Львівський професійний коледж
готельно-туристичного та ресторанного сервісу

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора з НМР
_____ Марія СКОРОБОГАТА
26 серпня 2025 р.

Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дисципліни «БІОХІМІЯ»

Спеціальність «Харчові технології»
Освітньо-професійний ступінь фаховий молодший бакалавр
Освітньо-професійна програма «Харчові технології»

Підготувала:
Викладач Мельник Н.М.

Погоджено на засіданні циклової комісії викладачів природничо-математичного циклу
Протокол № 01 від 26 серпня 2025 р.

Голова циклової комісії _____ Ігор МАТВІЇВ

Львів 2025

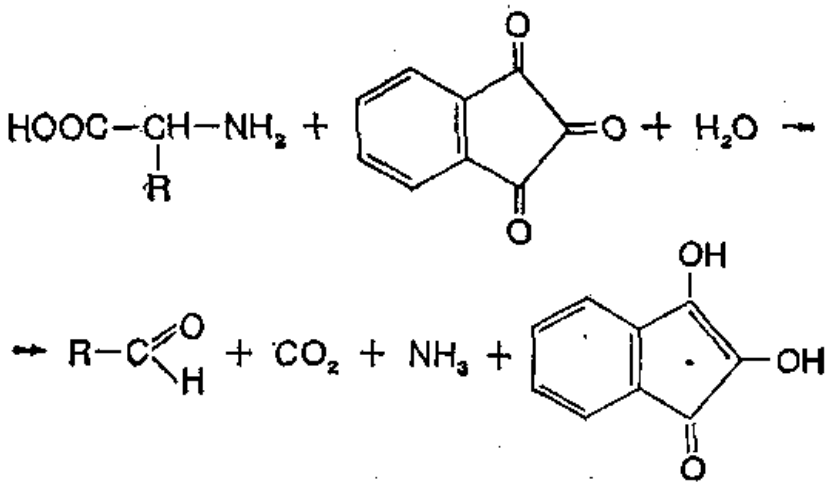
Лабораторна робота 1. Якісні реакції виявлення амінокислот.

Мета роботи: провести якісні реакції на амінокислоти ; засвоїти механізм цих реакцій.

Практичне значення роботи: якісні реакції на амінокислоти широко використовуються для вивчення амінокислотного складу різноманітних природних білків, пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот.

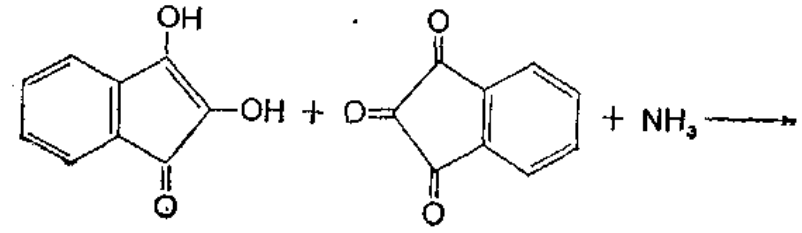
Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пробіркотримач, піпетки, сухе пальне, сірники; дистильована вода, 1%-й розчин яєчного білка або концентрований розчин яєчного білка, 10%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, розчин нінгідрину, концентрована нітратна кислота, волосся або шматочок нігтя, розчин плюмбум ацетату, розчин натрій нітриту, концентрована оцтова кислота.

У результаті взаємодії α-амінокислоти з нінгідрином (трикетогідринденгідратом) утворюється забарвлена комплексна сполука.

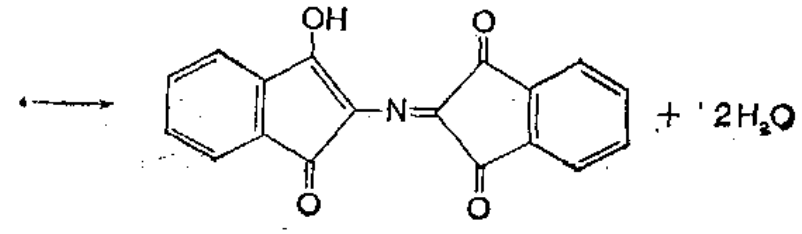


П ри нагріванні (до 70 °С) α-амінокислоти окислюються нінгідрином і піддаються окислювальному дезамінування з утворенням аміаку і декарбоксилюванню з утворенням альдегіду і CO_2, а нингидрин відновлюється:

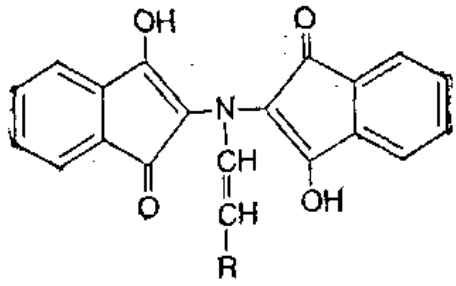
Відновлений нінгідрин, конденсуючись з аміаком і окисленим нінгідрином, утворює сполуку, яка, енолізуючись, переходить у забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір:



