

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
«ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

Кафедра хімії та біології

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**  
**ДО ПРОВЕДЕННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ**  
з дисципліни « Біохімія з основами фізичної  
та колоїдної хімії »

для здобувачів другий (магістерський)

спеціальність 212 «Ветеринарна гігієна; санітарія і експертиза»

освітньо-професійна програма «Ветеринарна гігієна; санітарія і експертиза»

факультет біолого-технологічний

Змістовна частина 2

БІЛКИ, АМІНОКИСЛОТИ, ЛІПІДИ, ВУГЛЕВОДИ

Херсон- 2020

УДК

Методичні рекомендації до проведення лабораторно-практичних занять з дисципліни «Біохімія з основами фізичної та колоїдної хімії» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти другого року навчання денної форми. Спеціальність 212 «Ветеринарна гігієна; санітарія і експертиза». Факультет біолого-технологічний. Частина 2 «Білки, Амінокислоти, Ліпіди, Вуглеводи».

**Підготували:** доцент Вогнівенко Л.П.

**Рецензент:** доцент Ряполова І.О.

Розглянуто і рекомендовано до видання на засіданні кафедри хімії та біології

Протокол від 21.05.2020 року № 12

Методичні рекомендації затверджено до видання на засіданні методичної комісії біолого-технологічного факультету

Протокол від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ року № \_\_\_\_\_

Вогнівенко Л.П. Методичні рекомендації до проведення лабораторно-практичних занять з дисципліни «Біохімія з основами фізичної та колоїдної хімії» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти другого року навчання денної форми. Спеціальність 212 «Ветеринарна гігієна; санітарія і експертиза». Факультет біолого-технологічний. Частина 1 «Фізична хімія». – Херсон: НМВ ДВНЗ «ХДАУ», 2019.– 22 с.

*У методичних рекомендаціях викладено план вивчення теоретичної частини дисципліни, методики виконання лабораторних та практичних занять за II частиною.*

УДК

© Вогнівенко Л.П., 2020

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
Загальні рекомендації щодо виконання лабораторних робіт.	4
Основні вимоги і правила техніки безпеки у біохімічній лабораторії	5
Тема 1. Амінокислоти. Теоретичний огляд	7
Лабораторна робота 1. Кольорові реакції на амінокислоти	8
Питання для самоперевірки	10
Тема 2. Білки. Теоретичний огляд	11
Лабораторна робота 2. Фізико – хімічні властивості білків	15
Питання для самоперевірки	19
Лабораторна робота 3. Кольорові реакції на білки	19
Питання для самоперевірки	21
Тема 3. Нуклеїнові кислоти. Теоретичний огляд	22
Лабораторна робота 4. Визначення нуклеїнових кислот	23
Питання для самоперевірки	24
Контрольні питання для підготовки до II змістовної частини	25
Список рекомендованої літератури	26

## ВСТУП

Дані методичні вказівки рекомендовано для студентів 2 курсу факультету рибного господарства та природокористування з метою надання студентам можливості самостійно готуватися до проведення лабораторних робіт з даної дисципліни. У даних методичних вказівках наведено правила техніки безпеки під час проведення окремих робіт, наведено короткий теоретичний огляд тем, хід виконання дослідів. Результати проведених дослідів студенти записують у робочий зошит за схемою: тема, мета, послідовність проведення досліду, хімізм реакцій, висновки. У кінці методичних вказівок наведено контрольні запитання першого модуля

Методичні вказівки підготовлені з урахуванням структурно-логічного зв'язку дисципліни з неорганічною, органічною, аналітичною хімією, фізіологією, годівлею, генетикою, розведенням, гігієною риб та ін.

### **Загальні рекомендації щодо виконання лабораторних робіт.**

Для успішної роботи в хімічній лабораторії необхідно чітко дотримуватись таких правил та рекомендацій:

1. точно виконувати усі розпорядження викладача та вказівки методичних розробок.
2. робоче місце тримати у зразковій чистоті.
3. обережно, згідно інструкції, користуватися приладами, хімічним посудом та обладнанням.
4. виконувати тільки ті досліди, які є у програмі лабораторного заняття.
5. чітко дотримуватись правил техніки безпеки.

До кожної лабораторної роботи студенти повинні:

- підготувати теоретичний матеріал із теми заняття, користуючись рекомендованою літературою та конспектом лекцій;
- уяснити мету лабораторної роботи, техніку виконання дослідів;

На початку заняття викладач перевіряє теоретичну та методичну підготовку студентів. Якщо підготовка незадовільна – студенти не допускаються до виконання лабораторних робіт.

Студенти одержують допуск до екзамену після успішного виконання повної програми лабораторно-практичних занять.

### **Основні вимоги і правила техніки безпеки у біохімічній лабораторії**

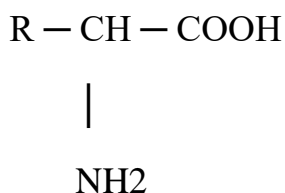
1. Перед проведенням лабораторної роботи студенти зобов'язані теоретично підготуватися до відповідної теми, використовуючи рекомендовану літературу, ретельно, якщо необхідно – за допомогою викладачів, продумати хід досліджень, з'ясувати можливу небезпеку під час їх проведення і вжити відповідних заходів щодо її запобігання.
2. Працювати самому у лабораторії студенту забороняється. Він може починати роботу тільки у присутності викладача або лаборанта.
3. У лабораторії забороняється їсти, пити, палити. Треба працювати у чистих халатах. Після виконання роботи слід обов'язково помити руки.
4. У лабораторії слід дотримуватися порядку розміщення обладнання, апаратури та реактивів. Забороняється виносити реактиви з приміщення, переносити їх з-під витяжної шафи, або титрувального столика.
5. Під час роботи у лабораторії слід дотримувати тиші, чистоти, порядку розміщення обладнання і реактивів на робочому місці.
6. Усі досліди з отруйними речовинами, або сполуками, що мають неприємний запах, слід проводити у витяжній шафі.
7. Будьте обережними під час кип'ятіння розчинів! Під час нагрівання пробірок із розчинами відкриту частину пробірки слід спрямовувати від себе та від людей, що знаходяться поруч. Пробірку треба тримати спеціальним тримачем.
8. Під час перемішування рідини пробірку не слід закривати пальцем.
9. Під час роботи з концентрованими кислотами їх слід вливати у воду малими порціями.

