

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування

Навчально-науковий інститут агроекології та землеустрою
Кафедра водних біоресурсів

05-03-211М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних та самостійних робіт з навчальної
дисципліни «Біохімія гідробіонтів» для здобувачів вищої освіти
першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною
програмою «Водні біоресурси та аквакультура» спеціальності
207 «Водні біоресурси та аквакультура»
денної та заочної форми навчання

Рекомендовано
науково-методичною радою
з якості ННІАЗ
Протокол № 1 від 03.09.2024 р.

Методичні вказівки до виконання лабораторних та самостійних робіт з навчальної дисципліни «Біохімія гідробіонтів» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Водні біоресурси та аквакультура» спеціальності 207 «Водні біоресурси та аквакультура» денної та заочної форми навчання. [Електронне видання] / Гроховська Ю. Р. – Рівне : НУВГП, 2025. – 25 с.

Укладач: Гроховська Юлія Романівна, доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри водних біоресурсів.

Відповідальний за випуск: Полтавченко Т. В., к.вет.н., доцент, завідувачка кафедри водних біоресурсів.

Керівник групи забезпечення спеціальності 207

«Водні біоресурси та аквакультура»

Петрук А. М.

Попередня версія методичних вказівок 05-03-72.

Зміст

ВСТУП	3
1. Обмін вуглеводів	4
2. Обмін ліпідів	9
3. Обмін білків. Якісні реакції на амінокислоти і білки	13
4. Якісні реакції на вітаміни	19
Рекомендована література	25

© Ю. Р. Гроховська, 2025
© НУВГП, 2025

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Біохімія гідробіонтів» належить до числа обов'язкових компонентів освітньо-професійної програми «Водні біоресурси та аквакультура» і завершується екзаменом у 3-му семестрі.

Метою вивчення навчальної дисципліни є набуття здобувачами вищої освіти знань про хімічний склад водних організмів, біохімічні особливості будови клітин, тканин і органів гідробіонтів, зокрема, риб, фізіолого-біохімічні процеси, які забезпечують їх існування. Розуміння загальних біохімічних процесів, які відбуваються організмі гідробіонтів, дозволить здобувачам освіти набутти здатність досліджувати і аналізувати їх особливості у цінних, рідкісних і зникаючих видів для розробки заходів зі збереження та відновлення біорізноманіття водних екосистем та запровадження принципів сталої аквакультури в рамках Європейського зеленого курсу.

Завдання: після вивчення ОК студент повинен знати та розуміти основи біохімії гідробіонтів; знати основні історичні етапи розвитку біохімії як науки; розуміти зв'язки водних біоресурсів та аквакультури з біохімією; бути здатним правильно проводити наукові спостереження і експерименти; проводити біохімічні дослідження і аналізувати їх результати; використовувати отримані знання при підготовці самостійного наукового дослідження за обраною темою.

На вивчення дисципліни передбачено 4,0 кредити ЄКТС, 40 год. аудиторних занять, у тому числі 12 год. практичних і 8 год. лабораторних занять. Основними завданнями лабораторних занять з ОК є набуття практичних навичок виконання різноманітних досліджень обміну білків, вуглеводів, ліпідів, вітамінів тощо на сучасному лабораторному обладнанні та приладах.

1. ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ

Мета роботи. Ознайомитися з основними якісними реакціями на вуглеводи, дослідити властивості полісахаридів.

Якісні реакції на вуглеводи

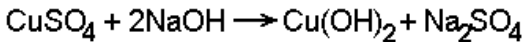
Реакції відновлення

Всі моносахариди, що володіють вільною карбонільною групою, дають ряд характерних реакцій, основаних на окисненні цієї групи і відновленні деяких слабких окиснювачів (оксиду купруму (II), солей аргентуму, солей вісмуту і ін.). Кетоцукри, наприклад фруктоза, не окиснюються слабкими окиснювачами. Проте фруктоза в лужному середовищі легко перетворюється на глюкозу, яка проявляє відновні властивості. Окиснення легко протікає в лужному, важче в нейтральному і особливо важко — в кислому середовищі.

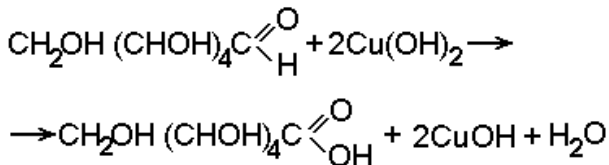
1. Реакція Троммера

Розчини гексоз, наприклад, глюкози і фруктози в лужному середовищі відновлюють при нагріванні оксид купруму (II) до геміоксиду, а самі окиснюються до альдонових кислот.

Перший етап реакції полягає в утворенні гідроксиду купруму (II) при взаємодії сульфату купруму і гідроксиду натрію:



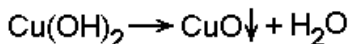
Другий етап реакції. При нагріванні гідроксид купруму (II) відновлюється в гідроксид купруму (I) жовтого кольору, а карбонільна група глюкози окиснюється до карбоксильної (глюконова кислота).