У присутності органічних розчинників, на яких готують розчин



нінгідрину (ацетон, етанол), можливе протікання побічної реакції з утворенням сполуки, що містить у своєму складі радикал (R) амінокислоти:

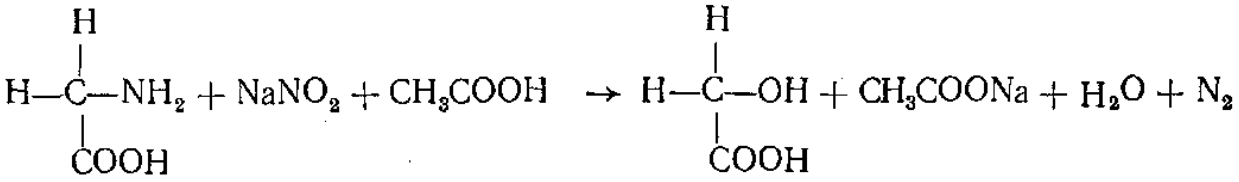


Наявність радикала амінокислоти у складі цієї сполуки обумовлює різне її забарвлення (червоне, жовте, блакитне), що виникає при реакції амінокислот з нінгідрином.

Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, що містять α-аміногрупу, і характерна як для деяких карбонових, так і циклічних амінокислот. У реакції гліцину з нінгідрином утворюється комплексна сполука, має синьо-фіолетове забарвлення.

2. Реакція з азотистої кислотою

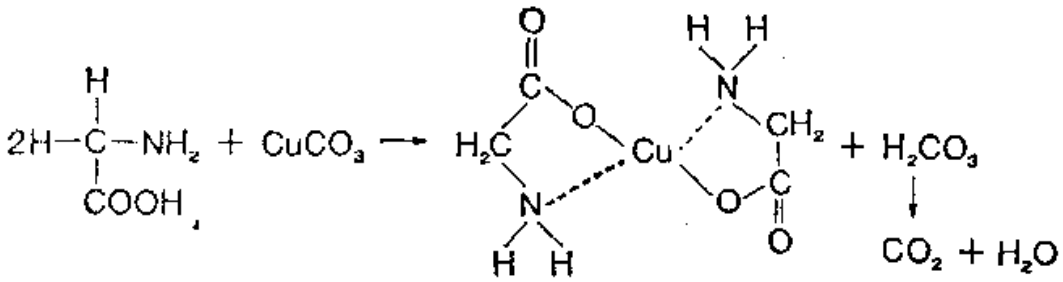
У результаті взаємодії α-амінокислоти з азотистої кислотою, утвореною в реакції нітриту натрію з оцтовою кислотою, відбувається утворення газоподібного азоту. Для гліцину рівняння реакції має вигляд:



3. Утворення комплексної солі міді

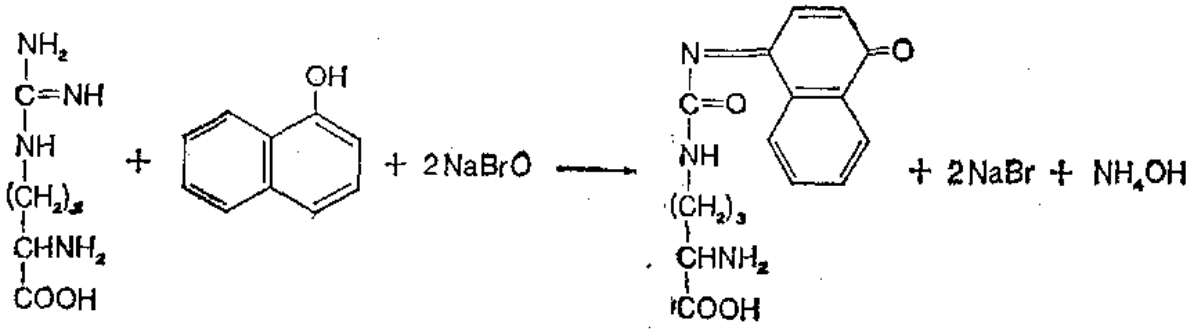
При нагріванні амінокислоти з карбонатом міді (II) утворюється комплексна сполука міді, що має синє забарвлення. У разі використання гліцину рівняння реакції має вигляд:

4.



Реакція Сакагучи на аргінін

У реакції аргініну, що містить гуанідинову групу, з гіпобромітом відбувається утворення окисленої форми аргініну, яка при взаємодії з α-нафтолом утворює сполуку червоного кольору:



5. Реакція Фоля на «слабозв'язану» сірку цистеїну та цистіну

При кип'ятінні цистеїну та цистіну в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який у лужному середовищі утворює сульфід натрію. Для цистеїну рівняння реакції має вигляд:

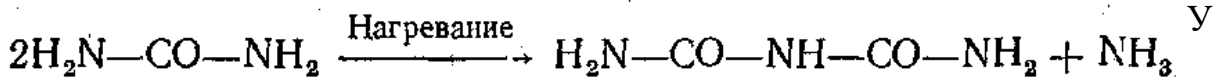
Утворення сульфіду натрію можна виявити за допомогою іонів важких металів, наприклад, іонів свинцю, що утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для виявлення сульфіду сірки можна використовувати ацетат свинцю, який при взаємодії з гідроксидом натрію утворює плюмбіт натрію. У свою чергу плюмбіт натрію, реагуючи з сульфідом натрію, призводить до утворення сульфіду свинцю:

