтрат випаровують до зникнення запаху спирту.

До сухого залишку приливають 2,5 $см^3$ хромової суміші і нагрівають 20 хв. за 80ºС в сушильній шафі.

Після охолодження до 40ºС вміст розбавляють водою до 50 $см^3$ в колбочці і додають 5 $см^3$ 10 % KI. Накривають колбочку годинниковим склом, дають постояти 2 хв. і титрують виділений йод

натрій триоксотіосульфатом за присутності крохмалю до зникнення синього забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід, титруючи натрій триоксотіосульфатом 2,5 $см^3$ хромової суміші.

Із кількості триоксотіосульфату, що витрачено на титрування контролю, віднімають кількість цього ж реактиву, витрачену на титрування після окиснення жирів. Різниця відповідає кількості хромової суміші, витраченої на окиснення жирів. Цю кількість множать на 81,63 і одержують кількість "жиру" в міліграм-процентах (мг %).

Лабораторна робота № 16
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА КЕТОНОВІ ТІЛА В СЕЧІ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення кетонових тіл.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про механізм утворення кетонових тіл в організмі людини і тварин; вміння проводити якісні реакції на кетонові тіла.*

Кетоновими тілами називають: ацетон ($CH_3–CO–CH_3$), ацетооцтову кислоту ($CH_3–CO–CH_2COOH$), β-оксимасляну кислоту ($CH_3–CH(OH)–CH_2–COOH$).

Ці речовини є продуктами неповного окиснення жирів. При нормальному обміні жирів β-оксимасляна та ацетооцтова кислоти окиснюються майже повністю. При порушенні окиснення їх виявляють в сечі поряд з ацетоном, який утворюється із ацетооцтової кислоти в результаті декарбоксилювання.

$$CH_3–CO–CH_2COOH \rightarrow CH_3–CO–CH_3 + CO_2.$$
Ацетооцтова кислота Ацетон

В сечі здорової людини зазвичай міститься незначна кількість кетонових тіл. Однак якщо людина чи тварина довготривалий час харчується їжею, яка складається майже виключно із білків та жирів, тобто містить мало вуглеводів, то в сечі з'являється помітна кількість кетонових тіл. Таке ж явище спостерігається і при голодуванні.

Особливо різке підвищення вмісту кетонових тіл спостерігається в сечі хворих на діабет. Значний вміст ацетону виявляють за характерним плодовим запахом. Ацетон може бути відкритий по утворенню йодоформу при реакції з йодом за присутності лугу:

$$CH_3COCH_3 + 3I_2 + 4\ NaOH \rightarrow CHI_3 + CH_3COONa + 3\ NaI + 3\ H_2O.$$
Ацетон Йодоформ

Ацетон і ацетооцтову кислоту, а також β-оксимасляну кислоту (після окиснення її в ацетооцтову), виявляють за пурпурно-фіолетовим забарвленням з натрій нітропрусидом $Na_2[Fe(CN)_5NO]$. Ацетооцтова кислота дає вишнево-червоне забарвлення з ферум (III) хлоридом.

Реакція утворення йодоформу

В пробірку наливають $1 – 2$ см^3 розчину ацетону, додають близько 1 см^3 розчину натрій гідроксиду і 5 – 7 крапель розчину йоду в калій йодиді. Випадає жовтуватий осад йодоформу, який легко виявити за характерним запахом. За наведеною схемою визначте наявність ацетону в сечі.

Реакція з нітропрусидом

Наливають в одну пробірку $1 – 2$ см^3 розчину ацетону, а в іншу – таку ж кількість розчину ацетооцтового естеру. В обидві пробірки додають по $0{,}4 – 0{,}5$ см^3 концентрованої ацетатної кислоти і 5 – 7 краплин розчину натрій нітропрусиду. Перемішують вміст кожної пробірки і обережно наливають $1 – 2$ см^3 концентрованого розчину амоній гідроксиду. За присутності ацетону чи ацетооцтової кислоти

(тобто в обох пробірках) утворюється кільце пурпурно-фіолетового забарвлення. За наведеною схемою визначте наявність кетонових тіл в сечі.

Проба на ацетооцтову кислоту з ферум (III) хлоридом

Наливають в пробірку 1 – 2 $см^3$ розчину ацетооцтового ефіру і додають 4 – 5 крапель розчину ферум (III) хлориду. Спостерігають появу вишнево-червоного забарвлення. Колір відповідає комплексній сполуці заліза з енольною формою ацетооцтової кислоти (чи ацетооцтового естеру). Проводять визначення ацетооцтового ефіру в сечі. Від перших крапель ферум (III) хлориду утворюється осад ферум (III) фосфату. Коли утворення осаду припиниться, додають ще 4 – 5 краплин реактиву.

Реакція на β-оксимасляну кислоту

В стаканчик до 10 $см^3$ розчину β-оксимасляної кислоти (чи сечі) додають 10 $см^3$ дистильованої води і декілька крапель ацетатної кислоти. Рідину в стаканчику випарюють під тягою до половини початкового об'єму. При цьому відганяється ацетон і руйнується ацетооцтова кислота, а β-оксимасляна кислота залишається незруйнованою. Рідину охолоджують і переливають в пробірку. Додають до вмісту пробірки 1 $см^3$ гідроген пероксиду, нагрівають протягом 1 хв. і охолоджують. β-Оксимасляна кислота окиснюється в ацетооцтову, яку виявляють реакцією з натрій нітропрусидом.

Контрольні питання

1. Надайте загальну характеристику класу ліпідів. Зазначте локалізацію та функції в організмі.
2. Охарактеризуйте фізичні та хімічні властивості ліпідів.
3. Надайте класифікацію ліпідів, охарактеризуйте основні групи.
4. Покажіть подібність та відмінність у будові сфінголіпідів. В чому полягає їх біологічну роль?
5. У чому подібність та відмінність у будові сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну? Охарактеризуйте їх функції в організмі.
6. Що спільного і відмінного у будові лецитину, кефаліну та сфінгомієліну. Яка біологічна роль вказаних ліпідів?
7. Порівняйте будову сфінгомієліну, фосфатидилетаноламіну. Яке їх значення в процесах життєдіяльності організмів?
8. Запропонуйте будову різних сфінголіпідів, охарактеризуйте їх біологічну роль.
9. Охарактеризуйте схожість та відмінність у будові фосфати-дилгліцерину і кардіоліпіну. Яке їх значення в процесах життєдіяльності організмів?
10. Покажіть схожість та відмінність у будові гліко- та орнітинліпідів. Яка їх біологічна роль?
11. Показати відмінність у будові кардіоліпіну та сфінгомієліну. Яке значення вказаних ліпідів в організмі?
12. Охарактеризуйте будову фосфатидилгліцерину, монофосфоінозиту та їх функції в живих організмах.
13. Покажіть будову та біологічну роль зоо- та фітостеринів.
14. Порівняйте будову та надайте характеристику ВЖК, що входять до складу природних жирів.
15. Наведіть гіпотезу моделі елементарної мембрани.

Завдання для самостійної роботи

1. Як будуть заряджені при pH 7 а) фосфатидилхолін, б) фосфатидилетаноламін, в) фосфатидилсерин?
2. Назвіть продукти, що утворяться при м'якому гідролізі розведеним розчином натрій гідроксиду наступних сполук: а) 1-стероїл-2,3-диолеїлгліцеролу; б) 1-пальмітоїл-2-стеароїлфосфатидилхоліну. Які продукти утворяться при дії на речовину (б) гарячим концентрованим NaOH?
3. Охарактеризуйте вміст жиру, фосфатидів в організмі людини (печінка, кров, м'язи та ін.).
4. Напишіть формули жирів, до складу яких входять дві вищі жирні кислоти з одним подвійним зв'язком і одна – з потрійним. Дайте їм назву.
5. Розрахуйте процентний вміст холіну в лецитині та цитидилхоліні.
6. Поясніть, чому фосфоліпіди утворюють в олії осад. Чому для його видалення рекомендується додавати до олії кухонну сіль? Покажіть схематично будову системи, що складається а) з олії та фосфогліцерину; б) з олії, фосфоліпіду та натрій хлориду. Яка олія більш корисна – чиста чи з фосфоліпідами, яка з них довше зберігається? Відповідь аргументуйте.
7. Дайте визначення констант жирів. Наведіть приклади констант найбільш поширених жирів.
8. Порівняйте фізико-хімічні властивості двох ліпідів: а) трипальмітилгліцеролу і трилінолеїлгліцеролу; б) церетилпальмітину і мірицилпальмітину; в) 1-стеароїл-2,3-дипальмітоїлгліцеролу і триолеїлгліцеролу; г) олеїлолеїну і мірицилолеїну; д) лінолеїлхолестеролу і холестеролу. Запишіть рівняння реакції гідролізу і гідрогенізації (де можливо) за допомогою структурних формул.
9. Деякі кулінарні жири типу вершкового масла швидко псуються при зберіганні на повітрі, тоді як маргарин мало змінюється. Поясніть це явище.
10. Поясніть, чому жир не можна використовувати повторно для смаження. Напишіть відповідні рівняння реакцій.
11. Наведіть приклади, що підтверджують наступні біологічні функцій простих ліпідів: а) захист від випаровування води; б) джерело енергії під час зимової сплячки; в) регуляція плавучості; г) попередник статевих гормонів; д) терморегуляція; е) регулятор рідинного стану біомембран; є) джерело ендогенної води; ж) попередник вітаміну D.

Задачі

1. В сумарній фракції ліпідів, що виділили з мітохондрій, виявлено 250 мг неомилених речовин, що становить 25 % від загальної кількості ліпідів. Визначити масову частку ліпідів в мітохондріях, якщо відомо, що для аналізу було взято 30 г препарату.
2. На титрування в спиртовому розчині 10 мг невідомої монокарбонової кислоти витрачено 3,5 $см^3$ 0,01 н спиртового розчину КОН. Яка відносна молекулярна маса кислоти?
3. Розрахуйте кислотне число олії, якщо наважка її становить 0,52 г, а на титрування витрачено 21,2 $см^3$ розчину натрій гідроксиду (0,1 моль/$дм^3$).
4. Розрахувати молярне співвідношення між ліпідом і білком у мембрані, що містить 30 % ліпідів і 70 % білків по масі. Враховувати, що середня M_r ліпідів становить 750, а білків – 60000.
5. Розрахувати йодне число жиру, якщо наважка його становить 0,75 г, а на титрування використано 15,0 $см^3$ натрій триоксотіосульфату (0,08 моль/$дм^3$) у контролі та 13,8 $см^3$ – у досліді.
6. Олія бобів какао містить у своєму складі 32 % пальмітинової та 43 % стеаринової кислот і плавиться при 31 – 35ºС. Соняшникова олія містить 40 % олеїнової та 47 % ліноленової кислот і плавиться при –21ºС. Визначити межі плавлення жиру, який має в своєму складі 20 % ненасичених та 80 % насичених ВЖК.
7. Маємо чистий тригліцерид з числом омилення 198 і йодним числом 59,7. Яка його молекулярна маса? Яка середня довжина ланцюга жирних кислот? Скільки подвійних зв’язків міститься в молекулі тригліцериду?

ФЕРМЕНТИ, КОФЕРМЕНТИ

Ферменти в організмі змінюють швидкість перебігу хімічних реакцій, тобто діють як *каталізатори*. Проте, на відміну від класичних каталізаторів, ферменти і самі зазнають в ході реакції деяких змін. За своєю природою всі ферменти – білки, що підтверджується спільними фізико-хімічними властивостями.

Властивості ферментів

Ферменти – термолабільні сполуки. Це означає, що за дії високих температур вони денатурують. За низьких температур (нижче 0º С) ферменти нативні. Для більшості ферментів людини і ссавців оптимальною температурою дії є 37 – 40º С. Таким чином, чутливість до температури – характерна властивість ферментів, що пояснюється їх білковою природою.

Кожний фермент проявляє свою максимальну дію при певному значенні pH, яке одержало назву pH-оптимуму. Для більшості ферментів людини і ссавців оптимальне значення pH знаходиться в слабкокислому або слабколужному середовищі. Проте відомі ферменти, що проявляють максимальну активність при pH 1,5 – 2,5 (наприклад, пепсин шлункового соку) і при pH 8,0 (наприклад, хімотрипсин дванадцятипалої кишки).

Однією з найважливіших особливостей, що відрізняє ферменти від інших каталізаторів, є висока специфічність дії, яка полягає в тому, що фермент діє на певну речовину (субстрат) або на декілька близьких за своєю хімічною структурою речовин. Залежно від того, може фермент каталізувати одну реакцію (діяти тільки на одну речовину) чи декілька (діяти на групу близьких за будовою речовин), розрізняють абсолютну і відносну специфічність. Прикладом абсолютно специфічного ферменту може бути фермент уреаза, який розщеплює сечовину на вуглекислий газ і амоніак. Серед ферментів є також і такі, що проявляють свою дію залежно від просторової

конфігурації, тобто мають просторову специфічність. Ферменти прискорюють перебіг хімічних реакцій як розщеплення, так і синтезу певної речовини, тобто діють в обох напрямках.

Крім температури і значення pH, на активність ферментів впливає ще цілий ряд чинників, серед яких велике значення має концентрація субстрату. За малих концентрацій субстрату реакція відбувається з малою швидкістю, з підвищенням концентрації швидкість реакції поступово зростає і за певних значень стає постійною. Відбувається процес так званого насичення ферменту субстратом. Подальше збільшення концентрації субстрату призводить до уповільнення реакції. Велике значення для швидкості реакції має і концентрація самого ферменту. За оптимальної концентрації речовини швидкість реакції прямо пропорційна концентрації ферменту в розчині.

На активність ферментів впливають хімічні сполуки, що знаходяться в реакційній системі. Одні з них підвищують активність ферментів і називаються активаторами. Речовини, що знижують активність ферментів, називаються інгібіторами.

Будова ферментів

Ферменти як речовини білкової природи діляться на прості і складні, або, як їх ще називають, ферменти-протеїни і ферменти-протеїди.

Ферменти-протеїни складаються тільки з амінокислот. У більшості з них до складу молекули входить один поліпептидний ланцюг. За хімічними властивостями прості ферменти відносять до альбумінів, глобулінів та інших груп простих білків.

Ферменти-протеїди складаються з двох частин: термолабільної білкової і термостабільної небілкової. Білкова частина складного ферменту називається *апоферментом*, небілкова – *кофактором*. Комплекс кофактора з апоферментом називається холоферментом. Зв'язок між апоферментом і кофактором у молекулах складних ферментів неоднаковий. У багатьох випадках *кофактори* слабо зв'язані з апоферментом, з'єднуються з ним тільки під час ферментативної реакції і легко відокремлюються в процесі діалізу. У цьому разі кофактор називають *коферментом*. Деякі кофактори сполучені з апоферментом дуже міцним ковалентним зв'язком. Такий кофактор називають простетичною групою. Найважливішими

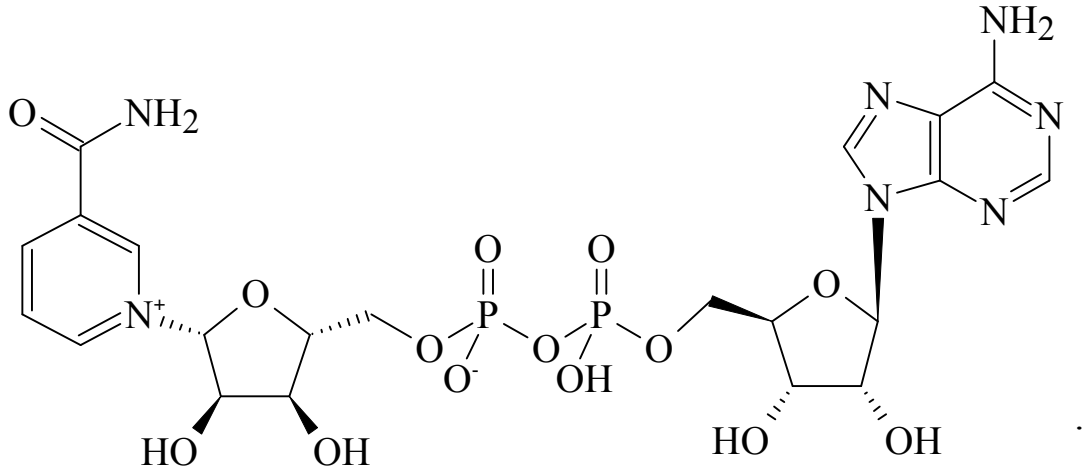
простетичними групами складних ферментів є флавіннуклеотиди – ФМН та ФАД, тіамінпірофосфат, похідні вітаміну B_6 (піридоксаль- і піридоксамінфосфат), біотин, ліпоєва кислота, залізопорфіринові комплекси тощо.

Як правило, у ролі коферментів виступають вітаміни та їх похідні. Крім вітамінів, роль коферментів виконують також іони деяких металів (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} і ін.).

Функції коферментів різноманітні. Головною з них є формування так званого активного центру ферменту і здійснення контакту молекули ферменту з молекулою субстрату. Крім того, коферменти беруть участь у переносі електронів, протонів, атомів, амінних груп у процесі реакцій, а також виконують об'єднуючу функцію між окремими ферментами, забезпечуючи тим самим узгодженість їх дії.

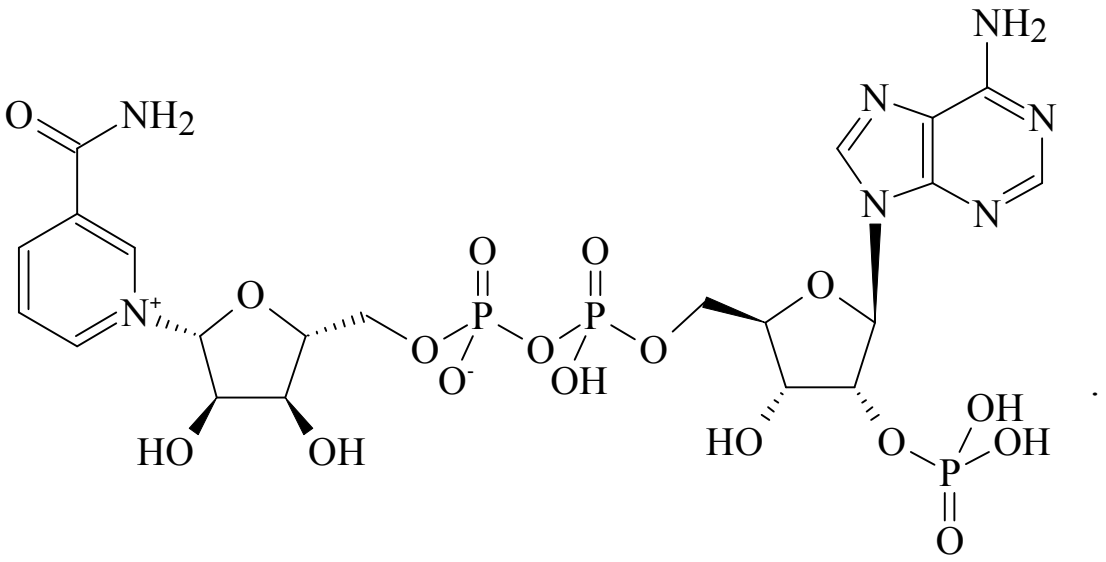
Характеристика найважливіших кофакторів ферментів-протеїдів, які виступають у ролі коферментів

Нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) складається з двох мононуклеотидів, сполучених між собою пірофосфатним зв'язком. До складу одного мононуклеотиду входить азотиста основа аденін, у складі іншого азотистою основою є амід нікотинової кислоти (водорозчинний вітамін РР):



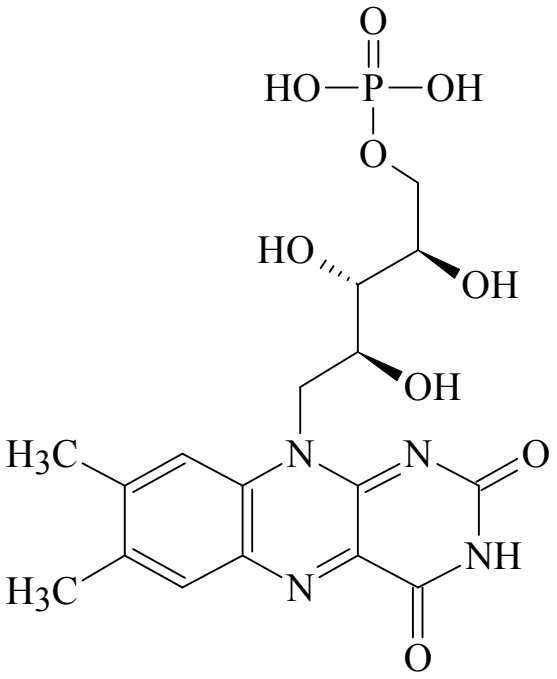
Є небілковою частиною ферментів дегідрогеназ, які приймають участь у процесах окислення органічних сполук у клітині. Фермент дегідрогеназа переносить атом Гідрогену з двома електронами з субстрату, що окислюється, на кофермент НАД. Активною групою коферменту є амід нікотинової кислоти. Він приймає Гідроген у вигляді гідрид-іону на піридинове кільце, інший атом Гідрогену у вигляді протону переходить у розчин. Кофермент вільно дисоціює, тобто може відділятися від одного ферменту та з'єднуватись з іншим, переносячи Гідроген та електрони від молекули донора на молекулу акцептора.

Нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ). На відміну від НАД він містить у своєму складі ще один залишок фосфатної кислоти, сполучений ефірним зв'язком із другим атомом Карбону рибози аденілової кислоти:

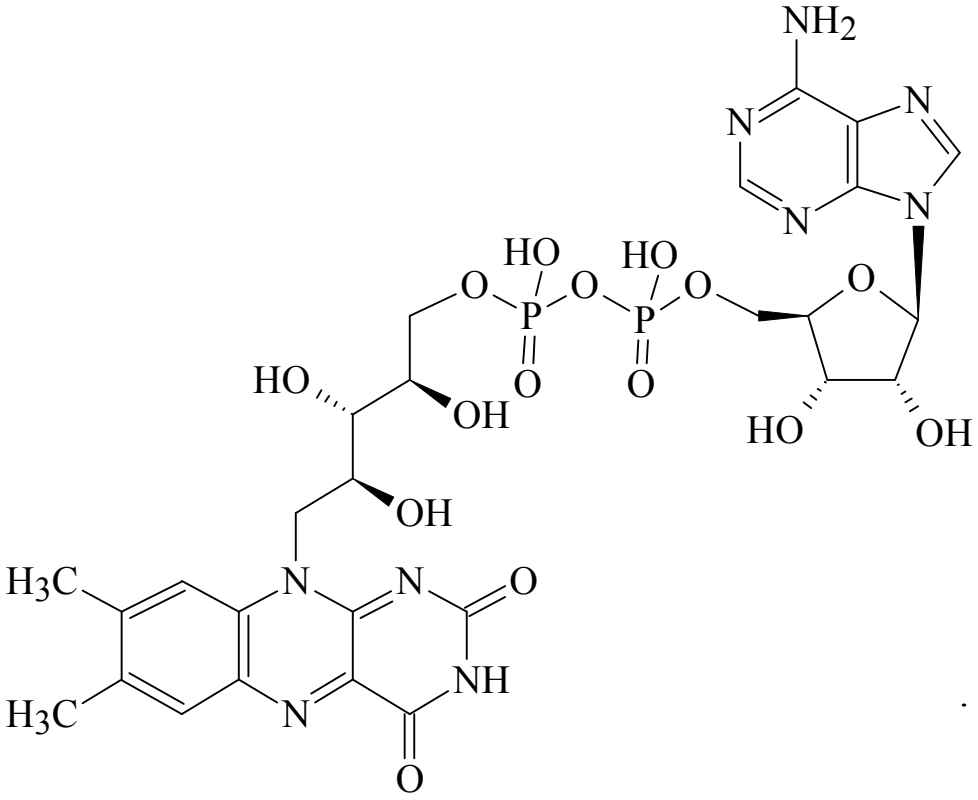


Входить до складу дегідрогеназ.

Флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) містять у своєму складі *рибофлавін* (вітамін B_2). ФМН і ФАД входять до складу дегідрогеназ.

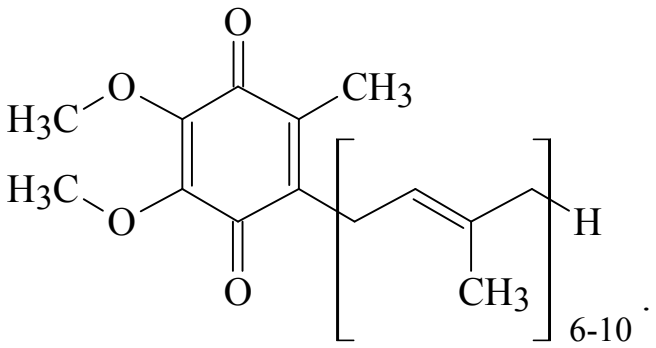


Флавінмононуклеотид



Флавінаденіндинуклеотид

Убіхінон – кофермент, здатний зворотно приєднувати атоми Гідрогену:



Коферменти – порфіринові комплекси. Порфіринові комплекси є складовою частиною ряду окисно-відновних ферментів, які здійснюють перенесення електронів, зокрема цитохромів. Активною частиною цих ферментів є залізо-порфіриновий комплекс. Найбільш вивченим коферментом порфіринової групи є цитохром *с*.

Спеціалізовані центри ферментів. Молекули ферментів мають великі розміри (загалом більші, ніж субстрати) і складну просторову конфігурацію. У молекулі ферменту розрізняють три спеціалізованих центри: активний, субстратзв'язуючий і алостеричний. При цьому кожна частина молекули строго спеціалізована.

Активний центр – це динамічне утворення. У простих ферментів активний центр виникає в той момент, коли білкова молекула набуває характерної для неї третинної структури. Тому її зміна може викликати деформацію або руйнацію активного центру й ослаблення ферментативної активності.

У складних ферментів роль активного центру виконує його небілкова частина, тобто кофактор, а також прилягаючі до нього білкові функціональні групи: –SH – цистеїну, –OH – серину, –COOH – аспарагінової і глутамінової кислот, імідазольне кільце гістидину й ін.

Активний центр, утворений радикалами зазначених амінокислот або кофактором, характеризується чіткою просторовою конфігурацією. У зв'язку з цим даний фермент може проявляти свою каталітичну дію на субстрат, який стерично відповідає структурі активного центру, подібно до того, як ключ підходить до замка.

У молекулах ферментів розрізняють також спеціалізовані ділянки, відповідальні за зв'язок із субстратом, їх називають ще

субстратзв'язуючим (субстратним) центром, або “якірною” площадкою.

Крім активного і субстратного центрів деякі ферменти мають алостеричні, або регуляторні, центри. До них можуть приєднуватися різні речовини, викликаючи при цьому зміну просторової конфігурації молекули ферменту. Як наслідок, відбувається зміна конфігурації й активного центру, що збільшує або зменшує каталітичну активність ферменту.

Класифікація та номенклатура ферментів

В основу класифікації ферментів покладено принцип поділу всіх ферментів відповідно до типу хімічних реакцій, які вони каталізують. Тому всі відомі реакції, що відбуваються в організмі, були поділені на шість основних типів, яким відповідають класи ферментів:

1. Окисно-відновні реакції – оксидоредуктази.
2. Процеси перенесення окремих груп від одних субстратів до інших – трансферази.
3. Реакції розщеплення субстратів за участю води (гідроліз) – *гідролази*.
4. Процеси відщеплення груп з утворенням подвійних зв'язків без участі води – ліази.
5. Реакції, за яких одні речовини перетворюються в інші при незмінній кількості атомів (процеси ізомеризації) – *ізомерази*.
6. Синтетичні процеси, у результаті яких утворюються нові речовини, з використанням енергії АТР – лігази (синтетази).

Крім того, кожний клас поділяється на підкласи, які, у свою чергу, діляться на підпідкласи, останні складаються з окремих представників. Таким чином, кожний фермент має чотиризначний шифр, або код, в якому перша цифра позначає клас, до якого належить фермент, друга – підклас ферменту в цьому класі, третя – підпідклас, четверта – порядковий номер ферменту в підпідкласі. На початку шифру ставиться дві літери – КФ (класифікація ферментів). Скажімо, фермент спиртового бродіння алкогольдегідрогеназа відповідно до номенклатури має таку назву: алкоголь: НАД-*оксидоредуктаза* (КФ 1.1.1.1).

Лабораторна робота № 17
ВПЛИВ ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ

Мета і завдання роботи: *виявити вплив температури, кислотності середовища на активність ферментів; з'ясувати механізм конкурентного гальмування активності ферменту.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання щодо способів впливу на активність ферментів та механізму конкурентного і неконкурентного гальмування активності ферментів; вміти підбирати оптимальні умови для роботи ферментів.*

Вплив температури на активність амілази слини

В чотири пронумеровані пробірки наливають 2 $см^3$ 1 % розчину крохмалю. Пробірку 1 вміщують у киплячу водяну баню, пробірку 2 – в водяну баню за 40ºС, пробірку 3 залишають при кімнатній температурі і пробірку 4 вміщують у лід. Через 10 хв., коли вміст набуде заданої температури, в усі пробірки додають по 0,5 $см^3$ розведеної в 10 разів слини, паличкою перемішують реакційну суміш і залишають за тих самих умов. Спостереження про хід гідролізу крохмалю ведуть за реакцією з Йодом. Для цього наносять на фарфорову пластинку декілька крапель розчину Йоду в калій йодиді і змішують з краплями рідини з кожної пробірки, беручи проби через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 хв. По зміні забарвлення крохмалю з Йодом роблять висновок щодо ступеню гідролізу крохмалю в кожній пробірці. Результати заносять до таблиці, помічаючи літерою "С" (синій колір) позитивну пробу з йодом на крохмаль, літерою "К" – позитивну пробу на *декстрини* (колір червоних тонів) і літерою "Ж" – негативну пробу (жовтий колір йоду).

Номер пробірки	Температура в пробірці, ° С	Реакція з йодом по закінченню часу, хв.						
		1	2	4	6	8	10	12
1 2 3 4	100 40 15-20 0							

На основі одержаних даних роблять висновок щодо наявності температурного оптимуму для *амілази* слини.

Вплив температури на активність пепсину

В чотири пробірки наливають 2 $см^3$ молочно-ацетатної суміші. Пробірку 1 вміщують в киплячу водяну баню; пробірку 2 – у водяну баню за 40º С; пробірку 3 залишають при кімнатній температурі; пробірку 4 вміщують у лід. Через 10 хв., коли вміст пробірок набуде необхідної температури, у всі пробірки додають по 0,1 $см^3$ шлункового соку, швидко перемішують і залишають за тих самих умов. Спостерігаючи за моментом появи на стінках пробірок перших згустків казеїну, що утворюються з казеїногену під дією пепсину, відмічають оптимальну температуру дії даного ферменту.

Вплив pH середовища на активність ферментів

Серії розчинів з певними значеннями pH одержують, використовуючи фосфатний буфер. Дві бюретки заповнюють 1/15 М розчином натрій дигідрогенфосфату і 1/15 М розчином калій гідрогенфосфату. Розчини змішують у певних (попередньо розрахованих) співвідношеннях таким чином, щоб в кожній пробірці одержати 5 $см^3$ буферної суміші зі значеннями pH: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04. У кожну з чотирьох пробірок додають 1 $см^3$ 0,5 % розчину крохмалю, 1 $см^3$ розведеної в 10 разів слини і перемішують вміст скляною паличкою. Потім всі пробірки, не виймаючи з них скляних паличок, поміщують у водяну баню, нагріту до 40º С. Через 3 – 5 хв. паличками переносять по краплі суміші з усіх пробірок на фарфорову пластинку, поряд із попередньо вже нанесеними краплями розчину Йоду. Краплі з'єднують і, якщо спостерігається відмінності у забарвленні з Йодом в досліджуваних пробах, пробірки виймають із бані, охолоджують і додають в кожну по 3 – 4 краплі розчину Йоду в калій йодиді. При відсутності помітної відмінності в забарвленні з Йодом продовжують нагрівання пробірок у водяній бані ще декілька хвилин. Потім знову досліджують проби на ступінь розщеплення

крохмалю. Цю операцію повторюють, поки не відбудуться помітні зміни в забарвленні проб з Йодом. Продовжують інкубацію усіх проб за присутності доданого Йоду і для кожної з них відмічають час, коли зникне синє забарвлення (закінчення амілолітичного розщеплення). Одержані результати виражають графічно: по осі абсцис наносять значення pH розчинів, а по осі ординат – час розщеплення крохмалю при відповідних значеннях pH. З'єднуючи точки лінією, отримують криву, що характеризує залежність активності ферменту від значення pH середовища. Відмічають оптимальне значення pH середовища для дії даного ферменту.

Визначення оптимального значення pH для амілази слини

Пробірки встановлюють у два ряди: по 5 штук у кожному. В пробірки першого ряду вносять по 0,2 $см^3$ розведеного розчину слини, другого ряду – 0,2 $см^3$ дистильованої води. Потім в кожну пробірку додають із бюретки 4 $см^3$ фосфатного буферного розчину так, щоб перші пробірки обох рядів містили буферний розчин з pH 5,59; другі пробірки – з pH 6,24; треті – з pH 6,98; четверті – з pH 7,38; п'яті – з pH 8,04. Пробірки закривають пробками і поміщують до термостату (37ºС) на 10 хв., після чого у всі пробірки вносять по 0,2 $см^3$ розчину крохмалю, нагрітого до 37ºС. Вміст пробірок перемішують і проби інкубують у термостаті 10 – 15 хв. за 37ºС. Пробірки поміщують в лід і в кожну додають 3 – 4 краплі розчину Йоду, перемішують вміст і колориметрують із світловим фільтром № 7. Активність амілази розраховують по різниці екстинкцій між контрольною і досліджуваною пробами

$$E_ф = E_к - E_д,$$

де $E_ф$ – екстинкція, яка відповідає активності амілази в досліджуваному розчині, $E_к$ – екстинкція контрольної проби; $E_д$ – екстинкція досліджуваної проби.

На основі одержаних даних будують графік залежності активності амілази від величини pH і знаходять на ньому оптимальне значення pH ферменту, для чого на осі ординат відкладають значення $E_Ф$, на осі абсцис – значення pH. Відмічають оптимальне значення pH середовища для дії даного ферменту.

Конкурентне гальмування сукцинатдегідрогеназної активності

В три пронумеровані пробірки вносять 3 – 4 $см^3$ м'язової кашки і додають: в першу – 0,4 $см^3$ води, в другу – 0,2 $см^3$ 1 % розчину малонової кислоти. У всі пробірки додають по 1 $см^3$ 1 % розчину

бурштинової кислоти, 2 – 3 краплі 1 % розчину метиленового синього і після перемішування 3 – 4 краплі вазелінової олії. Пробірки ставлять на водяну баню, нагрівають до 40º С. Через 3 – 5 хв. спостерігається майже повне зникнення блакитного забарвлення в пробірці 1, деяке зменшення інтенсивності забарвлення в пробірці 2 і повне зберігання його в пробірці 3. Роблять висновок щодо гальмування сукцинатдегідрогеназної активності за присутності малонової кислоти внаслідок схожості її структури з бурштиновою кислотою.

Лабораторна робота № 18
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ФЕРМЕНТИ

Мета і завдання роботи: *провести якісні реакції на каталазу, сукцинатдегідрогеназу, альдегіддегідрогеназу, лактат-дегідрогеназу.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *вміти визначати активність ферментів у біологічних об'єктах, з'ясувати роль каталази, сукцинатдегідрогенази, альдегіддегідрогенази, лактатдегідрогенази у процесах метаболізму; знати механізм дії окисно-відновних ферментів.*

Якісна реакція на каталазу

Каталаза – фермент, що розкладає гідроген пероксид за рівнянням

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

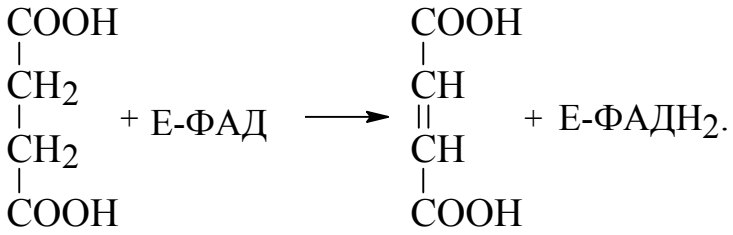
Біологічна роль каталази полягає в руйнуванні шкідливого для організму гідроген пероксиду, що накопичується в тканинах при окиснювальних процесах. Каталазна активність спостерігається майже у всіх тваринних клітинах і органах. Молекулярна маса кристалічної каталази, її активність і деякі інші властивості незначною мірою відрізняються залежно від джерела одержання

ферменту. Ці відмінності обумовлені головним чином різницею у складі або структурі білкового компонента.

Хід роботи. В пробірку вміщують 0,3 – 0,5 г розтертої печінки, додають близько 10 $см^3$ води і перемішують вміст. Швидко наливають розчин гідроген пероксиду до верху пробірки і відразу, закриваючи пробірку пальцем, перевертають її в стакан з водою, не виливаючи рідини. Спостерігають виділення газу (кисню) в пробірці і витіснення ним рідини в стакан. Закривши пробірку пальцем, обережно виймають її з води, перевертають і швидко вносять в пробірку тліючу скіпку. Розгоряння якої вказує на те, що виділившийся газ – кисень. Роблять висновок стосовно наявності каталази в досліджуваній тканині.

Визначення активності сукцинатдегідрогенази в м'язах

Сукцинатдегідрогеназа – дуже поширений фермент у тканинах живих організмів, зокрема він наявний в складі внутрішньої мембрани мітохондрій. Каталізує реакцію окиснення бурштинової кислоти (сукцинат) у фумарову кислоту (фумарат). Це один з найважливіших етапів *метаболізму* за аеробних умов. За своєю хімічною природою цей фермент являє собою флавопротеїд, коферментом якого є ФАД – акцептор водню при окисненні бурштинової кислоти:



У клітинах живих організмів акцептором електронів, що відщеплюються від Е-$ФАДН_2$, є цитохромна система ферментів. Проте відновлені флавінові *дегідрогенази* легко окиснюються і штучними акцепторами електронів, наприклад метиленовим синім (Мс):

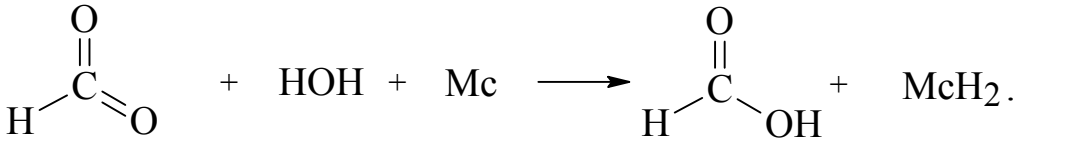
$$Е\text{-}ФАДН_2 + Мс \rightarrow Е\text{-}ФАД + МсН_2.$$

За цією реакцією можна якісно і кількісно визначити активність флавінових дегідрогеназ, зокрема сукцинатдегідрогенази.

Хід роботи. Гомогенат м'язової кашки розливають у дві пробірки. Одну з них (контрольну) кип'ятять і охолоджують. В обидві пробірки добавляють по 2 $см^3$ нейтралізованого розчину бурштинової кислоти і по 2 краплі метиленового синього. Пробірки заливають тонким шаром олії і вміщують у водяну баню при температурі 37° С. Відмічають час (у хвилинах), протягом якого метиленовий синій у досліджуваній пробі знебарвлюється. Роблять висновок стосовно наявності ферменту в досліджуваній тканині.

Визначення альдегіддегідрогенази в молоці

Фермент альдегіддегідрогеназа – продукт життєдіяльності мікроорганізмів, які потрапляють в молоко з навколишнього середовища. Він каталізує окиснення альдегідів (наприклад формальдегіду, оцтового). При додаванні до сирого молока формальдегіду і метиленового синього фермент окиснює альдегід через гідратну форму до мурашиної кислоти, а водень, що виділяється, відновлює метиленовий синій в безбарвну сполуку (лейкооснову). Схематично це можна показати так:



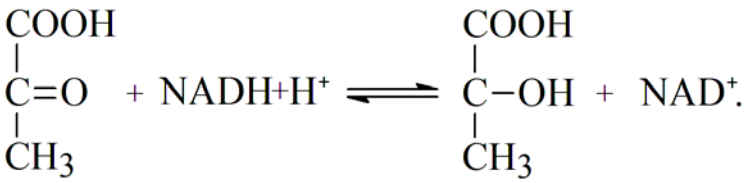
Мурашиний альдегід | Метиленовий синій | Мурашина кислота | Відновлена форма метиленового синього

Кип'ятіння молока денатурує фермент альдегіддегідрогеназу і тому кип'ячене молоко не окиснює мурашиний альдегід. Цією реакцією можна відрізнити кип'ячене молоко від сирого.

Хід роботи. В першу пробірку (дослідну) наливають 2 $см^3$ сирого молока, в другу – 2 $см^3$ кип'яченого. В обидві пробірки добавляють по 0,5 $см^3$ розчину формальдегіду і по 2 краплі розчину метиленового синього. Вміст пробірок заливають тонким шаром олії для створення анаеробних умов і переносять їх на водяну баню за температури 55° С. Поступове знебарвлення метиленового синього (перехід у відновну форму) спостерігають тільки в пробірці з сирим молоком. Роблять висновок стосовно наявності ферменту в молоці.

Визначення активності лактатдегідрогенази в м'язовій тканині

Лактатдегідрогеназа – ключовий фермент гліколізу. Він окиснює молочну кислоту (лактат), що утворюється в м'язовій тканині за анаеробних умов. Схематично це можна зобразити наступним чином:



Зміни оптичної густини за 340 нм за одиницю часу характеризують активність лактатдегідрогенази.

Виготовлення ферментного препарату

1 г м'язової тканини гомогенізують в 10 $см^3$ калій-фосфатного буферу pH 7.0 і центрифугують протягом 30 хв. при 12 тис. обертів у рефрижераторній центрифузі. Отриману надосадову рідину використовують як ферментний препарат для визначення лактат-дегідрогенази. Для визначення активності у спектрофотометричну кювету додають 2,8 $см^3$ калій-фосфатного буферу, 0,1 $см^3$ розчину натрій піруват, 0,05 $см^3$ розчину відновленого НАДНН$^+$, перемішують і додають 0,02 $см^3$ ферментного препарату. Вимірюють оптичну густину через 1, 2, 3, 4, 5 хвилин.

Розраховують кількість окисненого НАД за 1 хв. на 1 мг білка, який визначають біуретовим реактивом або за реакцією Фоліна.