10. Під час роботи з концентрованими розчинами кислот і лугів необхідно користуватися захисними окулярами та гумовими рукавичками.
11. Категорично забороняється всмоктувати у піпетки розчини кислот, лугів й отруйних речовин. Для цього необхідно користуватися гумовими грушами. Не слід виливати надлишок реактивів із пробірок, колб, хімічних стаканів та іншої посуду знову у той самий посуд із реактивами, оскільки останні можна забруднити й зіпсувати.
12. Не пробуйте реактиви на смак, не втягуйте піпеткою до рота невідому сполуку, оскільки вона може бути отруйною. Гази, що виділяються, потрібно вивчати здалеку, злегка спрямовуючи потік повітря від приладу до себе. Не вдихайте глибоко виділені газу або пару.
13. Реактиви необхідно зберігати у закритому посуді з етикеткою, де зазначена назва, формула і концентрація речовини.
14. Забороняється виливати у раковини вмивальників залишки розчинів, що містять сильні кислоти. Їх слід зливати у спеціальні ємкості, які знаходяться у витяжній шафі або поряд із раковиною вмивальника.
15. Працювати з речовинами, що подразнюють органи дихання або мають сильний запах слід під витяжною шафою.
16. Сипкі реактиви треба набирати спеціальними ложечками або шпателем.
17. Під час роботи у лабораторії категорично забороняється залишати без нагляду установки, що працюють, а також електричні нагрівальні прилади.
18. Не викидайте у раковини вмивальників використані фільтри, папір, вату, розбиті пробірки та уламки скла.
19. У разі виникнення пожежі необхідно: негайно відключити газову магістраль, вимкнути рубильники електромережі, прибрати у безпечне місце горючі речовини, вогнегасником загасити полум'я або засипати піском чи накрити азбестовим покривалом.
20. Виходячи з лабораторії, обов'язково слід вимкнути газ, електронагрівальні прилади, закрити водопровідний кран і витяжну шафу.

# ТЕМА 1. АМІНОКИСЛОТИ

## Теоретичний огляд

Амінокислоти є карбоновими кислотами, які мають амінну і карбоксильну групи, що знаходяться у того ж самого вуглецевого атома. В організмі людини знайдено біля 70 амінокислот, 20 із них входять до складу білків. Ці амінокислоти називаються протеїногенними. Крім них є ще так називані “мінорні” амінокислоти, що є компонентами лише деяких білків. Амінокислоти, крім карбоксильної та амінної груп, мають бічні радикали, причому саме ці хімічні групи визначають більшість властивостей тієї чи іншої амінокислоти. У загальному вигляді формула амінокислоти може бути представлена таким чином:



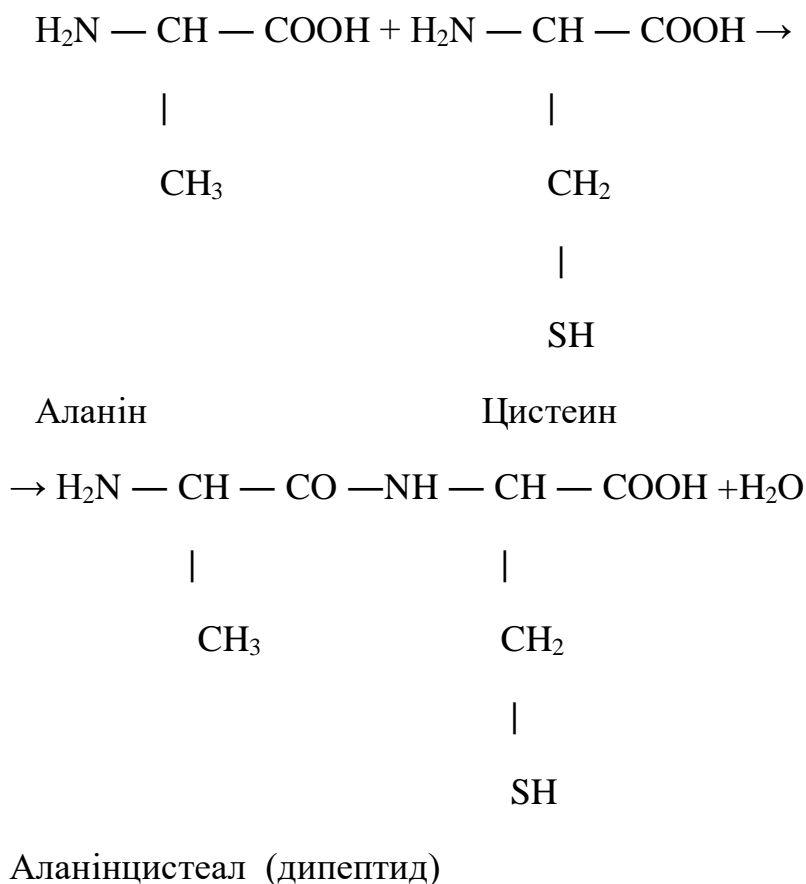
Радикалом амінокислоти називають угруповання атомів у її молекулі, що пов'язані з  $\alpha$ - вуглецевим атомом, яка не приймає участі у формуванні поліпептидного ланцюга.

### Фізико-хімічні властивості амінокислот.

Всі амінокислоти у водяних розчинах існують у вигляді біполярних йонів. Біполярність амінокислот забезпечує високу розчинність у воді та високі дипольні моменти їх молекул. Відносно високі температури плавлення обумовлені тим, що кристали амінокислот наділені йонною решіткою. У водних розчинах амінокислоти виявляють амфотерні властивості. Хімічна природа радикалів амінокислот дозволяє здійснювати реакції солеутворення (за  $-NH_2$  та  $COOH$  – групами); окислення та відновлення (за  $-SH$  та  $-SS-$  групами); алкілювання, ацилювання та етерифікації (за  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-COOH$  групами); амідирування (за  $-COOH$  – групами); дезамінування за допомогою азотистої кислоти (за  $-NH_2$ , групами), фосфорилювання та сульфотирування (за  $-OH$  – групами) та ін.