6. Біуретова реакція на пептидні зв'язки

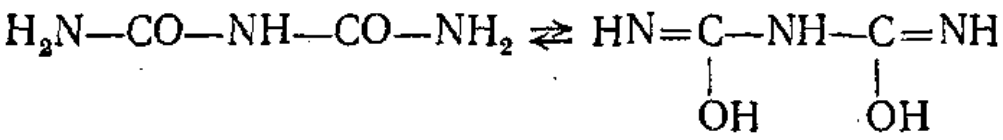
Амінокислоти, здатні утворювати не менше двох пептидних зв'язків (–CO-NH-), в лужному розчині в присутності сульфату міді (II) утворюють комплекси з атомами міді, забарвлені у фіолетовий колір.

Вперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена для біурета, тому вона і названа біуретовою.

Біурет, який може бути отриманий при нагріванні сечовини до температури 180 °C, не є амінокислотою, але має два пептидних зв'язки:



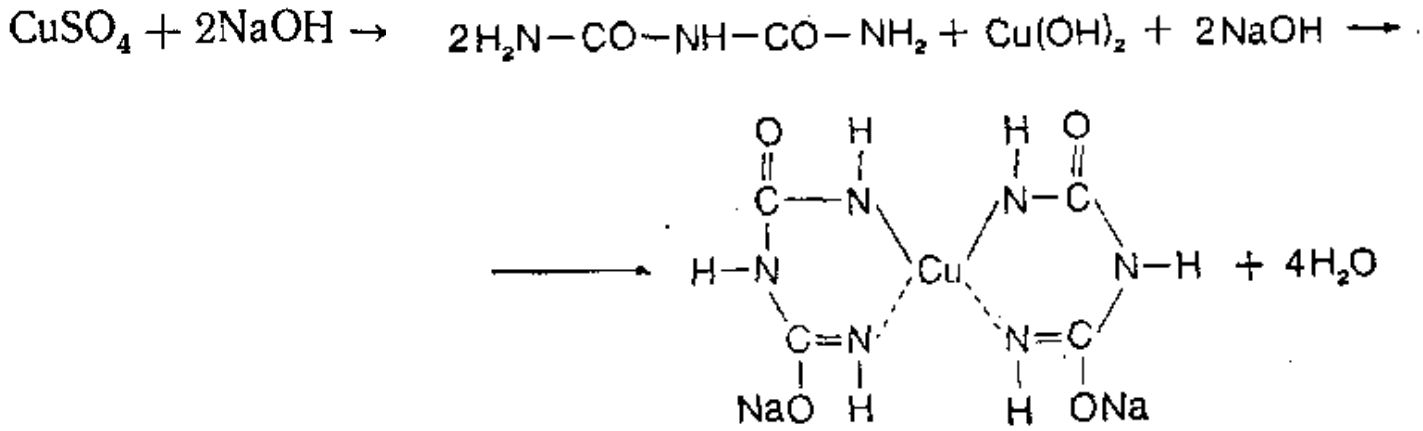
У лужному середовищі біурет піддається енолізації за схемою:



Дві молекули енольної форми біурета взаємодіють з гідроксидом міді (II) і утворюють комплекс, в якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

Гідроксид міді (II) для проведення біуретової реакції отримують, як правило, в результаті реакції взаємодії сульфату міді (II) з гідроксидом натрію (або калію):

Утворення комплексу біурета з міддю відбувається за такою схемою:



Подібний комплекс з міддю можуть створювати деякі амінокислоти, у яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної і аміногруп. Прикладом такої амінокислоти може бути аспарагін.

Література

Основна:

1. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
2. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. – Харків: Основа. – 608 с.
3. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.

Лабораторна робота 2. Якісні реакції на виявлення білків.

Білки – біоорганічні високомолекулярні сполуки, молекули яких являють собою гетерополімери, побудовані із залишків амінокислот, об'єднаних кислотоамідними (пептидними) зв'язками (-CO-NH-).

Білки, або протеїни, складаються з амінокислот, узагальнена формула яких має вигляд:

R-CH-COOH |

NH_2

Наявність в амінокислотах карбоксильної групи (–COOH) та аміногрупи (-NH_2) надає

їм як кислотних, так і основних властивостей, тобто амінокислоти проявляють амфотерність. До складу білків найчастіше входить 20 L-α-амінокислот, а взагалі відомо більше 200 індивідуальних амінокислот, що одержані з природної сировини і синтетичними методами. Деякі амінокислоти в організмі людини не синтезуються і їх поповнення в організмі відбувається лише завдяки надходженню з їжею, тому вони вважаються незамінними (гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан, валін і

аргінін).

Кольорові реакції на білки. Кольорові реакції на білки є якісними на функціональні

групи радикалів амінокислот, які входять до складу білків. Ці специфічні реакції часто використовують у лабораторній практиці для ідентифікації та кількісного визначення білків і окремих амінокислот.