Визначення білка мікробіуретовим методом

Хід роботи. В пробірку наливають 0,5 – 1,0 $см^3$ досліджуваного розчину з вмістом білка близько 0,1 – 2,0 мг. Потім додають 4 $см^3$ 6 % розчину натрій гідроксиду, 10,2 $см^3$ розчину Бенедикта. Через 15 хв. розчин фотометрують за 330 нм у кюветі з робочою довжиною 10 мм.

Стандартна крива будується із розчинів зі вмістом білка: 0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 мг/$см^3$.

Контрольні питання

1. Показати структуру і навести приклади коферментів-переносників водню та електронів.
2. Яка будова та біологічна роль коферментів ФМН та ФАД?
3. Надайте характеристику структури та функцій коферментів тіамінпірофосфата та ліпоєвої кислоти.
4. Кінетика ферментативних реакцій. Субстратна константа і константа Міхаеліса. Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату і ферменту. Поняття про катал.
5. Опишіть відомі вам ферментні системи клітини. Поняття про конститутивні, адаптивні та репресивні ферменти.
6. Молекулярна маса ферментів. Мономерні та мультимерні структури ферментів. Наведіть приклади.
7. Історія відкриття та вивчення ферментів (праці Данилевського, Павлова та інших вчених). Подібність та відмінність у роботі ферментів та каталізаторів.
8. Наведіть номенклатуру ферментів. Наукова номенклатура (Московська, 1961р). Систематичні та робочі назви. Шифри ферментів. Класифікація ферментів та її принципи.
9. Опишіть молекулярну будову ферментів. Субстратний та алостеричний центри. Їх будова і принцип функціонування.
10. Охарактеризуйте кінетичні властивості ферментів. Перелічіть фактори, що впливають на швидкість ферментних реакцій. Специфічність ферментів. Наведіть приклади.
11. Перелічіть способи регуляції ферментативної активності, конкурентне і неконкурентне *інгібування ферментів*. Алостерична регуляція ферментів, її механізм. Зазначте вплив інгібіторів на кінетичну характеристику ферментів.
12. Опишіть особливості ферментів-протеїнів і ферментів-протеїдів. Особливості будови їх каталітичних центрів. Взаємодія каталітичного і алостеричного центрів в процесі ферментативного каталізу.

Завдання для самостійної роботи

1. Запропонуйте принципи взаємовідношення та можливі механізми взаємодії ферменту з субстратом. Механізм ферментного каталізу.
2. Охарактеризуйте локалізацію ферментів у клітині; методи їх виділення і очищення; методи вивчення молекулярної маси; експрес-методи виявлення ферментів.
3. Поясніть терміни, які використовують для характеристики будови ферментів: а) апофермент; б) простий кофактор; в) простетична група; г) кофермент; д) алостеричний центр; е) активний центр; є) субстратний центр; ж) каталітичний центр.
4. Ацетатний альдегід, який утворюється в клітинах печінки з етанолу, здатний утворювати стабільні комплекси з ферментами, знижуючи їх активність на 50 – 80 %. Яка, на вашу думку, природа взаємодії альдегіду і ферментів?
5. Відомо, що рівень свинцю в тканинах людей, які живуть у високо індустріальних зонах, більший, ніж у наших древніх предків, у тисячі разів. Як підвищений рівень свинцю може впливати на активність ферментів? Які молекулярні основи цього впливу? Назвіть причини збільшення рівня свинцю в середовищі.
6. Зазначте зміни активності ферменту слини α-амілази, які викликає дія на нього в лабораторному досліді наступних факторів: а) кип’ятіння; б) додавання до нього іонів міді; в) додавання в його розчин натрій хлориду; г) додавання фосфатного буферного розчину (pH 8,0)? За якими ознаками визначають зміну активності цього ферменту?
7. Перелічити класи, до яких належать ферменти, що використовуються: а) для розчинення тромбів у судинах; б) для покращення травлення; в) для видалення плям білку і жиру в побутовій хімії? Відповідь обґрунтуйте.
8. Зазначте переваги, які мають ферменти перед каталізаторами небілкової природи?
9. Перелічіть труднощі, пов’язані з використанням ферментів, виділених з рідин, у хімічному синтезі? Що таке “іммобілізовані ферменти”?
10. Поясніть, чому з ферментними технологіями пов’язують перспективи створення екологічно сумісних хімічних виробництв?

Задачі

1. Одна молекула каталази розщеплює за хвилину 5,58 × 10–25 кг гідроген пероксиду. Розрахувати активність каталази і виразити її в стандартних одиницях загальної та питомої активності, а також в каталах. M_r каталази 250000.
2. За результатами очищення альдолази одержано наступні дані по кожному етапу виділення ферменту:

Стадія очищення	*1*	*2*	*3*	*4*
Вміст білка, мг	18750	8500	189	12
Загальна активність, мкмоль субстрату/хв.	2593	1854	654	248

   Визначити питому активність ферменту на кожній стадії очищення, ступінь очищення.
3. Саліцилат інгібує дію глутаматдегідрогенази. Визначити тип інгібування на основі наведених нижче даних. Концентрація саліцилату 40 ммоль/дм^3 підтримується на постійному рівні. Розрахувати $K_м$.

Концентрація субстрату, ммоль/дм^3	*1,5*	*2,0*	*3,0*	*4,0*	*8,0*
Швидкість утворення продукту без саліцилату, мг/хв.	0,21	0,25	0,28	0,33	0,44
Швидкість утворення продукту з саліцилатом, мг/хв.	0,08	0,1	0,12	0,13	0,16

4. Ферментна реакція характеризується наступними кінетичними закономірностями:

Швидкість реакції, мкмоль субстрату/мг білку	*1,2*	*4,1*	*5,8*	*5,9*	*4,7*	*3,6*
Час, хв.	0	5	15	30	60	90

   Розрахуйте початкову, максимальну та середню швидкість даної реакції.
5. Фермент карбоксипептидаза складається з одного поліпептидного ланцюга, що містить 307 амінокислотних залишків, з них в каталітичній дії безпосередньо беруть участь залишки аргініну – 145, тирозину – 248 і глутамінової кислоти – 270. Обчисліть, на

якій відстані (нм) знаходились би ці групи, якби молекула ферменту представляла собою ідеальну α-спіраль. Поясніть, як ці три радикали, які розташовані на великій відстані в поліпептидному ланцюгу, можуть спільно каталізувати реакцію перетворення пептидного зв'язку, який має розмір менше 1 нм. Чому фермент представлений великою молекулою, якщо в хімічних перетвореннях субстрату беруть участь лише три функціональні групи?

6. Яка масова частка Купруму у купрумвмісному ферменті аскорбатоксидазі, якщо його молекула має масу 150000 а.о.м. і містить 6 атомів Купруму? Яку роль можуть виконувати іони міді в роботі ферменту?
7. Обчисліть молекулярну масу протомера кристалічної каталази, яка є протеїдом із активною групою у вигляді залізо-порфіринового комплексу з одним атомом Феруму, якщо його вміст в кристалічній каталазі становить 0,12 % за масою.
8. Кількість гідроген пероксиду, що розщеплено за дії каталази відповідає 14,7 мл 0,1 н розчину калій перманганату. Витяжка каталази, узята для досліду в кількості 20 мл, була приготована з 0,25 г моркви. Дослід проводили протягом 30 хв. Визначте активність ферменту, що міститься в 1 г моркви.
9. Розрахуйте питому активність каталази (M_r = 250000) та лактатдегідрогенази (M_r = 140 000), якщо відомо, що молекулярна активність цих ферментів за температури 25°С, оптимального pH і повного насичення субстратом дорівнює 5×10^6 і $3{,}7\times10^4$ відповідно.

НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ БІОРЕГУЛЯТОРИ

Низькомолекулярні біорегулятори є досить численною групою фізіологічно активних сполук – як природних так і синтетичних. Вони виконують різноманітні функції в організмах тварин, рослин та мікроорганізмів. *Алкалоїди*, вітаміни, терпеноїди, антибіотики, стероїдні гормони, гормони рослин, феромони, *простагландини*, природні отрути і токсини, пестициди увійшли у цей клас сполук за двома ознаками, якими є відносно низька молекулярна маса і висока біологічна дія.

Вітаміни

Для повноцінності харчового раціону, який містить основні поживні речовини і мінеральні солі, необхідні також додаткові фактори. Їх назвали вітамінами. Наразі більшість вітамінів виділено в чистому вигляді або синтезовано, що дозволяє застосовувати їх як лікарські препарати.

Вітаміни – це необхідні для нормальної життєдіяльності низькомолекулярні органічні сполуки, синтез яких у організмів даного виду відсутній або обмежений.

На відміну від інших харчових речовин, вітаміни виступають складовими коферментів, без яких неможлива нормальна функція відповідних ферментів, або слугують регуляторами біохімічних процесів. Деякі вітаміни поступають з їжею у вигляді попередників – провітамінів. В тканинах вони перетворюються на біологічно активні форми вітамінів.

Жиророзчинні вітаміни поступають в тканини при всмоктуванні із шлунково-кишкового тракту і депонуються в них; водорозчинні вітаміни перетворюються у коферменти та, з'єднуючись з апоферментом, входять до складу складного ферменту.

Дисбаланс вітамінів проявляється у формі нестачі та надлишку. Часткова нестача вітаміну називається *гіповітамінозом*, а сильно

виражений дефіцит – *авітамінозом*. Нестачу одного вітаміну відносять до моногіповітамінозів, декількох – до полігіповітамінозів. Надлишкове накопичення в тканинах вітамінів називається гіпервітамінозом. Це супроводжується клінічними та біохімічними ознаками порушень. Гіпервітаміноз характерний в основному для жиророзчинних вітамінів.

Всі гіповітамінози та авітамінози проявляються у затримці росту молодого організму. Крім того, для кожного конкретного гіповітамінозу характерні свої симптоми порушень обміну речовин та функцій, що відображають регуляторні властивості даного вітаміну. За цими симптомами виявляють нестачу відповідного вітаміну. Причини гіповітамінозу можуть бути екзогенні та ендогенні. До екзогенних відносяться нераціональне харчування, зміна складу нормальної кишкової мікрофлори, що звичайно викликається довготривалим застосуванням хіміотерапевтичних засобів; до ендогенних – порушення всмоктування та транспорту вітамінів, утворення коферментів, посилення розпаду вітамінів, фізіологічно обумовлена висока необхідність вітамінів.

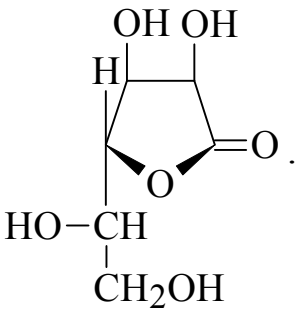
Гіпервітаміноз, або вітамінна інтоксикація, проявляється загальними симптомами: втрата апетиту, розлади моторної функції шлунково-кишкового тракту, сильні головні болі, підвищена збуджуваність нервової системи, випадіння волосся, шкіра, що лупиться та деякі специфічні ознаки, які притаманні даному вітаміну. Гіпервітаміноз може закінчитись летально.

Класифікація вітамінів

За фізико-хімічними властивостями вітаміни поділяються на дві групи: жиророзчинні та водорозчинні. Окремі вітаміни являють собою групу близьких за хімічною структурою речовин, ці варіанти одного й того ж вітаміну називають вітамерами. Вони мають подібний специфічний, але різний за силою біологічний ефект. До водорозчинних відносять вітаміни груп В, С, РР, Р. Жиророзчинні вітаміни – А, D, К, Е.

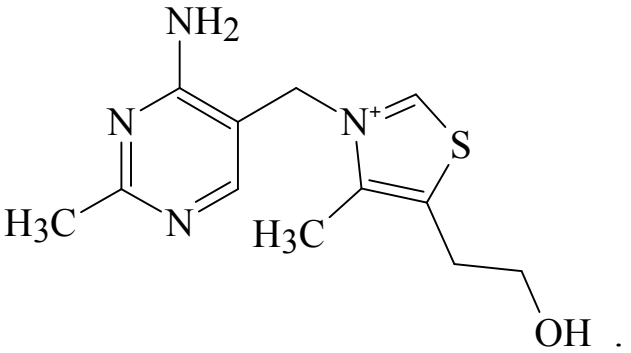
Водорозчинні вітаміни

Вітамін С (аскорбінова кислота) не синтезується в організмі людини, він поступає головним чином з рослинною їжею. Особливо багато вітаміну С в плодах шипшини, чорної смородини, лимонах.



За відсутності у їжі вітаміну С виникає хвороба, що називається цинга, симптомами якої є загальна слабкість, втомлюваність, знижений опір інфекціям, розлади серцевої діяльності. Відмічено сильну крихкість капілярів, що призводить до крововиливів під шкіру та в суглоби; порушується розвиток кісток та зубів. У дорослих людей спостерігається кровоточивість ясен, розхитуються та випадають зуби. Добова потреба – 50 – 100 мг аскорбінової кислоти. В медичній практиці аскорбінову кислоту застосовують для лікування гіповітамінозів, стимуляції кровотворення. Разом з фолієвою кислотою, вітаміном B_{12} та Ферумом, для укріплення капілярів при підвищеній їх кровоточивості при різних захворюваннях, стимуляції регенеративних процесів, ураження сполучної тканини, при гострих захворюваннях дихальних шляхів і т.і.

Вітамін B_1 (*тіамін*) входить до складу ферментів, які беруть участь у вуглеводному, жировому та білковому обміні.

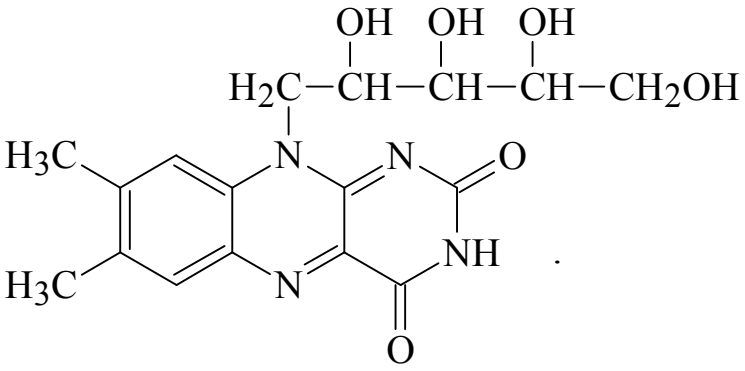


Відсутність в їжі вітаміну B_1 викликає важке захворювання поліневрит, або бері-бері. Для захворювання характерні такі симптоми: специфічні ураження нервових стовбурів, хворобливість в ділянці серця, розвиток набряків нижніх кінцівок, живота, ослаблення секреції шлунку і перистальтики кишок, судоми і паралічі м'язів. За відсутності або недостатнього надходження вітаміну B_1 в організм сповільнюється процес декарбоксилювання піровиноградної кислоти, а разом з цим порушується й увесь процес окиснення

вуглеводів. Порушення вуглеводного обміну і накопичення піровиноградної кислоти за нестачі вітаміну B_1 відбувається насамперед у мозку. Це призводить до розладу функцій центральної та периферичної нервової системи, у результаті чого з'являються судоми, м’язова слабкість, втрата чутливості, паралічі і т.д.

Багато вітаміну B_1 знаходиться в пивних дріжджах, печінці, свинині, горіхах, цілих зернах хлібних злаків, у жовтку яйця. В подальшому було виявлено, що в цих продуктах є ще близько 10 самостійних вітамінів групи В: B_2, B_3, B_6, B_{12} та інші. Кожен з них має специфічні властивості. Добова потреба людини у вітаміні B_1 складає 14 – 24 мг. В медицині використовуються різні лікарські форми вільного тіаміну та тіамінпірофосфат. Ці препарати використовують з метою покращення засвоювання вуглеводів при цукровому діабеті, при гіповітамінозах, при дистрофіях серця та скелетних м'язів, при запаленнях периферичних нервів та ураженнях нервової системи.

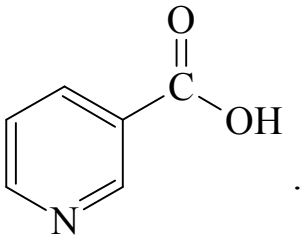
Вітамін B_2 (рибофлавін) міститься у всіх клітинах організму та каталізує окисно-відновні процеси. При його нестачі порушується обмін речовин, виникають ураження шкіри, рогівки очей, тріщини слизової оболонки ротової порожнини. Нестача рибофлавіну в експерименті проявляється у зупинці росту тварин, випаданні шерсті, розвитку катаракти, запаленні очей. Добова потреба людини у вітаміні B_2 – 2 – 3 мг.



Рибофлавін широко розповсюджений у природі. Його багато в печінці, нирках, дріжджах та інших тваринних та рослинних продуктах.

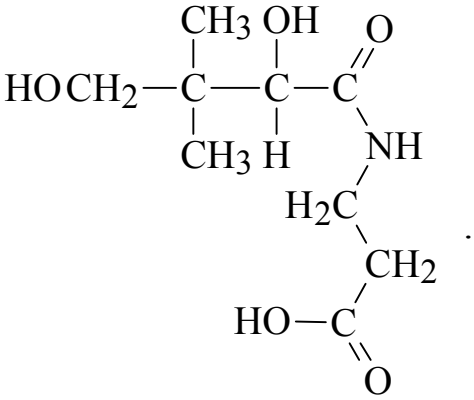
Вітамін використовується при гіпорибофлавінозі, а також при захворюваннях шкіри та очей, викликаних не дефіцитом рибофлавіну, а швидше надлишковою потребою в ньому: при дерматитах, погано заживаючих ранах та виразках, катарактах, кон’юнктивітах.

Вітамін B_3 (PP) (нікотинова кислота) антипеларгічний, входить до складу ферментних систем, що каталізують окисно-відновлювальні процеси. Особливо багато його в дріжджах, свіжих овочах, м'ясі, висівках.



При нестачі вітаміну РР розвивається пелагра – захворювання, при якому відмічаються характерний дерматит, пронос та порушення психіки. Біологічне значення вітаміну РР полягає в тому, що він здатний зворотно приєднувати атоми Гідрогену і є складовою частиною коферментів НАД і НАДФ. Останні входять до складу багатьох дегідрогеназ – ферментів, що каталізують реакції біологічного окиснення (їх відомо близько 100). Добова потреба складає 14 – 15 мг.

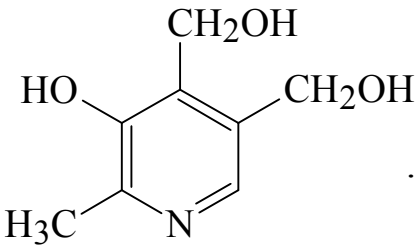
Вітамін B_5 (пантотенова кислота) входить до складу коферменту А (кофермент ацилювання).



Джерелом пантотенової кислоти для людини є кишкові мікроорганізми і продукти харчування. Найбільше її міститься в дріжджах, печінці, курячих яйцях, молоці, м'ясі, стручкових тощо. Добова потреба у вітаміні B_5 для дорослої людини становить приблизно 10 мг. При недостатньому забезпеченні організму вітаміном B_5 спостерігається порушення обміну речовин, розвивається дерматит, депігментація та втрата волосяного покриву, шерсті чи пір'я; припиняється ріст, спостерігаються зміни у роботі нервової системи, розлади у координації рухів, порушення

функціонування серця, нирок, шлунку, кишечнику. Пантотенову кислоту застосовують для усунення атонії кишечнику після операцій на шлунково-кишковому тракті. Кальцієву сіль цієї кислоти використовують з лікувальною метою.

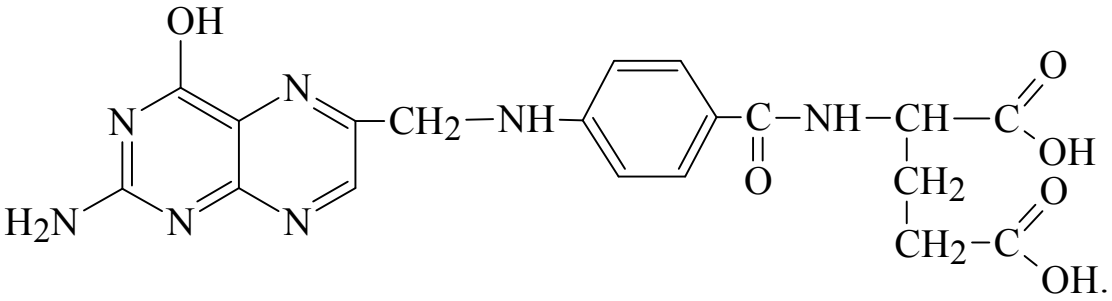
Вітамін B_6 (піридоксин) – приймає участь в обміні амінокислот. Біологічна роль вітаміну B_6 полягає в тому, що він є коферментом так званих трансаміназ або амінотрансфераз – ферментів, що беруть участь у білковому обміні, у реакціях перетворення α-амінокислот. У складі амінотрансфераз вітамін B_6 знаходиться у формі піридоксальфосфату, який здатний зворотно реагувати з амоніаком і іншими амінами. При цьому піридоксальфосфат зворотно переходить в аміновану форму – піридоксамінфосфат. Переходячи з альдегідної форми в аміновану і навпаки, вітамін B_6 діє як переносник аміногруп.



При його нестачі спостерігається втрата апетиту, нудота, слабкість, запальні ураження шкіри та нервів. Добова потреба у вітаміні 1,5 – 3,0 мг. Особливо багаті на B_6 боби, дріжджі, нирки, печінка, м'ясо.