Здатність амінокислот вступати до хімічних реакцій залежить від реакційної здатності належних груп. Моноаміномонокарбонові амінокислоти вступають до реакцій, що характерні для їх амінних та карбоксильних груп. Інші амінокислоти, крім того, вступають до реакцій, що характерні для сульфгідрильної та фенольної груп, та ін.

Одним із найважливіших хімічних властивостей  $\alpha$  – амінокислот, що залежать від одночасної присутності у молекулі аміної та карбоксильної груп, є властивість у визначених умовах утворювати пептиди. Цей процес протікає по типу реакції поліконденсації



## Лабораторні роботи

### Лабораторна робота 1. Кольорові реакції на амінокислоти

#### Дослід 1. Ксантопротеїнова реакція.

Ця реакція дає можливість виявити у молекулі білка циклічні амінокислоти (фенілаланін, тирозін, триптофан). Реакцію обумовлюють ароматичні кільця амінокислот, що піддаються нітруванню. У результаті утворюються нітропохідні білків, забарвлені у жовтий колір.

**Мета роботи:** Ознайомитися з однією з кольорових якісних реакцій на амінокислоти – ксантопротеїновою.

**Прилади.** Штатив із пробірками.

**Реактиви.** Фенол, 0,1 % розчин. Азотна кислота, концентрована. Розчин білка, гідроксид натрія 20 % розчин або аміак.

**Хід роботи:** Спочатку проводять реакцію з фенолом. У пробірку наливають 2 мл розчину фенолу й додають 1-2 мл концентрованої азотної кислоти. При обережному нагріванні з'являється жовте забарвлення.



У другу пробірку наливають 2 мл розчину білка й додають 6–10 крапель концентрованої азотної кислоти. Під впливом кислоти з'являється осад білка, який при нагріванні забарвлюється у жовтий колір. Потім пробірці дають охолонути й обережно додають надлишок гідроксиду натрія або аміаку. При цьому жовте забарвлення переходить в оранжеве.

Ксантопротеїнову реакцію дають прості ароматичні поєднання – бензол та його гомологи, фенол, тирозин при нітруванні переходить у нітротирозин, із якого під впливом лугу утворюється амонійна сіль, що має хіноїдне угруповання.

### **Дослід 2.** Реакція Шульце – Распайля (на триптофан).

Реакція основанийна на здатності триптофана у кислому середовищі взаємодіяти з альдегідами, утворюючи при цьому забарвлені продукти конденсації. Під впливом сірчаної кислоти відбувається гідроліз сахарози до моносахаридів, які збезводнюються й перетворюються в оксиметилфурфурол. Триптофан, реагуючи з оксиметилфурфуролом, утворює комплекс, забарвлений у вишнево – червоний колір.

**Прилади.** Штатив із пробірками. Піпетки на 1 мл.

**Реактиви.** Розчин білка. Сахароза, 10 % розчин. Сірчана кислота, концентрована.

**Мета роботи.** Ознайомитися з методом якісного визначення триптофану.

**Хід роботи:** У пробірку наливають 1 мл розчину білка, додають 2 краплі розчину сахарози. Потім піпеткою нашаровують 1 мл. концентрованої сірчаної кислоти. На межі поділу рідин з'являється вишнево-червоне забарвлення у вигляді кільця.

### **Дослід 3.** Реакція Фоля (на сірковмісні амінокислоти).

До складу молекул більшості білків входять сірковмісні амінокислоти – цистеїн, цистин і метіонін. При нагріванні з лугом від цих амінокислот – відщеплюється сірка у вигляді сірководню, що виявляється у реакції з ацетатом свинцю.

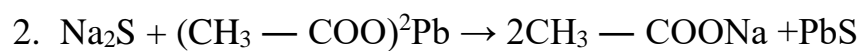
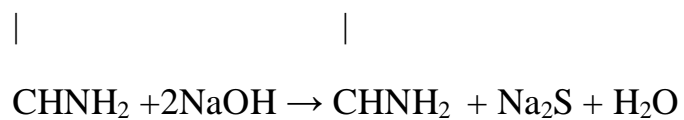
**Прилади.** Штатив із пробірками.

**Реактиви:** Білок яйця, нерозбавлений. Гідроксид натрію, 20% розчин. Свинець оцтовокислий, 0,5 % розчин.

**Мета роботи.** Ознайомитися з методом якісного визначення сірковмісних амінокислот.

**Хід роботи:** У пробірку наливають 1 – 2 мл. білка й по краплям додають розчин гідроксиду натрію до розчинення утвореного осаду гідрату окису свинцю. Додають кілька крапель (4-5) білка й суміш поступово нагрівають. Спостерігають поступове потемніння розчину.





### Питання для самоперевірки

1. Фізико – хімічні властивості амінокислот
2. Хімічні реакції, що характерні для амінокислот
3. Амінокислоти як лікарські речовини
4. Класифікація амінокислот

## ТЕМА 2. БІЛКИ.

### Теоретичний огляд

Білки – це високомолекулярні органічні речовини, що характеризуються строго визначеним елементарним складом та розпадаються до амінокислот при гідролізі. Білки відіграють найважливішу роль у процесах життєдіяльності. Вони приймають участь у побудові клітин і тканин, здійснюють біологічний каталіз, регуляторні і скорочувальні процеси, захист від зовнішніх впливів.

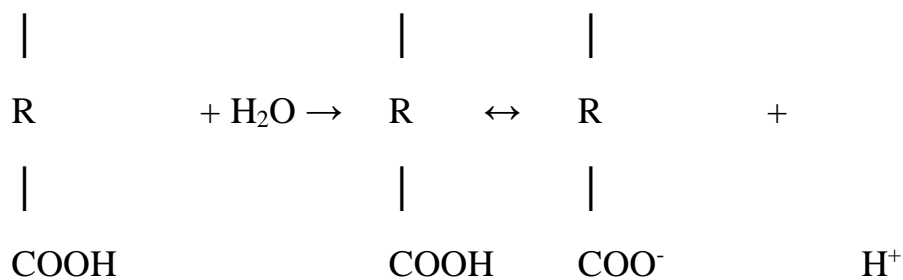
#### Фізико – хімічні властивості білків.