Жовтий гідроксид купруму (I) при подальшому нагріванні втрачає молекулу води і перетворюється в оксид купруму (I) червоного кольору:



Надлишок сульфату купруму маскує реакцію, оскільки гідроксид купруму (II) при нагріванні втрачає воду і утворюється оксид купруму (II) чорного кольору.



Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив з пробірками, газовий пальник, розчин глюкози (5%-ний), 5%-ний розчин гідроксиду натрію, 5%-ний розчин сульфату купруму.

Хід роботи. В пробірку до 3 мл розчину глюкози додають розчини гідроксиду натрію (1 мл) і сульфату купруму (5 крапель). Випадає осад гідроксиду купруму (II), який при перемішуванні або струшуванні пробірки розчиняється і розчин набуває блакитного кольору. При його обережному нагріванні в полум'ї пальника до кипіння спостерігається утворення жовтого осаду гідроксиду купруму (I) або червоного осаду геміоксиду купруму.

2. Реакція Фелінга

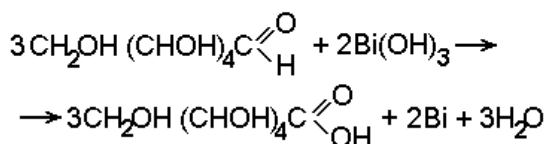
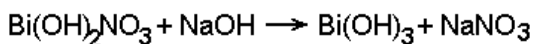
У реактиві Фелінга йони купруму (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами (солями винної кислоти). Перевагою реактиву є те, що мідь при надлишку реактиву не випадає в осад у вигляді оксиду купруму (II). Дисахариди і полісахариди взаємодіють з реактивом Фелінга після кип'ятіння з мінеральними кислотами.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки, штатив, пальник, розчин глюкози (5%-ний), реактив Фелінга, який складається з двох розчинів. Для приготування першого розчину 200 г сегнетової солі і 150 г гідроксиду натрію розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм до 1 л. Для приготування другого — 40 г перекристалізованого сульфату купруму розчиняють у дистильованій воді до об'єму 1 л. Рівні об'єми першого і другого розчинів змішують перед роботою.

Хід роботи. В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози і 1 мл реактиву Фелінга. Суміш перемішують і нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Спостерігають появу червоного осаду геміоксиду купруму.

3. Реакція Ніландера

Редукуючі цукри в лужному середовищі відновлюють окисний вісмут до металічного. Використання солей вісмуту особливо вигідне для виявлення цукру в сечі, оскільки на відміну від солей купрумівони вони не відновлюються сечовою кислотою. Реактив Ніландера містить азотнокислий вісмут, сегнетову сіль та гідроксид натрію. Сегнетова сіль додається для того, щоб гідроксид вісмуту не випадав у осад.

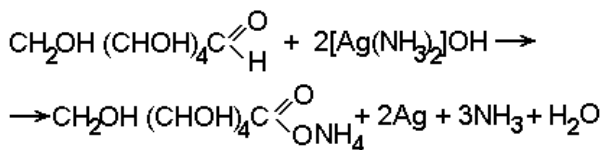


Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, лопатки (або шпатель), штатив для пробірок, пальник, піпетки, розчин глюкози (5%-ний), 5%-ний розчин гідроксиду натрію, сухий порошок нітрату гідроксиду вісмуту.

Хід роботи. У пробірку до 3 мл розчину глюкози додають 1 мл розчину гідроксиду натрію і на кінчику лопатки або шпателя нітрат гідроксиду вісмуту. Суміш перемішують і обережно нагрівають у полум'ї пальника. Спостерігають утворення чорного осаду металічного вісмуту.

4. Відновлення аміачного розчину гідроксиду аргентуму глюкозою

Глюкоза відновлює аміачний розчин гідроксиду аргентуму, який утворюється при взаємодії нітрату аргентуму з гідроксидом натрію і водним розчином аміаку, до металічного аргентуму.



Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки, крапельниці, штатив для пробірок, пальник, розчин нітрату аргентуму (5%-ний), 5%-ний розчин гідроксиду натрію, 10%-ний водний розчин аміаку, 5%-ний розчин глюкози.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл розчину нітрату аргентуму, 1 мл розчину гідроксиду натрію і по крапельці додають водний розчин аміаку до розчинення сірого осаду, який утворився. Потім до вмісту пробірки додають 3 мл розчину глюкози, перемішують і обережно нагрівають у полум'ї пальника до появи бурого забарвлення. Далі реакція йде без нагрівання. Спостерігають випадіння металічного аргентуму у вигляді чорного осаду або його осадження на стінках пробірки у вигляді блискучого дзеркального нальоту.