Існує два типи кольорових реакцій:

а) універсальні - біуретова (на всі білки) та нінгідринова (на всі α-амінокислоти);

б) специфічні - тільки на окремі амінокислоти як у молекулах білків, так і в розчинах

окремих амінокислот.

II. Практична частина

Дослід 1. Біуретова реакція на білки.

Принцип методу. Білки та пептиди в лужному середовищі за присутності солей міді дають біуретову реакцію. Реакція дістала свою назву від біурету (похідне від сечовини). Хімічна формула біурету H_2N-CO-NH-CO-NH_2, як видно він, як і молекули білків, містить пептидний зв'язок (-CO-NH-). Біурет синтезується із сечовини і дає у ході цієї реакції те саме забарвлення, що й вона.

За допомогою біуретової реакції виявляють у сполуках пептидний зв'язок, який утворюється з α-амінокислот за рахунок реакції між карбоксильною групою (-COOH) однієї кислоти з аміногрупою (-NH_2) іншої, з виділенням молекули води. Вільні амінокислоти такої реакції не дають.

Біуретова реакція характерна тільки для тих речовин, які містять не менше, ніж 2 пептидні зв'язки. У сильнолужному середовищі білки за присутності купруму сульфату ($CuSO_4$) утворюють комплексні сполуки купруму з пептидними групами, забарвлені у червоно-фіолетовий або синьо-фіолетовий колір. Забарвлення білково-мідного комплексу залежить від довжини пептидного ланцюга. Дипептиди дають синій комплекс, трипептиди - фіолетовий, а пептиди з довжиною ланцюга від чотирьох амінокислотних залишків і більше дають червоний комплекс. Так, синьо-фіолетове забарвлення дають розчини білків, а пептони - продукти неповного гідролізу білків - рожеве або червоне забарвлення. Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 10% розчин натрію гідроксиду (NaOH),

0,5% розчин купруму сульфату ($CuSO_4$), пробірки, піпетки.
Хід роботи. До 2-3 мл розчину білка додають стільки ж 10% розчину натрію

гідроксиду та декілька крапель 0,5% розчину купруму сульфату. При цьому спочатку утворюється рожеве забарвлення, яке у разі додавання розчину купруму сульфату переходить у червоне, фіолетове і синє.

Цю реакцію використовують у лабораторній практиці для виявлення білків у біологічних рідинах.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 2. Ксантопротеїнова реакція.

Принцип методу. Ксантопротеїнова реакція характерна для ароматичних амінокислот, у яких під дією нітратної кислоти бензольне ядро нітрується з утворенням нітросполук жовтого кольору. У разі додавання амоніаку (аміаку) колір переходить в оранжевий. Реакція дуже чутлива.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 20% розчин нітратної кислоти, 20 % розчин натрію гідроксиду, газовий пальник, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Цю реакцію дають білки, до складу яких входять амінокислоти з бензольним кільцем (тирозин, фенілаланін, триптофан).

До 2 мл досліджуваного розчину білка додають 0,5 мл 20% розчину нітратної кислоти та кип'ятять протягом 30 с. Утворюється жовтий осад. У разі додавання до розчину 2-3 мл 20% натрію гідроксиду жовте забарвлення переходить в оранжеве.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 3. Реакції на амінокислоти, що містять сірку. Реакція Фоля.

Принцип методу. До складу більшості білків входять сірковмісні амінокислоти. Реакція Фоля виявляє в білках амінокислоти цистеїн і цистин, що містять слабозв'язану сірку. Амінокислота метіонін не дає цієї реакції, оскільки в ній сірка зв'язана дуже міцно.

Реакція полягає в тому, що під час кип'ятіння білка з основами останні руйнують цистин і цистеїн, відщеплюючи від них сірку, яка виділяється у вигляді сірководню. Іони плюмбуму утворюють із сірководнем чорний або бурий (залежно від концентрації білка і сірковмісних амінокислот) осад плюмбуму сульфіду.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 30% розчин натрію гідроксиду (NaOH), 5% розчин плюмбуму ацетату ($C_4H_6O_4Pb \bullet 3H_2O$), 5% розчин натрію нітропрусиду ($Na_2[Fe(CN)_5(NO)] \bullet 2H_2O$), газовий пальник, пробірки, піпетки.

Хід роботи.

1. Реакція з плюмбуму ацетатом (реакція Фоля).

У пробірку вміщують 5-6 крапель розчину досліджуваного білка, додають 4-5 крапель 30% розчину їдкого натру та обережно нагрівають протягом 2 хв. Після охолодження додають 1 краплю 5% розчину плюмбуму ацетату. Рідина забарвлюється у темно- коричневий колір.

2. Реакція з натрію нітропрусидом.

У пробірку вміщують 5-6 крапель розчину досліджуваного білка, додають 4-5 крапель 30% розчину їдкого натру та обережно нагрівають протягом 1-2 хв. Після охолодження додають у кожну пробірку по 1-2 краплі розчину натрію нітропрусиду. Вміст пробірок забарвлюється у червоно-коричневий колір.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 4. Кількісне визначення білку в сироватці крові біуретовим методом.