Білки мають високу молекулярну масу, що пояснює колоїдний характер їх розчинів. Діаметр білкових часточок у розчині перевищує 0,01мк. Важливою властивістю білків є їх розчинність у воді, водно – сольових розчинах і водних розчинах полярних розчинників (спирт). Процес розчинення білків тісно пов'язаний з гідратацією їх макромолекул, і будь – який фактор, що порушує цю гідратацію, буде у той же час знижувати розчинність білків у воді та сприяти випаданню їх у осад. Зменшення гідратації колоїдних часточок білків легко досягається додаванням до їх розчину речовин, що віднімають воду (спирт, ацетон, розчини нейтральних солей лужних металів та ін.). Ці речовини осаджують білки без явища денатурації, а солі важких металів – із денатурацією, сутністю якої є втрата білками гідрофільних та набуття гідрофобних властивостей.

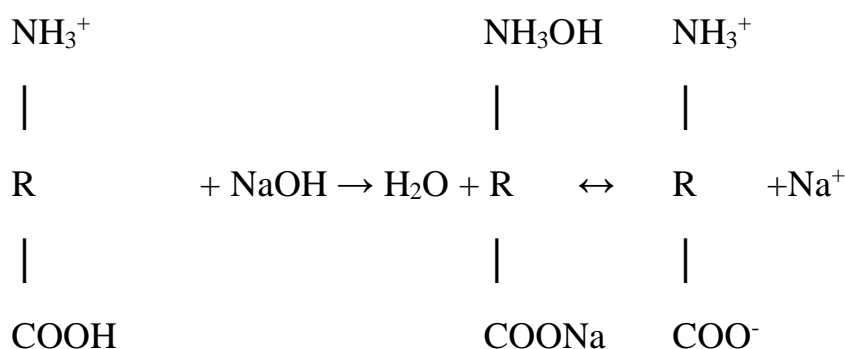
Білок кислий, молекули його мають знак заряду (-), а  $pI < 7,0$ . Якщо рН середовища більше значення ізоелектричної точки білку, то білкові молекули будуть мати знак заряду (-). Отже, лужне середовище буде запобігати досяганням кислим білком ізоелектричного стану ( $pH < 7,0$ ) і білок випадати в осад не буде. Сильно кисле середовище теж буде стримувати досягання білком ізоелектричного стану, особливо для основних білків, у яких  $pI > 7,0$ .

Білки, як амфотерні електроліти, дисоціюють як кислоти і як основи. У водному середовищі, особливо поблизу ізоелектричної точки, молекули білку являють собою біполярні йони, що пояснюється присутністю одночасно кислих і основних груп білків у водному середовищі.

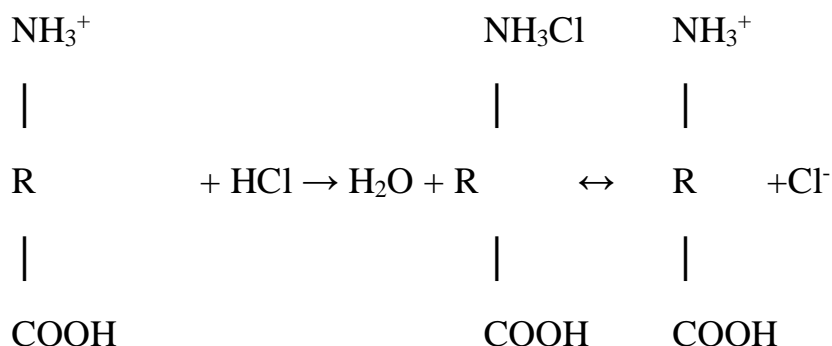




У лужному середовищі білки відіграють роль аніона. При втраті протона з групи  $-\text{NH}_3^+$ , наприклад, при дії гідроксиду натрію, утворюється натрієва сіль білку (протеїнат натрію)



У кислому середовищі білок відіграє роль катіона, наприклад, із соляною кислотою утворюється хлористоводородна сіль (протеїнхлорид)



Таким чином фактором, що визначає поведінку білка у розчині, є концентрація водневих іонів. У кислому середовищі зменшується дисоціація карбоксильних груп білка і він переходить у катіон. У лужному середовищі пригнічується дисоціація основних груп і білок переходить у аніон.

При визначеному значенні рН дисоціація карбоксильних груп дорівнює основній: кількість позитивних зарядів білкової молекули прирівнюється кількості від'ємних й у цілому заряд білкової молекули дорівнює нулю. Білок, який не має електричного заряду, знаходиться в ізоелектричному стані й у електричному полі не буде рухатися ні до катоду, ні до аноду, а рН розчину, при якому білок знаходиться в ізоелектричному стані, називається ізоелектричною точкою білка, або ізопунктом білка.

У кислому середовищі зменшується дисоціація білка за карбоксильними групами, молекула білку отримує позитивний заряд, а у лужному середовищі зменшується протонізація аміногруп білка, молекули отримують від'ємний заряд і залишаються у розчині навіть при кип'ятінні. Додавання до розчину білка нейтральних солей полегшує і прискорює згортання білків при кип'ятінні внаслідок дегідратації їх молекул.

Під коагуляцією розуміють зближення та склеювання білкових часточок, у результаті чого збільшується їх розмір і вони легко випадають у осад. У ізоелектричному стані у білків різко знижується ступінь дисоціації і часточки становляться електронейтральними. При цьому утворюються умови для порушення гідратаційної оболонки білків, що разом із втратою заряду сприяє їх коагуляції.

При нагріванні розчину білка вище 60°C більшість білків коагулює, особливо легко цей процес протікає в ізоелектричній точці. При цьому порушується гідратаційна оболонка білкової часточки і третинна структура молекули білка втрачає гідрофільність, стає гідрофобною і легко осаджується.

Таким чином, основними факторами стабілізації білкових колоїдів є гідратація частинок і виникнення однойменного електричного заряду у результаті дисоціації основних і кислотних груп.

Для розчинів білкових речовин є характерним явище опалесценції, яке виникає у прохідному світлі внаслідок дифракції. При втраті факторів агрегативної стійкості (заряд, гідратаційна оболонка) розчини білка зі стану золю переходять у гель, при якому відбувається відділення дисперсійної фази від дисперсійного середовища.

Всі реакції на білки ґрунтовані на наявності у них визначених хімічних груп, зв'язків та на їх фізико-хімічних властивостях.