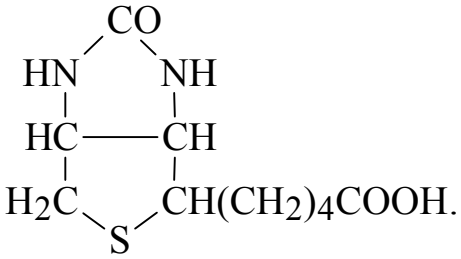
Вітамін B_{12} (ціанкобаламін) – антианемічний вітамін, що впливає на функцію кровотворення, застосовується для лікування малокрів'я. Ціанкобаламін – єдиний відомий на даний час вітамін, що містить у своїй молекулі метал і практично не утворюється ні в рослинах, ні в тканинах тварин. Вітамін B_{12} синтезується переважно мікроорганізмами, у тому числі тими, що існують в кишках людини. Вітамін B_{12} відіграє важливу роль у процесах стимуляції і регулювання кровотворення. Встановлено також, що ціанкобаламін покращує засвоєння білків у організмі, бере участь у біосинтезі біологічно активних речовин, ряду аміно- і нуклеїнових кислот. У великій кількості міститься у печінці великої рогатої худоби і курчат. Добова потреба – 2 мг.

Вітамін Вс (фолієва кислота) впливає на синтез нуклеїнових кислот та амінокислот. Стимулює та регулює кровотворення. Добова потреба – 400 мг.



Багато вітаміну Вс у салаті, капусті, шпинаті, томатах, моркві, пшениці, печінці, нирках, м'ясі, яйцях.

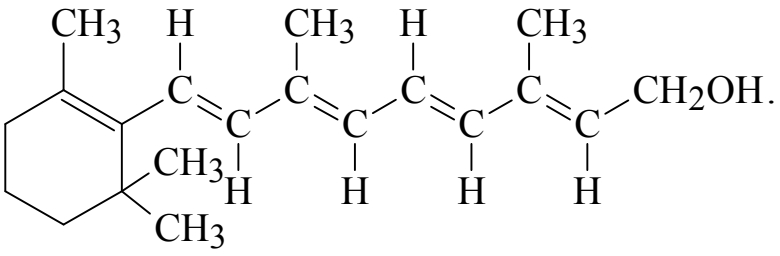
Вітамін Н (біотин) приймає участь у процесах біосинтезу вищих жирних кислот і пуринових основ, процесах карбоксилювання.



Добова потреба – 30 – 100 мкг. Міститься у печінці тварин, арахісі, горосі.

Жиророзчинні вітаміни

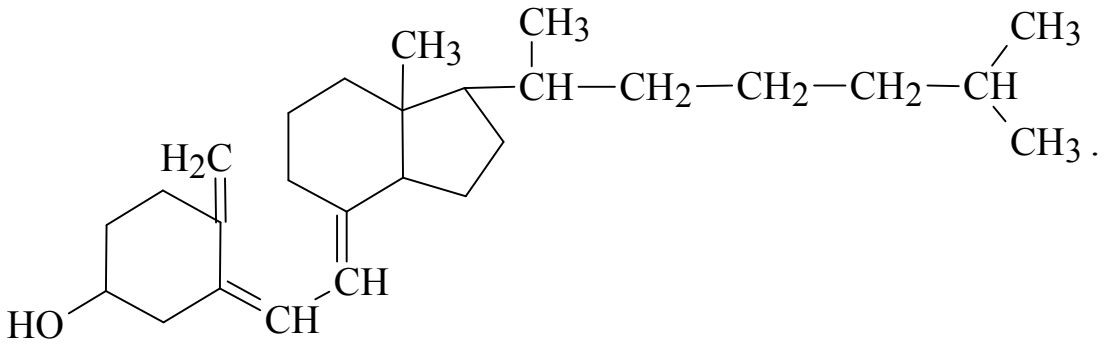
Вітамін А (*ретинол*) міститься в продуктах тваринного походження. Особливо багаті на нього риб'ячий жир, печінка тріски та палтуса. В рослинах є провітамін α-каротин, який в організмі тварин під впливом каротинази печінки перетворюється у вітамін А. Добова потреба людини 1,0-1,5 мг. Потреба збільшується за інфекційних захворювань, посилених напруженнях зору.



Симптомами А-авітамінозу являються інтенсивне ороговіння, посилене злущування епітелію шкіри, очей, травного каналу та дихальних шляхів. Розвивається сухість очей – ксерофтальмія.

Прогресуюче захворювання призводить до некротичного розпаду рогівки – кератомаляції. Крім того, виникає так звана "куряча сліпота": людина бачить вдень, але не бачить у сутінках. Захворювання зумовлене порушенням синтезу зорового пурпуру – родопсину, складовим якого є вітамін А. Зоровий пурпур міститься у рецепторах сітківки ока – палочках, він забезпечує сутінковий зір. В медичних цілях використовуються природні препарати вітаміну А та синтетичні – ретинолацетат та ретинолпальмітат. Вони використовуються для лікування гіповітамінозу як засіб профілактики у людей, робота яких пов'язана з напруженням зору, для стимуляції росту та розвитку у дітей, посилення регенерації погано заживаючих тканин, підвищення опору інфекціям.

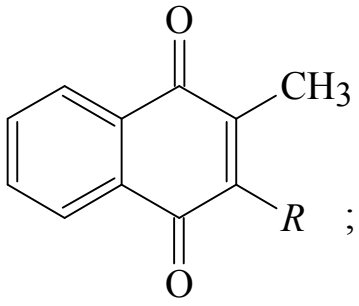
Вітамін D міститься у коров'ячому маслі, жовтку яєць, особливо багатий на нього риб'ячий жир. Відомо декілька вітамінів групи D (D_2, D_3, D_4, D_5, D_6, D_7), що мають подібну будову. Найбільшу біологічну активність проявляють вітаміни D_2 (ергокальциферол) і D_3 (холекальциферол). Вітаміни групи D містяться переважно в організмі людини і тварин. У рослинах їх майже немає, у них знаходяться попередники вітаміну D – стерини, що є похідними циклопентанпергідрофенантрену. Найбільш важливим представником стеринів є ергостерин, що міститься у великих кількостях у грибах і дріжджах. Добова потреба дорослого – 0,025 мг. Характерними симптомами D-авітамінозу – рахіта – являється порушення обміну Кальцію та Фосфору в організмі. У хворих розм'якшуються кістки і під впливом важкості тіла викривлюються, крім того, у дітей непропорційно велика голова, сильно запізнюється поява перших зубів, м'язи стають в'ялими.



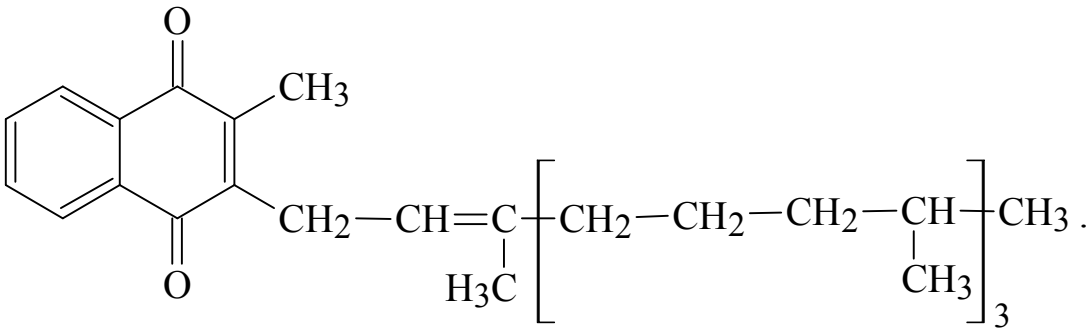
Прийом великих доз вітаміну D веде до тяжкого захворювання, яке характеризується відкладенням великої кількості Кальцію в органах та тканинах. Тому вітамін D слід приймати суворо за призначенням лікаря. Препарати вітаміну D застосовуються для профілак-

тики та лікування рахіту та інших захворювань (туберкульозу кісток, шкіри).

Вітамін К (філохінон). На цей час відомо декілька вітамінів групи К. Усі вони мають подібну структуру і загальну назву – філохінони. Вітамін К необхідний для синтезу в печінці групи білків, що забезпечують процес зсідання крові. Крім того, він прискорює загоєння ран і регенерацію тканин після опіків, а також бере участь в окисно-відновних процесах.



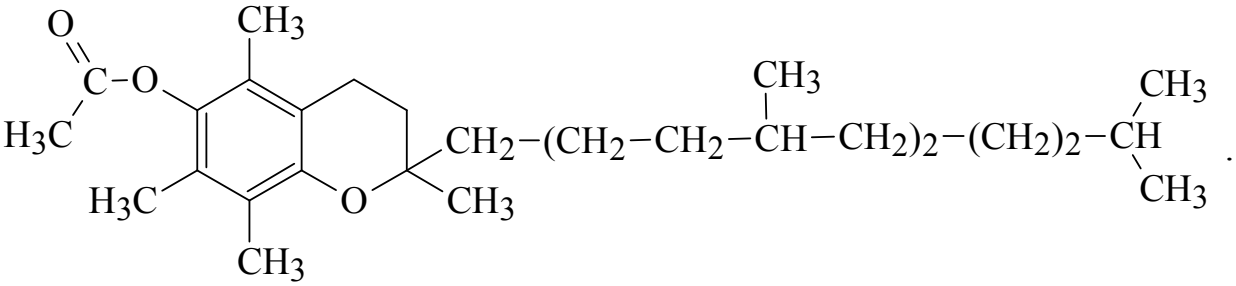
;



.

У людини авітаміноз К зустрічається дуже рідко, оскільки цей вітамін у достатній кількості синтезується кишковою мікрофлорою. Крім того, потреба організму людини в цьому вітаміні забезпечується вживанням продуктів рослинного (капуста, томати, салат) і тваринного (печінка, м'ясо) походження. Потреба людини у вітаміні К точно не встановлена, проте відомо, що в разі його дефіциту після щоденного введення 1 – 5 мг вітаміну К через деякий час швидкість зсідання крові повертається до норми. Добова потреба – 1 – 2 мг.

Вітамін Е (*токоферол*) відіграє важливу роль у забезпеченні функції розмноження. Він представлений цілою групою вітамінів, що містяться у великих кількостях у рослинних оліях і мають назву токофероли. Їх відсутність у їжі негативно позначається на здатності організму до розмноження. Тому вітамін Е називається також антистерильним вітаміном, або вітаміном розмноження.



Препарати токоферолу використовуються як антиоксиданти, для профілактики безпліддя та загрози переривання вагітності, вроджених порушеннях мембран еритроцитів у новонароджених недоношених дітей і т.і. Добова потреба – 10 – 12 мг.

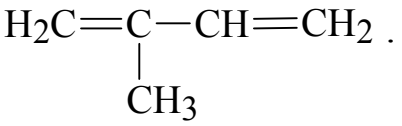
Вітаміни не постачають енергію і не є постійною складовою частиною організму. Більшість вітамінів входить до складу ферментів і приймають участь у ферментативних реакціях, тому вони життєво необхідні. Потреба організму в них вимірюється міліграмами, але при нестачі вітамінів виникають серйозні порушення в обміні речовин. Вітаміни в достатній кількості необхідні молодому організму, потреба в них дорослої людини залежить від багатьох факторів. Наприклад, вона зростає при значних м'язових напругах, при роботі за умов високої або низької температури, підвищеному чи пониженому тиску, при вагітності.

Терпени

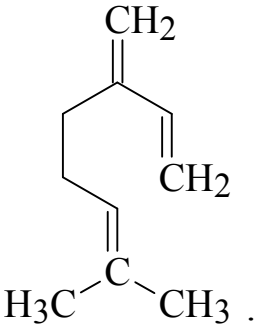
Терпени є надзвичайно поширеними у природі сполуками і виконують різноманітні біологічні функції. Приємний запах багатьох рослин обумовлений їх присутністю. Наприклад, ментол входить до складу м’яти, лимонен – до складу лимону, карвон – до складу кмину, гераніол – до складу троянди, оцимен – до складу базиліку, мірцен – до складу лавру.

Хімічна будова

Терпени можна розглядати як продукти полімеризації ізопрену:



Оскільки ізопрен вміщує п’ять атомів Карбону, то для терпенів характерним є кількість атомів Карбону кратна п’яти. Хімічна будова терпенів дуже різноманітна внаслідок того, що у продуктах полімеризації ізопрену може відбуватися перестановка подвійного та σ-зв'язку, замикання карбонового ланцюга в кільце. Як приклад, розглянемо будову мірцену, молекула якого вміщує два ізопренових фрагменти:



Використовують терпени в харчовій промисловості, при виготовленні лікарських препаратів (валідол), парфумів і косметичних засобів; як розчинники смол і восків.

Стероїди

Стероїди – речовини тваринного чи рослинного походження, що проявляють високу біологічну активність. Стероїди утворюються у природі з ізопреноїдних попередників. Найбільш розповсюджені стероїди – *стерини* – ліпідоподібні природні сполуки, до них відноситься, зокрема, холестерин, статеві гормони.

Кортикоїди. Стероїди, що виділяються корою наднирників, називаються кортикоїдами або кортикостероїдами. Відомо близько 30 різних кортикоїдів, що поділяються на два класи: мінерало-

кортикоїди і глюкокортикоїди. Перші регулюють мінеральний, водно-сольовий обмін; а другі – білковий і вуглеводний. Функцією кортикоїдів є в основному підтримання *гомеостазу*.

Жовчні кислоти входять до складу жовчі, найважливішою функцією якої є прискорення засвоєння жирів в кишечнику. Майже всі вони – похідні холанової кислоти. Жовчні кислоти складають близько 60 % органічних сполук жовчі та є по суті її єдиним функціональним компонентом. Вони сприяють перетравленню жирів, жиророзчинних вітамінів, мають бактеріостатичний вплив на кишкову мікрофлору, стимулюють моторну функцію кишок, екзокринну функцію підшлункової залози. Жовчні кислоти багато в чому визначають фізико-хімічні якості жовчі та сприяють утриманню холестерину у розчині.

Антибіотики

Антибіотики (від грецьк. “анти” – проти, “біос” – життя), органічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами в природі для захисту від інтервенції інших видів мікроорганізмів, та мають здатність пригнічувати розвиток, або знищувати мікроорганізми-інтервенти. Як правило, антибіотики виділяють з живих бактерій або грибів. Існує також велика кількість синтетичних антибіотиків, які відрізняються модифікаціями функціональних хімічних груп природних антибіотиків. Такі модифіковані сполуки часто більш ефективні, або більш стійкі до нейтралізації, що виникає внаслідок набутої мікроорганізмами резистентності. Найбільше увійшли в практику антибіотики, добуті з актиноміцетів, – стрептоміцин, левоміцетин, біоміцин, тераміцин, тетрациклін, ауреоміцин, неоміцин та ін. Широко застосовується пеніцилін, добутий з мікроскопічних грибів. Їх використовують при лікуванні дизентерії, стрептококових і стафілококових септичних захворювань, пневмоній, висипного й черевного тифу та ряду інших інфекційних захворювань. Антибіотики вищих рослин – фітонциди – ще мало вивчені. Застосовується в медицині іманін, добутий із звіробою, та сативін – з часнику. Видобуто антибіотики і з лишайників. З антибіотиків тваринного походження найвідомішими є лізоцим, еритрин, екмолін. Відомі антибіотики, одержані шляхом синтезу. За хімічною структурою антибіотики об'єднують у різноманітні групи сполук. Зокрема, сполуки, що блокують біосинтез білку на рибосомах, утворюють іонопроникні канали у плазматичній мембрані та ін.

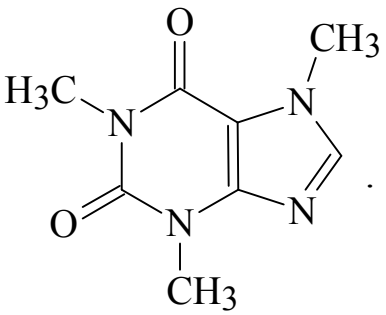
Алкалоїди

Алкалоїди – це органічні нітрогенвмісні сполуки рослинного походження, що є продуктами життєдіяльності грибів та деяких тварин (молюски, жаби). Назву – перекладається як “подібні до лугів” – одержали через відповідну реакцію водних розчинів перших ізольованих представників. Майже всі алкалоїди мають високу біологічну активність, що обумовлено їх захисною функцією в живих організмах. Алкалоїди поділяють на групи згідно їх будови та біологічної дії. Найбільш відомими є групи хініну, кофеїну, нікотину, кокаїну і морфіну.

Хінін – основний алкалоїд кори хінного дерева, що має жарознижувальні, антималярійні, анальгетичні (знеболюючі) та протизапальні властивості. Це стереоізомер хінідину, що характеризується гірким смаком.

Хінін був першим ефективним лікарським препаратом, що використовувався проти малярії; його почали використовуватися ще в 17 столітті. Крім того, хінін використовується для лікування спазмів м'язів та артриту.

Кофеїн — ксантиновий алкалоїд, знаходиться у листах і бобах кавового дерева, чаю, мате, ягодах гуарани, а також у невеликих кількостях у какао та горіхах кола.



Стимулятор центральної нервової системи, компонент тонізуючих напоїв та полегшуючих дихання лікарських засобів. У рослинах кофеїн відіграє роль природного пестициду, який паралізує та вбиває комах-паразитів.

Кофеїн – безбарвна, гіркого смаку, кристалічна речовина, за структурною будовою гетероциклічний алкалоїд пуринового ряду. Вперше був виділений з кавового екстракту в 1821 році. Напої, що містять кофеїн – кава, чай, енергетичні напої.

Кокаїн – білий кристалічний порошок, з вигляду подібний на харчову соду. Наркотик, виробляється з рослини кока. Потрапивши на язик, викликає відчуття оніміння. Вживання кокаїну може

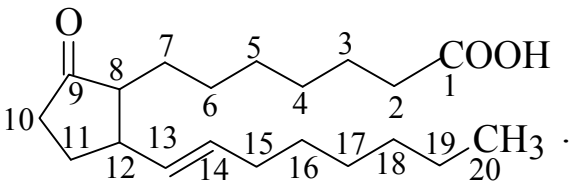
викликати параною, глухоту, маячню, порушення травлення. Можуть з'явитись проблеми зі слизовою носа або затвердіння вен, порушення сну. Негативно впливає на потенцію.

Морфін – головний алкалоїд снодійного маку. Наркотична речовина. Має болезаспокійливу та снодійну дію на організм людини. Викликає звикання. Особливо небезпечним у цьому відношенні є похідне морфіну – героїн.

Нікотин – алкалоїд, який продукують рослини родини *Solanaceae*. Вміст в сухому тютюні складає від 0,6 до 3 % . Біосинтез нікотину відбувається в коренях рослин, а накопичується він у листі. Його основна функція – захист рослини від поїдання, особливо комахами. Тому в минулому нікотин широко використовувався як інсектицид. Наразі використовують його аналоги, такі як імідаклоприд. В малій концентрації, а з середньої сигарети в організм поступає приблизно 1 мг нікотину, речовина діє на ссавців як стимулятор. Це один із факторів, що спричиняють звикання до тютюнопаління. Фармакологічні та поведінкові риси звикання до тютюну аналогічні рисам звикання до таких наркотиків, як героїн та кокаїн.

Простагландини

Простагландини – група фізіологічно активних речовин, що виробляються в дуже малих кількостях клітинами різних тканин більшості тварин. Мають різну фізіологічну дію: викликають скорочення гладкої мускулатури (особливо м'язів матки), впливають на кров'яний тиск, залози внутрішньої секреції, водно-сольовий обмін та ін. Використовуються для полегшення пологів, штучного переривання вагітності й ін. Простагландини звичайно утворюються з поліненасичених жирних кислот, з лінійним ланцюгом із 20 атомів Карбону. Попередниками їх виступають ненасичені жирні кислоти: лінолева, ліноленова, арахідонова й ін. Під впливом спеціалізованої ферментної системи в мікросомах клітин відбувається окиснювальна циклізація Карбонового ланцюга з утворенням циклопентанового або циклопентенового кільця в середині ланцюга жирної кислоти:



Лабораторна робота № 19
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРОТИНІВ У РІЗНИХ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТАХ

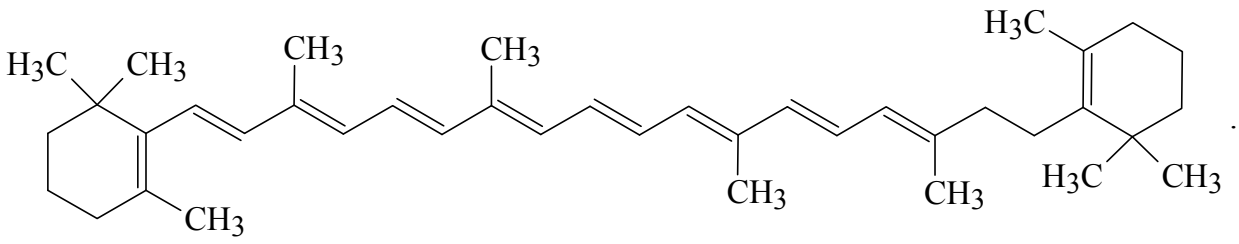
Мета і завдання роботи: *виділити каротини з рослинного матеріалу, відділити їх від інших пігментів методом адсорбційної хроматографії, кількісно визначити їх вміст у рослині; поглибити знання про роль каротинів у життєдіяльності рослин.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *розширити знання про будову різних каротиноїдів, їх участь у процесах метаболізму в рослинах; освоїти методику виділення каротинів з рослинних об'єктів, хроматографічного розділення рослинних пігментів; кількісно визначити вміст каротинів в органах різних видів рослин.*

Каротиноїди – жовті й червоні пігменти рослин. За хімічною будовою вони є поліізопреноїдами, що містять вісім залишків ізопрену. До цієї групи ненасичених вуглеводнів терпенового характеру за хімічною будовою і фізико-хімічними властивостями наближаються також багато інших пігментів, у молекулах яких є Оксиген. На пропозицію М.С. Цвєта всі ці пігменти об'єднані в одну групу каротиноїдів. Найбільш поширеними в природі пігментами є каротини. Разом із хлорофілом і ксантофілами вони завжди містяться в хлоропластах зелених листків, у багатьох квітках і плодах. Серед каротинів найбільше значення мають α-, β- і γ-каротини. У рослинах переважає $-\beta$-каротин. Так, у коренеплодах моркви частка α-каротину становить 15 %, β-каротину – 85 %, а γ-каротину – тільки сліди. У деяких плодах, водоростях і мікроорганізмах у невеликих кількостях містяться δ- і ε-каротини.