Принцип методу. Білки в лужному середовищі реагують із купруму сульфатом, при цьому утворюються сполуки, забарвлені у фіолетовий колір (біуретова реакція).

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, калій-натрій виннокислий, купруму сульфат, 0,9% розчин натрію хлориду, 10% розчин натрію гідроксиду, мірні пробірки, піпетки на 1, 2 і 10 мл, фотоелектроколориметр (ФЕК), біуретовий реактив (беруть 0,15 г $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$, 0,6 г калій-натрію виннокислого (інша назва – сегнетова сіль) і 50 мл води, суміш перемішують, додають 30 мл 10% розчину натрію гідроксиду і 0,1 г калію йодиду, доводять водою до об'єму 100 мл, зберігають у холодильнику в запарафінованому посуді).

Хід роботи. У першу пробірку вміщують 0,1 мл 0,9% розчину хлориду натрію (контроль), у другу - 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю, четверту і п'яту пробірки — по 0,1 мл дослідного розчину білка (задачі). В усі пробірки вливають по 5 мл біуретового реактиву, перемішують і через 30 хв визначають екстинкцію (пропускання світла) за допомогою ФЕК у кюветах на 10 мм при зеленому світлофільтрі λ=540-560 нм (або при червоному світлофільтрі λ=750 нм) проти контрольного розчину.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{(A \times B)}{C},$$

де X — концентрація речовин у дослідній пробі, г/л; A — концентрація речовин у стандартному розчині; B — екстинкція дослідного розчину; C — екстинкція стандартного розчину білка.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Література

Основна:

4. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
5. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. – Харків: Основа. – 608 с.
6. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.

Лабораторна робота 3. Якісні реакції на виявлення глюкози.

Мета: Вивчити механізм взаємодії глюкози з купрум (II) сульфатом у лужному середовищі.

Теоретична частина: Розчини гексоз (наприклад, глюкози або фруктози) у лужному середовищі відновлюють купрум (II) оксид у процесі нагрівання в купрум (I) оксид , а самі окиснюються до альдонових кислот. Цю реакцію за участю глюкози можна записати рівнянням:

$CH_2OH(CHOH)_4COH + 2CuSO_4 + 5NaOH \rightarrow$

$CH_2OH(CHOH)_4COONa + Cu_2O\downarrow + 2Na_2SO_4 + 3H_2O.$

Принцип методу: глюкоза в лужному середовищі відновлює купрум (II) оксид (CuO) в купрум (I) оксид (Cu_2O).

Матеріали та реактиви: біологічна рідина, що містить глюкозу (сеча), розчин з масовою часткою натрій гідроксиду 0,5 %, розчин з масовою часткою купрум (II) сульфату 0,5 %, пробірки, скляні палички, піпетки градуйовані на 5 мл, 1 мл, штатив для пробірок, пальник.

Хід визначення

У пробірку до 3 мл сечі додають 1 мл розчину натрій гідроксиду і 5 крапель розчину купрум (II) сульфату. Спостерігається поява осаду купруму (II) гідроксиду, що у процесі перемішування або струшування розчиняється, а розчин набуває блакитного забарвлення. Під час його обережного нагрівання

в полум'ї пальника до кипіння спостерігається випадіння жовтого осаду купруму (I) гідроксиду чи червоного осаду купрум (I) оксиду.

За результатами досліду зробити висновок про наявність глюкози в досліджуваних біологічних рідинах, сформулювати клініко-діагностичний висновок (стор. 110).

Лабораторна робота № 18 Визначення глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним (уніфікованим) методом

Мета: Опанувати кількісний колориметричний глюкозооксидазний метод визначення глюкози в сироватці крові та за отриманими результатами зробити клініко-діагностичний висновок (стор. 110).

Принцип методу: Глюкоза у присутності ферменту – глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти:

$$CH_2OH–(CHOH)_4–CHO+O_2+H_2O \rightarrow CH_2OH–(CHOH)_4–COOH+H_2O_2.$$

глюкоза глюконова кислота

Перекис водню окиснює хромоген, перетворюючи його в забарвлену у синій колір сполуку. Реакція проводиться у термостаті при температурі 37 ^{0}C протягом 15 хвилин, потім зупиняється введенням у розчин сульфатної кислоти. Сульфатна кислота перетворює жовте забарвлення у червоне. Стабільність забарвленого комплексу зберігається протягом 1 години.

Прилади та матеріали: колориметр фотоелектричний концентраційний КФК–2, піпетки градуйовані на 5 мл, 1 мл, 0,1 мл, штатив для пробірок та піпеток, досліджувана сироватка крові**.**

Робота проводиться з використанням готового набору реактивів.

Реактиви: склад набору: суха суміш реактивів (1 флакон), розчин пероксидази в стабілізаторі (1 амп.), розчин хромогену (1 амп.), розчин з масовою часткою цинк сульфату 10 % (10 мл), барій гідроксид (1 г), спиртовий розчин з масовою часткою фенолфталеїну1 % (1 мл), стандартний розчин глюкози 10 ммоль/л (1 амп.);

розчин з масовою часткою сульфатної кислоти 15 % (не комплектується).