### **Реакції осадження білків.**

Висолювання білків це є оборотний процес коагуляції й осадження білків йонами солей лужних металів. У водному розчині білкові молекули заряджені й гідратовані, що забезпечує стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, йони яких теж гідратовані, відбувається руйнування водних оболонок білкових молекул у результаті конкуренції за воду йонів солей. Крім того, йони солей з протилежним, ніж у білка зарядом, адсорбуються на поверхні білкової молекули, внаслідок чого частинки білку

стають електронейтральними, що знижує їх стійкість у розчині. При розбавленні водою білкових розчинів, які коагулювали під впливом солей лужних металів, білок знову переходить у розчинений стан (золь). Осади білків (гель), які отримані за допомогою висолювання, можуть бути знову розчинені після зменшення концентрації солей. Таким чином, процес висолювання білків є оборотним процесом.

Солі важких металів необоротно осаджують білки внаслідок зшивання поліпептидних ланцюгів багатовалентними атомами металів. Тому білки застосовують при отруєнні солями важких металів. Деякі з таких осадів (наприклад, з солями міді, свинцю, цинку) розчиняються у надлишку солі внаслідок адсорбції йонів цих металів на поверхні білкових частинок. У результаті цього білкові частинки набувають заряд і переходять у розчин. Розчинення осадів денатурованих білків у надлишку солей важких металів називається адсорбційною пептизацією. Під впливом солей важких металів (свинцю, міді, срібла, ртуті) білки зі стану золя необоротно коагулюють у гель. Йони солей важких металів із білками утворюють міцні комплексні поєднання. Крім того, важкі метали знімають електричний заряд і глибоко змінюють вторинну й третинну структури макромолекули білка. При надлишку оцтовокислого свинцю й сірчанокислої міді утворений ними осад розчиняється. Це явище пояснюється адсорбцією надлишку йонів метала й перезарядженням білкового комплексу, у результаті чого у розчин переходить комплекс зміненого білка з металом.

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфорної) викликають необоротне осадження білків із розчину. Це пояснюється дегідратацією колоїдних часточок білка, зняттям заряду, частковим гідролізом білкової молекули, утворенням солей із білка та кислот та ін. Надлишком мінеральних кислот (крім азотної) розчиняють осад білків (гідроліз).

Органічні кислоти (трихлороцтова та сульфосаліцилова) необоротно осаджують тільки білки, а продукти їх розпаду (сечовина, амінокислоти, аміді та ін.) залишається у розчині.

Органічні розчинники (спирт, ацетон, хлороформ) витісняють білки з водних розчинів. Це пояснюється дегідратацією міцели білка, що призводить до зниження їх стійкості у розчині. Якщо у розчині білка присутня соль NaCl, осад утворюється швидше внаслідок зняття заряду з колоїдної частинки. Це явище ще більш знижує стійкість розчину білка. Якщо осадження проводити на холоді й отриманий осад швидко відділити від розчинника, то білок знову може розчинитися у воді, тому що властивості його не змінюються,

денатурація не встигає відбутися й осадження є оборотним. Якщо час впливу розчинника збільшити, білок денатурує.

При нагріванні білки згортаються, перетворюючись необоротно у гель. Механізм температурної коагуляції і денатурації білків пов'язаний із перебудовою структури макромолекул білків. Колоїдні частинки білка під впливом високої температури з гідрофільних стають гідрофобними. Відбуваються глибокі й необоротні зміни вторинної і третинної структури молекул білка – вони вивертаються немов би навиворіт. Швидкість температурної коагуляції залежить від присутності у розчині йонів солей і водневих йонів. У сильно кислих розчинах білкові частинки перезаряджаються внаслідок їх амфотерних властивостей і несуть позитивний заряд, що підвищує їх стійкість. У лужних розчинах стабільність білкового колоїду пояснюється від'ємним зарядом білкової частинки.

Наявність білка у досліджуваному об'єкті можна виявити за допомогою кольорових реакцій. Ці реакції можна розділити на дві групи: 1 - загальні, що обумовлені наявністю пептидного зв'язку і вільних амінних груп та 2 – специфічні, що обумовлені наявністю у білку окремих амінокислот, які здатні давати кольорові реакції. У лужному розчині при додаванні сірчаної кислоти такі речовини, як біурет, поліпептиди й білки утворюють комплексні солі, які забарвлені у фіолетовий колір. Ця реакція обумовлена наявністю у молекулі білка пептидної групи.

## **Лабораторні роботи**

### **Лабораторна робота 2. Фізико – хімічні властивості білків.**

#### **Реакції осідання білків. Визначення ІЕТ білка.**

##### **Дослід 1. Осадження білків йонами важких металів**

**Мета роботи.** Ознайомитися з осадженням білків йонами важких металів.

**Прилади.** Штатив із пробірками. Скляні палички.

**Реактиви.** Розчин яєчного білка. Оцтовокислий свинець, 0,5 % розчин. Сірчаноокисла мідь, 6% розчин.

**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 1-2 мл розчину білка. Додають по краплям у першу пробірку розчин оцтовокислого свинцю, у другу – сірчаноокислої міді. В усіх пробірках утворюються осадки білків. Потім у пробірку додають надлишок цих солей, спостерігаючи при цьому розчинення осадків.

### **Дослід 2.** Осадження білків мінеральними кислотами.

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфорної кислоти) викликають необоротне осадження білків із розчину. Надлишком мінеральних кислот (за винятком азотної) розчиняють осад білків, що випав.

**Мета роботи.** Ознайомитися з осадженням білків під дією неорганічних кислот.

**Прилади.** Штатив із пробірками.

**Реактиви.** Соляна кислота, концентрована. Сірчана кислота концентрована. Азотна кислота концентрована. Розчин білка.

**Хід роботи.** У три пробірки обережно наливають по 1 мл кислот: у першу – соляної, у другу – сірчаної й у третю – азотної.

У всі пробірки обережно нашаровують на кислотну приблизно по 1 мл розчину білка. На межі двох рідин з'являється осад білка у вигляді невеличкого білого кружечка.

Кожну пробірку обережно струшують. Осад розчиняється у першій і другій пробірках, де є надлишок соляної і сірчаної кислот; у третій пробірці з азотною кислотою осад не зникає при струшуванні, тому що при надлишку азотної кислоти він не розчиняється.