Маючи в молекулах подвійні зв'язки, каротини можуть бути *цис*- і *транс*-ізомерами. Природними каротиноїдам більш властива *транс*-конфігурація.

Природний β-каротин має таку будову:



Каротин в організмах тварин і людини легко перетворюється у вітамін А. Під дією ферменту каротинази молекула каротину розщеплюється за місцем центрального подвійного зв'язку на дві молекули вітаміну A_1.

Каротиноїди містяться практично в усіх органах і тканинах рослин і виконують важливі біохімічні функції. Вони беруть участь у процесі фотосинтезу, забезпечуючи поглинання рослиною світлової енергії в синій зоні видимого спектру. Крім того, вони відіграють певну роль у процесах розмноження рослин, попереджують розпад хлорофілу під дією молекулярного кисню, виконують антиоксидантні функції.

Вміст каротиноїдів у рослинах суттєво змінюється як протягом вегетації рослин, так і залежно від умов їх вирощування. Здебільшого вміст каротиноїдів у листах зростає в перші фази росту рослин, досягає максимуму під час цвітіння і знижується при старінні листя. При дозріванні плодів вміст каротиноїдів в них підвищується. Високий вміст каротинів мають бобові трави, особливо люцерна. Каротини легко руйнуються під дією сонячного світла, тому у висушених на сонці рослинах каротинів значно менше, ніж у зеленій масі.

Хід роботи. Рослинний матеріал (листя, пагони, квітки й інші органи рослин) масою 0,5 – 1,0 г розтирають у ступці з 2 г безводного натрій сульфату і 0,5 г магній карбонату. Після розтирання суміш залишають на 5 хв. для підсушування. Після цього її наносять на хроматографічну колонку. Колонка являє собою скляну трубку діаметром 15 – 20 мм, довжиною 120 – 150 мм, у нижній частині звужена, а у верхній – розширена. В нижню частину колонки вміщують тампон зі скловати, потім насипають 10 г добре розтертої в ступці суміші натрій оксалату й тальку (1 : 1) і ущільнюють. Зверху також кладуть тампон зі скловати для запобігання змучування.

Хроматографічну колонку приєднують до колби Бунзена (приєднана до вакуумного насоса).

Після нанесення розтертої і підсушеної маси ступку обполіскують 5 $см^3$ бензину, який виливають у колонку. Потім вмикають насос і відсмоктують бензиновий екстракт зі швидкістю 50 – 60 крапель за хвилину. Колонку промивають порціями бензину по 3 $см^3$ до повного видалення нижньої жовтогарячої смуги каротинів, яка знаходиться попереду інших пігментів. За нею розташована жовта смуга ксантофілів, а вище – синя смуга хлорофілу *a.* Розчин каротинів доводять бензином до певного об'єму (10 або 15 $см^3$), колориметрують із світлофільтром з довжиною хвилі 490 нм.

Екстинкцію бензинового елюату порівнюють з екстинкцією стандартного розчину. Замість стандартного розчину каротину можна використати розчин калій дихромату, забарвлення якого схоже на забарвлення каротинів. Для виготовлення такого розчину калій дихромат масою 72 мг вносять у мірну колбу на 100 $см^3$, розчиняють, об'єм доводять до риски і ретельно перемішують. Один кубічний сантиметр такого розчину відповідає 0,00416 мг каротину.

Вміст каротину в досліджуваному матеріалі розраховують за формулою

$$X = \frac{100 \times D_1 \times m \times V}{a \times D_2},$$

де X – вміст каротинів у рослинному матеріалі, мг %; a – маса рослинного матеріалу, г; D_1 – екстинкція досліджуваного розчину каротинів; D_2 – екстинкція стандартного розчину $K_2Cr_2O_7$; m – вміст каротинів у стандартному розчині, мг/$см^3$; V – об'єм бензинового елюату каротинів, $см^3$.

Лабораторна робота № 20
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТІАМІНУ В СЕЧІ ФЛУОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику визначення тіаміну в сечі флуориметричним методом; визначити фізіологічні межі вітаміну за нормою; поглибити знання про участь тіаміну в процесах метаболізму у тварин і людини.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про будову, властивості, поширеність у природі, механізм дії тіаміну в організмі тварин і людини; уміння готувати об'єкт до аналізу, кількісно визначати тіамін флуориметричним методом після окиснення його в тіохром.*

У ділильну лійку вносять 6 – 8 $см^3$ сечі, додають рівний об'єм ізобутанолу і струшують протягом двох хвилин. Промиту сечу, тобто нижній шар, зливають у дві пронумеровані сухі ділильні лійки (по 2 $см^3$ у кожну) і додають по 1 $см^3$ 20 % розчину натрій гідроксиду.

У першу лійку (дослідну) краплинами додають свіжовиготовлений 10 % розчин $K_3[Fe(CN)_6]$, доки забарвлення не зникатиме протягом 30 сек. Проба, у яку не додавали калій гексаціано-(III)-ферат, є контрольною (друга лійка). В обидві лійки наливають по 5 $см^3$ дистильованої води, по 10 $см^3$ ізобутанолу й інтенсивно струшують протягом двох хвилин. Нижній шар сечі зливають, верхній – ізобутанольний – збирають у дві сухі пронумеровані пробірки (1 і 2).

У третю ділильну лійку наливають 1 $см^3$ робочого стандартного розчину тіаміну (10 мкг в 1 $см^3$) і 1 $см^3$ води, у четверту лійку (контрольну) – 2 $см^3$ дистильованої води. В обидві лійки додають по 1 $см^3$ 20 % розчину натрій гідроксиду і по 10 крапель 10 % розчину $K_3[Fe(CN)_6]$, струшують. Потім у кожну лійку додають по 5 $см^3$ води і по 10 $см^3$ ізобутанолу, знову струшують протягом двох хвилин. Нижній шар видаляють, а верхній збирають у дві сухі пронумеровані пробірки (3 і 4).

У всі чотири пробірки – дослідну, стандартну і дві контрольні – додають для освітлення розчинів по 2 см^3 етанолу. Порівнюють на флуориметрі інтенсивність флуоресценції досліджуваної сечі й контролю.

Вміст тіаміну в сечі за добу визначають за формулою

$$m = \frac{m_1 \times (a - б) \times V}{в \times V_1},$$

де m – маса тіаміну в добовому об'ємі сечі, мкг; m_1 – вміст тіаміну в 1 мл робочого стандартного розчину, мкг; a – інтенсивність флуоресценції дослідної проби, %; $б$ – інтенсивність флуоресценції контрольної проби, %; $в$ – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, %; V – добовий об'єм сечі; V_1 – об'єм досліджуваної сечі, см^3.

Лабораторна робота № 21
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ К В РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Мета і завдання роботи: *освоїти методику колориметричного визначення вітаміну К в рослинному матеріалі за реакцією з діетилмалоновим естером; з'ясувати роль вітаміну у процесах метаболізму в організмі.*

Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання про будову вітамінів групи К, їх природні джерела та участь у процесах метаболізму в рослинних і тваринних організмах; вміння кількісно визначати вміст вітаміну в рослинному матеріалі колориметричним методом за реакцією з діетилмалоновим естером.*

Роботу проводять у витяжній шафі. Дрібно нарізані шматочки моркви масою 10 – 15 г ретельно розтирають у ступці з кварцовим піском, додаючи невелику кількість натрій карбонату. Потім у ступку

доливають 10 $см^3$ діетилового етеру і знову розтирають. Гомогенат переносять на лійку Бюхнера, яку ставлять на колбі Бунзена, двічі обполіскують ступку невеликими порціями етеру, який виливають на лійку. Приєднують колбу Бунзена до вакуум-насоса. Фільтрують і тричі промивають осад на фільтрі етером. Фільтрат висушують безводним натрій сульфатом, після чого етер випаровують у витяжній шафі на теплій водяній бані, яку нагрівають заздалегідь. Користуватись електронагрівальними приладами чи пальниками відкритого вогню при випаровуванні діетилового етеру не можна. Залишок після випаровування етеру розчиняють у 5 $см^3$ хлороформу. До одержаного розчину додають 1 $см^3$ 1 % спиртового розчину діетилмалонового естеру і 0,2 $см^3$ 1 % розчину калій гідроксиду. Загальний об'єм доводять до 10 $см^3$ водою в мірній колбі. З'являється червоно-фіолетове забарвлення. Розчин колориметрують за 490 нм у кюветах з робочою довжиною 10 мм проти контролю на реактиви.

Одночасно проводять кольорову реакцію зі стандартним хлороформним розчином вітаміну К: 0,04 мкг вітаміну на 1 $см^3$.

Вміст вітаміну К розраховують за формулою

$$C = \frac{D_1 \times a \times V \times 100}{D_2 \times m},$$

де C – вміст вітаміну К, мкг %; m – маса матеріалу, взятого для дослідження, г; a – вміст вітаміну К в 1 $см^3$ стандартного розчину, мкг; V – об'єм стандартного розчину вітаміну К, взятий для визначення, $см^3$; D_1 – екстинкція досліджуваного розчину; D_2 – екстинкція стандартного розчину вітаміну К.

Лабораторна робота № 22
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С В РІЗНИХ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТАХ

Мета і завдання роботи: *сформувати вміння виділяти вітамін С з рослинного матеріалу і кількісно його визначати титриметричним методом; дати порівняльну характеристику вмісту аскорбінової кислоти у різних рослинах.*

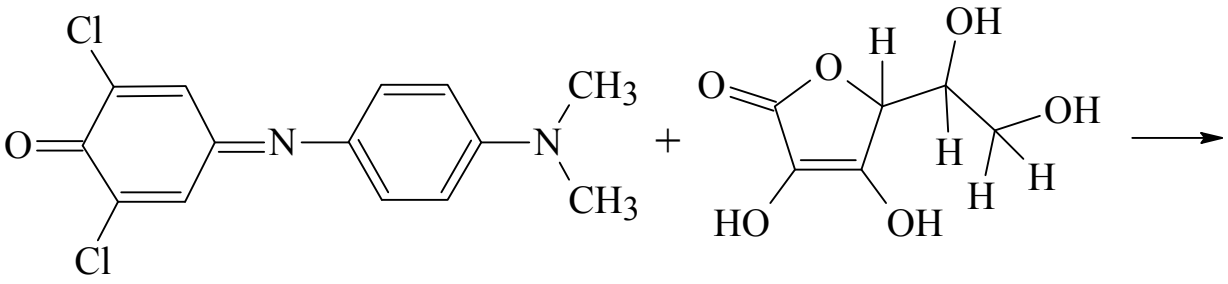
Знання і вміння, які повинні отримати студенти: *знання способів екстракції вітаміну С з біологічного матеріалу; знання про кількісний вміст аскорбінової кислоти в різних рослинах, роль вітаміну С у процесах метаболізму; уміння вилучати вітамін С з рослин і кількісно визначати титруванням робочим розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу.*

Хід роботи. Нарізають дрібними шматочками рослинний матеріал (картопля, цибуля, капуста, яблука, груші та інше). Непридатним для визначення аскорбінової кислоти за цим методом є матеріал, гомогенат якого має забарвлення (морква, буряк, пелюстки квітів та інше).

У фарфорову ступку переносять 10 г матеріалу і розтирають з невеликою кількістю кварцового піску, додаючи невеликими порціями 5 % розчин хлоридної кислоти до одержання рідкої кашки (розчину кислоти не повинно бути більше 100 $см^3$). Гомогенат кількісно переносять у мірну колбу на 100 $см^3$. Ступку і товкачик ретельно обмивають тим же розчином хлоридної кислоти, який переносять у мірну колбу. Вміст колби доводять дистильованою водою до риски, перемішують перевертанням колби догори дном і фільтрують або центрифугують. Не треба переносити із ступки в колбу пісок, який використовували для одержання гомогенату.

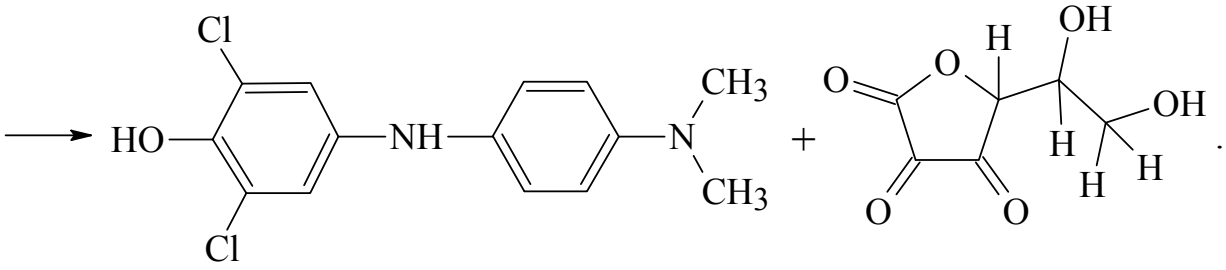
Одержаний екстракт має бути зовсім прозорим, його інколи треба фільтрувати декілька разів.

Для визначення вмісту аскорбінової кислоти у дві конічні колбочки на 50 см^3 беруть піпеткою по 10 см^3 одержаного екстракту з рослинного матеріалу. Вміст колб титрують з мікробюретки розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу.



2,6-дихлорфеноліндофенол (синє забарвлення)

Аскорбінова кислота



Відновлена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (безбарвна)

Дегідроаскорбінова кислота

За наявності в екстракті вітаміну С розчин знебарвлюється, а при подальшому додаванні робочого розчину з'являється блідо-рожеве забарвлення. Робочий розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлений у синій колір. При взаємодії з аскорбіновою кислотою відбувається відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу, а відновлена форма безбарвна. Коли вся аскорбінова кислота буде окиснена реагентом, подальше його відновлення не відбуватиметься і невеликий надлишок реагенту дасть блідо-рожеве забарвлення, а не синє, бо в кислому середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має червоне забарвлення.

В одній із проб руйнують вітамін С кип'ятінням за присутності декількох крапель гідроген пероксиду і проводять усі описані операції. У пробі, де вітамін С був зруйнований, при додаванні декількох крапель робочого розчину з'являється рожеве забарвлення. За середньою величиною титрування розраховують вміст вітаміну С:

$$C = \frac{100 \times V \times V_1 \times T}{a \times V_2},$$

де C – вміст аскорбінової кислоти, мг %; T – титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу за аскорбіновою кислотою; V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см^3; a – маса досліджуваного матеріалу, г; V_1 – затрачений об'єм реагенту при титруванні, см^3; V_2 – взята для титрування аліквота із загального об'єму екстракту, см^3.

У результаті знаходять вміст вітаміну С в міліграмах на 100 г досліджуваного матеріалу. За даною методикою визначається лише відновлена форма аскорбінової кислоти.

Визначення титру розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (С(1/2) = 0,001 моль/дм^3) за аскорбіновою кислотою визначають у день роботи. Беруть 2 см^3 0,1 % розчину аскорбінової кислоти і вносять у 50 см^3 2 % розчину HPO_3, перемішують. Беруть 5 см^3 одержаного розчину і титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення. Відмічають затрачений на титрування об'єм реагенту. Такий же об'єм розчину аскорбінової кислоти титрують з іншої бюретки титрованим розчином калій йодату (С(1/г) = 0,001 моль/дм^3). До розчину аскорбінової кислоти перед титруванням додають декілька кристалів (не більше 0,1 г) калій йодиду і 5 крапель 1 % розчину крохмалю. Обережно титрують до появи ледь помітного синього забарвлення і відмічають витрачений на титрування об'єм калій йодату. Оскільки в першому і другому випадку були відтитровані однакові об'єми аскорбінової кислоти, кількості затрачених калій йодату та 2,6-дихлорфеноліндофенолу еквівалентні. Через те що 1 см^3 розчину калій йодату (С(1/г) = 0,001 моль/дм^3) еквівалентний 0,088 мг аскорбінової кислоти, титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу за аскорбіновою кислотою становитиме

$$T = \frac{0,088 \times V_2}{V_1},$$

де T – титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, мг/см^3; V_1 і V_2 – об'єми розчинів 2,6-дихлорфеноліндофенолу та калій йодату відповідно, затрачені на титрування однакових об'ємів розчину аскорбінової кислоти, см^3.

Лабораторна робота № 23
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ Р В РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

***Мета і задачі роботи**: освоїти методику кількісного визначення вітаміну Р в рослинному матеріалі перманганатометричним титруванням; визначити фізіологічні межі його в різних рослинах; поглибити знання про фізіологічну роль рутину.*

***Знання і вміння, які повинні отримати студенти**: знання про різні форми вітаміну, поширеність у рослинному світі, біологічну дію; уміння кількісно визначати вміст вітаміну у рослинному матеріалі, фізіологічні межі рутину в досліджуваному об'єкті.*

Хід роботи. Чай або висушені шкірки цитрусових масою 100 мг заливають дистильованою водою об'ємом 50 $см^3$ і кип'ятять протягом 5 хв. Одержаний екстракт охолоджують, відбирають 10 $см^3$ і переносять у конічну колбу на 100 $см^3$, додають 10 $см^3$ дистильованої води і 5 крапель розчину індигокарміну (1 г індигокарміну розтирають у фарфоровій ступці, розчиняють в 50 $см^3$ 98 % сульфатної кислоти, вносять у мірну колбу на 1 $дм^3$, що містить близько 300 $см^3$ дистильованої води, перемішують вміст колби і доводять водою до 1 $дм^3$). З'являється синє забарвлення. Ретельно перемішуючи рідину в колбі, титрують 0,01 моль/$дм^3$ розчином $KMnO_4$ до появи стійкого жовтого забарвлення.

Різниця між дослідним і контрольним титруванням являє собою об'єм 0,01 моль/$дм^3$ розчину $KMnO_4$, який пішов на окиснення вітаміну Р.

Для розрахунків вмісту вітаміну користуються формулою

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times T \times V \times 100}{a \times V_3},$$

де X – вміст вітаміну Р, мкг/100 г матеріалу; V_1 – об'єм 0,01 моль/дм^{3}розчину $KMnO_4$, що пішов на титрування дослідної проби, см^3; V_2 – об'єм 0,01 моль/дм^3 розчину $KMnO_4$, використаного на титрування контрольної проби, см^3; V – загальний об'єм екстракту вітаміну, см^3; V_3 – аліквотний об'єм екстракту вітаміну, взятий для титрування, см^3; a – маса рослинного матеріалу, взятого для аналізу, г; T – титр 0,01 моль/дм^3 розчину $KMnO_4$ за рутином (3,2 мкг/см^3).

Контрольні питання

1. Вітамін С. Охарактеризуйте його структуру, біологічну роль, добову потребу, харчові джерела.
2. Вітаміни групи В. Їх структура, біологічна роль, добова потреба, харчові джерела.
3. Вітамін А. Його структура, біологічна роль, добова потреба, харчові джерела.
4. Навести приклади та надати характеристику вітамінам, що приймають участь у окисно-відновних реакціях.
5. Вітаміни групи D. Їх структура, біологічна роль, добова потреба, харчові джерела.
6. Вітамін Е. Його структура, біологічна роль, добова потреба, харчові джерела.
7. Вітамін Н. Його структура, біологічна роль, добова потреба, харчові джерела.

Завдання для самостійної роботи

1. В традиціях ескімосів накладено табу на вживання в їжу печінки білого ведмедя. Ескімоси вірили, що кожного, хто з'їсть цю печінку, настигне нещастя у вигляді хвороби. Члени Австралійської антарктичної експедиції 1911 року К. Мерц і Д. Мусон, які були змушені харчуватись печінкою собак – лайок, тяжко захворіли і К. Мерц, який спожив більше печінки, як легкої їжі, а менше м'яса, оскільки був вегетаріанцем, помер. Який токсин міститься в печінці полярних видів тварин, які харчуються рибою?
2. Поясніть, чому жиророзчинні вітаміни, на відміну від водорозчинних, можуть викликати *гіпервітамінози*?

ГОРМОНИ

Зв'язок та злагоджену роботу усіх органів та систем поряд з нервовою системою здійснює й ендокринна система. Ендокринна система забезпечує ріст, статевий розвиток, обмін речовин, пристосування організму за умов стресу, напруження, дії зовнішнього середовища.

Ендокринна система – це система залоз внутрішньої і змішаної секреції. До ендокринних залоз відносять: гіпоталамо-гіпофізарну систему, епіфіз, щитоподібну і паращитоподібні, зобну, наднирники, та змішаної секреції – статеві та підшлункову. Секрети, які вони виробляють, називаються *гормонами*. Гормони характеризуються високою біологічною активністю та специфічністю.