Готування робочих розчинів

1. Ензимний розчин. У хімічний стакан влити 50 мл фізіологічного розчину, кількісно додати вміст флакону сухої суміші реактивів, додати розчин хромогену, розчин пероксидази, перемішати до повного розчинення кристалів. Відфільтрувати через вату. Зберігати в холодильнику до 10 днів.

2. Розчин з масовою часткою сульфатної кислоти H_2SO_4 15 % готується у лабораторії.

3. Стандартний розчин глюкози (з молярною концентрацією глюкози 10 ммоль/л) готовий до роботи.

4. Фізіологічний розчин – розчин з масовою часткою натрій хлориду NaCl 0,9 % .

Література

Основна:

7. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
8. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. – Харків: Основа. – 608 с.
9. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.

Лабораторна робота 4. Дослідження впливу умов середовища на швидкість ферментативних реакцій

Мета роботи: засвоїти загальні властивості ферментів у ході виконання дослідів.

Практичне значення роботи: вивчення властивостей ферментів необхідне для підбору оптимальних умов дії ферментів або визначення їх активності в наукових чи клінічних дослідженнях, а також для проведення фармакологічного аналізу ферментативних препаратів.

Матеріали і реактиви: штатив для пробірок, пробірки, піпетки, крапельниці, фарфорова ступка з товкачиком, термостат, водяна баня з термометром, сірники, спиртівка, скляні палички, годинникове або предметне скло, чашка Петрі; лід, розчин амілази слини, дистильована вода, 1%-й розчин крохмалю, реактив Люголя (1%-й розчин йоду в калій йодиді), варена й сира картопля, 3%-й розчин H_2O_2, 5%-й розчин сахарози або 2%-й

розчин сахарози, препарат сахарази (гідролізат дріжджів), 0,4%-й розчин натрій гідроксиду, 0,4%-й розчин хлоридної кислоти, 1%-й розчин натрій хлориду, 1%-й розчин купрум (II) сульфату, реактив Фелінга (реактив Фелінга I та реактив Фелінга II).

Хід роботи

Дослід 1. Дія амілази

Принцип методу. Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз α-глюкозидного зв'язку α-1-4-крохмалю до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуку *синього* кольору, амілодекстрин – *фіолетового*, еритродекстрин – *червоно-бурого*, ахродекстрин – *жовтого*.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2 мл 1%-го розчину крохмалю, в одну із пробірок додають 2 мл розчину амілази слини; вміст пробірки добре перемішують. Обидві пробірки із зануреними в них скляними паличками одночасно поміщають у водяну баню при температурі 40 ^{0}C. Через 4 хв з кожної пробірки за допомогою скляної палички відбирають по краплі рідини, змішують їх окремо з краплею реактиву Люголя, заздалегідь нанесеною на годинникове або предметне скло. Повторюють взяття проб через 6 та l0 хвилин.

Забарвлення з йодом проб із пробірки, що містить **слину**, змінюється від *синього* до *синьо-фіолетового*, *буро-червоного*, *червоного* і, зрештою, − *жовтого.*

До вмісту пробірки з розчином амілазою слини додають реактив Фелінга (реактив Фелінга I та реактив Фелінг II по 0,5 мл відповідно) і нагрівають до кипіння. Утворюється червоний осад купрум (I) оксиду.

Дослід 2. Дія каталази

Принцип методу. Каталаза прискорює реакцію розщеплення гідроген пероксиду на H_2O та O_2:

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

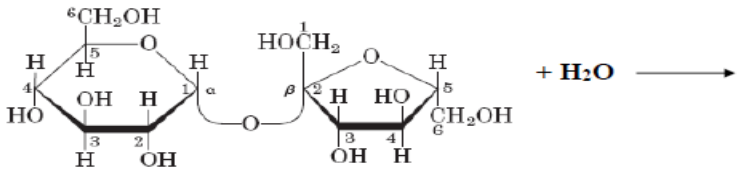
У цій реакції одна молекула гідроген пероксиду окиснюється і виступає донором електронів, а друга молекула відновлюється і виступає акцептором електронів.

Хід роботи. Розрізати сиру та варену картоплю, додати на зрізи по 2 краплі розчину H_2O_2.

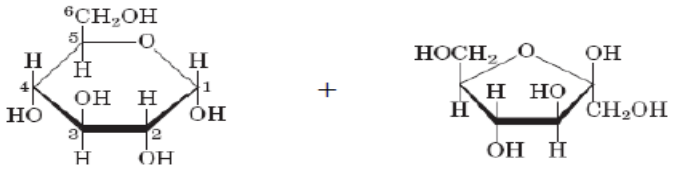
На зрізі сирої картоплі внаслідок утворення молекулярного кисню утворюється велика кількість бульбашок. На вареній картоплі бульбашки газу не спостерігатимуться.

Дослід 3. Дія сахарази

Принцип методу. Сахараза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози.