### **Дослід 3.** Осадження білків органічними кислотами.

Із розчинів білки можуть осаджуватися також й органічними кислотами, але різні кислоти діють на білки неоднаково.

**Мета роботи.** Ознайомитися з осадженням білків під дією органічних кислот

**Прилади.** Штатив із пробірками.

**Реактиви.** Трихлороцтова кислота, 5% розчин. Сульфосаліцилова кислота, 20%-вий розчин. Розчин білка.



**Хід роботи.** У дві пробірки наливають по 1-2 мл розчину білка і додають у першу пробірку декілька крапель 5% розчину трихлороцтової кислоти, а у другу – декілька крапель сульфосаліцилової. Пробірки струшують і спостерігають випадіння осаду білка.

**Дослід 4.** Осадження білків спиртом, ацетоном і хлороформом.

Органічні розчинники осаджують білки з нейтрального або слабо кислого розчину. Вони витискують білки з водяних розчинів. Механізм дії спирту й інших органічних розчинників можна пояснити дегідратацією міцел білка, що веде до зниження стійкості їх у розчині.

**Мета роботи:** Ознайомитися з осадженням білків під дією органічних розчинників.

**Прилади.** Штатив із пробірками.

**Реактиви.** Розчин білка. Етиловий спирт 96°. Ацетон. Хлороформ. Хлористий натрій, кристалічний.

**Хід роботи.** У три пробірки наливають по 1-2 мл розчину білка і паличкою додають небагато (0,2—0,3 г) хлористого натрію і енергійно струшують. У першу пробірку поступово (краплями) додають 2-3 мл спирту, у другу – 2–3 мл ацетону й у третю – хлороформу. Енергійно збовтують і через 3-6 хв. спостерігають випадіння мілкового осаду білки

**Дослід 5.** Осадження білків кип'ятінням.

**Мета роботи:** Ознайомитися з осадженням білків при кип'ятінні у залежності від рН середовища.

**Прилади.** Штатив із пробірками. Спиртівка.

**Реактиви.** Розчин білка. Оцтова кислота, 2% розчин. Оцтова кислота, 10% розчин. Хлористий натрій, насичений розчин. Гідроксид натрію, 10% розчин.

**Хід роботи.** Наливають у п'ять пробірок по 2 мл розчину білка. Нагрівають вміст першої пробірки й спостерігають поступове випадіння білка в осад. У другу пробірку додають 1 краплю 2% оцтової кислоти й нагрівають. Осад білка випадає швидше й повніше, так як білок при цьому знаходиться в ізоелектричній точці.

У третю пробірку додають близько 0,5 мл 10% оцтової кислоти і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні.

У четверту пробірку додають близько 0,5 мл 10% оцтової кислоти і 3–4 краплі насиченого розчину хлористого натрію і нагрівають. Утворюється осад білка.

У п'яту пробірку додають близько 0,5 мл розчину гідроксиду натрію і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні.

Швидкість осадження та денатурація білків збільшується при нагріванні, високій кислотності й залежить від характеру білка, солей, що знаходяться у розчині та ін.

#### Дослід 6. Визначення ізoeлектричної точки білків.

Дослід оснований на властивостях білків як амфотерних електролітів. Кислотні властивості білків обумовлені наявністю кінцевих карбоксильних і дикарбонових амінокислот, а лужними – амінним, імінним та гуанідиновим групам амінокислот.

**Мета роботи:** Навчитися визначати ізoeлектричну точку білків.

**Прибори.** Штативи з пробірками. Піпетка на 2 мл з діленнями. Піпетка на 10 мл з діленнями.

**Реактиви.** Оцтовокислий натрій, 0,1н розчин. Оцтова кислота, 0,1н розчин. Оцтова кислота, 1н розчин. Желатин, 1% розчин. Етиловий спирт.

**Хід роботи.** Готують серію буферних розчинів.

Розчин	№ пробірки					
	1	2	3	4	5	6
	кількість, мл					
Оцтовокислий натрій, 0,1н розчин	2	2	2	2	2	2
Оцтова кислота, 0,1н розчин	0,25	0,5	1	2	4	-
Оцтова кислота, 1н розчин	-	-	-	-	-	0,8
Дистильована вода	3,75	3,5	3	2	-	3,2
Желатин, 1% розчин	2	2	2	2	2	2

Вміст пробірок збовтують.

У пробірку № 4 додають із піпетки повільно, при помішуванні 2-3 мл спирту, щоб через деякий час залишалась ледь помітна муть.

У всі інші пробірки додають при помішуванні стільки спирту, скільки додавали у пробірку №4. Спостерігають через 20-30 хвилин помутніння, яке позначають за наступною схемою:

+ - слабка коагуляція

++ - більш сильна коагуляція

+++ - найбільш сильна коагуляція

Розчин	№ пробірки					
	1	2	3	4	5	6
Коагуляція рН	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
	-	-	++	+++	+-	-

Таким чином, ІЕТ желатину дорівнює рН – 4,7. У залежності від сорту желатина ІЕТ може змінюватися у невеликих межах.

### Питання для самоперевірки

1. Фізичні властивості білків
2. Охарактеризуйте реакції осадження білків
3. Денатурація білків
4. Ізоелектрична точка білків

## Лабораторна робота 3. Кольорові реакції на білки

### Дослід 1. Біуретова реакція.

При нагріванні сильно лужного розчину сечовини, біурета ( $\text{H}_2\text{NCONHCONH}_2$ ), або білка з солями міді утворюються комплексні сполуки міді. Забарвлення розчинів при проведенні біуретової реакції можуть бути від синього до червоного з переваженням фіолетового.

**Мета роботи:** Ознайомитися з кольоровою якісною реакцією на білок – біуретовою

**Прилади:** Штативи з пробірками.

**Реактиви:** Сечовина кристалічна. Гідроксид натрію, 10% розчин. Сірчаноокисла мідь, 1% розчин. Розчин білка (білок двох яєць змішують із літром дистильованої води).