Класифікація гормонів

Гормони *за фізіологічною дією* поділяються на пускові, тобто ті, які впливають на інші залози, наприклад гормони гіпофізу, епіфізу та на виконавчі – гормони наднирників, щитоподібної та паращитоподібних залоз, зобної, підшлункової та статевих залоз.

За хімічною структурою гормони поділяються на

- пептидні: тропні гормони гіпофіза,
- стероїдні: стероїди кори наднирників та статеві гормони,
- похідні амінокислот: похідні тирозину – *тироксин*, трийодтіронін (гормони щитоподібної залози),
- похідні жирних кислот: простагландини.

Механізм дії гормонів полягає у впливу на генетичний апарат клітини, при цьому синтезується білок – фермент, необхідний тканині за певних умов. Деякі гормони впливають на активність ферментів, інші – на проникність клітинних мембран.

Залози внутрішньої і змішаної секреції знаходяться в постійній взаємодії. Гормони гіпофіза впливають на роботу щитоподібної, підшлункової, наднирникових та статевих залоз. Гормони статевих залоз впливають на роботу зобної залози, а гормони останньої – на статеві.

Гормони різних залоз за дією можуть бути синергістами, наприклад *адреналін* та гормони щитоподібної залози, або антагоністами, наприклад адреналін та інсулін (гормон підшлункової залози). Гормони діють на нервову систему, в результаті чого також змінюється робота органів та їх систем.

Транспорт гормонів здійснюється з током крові, лімфи та міжклітинної рідини. Швидкість надходження і видалення гормону з рідких середовищ організму залежить від білків-переносників та від концентрації гормону у відповідній рідині. Гормони швидко руйнуються, але постійно синтезуються в кількості, необхідній для здійснення гомеостазу. Руйнування гормону відбувається в тканинах-ефекторах (тканина, на яку направлена дія гормону), а також в печінці та нирках. Клітини, на які направлена дія гормону, називають клітинами-мішенями.

Гормони гіпофізу

Гіпофіз розташовується в турецькому сідлі на тілі клиноподібної кістки. Маса гіпофіза становить близько 0,4 – 0,5 г. Він поділяється на аденогіпофіз, який включає в себе передню та проміжну долю і складає 75 % маси залози, і задню долю – нейрогіпофіз. Клітини аденогіпофізу поділяються ацидофільні, які виділяють гормон росту та лактогенний гормон, базофільні, які виділяють інші гормони, та хромофоби, які є резервними клітинами і можуть за потребою ставати ацидофільними або базофільними.

Соматотропін, або гормон росту, стійкий до дії підвищеної температури, має властивості глобулінів. Молекула його складається з одного поліпептидного ланцюга. Соматотропін активізує діяльність ферментів синтезу РНК та інтенсивність білкового синтезу, посилює проникність клітин для амінокислот, мітотичний поділ клітин, біосинтез глікогену і мобілізацію жирів із жирових депо, а також відкладення Кальцію і Фосфору в кістках. Підвищена продукція соматотропіну в ранньому віці призводить до гігантизму, недостатня – до нанізму (карликового росту). У дорослих людей надмірне виділення цього гормону викликає захворювання акромегалію, яка виражається в непропорційному збільшенні виступаючих частин тіла (стіп, кистей, щелеп, губ, носа). Під контролем соматотропіну знаходиться ріст кісткової тканини, тісно пов'язаний із синтезом білків.

Пролактин регулює розвиток і функціонування молочних залоз. Після пологів вміст цього гормону завжди збільшується і залишається підвищеним протягом усього періоду секреції молока. Функція пролактину в організмі тісно пов'язана з дією гонадотропних гормонів, під впливом яких посилюється ріст залозистої тканини і вивідних протоків молочної залози. У свою чергу пролактин необхідний для продукування статевих гормонів і в такий спосіб доповнює дію гонадотропних гормонів. Пролактин бере участь також у регуляції водно-сольового обміну.

Тиреотропін, або тиреотропний гормон, стимулює розвиток і діяльність щитоподібної залози. Тиреотропін належить до складних білків глікопротеїдів. Під його впливом посилюється виділення гормонів щитоподібної залози. Вплив тиреотропіну на щитоподібну залозу полягає в тому, що він сприяє накопиченню Йоду і включенню його в молекулу тирозину. При захворюванні передньої долі гіпофізу синтез тиреотропіну сповільнюється, що призводить до переродження залозистої тканини щитоподібної залози, яке супроводжується появою зоба.

Кортикотропін, або адренокортикотропний гормон (АКТГ), стимулює діяльність кори надниркових. За своєю хімічною природою молекула кортикотропіну – нерозгалуджений поліпептид. Кортикотропін сприяє підвищенню вмісту холестерину в корі надниркових залоз і перетворенню його в *кортикостероїди* – гормони надниркових. Крім того, він підвищує проникнення глюкози в клітини надниркових і активізує процеси, пов'язані з утворенням відновлених форм $НАДФН_2$.

Гонадотропні гормони є стимуляторами функцій чоловічих і жіночих статевих залоз. *Фолітропін*, або фолікулостимулюючий гормон, стимулює ріст і дозрівання фолікулів яєчника самок і утворення сперми у самців. Фолітропін належить до складних білків глікопротеїдів, які містять Сульфур, Нітроген, глюкозу і глюкозамін. Інтенсивність виділення гормону залежить від фаз статевого циклу.

Лютропін стимулює в самок ріст і дозрівання фолікулів, овуляцію й утворення жовтого тіла. У самців лютропін викликає розвиток інтерстиціальної тканини сім'яників і синтез тестостерону. Гормон належить до глікопротеїдів. Його молекула містить тирозин, триптофан і глюкозамін.

Меланотропін регулює пігментацію шкіри. Його молекула являє собою поліпептид, що складається з 18 різних амінокислот. Під

впливом цього гормону амінокислота тирозин перетворюється в меланін. Останнім часом установлено, що меланотропін активізує біосинтез родопсину – світлочутливого пігменту сітківки ока, чим сприяє підвищенню гостроти зору.

Вазопресин, або антидіуретичний гормон, впливаючи на рецептори кровоносних судин, викликає їх звуження, у результаті чого підвищується кров'яний тиск. Поряд із цим відбувається зворотне всмоктування води в капілярах ниркових канальців, завдяки чому вазопресин одержав ще одну назву – антидіуретичний гормон. Вазопресин бере участь у підтриманні постійного водно-сольового обміну в організмі. Якщо функції гіпофізу порушені, продукція вазопресину послаблюється, що призводить до посиленого діурезу. Кількість сечі на добу може сягати десяти літрів і більше. Таке захворювання називається нецукровим діабетом.

Окситоцин підвищує тонус гладкої мускулатури, особливо це стосується матки. Механізм дії окситоцину полягає в тому, що він підвищує проникнення Калію в клітини м'язів матки і тим самим пригнічує активність ацетилхолінестерази. У результаті цього підвищується збуджуваність і скорочення м'язів. Тому окситоцин застосовують в акушерсько-гінекологічній практиці для стимулювання мускулатури матки при слабких потугах під час родів, а також для стимуляції м'язових скорочень молочної залози.

Гормони епіфізу

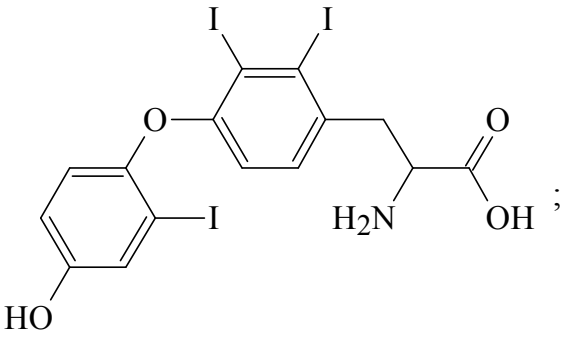
Епіфіз або шишкоподібна залоза розташована на межі проміжного та середнього мозку. Має форму ялинкової шишки. Маса залози становить приблизно 0,12 г. Зовні вона вкрита сполучною тканиною, що утворює перегородки, між якими розташовується функціональна тканина, нейроглія та нервові волокна.

Епіфіз виробляє гормон *мелатонін*, який є антагоністом меланотропного гормону гіпофізу. Епіфіз також гальмує гонадотропну функцію гіпофіза. Ця залоза забезпечує біологічні ритми людини: коли на сітківку ока потрапляє світло, збуджуються рецептори, по зоровому нерву збудження передається симпатичній нервовій системі, а звідти клітинам епіфіза, які зменшують вироблення мелатоніну. Таким чином, зміна дня і ночі приводить до циклічної зміни коливань рівня мелатоніну, що визначає добовий та сезонний ритми.

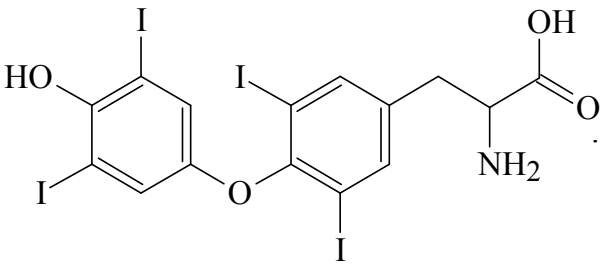
Гормони щитоподібної залози

Щитоподібна залоза у людини складається з двох долей, з'єднаних перешийком. Іноді зустрічається третя пірамідальна доля. Залоза лежить на передній поверхні щитоподібного хряща гортані – звідки й назва. Має фолікулярну будову. За добу щитоподібна залоза поглинає 120 мкг Йоду, який використовується на утворення гормонів. На функцію щитоподібної залози суттєвий вплив мають несприятливі екологічні фактори, з одного боку це пов'язано з її поверхневою локалізацією, а з іншого – з кумуляцією Йоду та інших мікроелементів. Важливу роль відіграє висока чутливість залози до імуностимуляції та іонізуючого випромінювання. Як наслідок, 6 % населення мають ті чи інші порушення функції щитоподібної залози.

Гормони щитоподібної залози: *тироксин та трийодтіронін*



;



.

Тироксин Трийодтіронін

Потрапляючи в кров, ці гормони досягають клітин, де впливають на мітохондрії, в яких зосереджені окисно-відновні ферменти тканинного дихання. Деформуючи мембрану мітохондрій, вони тим самим регулюють процеси складних взаємозалежних окиснювальних процесів, зокрема, окиснювальне фосфорилювання.

Як відомо на цей час, тироксин стимулює синтез великої кількості ферментів, підвищує активність ферменту, що каталізує реакцію окиснювального дезамінування глутамінової кислоти – глутаматдегідрогенази, активізує обмін нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, мінеральних речовин, прискорює процеси росту і розвитку організму. Тироксин і трийодтіронін підвищують активність гексокінази – першого ферменту при окисненні глюкози, а також забезпечують адаптацію організму до низьких температур,

роз'єднуючи реакції клітинного дихання й окиснювального фосфорилювання, у результаті чого зменшується утворення АТР і виділяється більше тепла. Основні напрямки дії гормонів щитоподібної залози зображено у таблиці 16.

Таблиця 16

Основні напрямки дії гормонів щитоподібної залози

Напрямок дії гормонів	*Ефекти*
Метаболізм вуглеводів	Прискорення всмоктування та окиснення глюкози. Розщеплення глікогену
Метаболізм ліпідів	Окиснення вищих жирних кислот
Метаболізм білків	Посилення синтезу сечовини. Активація біосинтезу протеїнів
Метаболізм нуклеїнових кислот	Активація синтезу ДНК та РНК
Вітамінний обмін	Підвищення потреби в вітамінах
Взаємозв’язок з іншими гормонами	Збільшення розпаду стероїдів та кортикостероїдогенез. Пригнічення дії ТТГ. Дія на гормоногенез зобної залози та мозковий шар наднирників

Гормони паращитоподібних залоз

Паращитоподібні залози розташовуються на задній стінці бокових долей щитоподібної залози і мають спільну з нею оболонку. Як правило, у людини чотири паращитоподібні залози загальною масою близько 0,1 г.

Гормони паращитоподібних залоз: паратгормон і тіреокальцетонін.

Паратгормон – регулює обмін Кальцію та Фосфору. В нирках за дії гормону зменшується всмоктування Фосфору, який виводиться з сечею. В кишечнику паратгормон стимулює надходження Кальцію в кров. При нестачі Кальцію посилюється виділення паратгормону, що призводить до вимивання Кальцію з кісток, як наслідок – схильність до переломів, випадіння зубів, відкладання Кальцію в судинах та ниркових канальцях.

Тіреокальцитонін – антагоніст паратгормону.

Гормони тимусу

Тимус, чи вилочкова або зобна залоза, розташована за грудиною, складається з двох долей. У немовляти маса залози 10 – 14 г. До 15 – 20 років її маса збільшується до 20 – 30 г, а потім починає зменшуватись, і в 40 років ця залоза важить приблизно 15 г. З початком підліткового періоду тимус починає атрофувати, цей процес генетично запрограмований і пов'язаний зі зміною функціонування багатьох залоз, в першу чергу статевих, наднирників, паракринних. Гормони тимусу впливають на роботу статевих залоз, ріст та розвиток організму до статевого дозрівання.

Гормони підшлункової залози

Підшлункова залоза є органом внутрішньої та зовнішньої секреції. Вона має альвеолярну будову, її дольки з вивідними протоками забезпечують її зовнішньосекреторну функцію.

Інсулін. Гормон білкової природи, що впливає на обмін речовин, насамперед, він сприяє використанню вуглеводів. Як регулятор інсулін підтримує активність ферменту гексокінази, стимулюючи тим самим процеси *фосфорилювання* цукрів – першого обов'язкового етапу, без якого в організмі не може використовуватись глюкоза. Одночасно з цим він гальмує функцію глюкозо-6-фосфатази (наступного ферменту в процесі перетворення глюкози), захищаючи фосфорильовані гексози від подальшого розщеплення. Таким чином, інсулін сприяє підвищенню кількості глюкозофосфорних ефірів, і тим самим затримці і використанню вуглеводів у клітині. Гормон необхідний також для дії цілого ряду ферментів, які беруть участь в обміні вуглеводів, жирів і білків, він ефективно стимулює перехід глюкози з крові до скелетних м'язів і жирової тканини, прискорює біосинтез глікогену в печінці, бере участь у біосинтезі клітинних мембран, а також змінює їх проникність відносно глюкози, стимулює процеси клітинного дихання і їх спряження з фосфорилюванням. У зв'язку з цим стає зрозумілим, що відсутність інсуліну може призвести до порушення багатьох найважливіших реакцій, що відбуваються в організмі. За умови дефіциту або відсутності в організмі інсуліну підвищується рівень глюкози у крові (*гіперглікемія*) і збільшується виділення її із сечею (глюкозурія). Ці явища є симптомами, що супроводжують хворобу під назвою "цукровий діабет".

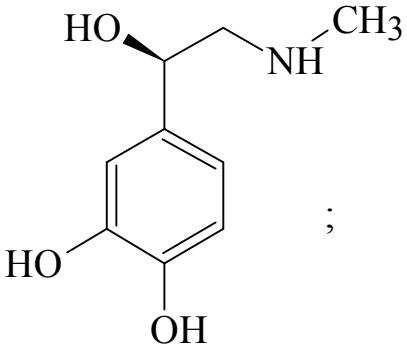
Глюкагон. За хімічною природою – поліпептид, що складається з 29 амінокислот. Цей гормон за своєю біологічною дією протилежний інсуліну. Глюкагон посилює розщеплення глікогену в печінці і тим самим сприяє поповненню глюкози в крові. Таким чином, разом з інсуліном він утворює єдину систему регуляції вмісту глюкози в організмі. Тому підвищений вміст глюкози в крові може бути наслідком незбалансованості цієї системи.

Ваготонін. Даний гормон одержано з екстрактів підшлункової залози нещодавно і ще недостатньо вивчено. Припускають, що ваготонін стимулює процеси кровотворення, затримує розщеплення глікогену до глюкози, викликаючи тим самим зменшення кількості цукру в крові. Передбачається також, що цей гормон має білкову природу.

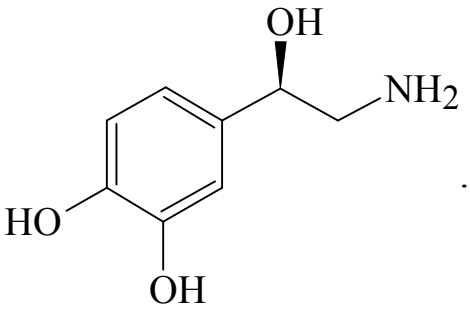
Гормони наднирників

Наднирники розташовані на верхньому полюсі нирок. У людини їх маса становить 15 – 20 г. Вони покриті ззовні сполучною капсулою. Наднирники складаються з кіркової та мозкової речовини. Наднирники є джерелом близько 40 стероїдних катехоламінових гормонів.

Адреналін та норадреналін синтезуються в клітинах мозкової речовини наднирників і симпатичних відділів нервової системи



;



.

Адреналін Норадреналін

Джерелом біосинтезу цих гормонів є амінокислота тирозин. Обидва гормони виконують функції медіаторів нервового збудження. Підвищене виділення гормонів в організмі викликає гіперглікемію і глюкозурію. На відміну від глюкагону, який прискорює розщеплення глікогену тільки в печінці, адреналін сприяє розщепленню його як у

печінці, так і в м'язовій тканині. Механізм дії адреналіну пов'язаний зі зміною активності фосфорилази – ферменту, що розщеплює глікоген до глюкозофосфату. Обидва гормони збільшують швидкість розщеплення білків у тканинах і виділення азотистих продуктів обміну із сечею. При введенні в організм адреналіну (навіть у дозах 0,0001 – 0,00001 г на 1 кг живої маси) підвищується кров'яний тиск, частішає і посилюється серцебиття, сповільнюється перистальтика кишок, підвищується температура тіла і збільшується споживання тканинами кисню. На відміну від адреналіну, норадреналін не збільшує частоти пульсу і не посилює споживання кисню тканинами. Захворювання наднирників іноді викликає гіперфункцію мозкової речовини, що супроводжується підвищеною продукцією гормонів. Вміст їх у крові збільшується, у результаті чого посилюються реакції обміну, з'являються гіпертонія (із тахікардією), глюкозурія, гіперглікемія, розвивається атеросклероз, нефрит, пригнічується діяльність кори надниркових залоз. У таких випадках може настати смерть.

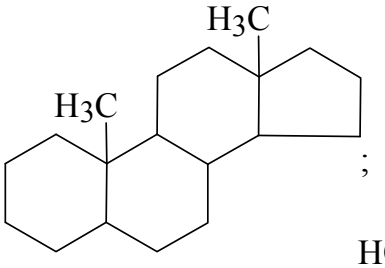
Альдостерон. Гормон, що належить до групи мінералокортикоїдів. Ці гормони регулюють мінеральний та водний обміни. Вони сприяють накопиченню Na^+ та виведенню K^+ з організму, і навпаки при недостачі гормону.

Гідрокортизон, кортизон та кортикостерон – гормони пучкової зони кори наднирників – глюкокортикоїди. Вони впливають на обмін речовин. Під їх дією збільшується швидкість розщеплення білка. Вони сприяють синтезу вуглеводів з білків та впливають на обмін жирів, сприяючи їх синтезу та виходу з жирових депо. Глюкокортикоїди являються імунодепресантами, тобто ведуть до зниження активності імунної системи. Тому їх використовують при пересадці донорських органів. Вони також беруть участь в реакціях на стресові фактори – це травми, операції, опіки, переохолодження, інфекції, отруєння, втома. В цих випадках вони забезпечують адаптаційний синдром, що пристосовує організм до даної незвичайної ситуації. Ця їх властивість використовується при термінальних станах.

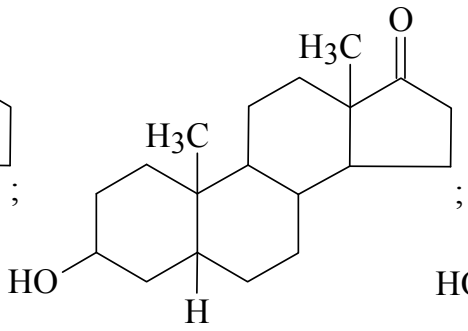
Гормони статевих залоз

Гормони чоловічих статевих залоз. Чоловічі статеві гормони, або андрогени, синтезуються в основному в сім'яниках, деяка частина – в яєчниках і корі надниркових залоз. Всі андрогени є похідними циклічного вуглеводню циклопентанпергідрофенантрену, точніше

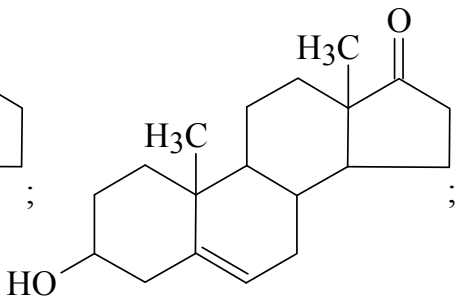
його метильованого похідного – андростану. З андростану утворюються чоловічі статеві гормони *андростерон, дегідроандростерон,* тестостерон і їх штучний аналог – метилтестостерон:



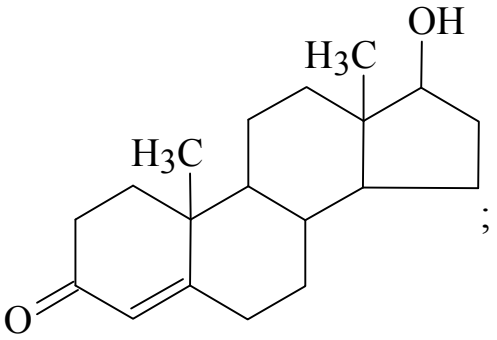
Андростан



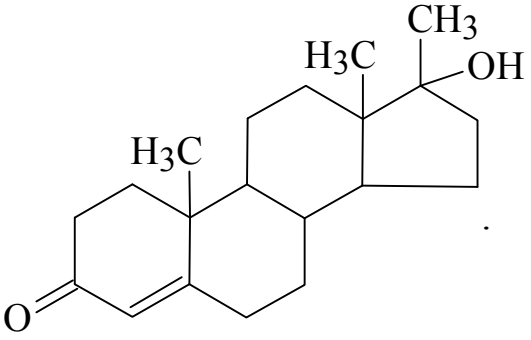
Андростерон



Дегідроандростерон



Тестостерон



Метилтестостерон

Біосинтез цих гормонів регулюється гормонами передньої долі гіпофізу – фолітропіном і лютропіном.