Сахароза



Глюкоза Фруктоза

Моносахариди, які утворюються, визначають реакцією Фелінга. Сахароза не містить вільної альдегідної групи і тому не має відновних властивостей.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1 мл препарату сахарази (гідролізат дріжджів). Вміст однієї з них (контроль) кип'ятять протягом 3 хв, після чого в обидві пробірки (охолоджені) додають по 3 мл 5%-й розчину сахарози або 2%-й розчину сахарози, добре перемішують і ставлять у термостат (або у водяну баню) при температурі 38^0С. Через 15 хв у пробірки вносять реактив Фелінга (реактив Фелінг I та реактив Фелінг II по 0,5 мл відповідно), перемішують і нагрівають до кипіння.

У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом сахаразаю (дослід) утворюється *червоний осад купрум (I) оксиду*.

Дослід 4. Термолабільність ферментів. Вплив температури на активність амілази слини

Принцип методу. Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури й визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю чи продуктів його перетворення з йодом.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 5 мл 1%-го розчину крохмалю. Пробірку 1 залишають при кімнатній температурі, пробірку 2 поміщають у термостат при температурі 40^0С, пробірку 3 – у киплячу водяну баню, а пробірку 4 − ставлять у лід.

Через 15 хв у всі пробірки, залишаючи їх за тих самих умов, додають по 1 мл розчину амілази слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю спостерігають за реакцією з краплею реактиву Люголя, заздалегідь нанесеною на годинникове або предметне скло через 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 хвилин.

У пробірці **1** при кімнатній температурі відзначається *червоне* чи *фіолетово-червоне забарвлення*, у пробірці **2** при оптимальній температурі

(40^0C) – *жовте забарвлення*, у пробірці 3 (100^0C) та пробірці 4 (лід) – *синє забарвлення*.

Дослід 5. Вплив pH середовища на активність амілази слини

Принцип методу. Для амілази слини оптимальне значення при pH = 6,8. У дуже кислому й сильнолужному середовищі активність амілази знижується.

Хід роботи. У 1-у, 2-у та 3-ю пробірки додати по 0,5 мл 1,0%-го розчину крохмалю, 0,5 мл розчину амілази слини; в 1-у пробірку − 1,0 мл 0,4%-го розчину натрій гідроксиду, в 2-у пробірку – 1,0 мл 0,4%-го розчину хлоридної кислоти, в 3-ю пробірку – 1,0 мл води. Нагрівають у термостаті при
t = 38 ^{0}C (або водяній бані). Через 15 хв у кожну пробірку додати по 3 краплі реактиву Люголя.

У 1-й пробірці спостерігається *жовте забарвлення*, у 2-й і 3-й пробірках − *фіолетове забарвлення.*

Дослід 6. Дія активаторів та інгібіторів на активність амілази слини

Принцип методу. Активатором амілази є натрій хлорид, а інгібітором – купрум (II) сульфат. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності натрій хлориду та купрум (II) сульфату.

Хід роботи. В 1-у пробірку наливають 1,5 мл води, в 2-у пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину NaCl, у 3-ю пробірку – 1 мл води та 0,5 мл розчину купрум (II) сульфату. В усі пробірки додають по 1,5 мл розчину амілази слини, перемішують, вносять по 1,5 мл 1%-го розчину крохмалю, знову перемішують і ставлять у термостат при температурі 38^0C (або у водяну баню). Через 5 хв додають по 5 крапель 1%-го розчину реактиву Люголя.

У 1-й пробірці спостерігається *фіолетове* або *червоне забарвлення*, у 2-й пробірці – *прозора рідина* або *жовте забарвлення*, у 3-й пробірці – *синє забарвлення.*

Література

Основна:

10. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
11. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. – Харків: Основа. – 608 с.
12. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.

Лабораторна робота 5. Окисне фосфорилювання.

Окисне фосфорилування - процес, шляхом якого хімічна енергія, що вивільняється під час транспортування електронів упродовж дихального (електронотранспортного) ланцюга мітохондрій, уловлюється та використовується для синтезу аденозинтрифосфату (АТФ) з аденозиндифосфату (АДФ) та неорганічного фосфату (Ф8). Синтез однієї молекули АТФ з АДФ та Фн потребує витрат хімічної енергії, що дорівнюють + 7,3 ккал (+ 30,5 кДж). Енергії, яка вивільняється за умов транспорту електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, достатньо для синтезу декількох молекул АТФ. Безпосередніми біохімічними дослідженнями доведено, що за умов окислення субстратів через НАДН: коензим Q-редуктазу утворюється 3 молекули АТФ, при дії сукцинат: коензим Q-редуктази - 2 молекули АТФ.

Пункти спряження транспорту електронів та окисного фосфорилування

Утворення АТФ з АДФ та $Ф_н$ може відбуватися тільки в певних ділянках електронотранспортного ланцюга мітохондрій, в яких величина хімічної енергії, що виділяється при транспортуванні пари електронів між двома редокс-системами (компонентами дихального ланцюга), достатня для синтезу 1 молекули АТФ (тобто > 7,3 ккал, або 30,5 кДж).