**Хід роботи.** Спочатку проводять реакцію з біуретом, який отримують із сечовини, а потім із білком. У суху пробірку беруть трохи (0,5 г) сечовини й обережно нагрівають на полум'ї. Сечовина спочатку плавиться, а при подальшому нагріванні виділяється аміак. У результаті нагрівання з сечовини утворюється біурет, а аміак виділяється у вигляді газу (це визначають за запахом і зміною кольору червоного лакмусового паперу, змоченого у воді й піднесеного до пари, що виділяється з пробірки, на синій). До охолодженого біурету додають 1-2 мл 10 % гідроксиду натрію, струшують і додають декілька крапель 1% розчину сірчаноокислої міді. Після струшування розвивається рожеве забарвлення розчину.

Реакція з білком. У пробірку наливають 2 мл розчину білка, 2 мл гідроксида натрію й 2 мл сірчаноокислої міді. При струшуванні утворюється фіолетове забарвлення.

## **Дослід 2.** Реакція з пікриною кислотою

Пікринова кислота при нагріванні з білком у лужному середовищі відновлюється до пікрамінової кислоти (червоного кольору). Цю реакцію можна провести й із іншими відновниками, наприклад, із глюкозою.

**Мета роботи:** Ознайомитися з кольоровою якісною реакцією на білок - із пікриною кислотою

**Прилади:** Штативи з пробірками. Шпатель. Спиртівка.

**Реактиви:** Пікринова кислота, насичений розчин. Розчин білка. Глюкоза 0,1% розчин. Гідрокарбонат натрію сухий. Глюкоза, 0,1% розчин.

**Хід роботи.** В першу пробірку наливають 2 мл розчину білка й додають 0,3-0,5 г порошка гідрокарбоната натрію. Додають 1 – 2 краплі насиченого розчину пікринової кислоти й кип'ятять впродовж 5-10 хвилин. Поступово жовте забарвлення розчину переходить у червоне внаслідок відновлення пікринової кислоти у пікрамінову.

У другу пробірку наливають 2 мл розчину глюкози й додають 0,3-0,5 г порошку гідрокарбоната натрію. Додають 1–2 краплі насиченого розчину пікринової кислоти й кип'ячать впродовж 5-10 хвилин. Спостерігається відновлення пікринової кислоти у пікрамінову за рахунок глюкози.

### **Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція.**

Ксантопротеїнову реакція дають прості ароматичні поєднання – бензол і його гомологи, фенол та ін..

**Мета роботи:** Ознайомитися з кольоровою якісною реакцією на білок - ксантопротеїною реакцією.

**Прилади:** Штативи з пробірками.

**Реактиви:** Фенол, 0,1% розчин. Азотна кислота, концентрована. Розчин білка. Аміак, або гідроксид натрію, 20% розчин.

**Хід роботи.** Спочатку проводять реакцію з фенолом. У пробірку наливають 2 мл розчину фенолу й додають 1 –2 мл концентрованої азотної кислоти. При обережному нагріванні з'являється жовте забарвлення.

У другу пробірку наливають близько 2 мл розчину білка й додають 6-10 крапель концентрованої азотної кислоти. Під впливом кислоти з'являється осад білка, що при нагріванні забарвлюється у жовтий колір. Потім пробірку охолоджують і обережно додають надлишок аміаку, або гідроксиду натрію. При цьому жовте забарвлення переходить у помаранчеве.

### **Питання для самоперевірки**

1. Хімічні властивості білків
2. Амфотерність білків
3. Характеристика пептидного зв'язку
4. Охарактеризувати окисно- відновні реакції

## ТЕМА 3. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

### Теоретичний огляд

Нуклеїнові кислоти – це речовини білого кольору, волокнистої будови, погано розчиняються у воді у вільному стані, але добре розчиняються у вигляді солей лужних металів. Добре розчиняються у сольових розчинах: РНК – у розчинених, а ДНК – у більш концентрованих. Добре розчинні у лужному середовищі і осаджуються кислотами. При кип'ятінні нуклеопротеїдів із розбавленими кислотами відбувається їх гідролітичний розпад: спочатку відщеплюється білок, нуклеїнові кислоти деполімеризуються, потім гідролізуються мононуклеотиди, відщеплюючи пуринові основи, вуглевод пентозу й фосфорну кислоту. Піримідинові основи відщеплюються тільки при глибокому гідролізі нуклеїнових кислот.

Більша частина нуклеїнових кислот у рослинних, тваринних та бактеріальних клітинах знаходиться у поєднанні з білками. Тому для виділення нуклеїнових кислот необхідно не тільки порушити цілісність клітинних оболонок, але й розірвати зв'язок між нуклеїновою кислотою та білком.

Серед структурних елементів нуклеїнових кислот знайдені піримідинові й пуринові основи, вуглеводи, фосфорну кислоту. Піримідинові основи є похідними гетероциклічного поєднання – піримідина, який складається з чотирьох атомів вуглецю, двох атомів азоту й чотирьох атомів водню. До складу нуклеїнових кислот входять такі похідні піримідина: цитозин, урацил, тимін та ін. Пуринові основи є похідними біциклічного гетероцикла – пурина. У гідролізатах нуклеїнових кислот завжди є два похідні пурина: аденін і гуанін. Вуглеводи нуклеїнових кислот представлені моносахаридами – рибозою й дезоксирибозою.

ДНК входить до складу хромосом ядра клітин, а РНК існує у вигляді трьох типів (інформаційна, транспортна, рибосомальна). До складу РНК у якості вуглеводу входить рибоза, а з пуринових та піримідинових основ – аденін, гуанін, цитозин, урацил. До складу ДНК замість рибози входить дезоксирибоза, а замість урацила – тимін.

## Лабораторні роботи

### Лабораторна робота 4. Визначення нуклеїнових кислот

**Дослід 1.** Виділення дезоксирибонуклеопротейду.

Дезоксирибонуклеопротейди є головною складовою частиною клітинних ядер. При осадженні з сольових розчинів ядерні нуклеопротейди випадають у вигляді ниток. Вони складають основну частину так названих структурних білків різних тканин.

**Мета роботи:** Навчитися отримувати дезоксирибонуклеопротейд із тваринних тканин.

**Прилади:** Ступка з пестиком. Центрифуга на 2500-3000 обертів. Мірні центрифужні пробірки (10 мл). Стакан на 300-400 мл. Циліндр на 100 мл. Паличка дерев'яна з насічками. Часове скло. Ваги технічні.