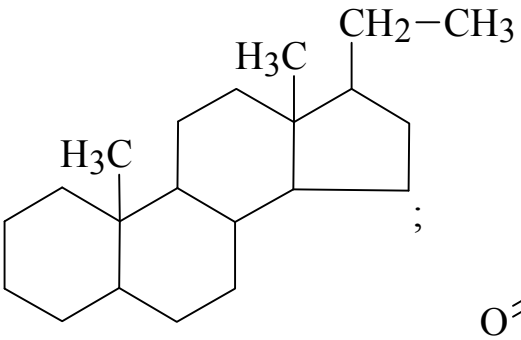
Діяльність чоловічих статевих гормонів спрямована на розвиток і прояв вторинних статевих ознак. Секреція їх відбувається безупинно. Будучи стероїдними гормонами, вони дуже легко проникають через мембрани клітин-мішеней і зв'язуються зі специфічними білками, створюючи гормон-білкові комплекси. Останні проникають в ядро, де впливають на біосинтез ДНК і РНК, і як наслідок – на клітинний синтез білку.

Андрогени регулюють різноманітні види обміну, стимулюють біосинтез білку в м'язовій тканині, сприяють накопиченню в організмі Нітрогену, Фосфору, Калію, Натрію, Хлору.

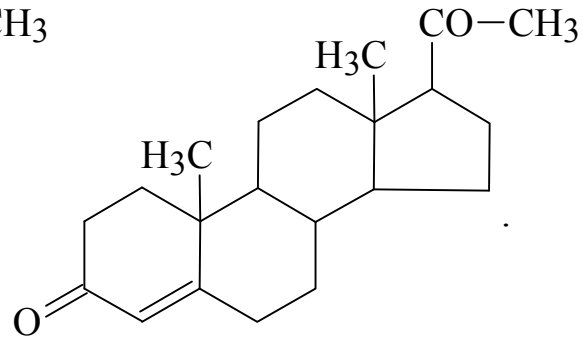
Якщо продукції андрогенів недостатньо, відбувається переорієнтування обміну речовин на відкладення надлишкової кількості жиру.

Гормони жіночих статевих залоз. Жіночі статеві гормони впливають на розвиток органів дітородіння і стимулюють їх нормальну функцію. Вони здійснюють також вплив на формування вторинних статевих ознак жіночого організму – характерна будова тіла, особливість голосу і волосяний покрив. Синтезуються жіночі статеві гормони в яєчниках, у корі надниркових залоз, а також у плаценті.

Всі жіночі статеві гормони можна поділити на п'ять груп: *естрогени, прогестерон, релаксин, андрогени і гормони плаценти*. Найбільш важливими з них є естрогени, прогестерон і гормони плаценти.

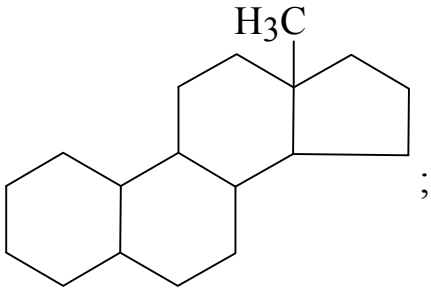


Прегнан

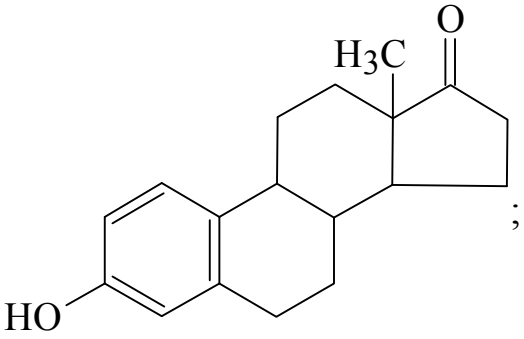


Прогестерон

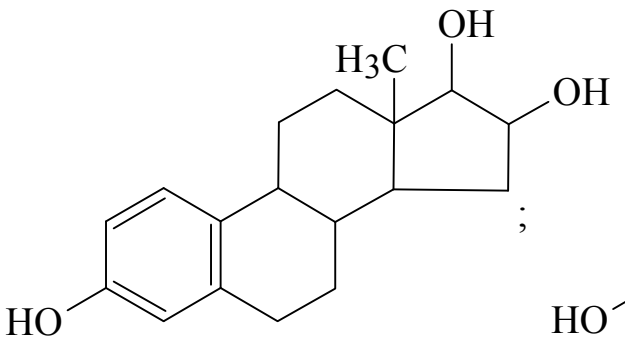
Естрогени і прогестерон, як і гормони чоловічих статевих залоз, є похідними циклопентанпергідрофенантрену. Естрогени синтезуються у фолікулах яєчника. В основі їх молекул міститься ядро естрану, тому вони називаються естроном, або фолікуліном, естріолом і естрадіолом:



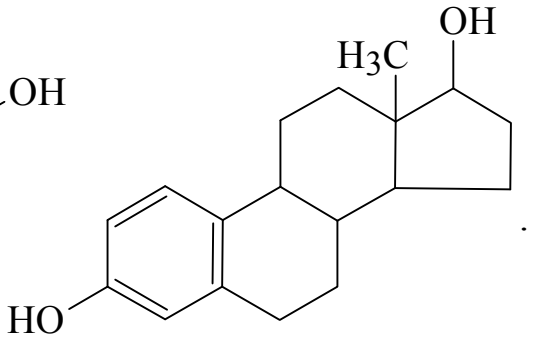
Естран



Естрон (фолікулін)



Естріол



Естрадіол

Утворення цих гормонів відбувається циклічно. Спочатку в яєчнику в клітинах фолікулів утворюються естрогени. Після овуляції, тобто після розриву фолікул і виходу яйцеклітини, утворюється жовте тіло, що виробляє прогестерон. За відсутності вагітності жовте тіло розсмоктується.

Під час вагітності в жіночому організмі розвивається новий орган, в якому продукуються гормони – плацента. У плаценті синтезується гормон хоріонгонадотропін. За своєю хімічною природою він є глікопротеїдом, і його біосинтез відбувається так само, як типовий синтез білку.

Між дією естрогенів і прогестерону існує тісний взаємозв'язок. Естрогени зумовлюють розвиток у жінок вторинних статевих ознак, створюють оптимальні умови для запліднення яйцеклітини, готують матку для імплантації заплідненої яйцеклітини. У період вагітності на місці фолікула, який лопнув, розвивається жовте тіло, що виробляє прогестерон. Цей гормон стимулює подальший розвиток маткових залоз і виділення ними секрету, який є поживною і захисною речовиною для яйцеклітини, що розвивається. Під час вагітності прогестерон сприяє розвитку молочних залоз, уповільнює синтез лютропіну і цим попереджує овуляцію нових фолікулів.

Крім репродуктивних функцій, статеві гормони стимулюють процеси тканинного дихання, регулюють фосфорно-кальцієвий і жировий обміни. Вони активують ряд ферментів циклу трикарбонових кислот. У чоловіків андрогени посилюють утворення білків у скелетних м'язах, зумовлюючи тим самим міцність і масу м’язової і кісткової систем. У жінок естрогени посилюють переважно процеси біосинтезу білків у матці.

За останні роки одержано ряд даних, які свідчать про те, що андрогени та естрогени активують біосинтез інформаційної, транспортної і рибосомної РНК і посилюють синтез білків.

Контрольні питання

1. Надайте загальну характеристику гормонів.
2. Запропонуйте класифікацію гормонів за хімічною будовою.
3. Перелічіть та охарактеризуйте гормони білкової природи. Вкажіть локалізацію їх синтезу та напрямок дії.
4. Надайте характеристику гормонів – похідних амінокислот.
5. Запропонуйте загальну характеристику простагландинів як похідних жирних кислот.
6. Назвіть стероїдні гормони, наведіть приклади процесів, що ними регулюються.
7. Запропонуйте класифікацію гормонів за характером дії.
8. Перелічіть гормони гіпофіза та наведіть їх біологічну роль.
9. Охарактеризуйте гормони, що виробляються підшлунковою залозою.
10. Назвіть гормони мозкової речовини надниркових залоз і зазначте їх біологічну роль.
11. Охарактеризуйте гормони щитоподібної залози, що регулюють процеси тканинного дихання.
12. Надайте характеристику гормонів кори надниркових залоз.

ОСНОВНІ ТЕРМІНИ ТА ПОНЯТТЯ

Авітаміноз(и) – порушення біохімічних і фізіологічних процесів унаслідок тривалої відсутності одного чи кількох вітамінів; приводить до захворювання чи загибелі організму.

Адаптація – тривала саморегуляція обміну речовин, пов'язана зі змінами хімічного складу і кількості ферментів у клітині.

Аденозинтрифосфатна кислота (АТР) – основна високоенергетична сполука; складається з аденіну, рибози і трьох залишків фосфатної кислоти.

Адреналін – гормон мозкової речовини надниркових залоз; посилює розпад глікогену і ліпідів у процесі інтенсивної роботи м'язів і печінки, збільшує силу серцевих скорочень, регулює тонус кровоносних судин, бере участь в адаптації організму до фізичних навантажень.

Азотисті основи – пуринові і піримідинові; входять до складу нуклеотидів і нуклеїнових кислот.

Активатори ферментів – специфічні хімічні сполуки, що знаходяться в реакційній системі; підвищують активність ферментів.

Активна реакція середовища – кисла, лужна чи нейтральна; залежить від співвідношення концентрації вільних водневих і гідроксильних іонів у біологічному середовищі. Визначається водневим показником (pH).

Активний центр ферменту – ділянка молекули ферменту, на якій відбувається зв'язування і перетворення речовини-субстрату.

Алкалоїди – органічні азотовмісні сполуки рослинного походження.

Альдостерон – гормон кори надниркових залоз із групи кортикостероїдів; регулює мінеральний обмін в організмі.

Амілази – ферменти третього класу, що каталізують різні реакції гідролізу; розщеплюють полісахариди їжі (крохмаль) і глікоген у процесі травлення.

Амінокислоти – органічні кислоти, важливі компоненти усіх живих організмів; містять аміногрупу ($–NH_2$). Основний структурний компонент білків.

Амінокислоти замінні – кислоти, які можуть синтезуватись в організмі людини: аланін, аспартат, аспарагін, глутамат, глутамін, серин, гліцин, пролін.

Амінокислоти незамінні – кислоти, що не синтезуються в тканинах організму: валін, гістидин, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін.

Андрогени – чоловічі статеві гормони.

Антикодон – ділянка молекули тРНК, що складається з трьох нуклеотидів, або триплет; є комплементарною кодону іРНК.

Апофермент – білкова частина складного ферменту, що обумовлює специфічність його дії.

Ацетил-КоА – активна форма ацетатної кислоти, інтегратор внутрішньоклітинного обміну вуглеводів, жирів і білків.

Ацетилхолін – складний ефір аміноспирту холіну і ацетатної кислоти; утворюється в нервових закінченнях і виділяється в невеликих кількостях при нервовому імпульсі.

Білки – високомолекулярні азотовмісні органічні сполуки, що складаються з амінокислот.

Білки глобулярні – білки зі сферичною або глобулярною структурою, поліпептидні ланцюги яких згорнуті в компактні утворення, що нагадують форму кулі (глобули).

Білки неповноцінні – білки рослинного походження, до складу яких не входять окремі амінокислоти.

Білки повноцінні – білки тваринного походження (риба, м'ясо, молочні продукти тощо), які містять усі незалежні амінокислоти.

Білки фібрилярні – білки, які мають ниткоподібну форму – фібрили (м'язовий білок міозин, білок сухожилля *колаген* та ін.).

Білковий мінімум – найменша кількість білків їжі, яка відновлює витрачені білки і забезпечує нормальне функціонування організму.

Біогенні елементи – хімічні елементи, що входять до складу клітин організмів і тканин та необхідні їм для життєдіяльності, а також для утворення біологічно активних речовин (ферментів, гормонів, вітамінів, білків), беруть участь у реакціях обміну.

Біологічна хімія – наука, що вивчає хімічну структуру, властивості молекул живих організмів і перетворення речовини в процесі життєдіяльності.

Біосинтез білка – процес утворення нових молекул білка; відбувається на рибосомах з участю нуклеїнових кислот. Основні етапи: *транскрипція* – синтез у ядрі інформаційної РНК на ДНК як матриці; *трансляція* – переведення інформації, закодованої у молекулі іРНК у послідовність амінокислотних залишків у молекулі білка (синтез білка на рибосомах).

Буферна система – розчин слабких кислот і їх солей, солей слабких основ і слабких кислот, білків, пов'язує надлишок іонів H^+ і гідроксилу OH^- та підтримує сталість pH середовища.

Вазопресин – гормон задньої частини гіпофізу. Регулює водно-сольовий обмін в організмі, антидіуретичний гормон.

Валентність – здатність атомів хімічних елементів до утворення хімічних зв'язків з атомами інших елементів. Залежить від будови зовнішніх електронних оболонок атома.

Валін – α-аміноізовалеріанова кислота, незамінна амінокислота. Входить до складу всіх білків, бере участь у біосинтезі пантотенової кислоти.

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, не синтезуються в організмі людини, надходять в організм з їжею в дуже малих кількостях.

Вода вільна – вода, яка входить до складу біологічних рідин (крові, лімфи, травних соків, спинномозкової рідини).

Вода гідратаційна – вода, зв'язана з іонами або молекулами речовин, бере участь у створенні гідратних оболонок.

Вода екзогенна – вода, що надходить в організм з їжею.

Вода ендогенна – вода, що утворюється в тканинах як кінцевий продукт при окисненні органічних речовин.

Вода іммобільна – вода, що міститься між молекулами внутрішньоклітинних білків, мембранами, волокнистими структурами, не входить до складу гідратних оболонок.

Вуглеводи ($C_nH_{2n}O_n$) – органічні сполуки, що складаються з атомів С, Н і О. В організмі виконують енергетичну роль, забезпечуючи більше 50 % потреби в енергії. Основні представники – глюкоза, фруктоза, рибоза, дезоксирибоза, глікоген.

Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) – важливий нейромедіатор, утворюється в тканинах головного мозку при декарбоксилюванні глутамінової кислоти, є чинником гальмування діяльності ЦНС, використовується як лікарський препарат.

Гем – небілкова частина гемоглобіну, міоглобіну та інших білків, яка надає їм червоного кольору; комплекс двовалентного заліза з плоскою молекулою протопорфірину. У живих організмах входить до складу складних білків – гемопротеїдів.

Гемоглобін (Hb) – червоний залізовмісний білок еритроцитів крові, який складається з небілкової частини – гема і білкової частини – глобіна; забезпечує перенесення (доставку) O_2 з легенів у тканини і CO_2 – від тканин до легенів, а також буферну дію. Киснева ємність крові залежить від вмісту гемоглобіну.

Гідролаза(и) – травні ферменти третього класу, які каталізують різні реакції гідролізу, тобто розщеплення органічних сполук із приєднанням у місці розриву елементів молекул води (H^+ і OH^-).

Гідроліз – реакція розпаду органічних речовин до більш простих за участі води.

Гіпервітаміноз – стан організму, викликаний надмірним вмістом вітамінів у тканинах, переважно жиророзчинних.

Гіперглікемія – підвищений вміст глюкози у крові.

Гіповітаміноз – порушення обміну речовин в організмі, пов'язане з недостатнім вмістом у ньому вітамінів.

Гіпоглікемія – понижений вміст глюкози в крові.

Гіпокапнія – зменшення кількості CO_2 у крові в гірських умовах, яке обумовлює різке зниження активності реакцій карбоксилювання в організмі, а відсутність достатньої кількості CO_2, як подразника дихального центру, обмежує легеневу вентиляцію.

Глікоген – основний полісахарид організму, який відкладається в печінці і скелетних м'язах; основний енергетичний резерв вуглеводів.

Гліцерин – триатомний спирт, один з продуктів гідролізу жиру.

Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) – основний моносахарид організму; структурний компонент складних вуглеводів, який використовується як енергетичний субстрат.

Глюкозамін – аміноцукор, похідний глюкози; у вільному вигляді не зустрічається.

Гомеостаз – відносна постійність складу внутрішнього середовища організму, біохімічних показників метаболізму (крові, температури тощо).

Гормони – біологічно активні органічні речовини, що виробляються залозами внутрішньої секреції і регулюють обмін речовин та функції організму.

Гормони гонадотропні – стимулятори функцій чоловічих і жіночих статевих залоз.

Дегідрогенази – ферменти, які каталізують реакції біологічного окислення поживних речовин, тобто передають водень від однієї речовини на іншу, крім кисню і пероксиду водню.

Дегідрогенізація – реакція відщеплення водню від молекул органічних сполук.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) – тип нуклеїнової кислоти, яка зберігає і передає спадкову інформацію організму.

Декарбоксилювання – реакція відщеплення карбоксильної групи органічних кислот, що приводить до утворення нових речовин у тканинах організму і виділення CO_2.

Декстрини – продукти неповного гідролізу крохмалю з утворенням проміжних, більш простих полісахаридів.

Денатурація – внутрішня зміна в структурі білка, пов'язана з втратою його біологічної активності під впливом певних чинників.

Дисахариди – вуглеводи, що складаються з двох молекул моносахаридів. Основні представники – сахароза, лактоза, мальтоза.

Дисоціація – розпад молекул на іони чи іонізація атомних груп в органічних речовинах.

Естрогени – жіночі статеві гормони, стероїди. Синтезуються в яєчниках, плаценті, у невеликій кількості – у сім'яниках і корі надниркових залоз. Регулюють ферменти аеробного окиснення у циклі Кребса, стимулюють окиснення жирних кислот.

Жир структурний – входить до складу протоплазми і структурних утворень клітин. Не використовується для енергетичних потреб.

Жири нейтральні (тригліцериди) – нерозчинні у воді ліпіди, похідні гліцерину, залишок якого зв'язаний з трьома залишками вищих жирних кислот. Депонуються в жировій тканині організму і являють резервний жир, який використовується як енергетичний субстрат.

Ізомерази – ферменти, каталізують реакції внутрішньомолекулярного утворення ізомерів.

Ізомерія – існування хімічних сполук вуглецю, молекули яких мають однаковий якісний і кількісний склад, але різні властивості.

Інвертний сахар – суміш рівних кількостей глюкози і фруктози в процесі розщеплення сахарози на глюкозу і фруктозу, пов'язана з відхиленням площини поляризації світла.

Інгібування ферментів – процес уповільнення активності ферменту під впливом речовин-інгібіторів. Часто це метаболіти чи субстрати реакцій.

Інсулін – гормон, утворюється з проінсуліну, який синтезується β-клітинами підшлункової залози, регулює вуглеводний обмін; стимулює проникнення глюкози в тканини, що приводить до зниження концентрації її в крові, а також обмін жирів і білків. При недостатньому синтезі інсуліну розвивається захворювання “цукровий діабет”.

Інтерферон – специфічний білок, синтезується в лейкоцитах крові і виконує захисну функцію. Використовується для профілактики і лікування гострих респіраторних захворювань.

Карбоксильна група – функціональна група (–COOH) органічних карбонових кислот.

Каталаза – фермент, каталізує реакцію розщеплення пероксиду водню (H_2O_2) у тканинах організму, захищає живі організми від H_2O_2 і знешкоджує його в тканинах: $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$.

Каталізатори – речовини, що змінюють швидкість хімічної реакції, але самі при цьому залишаються без змін. Біологічні каталізатори називаються ферментами.

Катехоламіни – біологічно активні гормони, похідні діоксибензолу – катехолу; гормони адреналін і норадреналін.

Кетози – моносахариди, що містять у своїй молекулі кетонову групу; фруктоза, сорбоза ті ін.

Кетони – органічні сполуки, що мають карбоксильну групу, пов'язану з двома вуглеводневими радикалами; використовуються як розчинники (наприклад, ацетон), як напівпродукти для синтезу органічних речовин.

Клітковина (целюлоза) – полісахарид рослин, який не засвоюється організмом людини, оскільки немає ферментів для його гідролізу в системі травлення; регулює механічну функцію травної системи.

Колаген – білок сполучної тканини, який утворює дуже міцні колагенові волокна.

Комплементарність – взаємне доповнення азотистих пуринових і піримідинових основ різних ланцюгів ДНК.

Кортикостероїди – регулятори процесів розщеплення і біосинтезу вуглеводів і білків в організмі.