Регулюється співвідношення концентрацій АТФ до АДФ регулює потік протонів через затвори синтази АТФ. Високий коефіцієнт *АТП/ADP* в матриці мітохондрій вказує на те, що клітці не потрібно більше АТФ, закриваючи протонні ворота, залишаються закритими, щоб градієнт протона не може бути звільнений. З іншого боку, низьке співвідношення *АТП/ADP* в матриці означає, що клітина гідролізує багато АТФ..., і що клітина потребує більше. Потім протонний затвор відкривається, і протони протікають через кристалічну мембрану АТФ-синтази назад в матрицю по градієнту концентрації. Коли вони протікають, вони виділяють вільну енергію, яка живить білковий двигун в ферменті, який, в свою чергу, активує синтез АТФ. Нагадаємо, що відповідно до *ендосимбіотичної теорії* аеробні бактерії є еволюційним предком мітохондрій; насправді, клітинна мембрана аеробних бактерій містить ЕТС та *хеміосмотичний механізм* генерації АТФ, подібний до мітохондрій.

Дослід 1. Визначення активності каталази крові

Принцип методу: Каталаза (H_2O_2:H_2O_2-оксидоредуктаза) розщеплює пероксид водню з утворенням молекулярного кисню і води:

Каталаза

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

Простетична група каталази побудована за типом гему гемоглобіну. Цей фермент міститься у всіх тканинах організму, але найбільш активний він в еритроцитах і печінці. Біологічна роль каталази полягає в знешкодженні пероксиду водню, який утворюється в процесі окисно-відновних реакцій в організмі.

Активність каталази крові встановлюють за кількістю розкладеного пероксиду водню за одиницю часу. Кількість пероксиду водню визначають титрометричним методом згідно з реакцією $\mathbf{2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 4H_2SO_4 \rightarrow 2KHSO_4 + 2MnO_4 + 8H_2O + 5O_2.}$

Різниця кількості $KMnO_4$, який використали на титрування до і після дії каталази, характеризує активність ферменту.

Активність каталази виражають каталазним числом і показником каталази. Каталазним числом називається кількість міліграмів пероксиду водню, яка розкладається каталазою в 1 мкл крові за 30 хв. Показником каталази називають дріб, у якому чисельником є каталазне число, а знаменником – число мільйонів еритроцитів в 1 мкл досліджуваної крові. Більш об´єктивною одиницею є показник каталази, а не каталазне число, оскільки фермент виявляється майже виключно в еритроцитах. Цей показник становить у нормі $2\text{-}3\times10^{-6}$.

Хід роботи: У дві колбочки вливають по 1 мл розведеної у 1000 разів крові(1 мл гемолізату містить 1 мкл крові, додають по 7 мл дистильованої і по 2 мл 1% розчину пероксиду водню. У контрольну пробу (перша колбочка) відразу ж наливають 5 мл 10% розчину сірчаної кислоти (дія каталази в кислому середовищі припиняється). Колбочки залишають при кімнатній температурі на 30 хв, періодично перемішуючи. Потім у другу колбочку (дослід) доливають 5 мл 10% розчину H_2SO_4. Вміст кожної колбочки титрують 0,1 н розчином $KMnO_4$до рожевого кольору. Розраховують каталазне число (КЧ) за формулою

$$КЧ = (A\text{-}B) \cdot 1{,}7,$$

де А – кількість 0,1 н $KMnO_4$, яка використана на титрування контрольної проби;

В - кількість 0,1 н $KMnO_4$, яка використана на титрування дослідної проби.

Примітка. Грам-еквівалент H_2O_2 = 17 г.

Отже, в 1 мл 0,1 н розчину міститься 1,7 мг H_2O_2. Оскільки

1 мл 0,1 н $KMnO_4$ еквівалентний 1 мл 0,1 н H_2O_2, то, помноживши 1,7 мг на різницю між кількістю $KMnO_4$, затраченою на титрування контрольної і дослідної проб, отримують кількість міліграмів H_2O_2, яка розщеплюється в 1 мкл крові, тобто безпосередньо каталазне число.

Пояснити отриманий результат. Зробити висновок.

***Клініко-діагностичне значення*.** У нормі КЧ коливається від 10 до 15 одиниць.

Висока активність каталази спостерігається за умов токсичного гепатиту, дії іонізувального випромінювання, солей важких металів, а також при перніціозній анемії та інших макроцитарних анеміях, при введенні в організм кофеїну, ацетонових тіл, алкоголю. Пониження активності ферменту спостерігається при злоякісних пухлинах, інфекційних захворюваннях, таких як черевний тиф, скарлатина, малярія, туберкульоз легень.

Література

Основна:

13. Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
14. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Мадієвська Н.М. та ін. Біологічна хімія. – Харків: Основа. – 608 с.
15. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.

Додаткова:

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф, Биологическая химия. – Москва: Медицина, 1998. –

701 с

2. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. – Москва: Мир, 2000. – 470 с.
3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. т. 1. – М.: Мир, 2004. – 381 с.