**Реактиви:** Селезінка, лімфовузол, тимус або печінка (кроля, ВРХ). Хлорид натрію 1 н. розчин.

**Хід роботи:** 2 г. тканин подрібнюють ножицями на годинному склі. Потім розтирають у ступці. Невеликими порціями у ступку додають 70-80 мл 1н. розчину хлористого натрію, ретельно розтирають вміст протягом 10-15 хв. Отриманий в'язкий розчин розливають у мірні центрифужні пробірки (по 10 мл), центрифугують протягом 10 хв. при 2500 – 3000 об/хв. Потім центрифугат зливають у циліндр і вимірюють його об'єм.

Відміряють шестикратний об'єм води (за відношенням до центрифугату), наливають її до стакану й, поволі обертаючи у ній дерев'яну паличку, вливають центрифугат.

Намотують на паличку нитки ядерного нуклеопротейду, що утворюються.

**Дослід 2.** Отримання нуклеопротейду з дріжджів.

У дріжджах є багато нуклеопротейдів різного типу. Нуклеопротейди можна видобути з розрушених клітин дріжджів при лужній реакції розчину й осадити підкисленням.

**Мета роботи:** Навчитися отримувати нуклеопротейди з дріжджів.

**Прилади.** Ступка з пестиком. Стакан або колба на 50-100 мл. Циліндр на 100 мл. Центрифуга на 2500-3000 обертів. Мірні центрифужні пробірки (10 мл). Піпетка на 10 мл. Скляна паличка.

**Реактиви.** Дріжджі пресовані. Діетиловий ефір. Пісок скляний. Гідроксид натрію, 0,4% розчин. Оцтова кислота, 5% розчин.

**Хід роботи.** 5 г. дріжджів кладуть у ступку, додають 10 крапель ефіру та 10 крапель води. Вносять дрібку піску й ретельно розтирають. До гомогенату додають 30 мл розчину гідроксиду натрію й продовжують розтирати впродовж 15 хвилин.

Вміст ступки розливають у три центрифужні пробірки, доводячи об'єм до 10 мл. Центрифугують впродовж 5-10 хвилин при 2500 обертів/хв.

Центрифугат із усіх пробірок зливають в один стакан, постійно розмішуючи паличкою, приливають розчин оцтової кислоти (12 мл) до повного осадження нуклеопротеїду.

### **Дослід 3. Виділення пентоз.**

**Мета роботи.** Навчитись проводити реакцію окислення альдопентоз, користуючись рідиною Фелінга.

**Прилади:** Штативи з пробірками.

**Реактиви:** Гідроксид натрію 10 % розчин. Реактив Фелінгу.

**Хід роботи:** У пробірку наливають 0,5 мл гідролізату й нейтралізують за лакмусом розчином лугу.

До нейтралізованого гідролізату додають рівний об'єм реактиву Фелінга, пробірку струшують і нагрівають. Спостерігають появу жовто-червоного осаду закису і окису міді.

### **Питання для самоперевірки.**

1. Загальна характеристика нуклеїнових кислот
2. Характеристика ДНК, значення у організмі тварин
3. Характеристика РНК, значення у організмі тварин



## **КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ДО ЗМІСТОВОЇ ЧАСТИНИ II**

1. Визначення амінокислотної послідовності у поліпептидах.
2. Амінокислоти у якості лікарських речовин.
3. Синтез амінокислот.
4. Пептиди.
5. Хімічний синтез пептидів
6. Природні пептиди.
7. Харчова цінність білків, повноцінні й неповноцінні корми.
8. Функції білків в організмі гідробіонтів.
9. Прості та складні білки.
10. Виділення та очищення білків.
11. Біологічні функції білків.
12. Характеристика гемоглобіну.
13. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
14. Азотисті основи.
15. Типи нуклеїнових кислот, їх будова, локалізація, функції.
16. Правило Чаргаффа.
17. Нуклеїнові кислоти та сучасні проблеми рибництва.
18. Класифікація ліпідів за їх хімічною будовою.
19. Мембранні ліпіди.
20. Стероїди, значення в обміні речовин у гідробіонтів.
21. Якості та особливості природних жирних кислот.
22. Класифікація вуглеводів.
23. Резервні полісахариди.
24. Структурні полісахариди.
25. Фізико-хімічні властивості моносахаридів.
26. Функції вуглеводів.
27. Біологічне значення вуглеводів у організмі гідробіонтів.
28. Практичне застосування вуглеводів у рибництві.

## Рекомендована література

- 1) Чечеткин А.В. Биохимия животных. – М.: Высшая школа, 1982. - 512 с.
- 2) Кононський О.І. Біохімія тварин. – К.: Вища школа, 1994. – 439с.
- 3) Молоди пресноводных рыб. – Петрозаводск. – 1985. – 114 с.
- 4) Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. – Петрозаводск. – 1977. – 157 с
- 5) Инструкция по физиолого – биохимическим анализам рыбы. – М, 1986. - 56с.
- 6) Березов Т.Г. и др. Биологическая химия. – М.: Высшая школа, 1982. – 275с.
- 7) Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. – М.: Дрофа. – 2004. – 639с.

## Рецензія

На методичні рекомендації до лабораторних занять з дисципліни «Біохімія з основами фізичної та колоїдної хімії» для студентів біолого-технологічного факультету за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієні: санітарія і експертиза»

### Змістовна частина 2

#### БІЛКИ, АМІНОКИСЛОТИ, ЛІПІДИ, ВУГЛЕВОДИ

Методичні рекомендації складено відповідно до навчального плану і робочої програми дисципліни. Методичні рекомендації дають можливість студентам оволодіти навичками проведення лабораторних досліджень, навчитись зіставляти і аналізувати результати дослідів і робити висновки .

Для кожного лабораторно-практичного заняття визначено мету, зміст, необхідне обладнання , обсяг самостійної роботи яку студенти виконують протягом заняття та контрольні запитання до даної теми.

Вважаю за необхідне рекомендувати до друку методичні рекомендації до лабораторно- практичних занять з дисципліни «Біохімія з основами фізичної та колоїдної хімії» для студентів біолого-технологічного факультету за спеціальністю 212 «Ветеринарна гігієні: санітарія і експертиза»

Кандидат с.-г. наук, доцент кафедри  
технологія харчового виробництва

І.О.Ряполова