Кофермент, або коензим А (КоА) – кофермент багатьох ферментів, які каталізують реакції приєднання ацетильних груп до інших молекул. До його складу входить вітамін B_3.

Коферменти (кофактори) – небілкова частина складного ферменту, яка може дисоціювати з ферментативного комплексу; відіграють

важливу роль у каталітичній функції ферментів. До їх складу можуть входити вітаміни, нуклеотиди, амінокислоти.

Креатинфосфат – макроергічна сполука, яка використовується для швидкого відновлення (ресинтезу) АТР у м'язах та інших тканинах організму.

Лактат (молочна кислота) – кінцевий продукт анаеробного окиснення вуглеводів – гліколізу.

Лактоза – дисахарид, при гідролізі утворюється глюкоза і галактоза; міститься в молоці (молочний цукор).

Ліпіди – органічні сполуки, не розчинні у воді, але розчинні в органічних розчинниках (ефір, бензол, спирти тощо); поруч з білками складають основну масу органічної речовини клітин і тканин рослин і тварин, структурні компоненти мембран.

Ліпопротеїди – складні білки, біологічно активні речовини для транспортування жирів у тканинах і клітинах, а також вітамінів A, D, E, K і F.

Макроергічні сполуки – речовини, що містять у складі своїх молекул багаті на енергію зв'язки (АТР та інші фосфоровмісні сполуки).

Мальтоза – дисахарид, який у результаті гідролізу утворює дві молекули глюкози. В організмі утворюється при гідролізі крохмалю в системі травлення.

Міоглобін – залізовмісний білок м'язів, за хімічною будовою і функціями близький до гемоглобіну крові. Зв'язує, як і гемоглобін, кисень і транспортує його у м'язах до місця використання.

Міозин – міофібрилярний скорочувальний білок м'язів. Кількість його у м'язах впливає на швидкісно-силові якості людини.

Моносахариди ($C_nH_{2n}O_n$) – підклас вуглеводів, які не вступають у реакцію гідролізу (глюкоза, фруктоза, рибоза, дезоксирибоза, галактоза); можуть містити від 3 до 9 атомів Карбону. Виконують енергетичну та інші функції в організмі.

НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) – кофермент ферментів біологічного окиснення, переносник атомів водню. До його складу входить вітамін РР (нікотинамід), який використовується як донор водню в процесах біосинтезу речовин.

Нікотинова кислота (вітамін РР або B_6) – входить до складу кофакторів дегідрогеназ НАД і НАДФ, які беруть участь у регуляції процесів біологічного окиснення і біосинтезу речовин.

Нуклеїнові кислоти – біополімери, які відіграють важливу роль у життєдіяльності організмів, забезпечують зберігання і передачу генетичної інформації (див. ДНК і РНК).

Нуклеотиди – сполуки нуклеозиду із залишком фосфатної кислоти; входять до складу нуклеїнових кислот і деяких коферментів.

Обмін речовин – див. *Метаболізм*.

Оксидоредуктаза(*и*) – ферменти, що каталізують окиснювально-відновні реакції.

Окситоцин – гормон задньої долі гіпофізу, за хімічною природою відноситься до пептидів; стимулює скорочення м'язів матки, активізує процес утворення молока.

Оротова кислота – вітамін B_{13}, похідне піримідинових основ; стимулює анаболічні процеси в організмі. У вигляді солі (оротату калію) використовується при хворобах печінки і серця, анеміях.

Осмос – одностороння дифузія розчинника через напівпроникну мембрану вбік розчину з більшою концентрацією розчинених речовин. Спрямована на вирівнювання концентрацій у розчинах, тобто установлення осмотичної рівноваги (ізотонічність). Відіграє важливу роль у житті клітин.

Пальмітинова кислота ($C_{15}H_8COOH$) – найбільш поширена у природі насичена жирна кислота. Міститься майже в усіх природних жирах.

Пангамова кислота (вітамін B_{15}) – ліпотропний чинник; активізує окислювальні процеси, впливає на синтез АТР і креатинфосфату; підвищує швидкісні здібності спортсменів.

Пантотенова кислота (вітамін B_3) – входить до складу коферменту А, тому регулює метаболічні процеси в організмі.

Пентози – моносахариди, які містять п'ять атомів Карбону; основні – рибоза, дезоксирибоза.

Пептиди – продукти неповного розщеплення природних білків у процесі травлення; утворюються в клітинах організму, біологічно активні речовини.

Піридоксин – бере участь у синтезі амінокислот, обміні білків, процесах тканинного дихання; використовується для посилення білкового синтезу.

Піровиноградна кислота (*піруват*) – проміжний продукт внутрішньоклітинного окислення вуглеводів в аеробних і анаеробних умовах.

Полівітаміноз – порушення обміну речовин в організмі, виникає внаслідок відсутності в ньому кількох вітамінів.

Полісахариди – високомолекулярні складні вуглеводи; утворюються з невеликої кількості моносахаридів; в організмі відіграють енергетичну роль; депонуються в печінці та скелетних м'язах у вигляді глікогену, у продуктах харчування – у вигляді крохмалю.

Простагландини – група "тканинних гормонів", які утворюються з поліненасичених жирних кислот. Використовуються у медицині для розширення судин і зниження кров'яного тиску.

Протеїди – складні білки, молекули яких складаються з білкової і небілкової (простетичної) частини.

Протеїни – прості білки, що складаються лише з амінокислот.

Пуринові основи – див. *Азотисті основи*.

Реплікація – передавання генетичної інформації від покоління до покоління шляхом самовідтворення точних копій ДНК батьків.

Ресинтез АТР – швидке відновлення (утворення, синтез) АТР із АДФ, забезпечення енергією організму за рахунок реакції біологічного окиснення.

Ретинол (вітамін А) – жиророзчинний вітамін, похідне каротиноїдів. Міститься лише в тканинах тварин. Бере участь у регуляції процесів росту, зору; впливає на засвоєння і обмін білків та інших речовин.

Рибоза – пентоза, досить поширена у тваринному та рослинному світі.

Рибонуклеїнова кислота (РНК) – вид нуклеїнових кислот, до складу яких входить вуглевод рибоза; синтезується на основі певного гена ДНК, переносить інформацію про структуру білка до рибосом і є матрицею при синтезі білка. Розрізняють іРНК, рРНК, мРНК.

Рибосоми – внутрішньоклітинні органели, розміщені у цитоплазмі, на яких при участі РНК здійснюється біосинтез білка.

Рибофлавін (вітамін B_2) – регулює процеси окиснення органічних речовин у клітинах організму, входить до складу ферментів біологічного окиснення.

Сахароза – дисахарид, що складається з залишків глюкози і фруктози. У великій кількості міститься у стеблах, коренях, бульбах і плодах рослин, особливо в буряку і цукровій тростині.

Стероїди – клас ліпідів. У клітинах представлені стеринами. Стерини – циклічні спирти, представник – холестерин, який є попередником синтезу жовчних кислот, стероїдних гормонів, вітамінів групи D.

Тестостерон – основний представник чоловічих статевих гормонів (андрогенів). Впливає на розвиток вторинних статевих ознак, посилює біосинтез білка в м'язах (анаболічна дія).

Тироксин – гормон щитоподібної залози. Містить атоми Йоду, регулює основний обмін.

Тіамін – входить до складу коферментів декарбоксилаз та ін.; регулює обмін вуглеводів, окиснювально-відновні процеси.

Токофероли – група вітамінів Е, жиророзчинні, сильний антиоксидант. Регулюють біосинтез білка у м'язах і дітородну функцію, посилюють тканинне дихання, виявляють анаболічну дію.

Транскрипція – біосинтез РНК. Полягає в перенесенні генетичної інформації від молекули ДНК до молекули іРНК при її синтезі в ядрі клітин.

Трансляція – синтез білка на рибосомах за участю нуклеїнових кислот.

Тріози – найпростіші моносахариди – гліцериновий альдегід і діоксиацетон.

Триплет (кодон) – певне розташування трьох нуклеотидів у молекулах ДНК та іРНК, що кодують одну амінокислоту в поліпептидному ланцюгу білка.

Ферменти, або ензими – біологічно активні білки, синтезуються в організмі і виконують роль біологічних каталізаторів.

Флавінаденіндинуклеотид (ФАД) – небілкова частина флавін-залежних дегідрогеназ, міцно пов'язана з білковою частиною ферменту. Бере участь в окиснювально-відновних реакціях, містить вітамін B_2.

Фосфоліпіди (фосфатиди) – підклас ліпідів, молекули яких складаються з гліцерину, жирних кислот, фосфатної кислоти, нітрогенвмісних речовин. Є важливим компонентом клітинних мембран.

Фосфопротеїди – складні білки, у молекулах яких білок зв'язаний з фосфатною кислотою (казеїн, пепсин, овальбумін та ін.).

Фосфорилювання – приєднання залишку фосфатної кислоти до органічних чи неорганічних речовин.

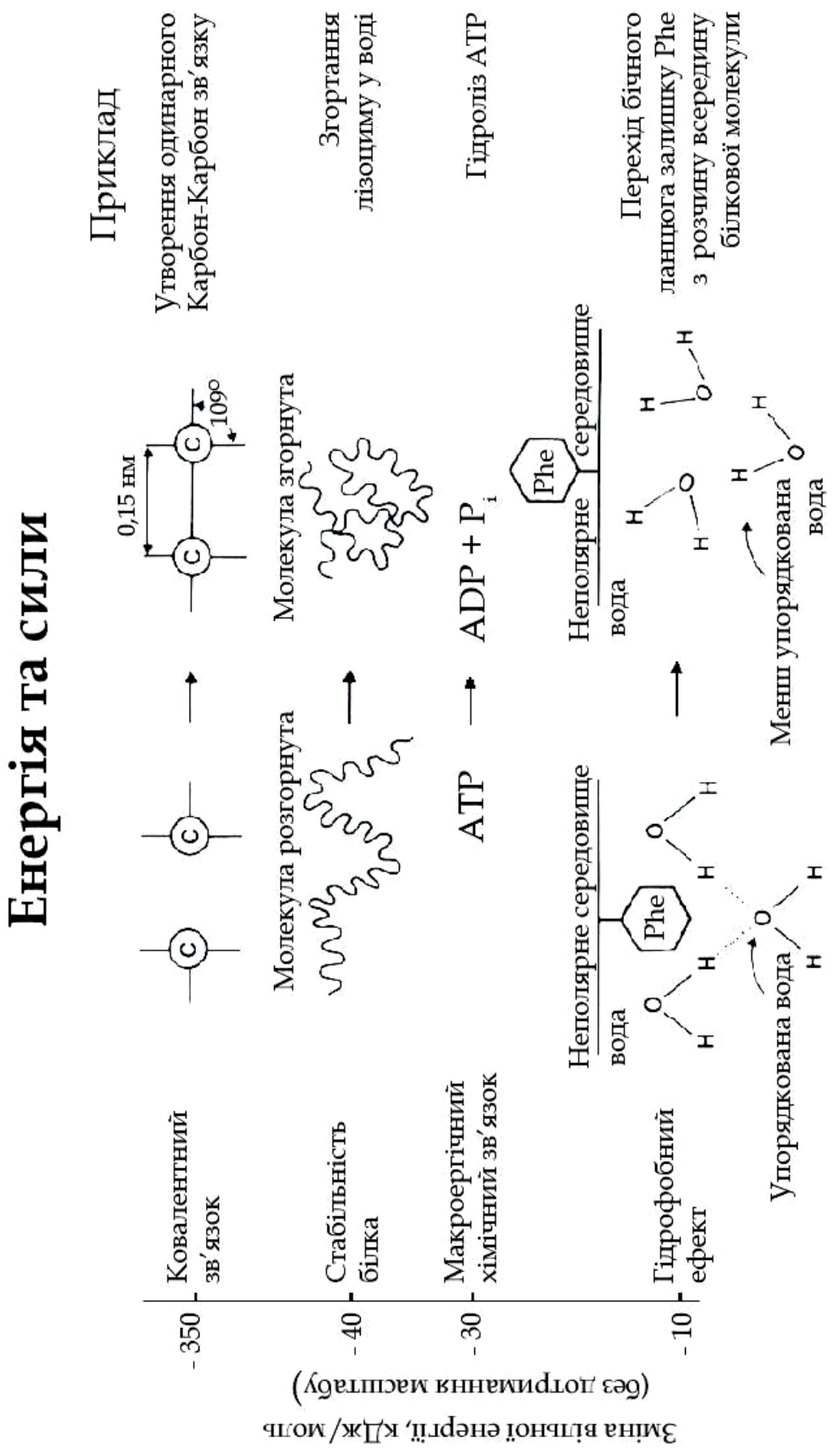
Фотосинтез – біосинтез вуглеводів у зелених рослинах під дією сонячної енергії.

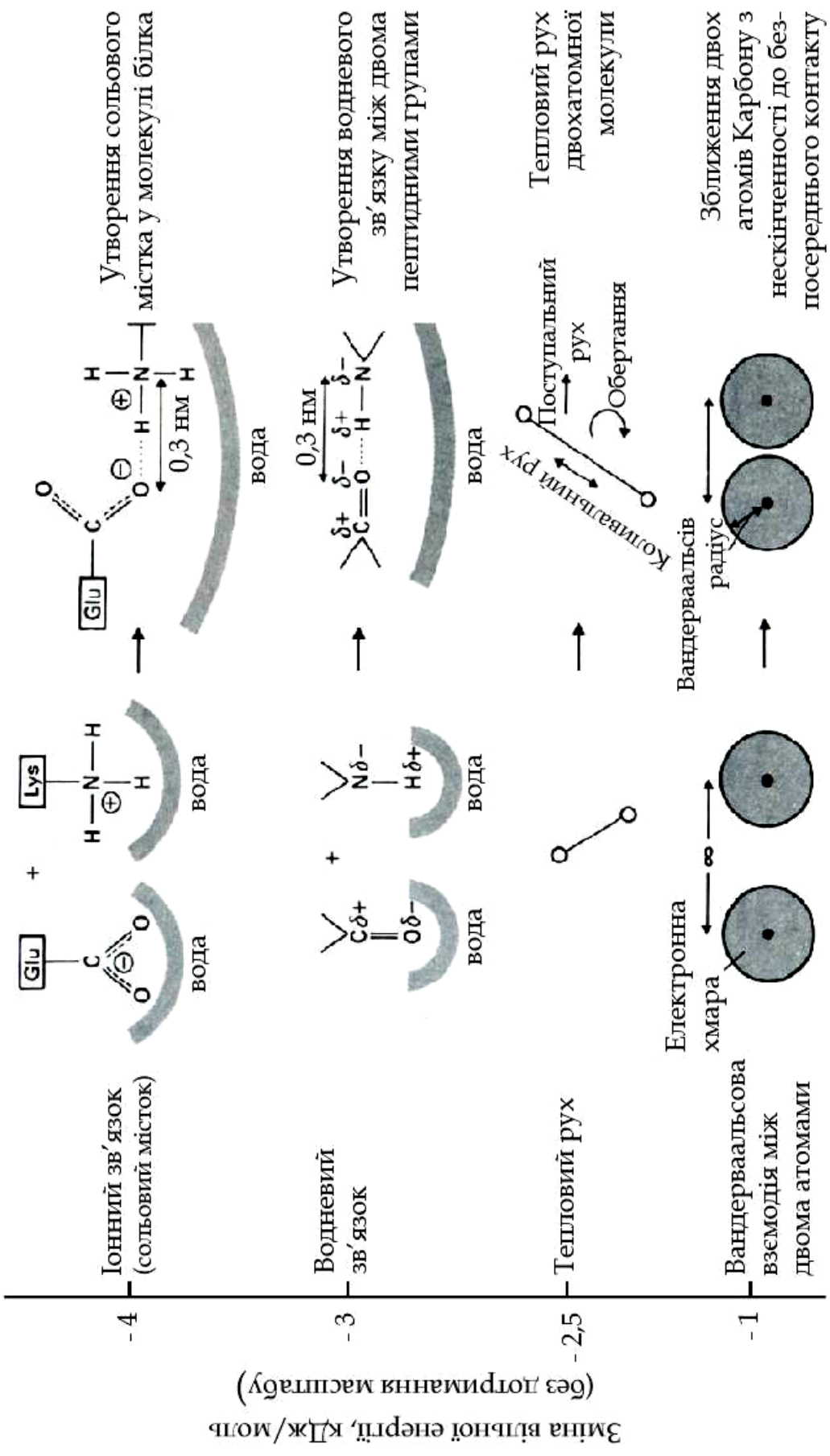
Холестерин – високомолекулярний циклічний одноатомний спирт, синтезується в усіх органах і тканинах.

ДОДАТКИ

Значення pK іонізованих груп деяких амінокислот (25° C)

Амінокислота	*pK_1 –COOH*	*pK_2 α–NH_3^+*	*pK_3 R-група*
Аланін	2,34	9,69	
Аргінін	2,17	9,04	12,48 (гуанідин)
Аспарагін	2,02	8,80	
Аспарагінова кислота	2,09	9,82	3,86 (COOH)
Валін	2,32	9,62	
Гістидин	1,82	9,17	6,0 (імідазол)
Гліцин	2,34	9,60	
Глутамін	2,17	9,13	
Глутамінова кислота	2,19	9,67	4,25 (COOH)
Ізолейцин	2,36	9,68	
Лейцин	2,36	9,60	
Лізин	2,18	8,95	10,53 (NH_3^+)
Метіонін	2,28	9,21	
Оксипролін	1,92	9,73	
Пролін	1,99	10,96	
Серин	2,21	9,15	
Тирозин	2,20	9,11	10,07 (OH)
Треонін	2,71	9,62	
Триптофан	2,38	9,39	
Фенілаланін	1,83	9,13	
Цистеїн	1,71	8,33	10,78 (SH)


Енергія та сили
Приклад
Утворення одинарного Карбон-Карбон зв'язку
0,15 нм
109°
Згортання лізоциму у воді
Молекула згорнута
Молекула розгорнута
Гідроліз АТР
ATP
ADP + P i
Перехід бічного ланцюга залишку Phe з розчину всередину білкової молекули
Неполярне середовище
вода
Phe
Менш упорядкована вода
Упорядкована вода
Ковалентний зв'язок
Стабільність білка
Макроергічний хімічний зв'язок
Гідрофобний ефект
- 350
- 40
- 30
- 10
Зміна вільної енергії, кДж/ моль
(без дотримання масштабу)


Зміна вільної енергії, кДж/моль
(без дотримання масштабу)
- 4
- 3
- 2,5
- 1
Іонний зв'язок (сольовий місток)
Водневий зв'язок
Тепловий рух
Вандерваальсова взаємодія між двома атомами
Glu
Lys
вода
0,3 нм
Утворення сольового містка у молекулі білка
Утворення водневого зв'язку між двома пептидними групами
Тепловий рух двохатомної молекули
Поступальний рух
Обертання
Коливальний рух
Вандерваальсів радіус
Електронна хмара
Зближення двох атомів Карбону з нескінченності до безпосереднього контакту

ЛІТЕРАТУРА

1. Асатиани В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М. : Наука, 1969. – 740 с.
2. Біологічна хімія : Лабораторний практикум / [за заг. ред. проф. Я. І. Гонського]. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2001. – 288 с.
3. Біохімія : Підручник / [М. Є. Кучеренко та ін.]. – К. : Либідь, 1995. – 464 с.
4. Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія : Навчальний посібник / Ф. Ф. Боєчко. – К. : Вища школа, 1995. – 536 с.
5. Коничев А. С. Основные термины молекулярной биологии / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М. : КолосС, 2006. – 188 с.
6. Кучеренко М. Е. Биохимия : Практикум / М. Е. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, А. Н. Васильев. – К. : Вища школа, 1988. – 128 с.
7. Кучеренко М. Е. Биохимия : Підручник / М. Е. Кучеренко, Р. П. Виноградова, Ю. Д. Бабенюк та ін. – К. : Либідь, 1995. – 464 с.
8. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1985. – Т. 1 – 3. – 1056 с.
9. Столяр О. Б. Збірник задач і вправ з біохімії. Навчальний посібник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів / О. Б. Столяр. – Тернопіль, 1999. – 99 с.
10. Филиппович Ю. Б. Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова. – М. : Просвещение, 1982. – 318 с.
11. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. – М. : Высшая школа, 1986. – 623 с.
12. Шевряков М. В. Практикум з біологічної хімії / М. В. Шевряков, Б. В. Яковенко, О. Ф. Явоненко. – Суми : ВТД “Університетська книга”, 2003. – 204 с.

НАВЧАЛЬНЕ ВИДАННЯ

МЕХЕД Ольга Борисівна

ЯКОВЕНКО Борис Володимирович

ТРЕТЯК Олександр Петрович

БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ

Навчальний посібник
для студентів хімічних та біологічних спеціальностей
вищих педагогічних навчальних закладів

Технічний редактор *О. Клімова*

Комп'ютерна верстка
та макетування *О. Клімова*

207

Свідоцтво про державну реєстрацію
друкованого засобу масової інформації
серія КВ № 17500-6250 ПР від 16.11.2010 р.

Підписано до друку 17.04.2013 р.
Формат 60х84 1/16. Друк на різографі.
Обл. друк. арк. 7,5. Ум. друк. арк. 11,39.
Наклад 300 прим. Зам. № 649.

Редакційно-видавничий відділ ЧНПУ імені Т.Г. Шевченка,
14013, м. Чернігів, вул. Гетьмана Полуботка, 53,
тел. 65-17-99