Полісахариди і їх властивості

1. Реакція крохмалю і глікогену з йодом.

Характерна реакція на крохмаль – поява синього забарвлення при взаємодії з розчином йоду в йодиді калію (реактив Люголя). При взаємодії глікогену з йодом з'являється червоно-буре забарвлення. Поява забарвлення пояснюється утворенням комплексних сполук йоду з полісахаридами, а також адсорбцією йоду розгалуженими молекулами амілопектину і глікогену. Гідратовані міцели амілози при додаванні йоду забарвлюються не у синій, а у червоно-фіолетовий колір. В утворенні комплексів бере участь молекулярний йод. При переведенні його у іонний стан (йодид-іон) забарвлення зникає.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, реактив Люголя (1 г йоду і 2 г KI розчиняють у 15 мл дистильованої води і подім розводять водою до об'єму 300 мл), 0,1%-ний розчин крохмалю і глікогену, 10%-ний розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. В одну пробірку поміщають 2 мл розчину крохмалю, в другу - 2 мл розчину глікогену. Потім у обидві пробірки вносять по 1-2 краплі розчину Люголя. Вміст пробірок перемішують і спостерігають утворення синього забарвлення у пробірці з крохмалем і червоно-бурого — у пробірці з

глікогеном. Потім з кожної пробірки по 1 мл рідини переносять у дві інші пробірки і додають по 1 мл розчину гідроксиду натрію. Спостерігають знебарвлення вмісту пробірок. Суміші, які залишилися у пробірках, де спочатку з'явилося забарвлення, нагрівають на водяній бані. Спостерігають зникнення забарвлення, яке знову з'являється при охолодженні.

2. Гідроліз крохмалю. Усі полісахариди побудовані так, що їх молекули не мають вільних карбонільних груп, тому вони не здатні до реакцій відновлення. Після розщеплення глікозидних зв'язків, наприклад при нагріванні з мінеральними кислотами, крохмаль розщеплюється до глюкози, яка вступає в окисно-відновні реакції. Глюкозу можна виявити за допомогою реакції Троммера.



Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, годинник, концентрована соляна кислота, 1%-ний розчин сульфату купруму.

Хід роботи. У дві пробірки поміщають по 5 мл розчину крохмалю. В одну з них вносять також 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти і кип'ятять на водяній бані 15 хв. Друга пробірка контрольна. Потім у обидві пробірки доливають по 2 мл 5%-ного розчину гідроксиду натрію і по 5 крапель розчину сульфату купруму та нагрівають (проробляють реакцію Троммера). У пробірці, де проводився гідроліз крохмалю соляною кислотою при нагріванні, спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду купруму (реакція Троммера позитивна), а в контрольній пробірці такий осад не утворюється (реакція Троммера негативна).

2. ОБМІН ЛІПІДІВ

Мета роботи. З'ясувати основні фізико-хімічні властивості ліпідів, засвоїти методику визначення їх окремих кількісних показників.

Фізико-хімічні властивості ліпідів

1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії

Характерною властивістю жирів є їх добра розчинність у багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, диетиловий ефір і ін.) і нерозчинність у воді. При змішуванні жирів з водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, у якому вони утворюються. Наявність у воді речовин — емульгаторів (мило, жовчні кислоти, карбонати) робить емульсії стійкішими. Утворення емульсії обумовлене тим, що в поверхневий водний шар, що оточує жирові краплини, спрямовуються поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонатів, які обволікають краплини жиру і перешкоджають їхньому злиттю.

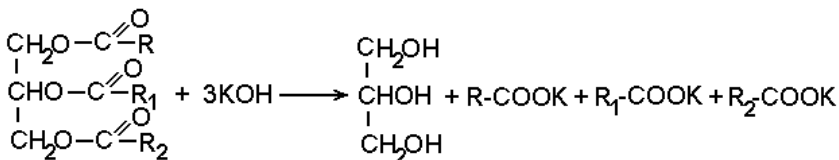
Обладнання і реактиви. Штатив із пробірками, крапельниці, піпетки, олія, спирт, бензол, хлороформ, 1 %-ний розчин карбонату натрію.

Хід роботи. У чотири пробірки поміщають по 0,2-0,3 мл олії, потім у першу додають 5 мл води, в другу — 5 мл спирту, у третю — 5 мл бензолу, у четверту — 5 мл хлороформу. Вміст усіх пробірок енергійно струшують. У першій пробірці олія і вода швидко розділяються на два шари, в другій — утвориться мутний розчин внаслідок недостатньої розчинності олії в спирті, у третій і четвертій — утворяться прозорі розчини.

У дві пробірки вносять по декілька крапель олії. В одну з них додають 2 мл води, в іншу — 2 мл розчину карбонату натрію. Вміст пробірок інтенсивно струшують і спостерігають утворення емульсії. Відмічають відмінності у стійкості емульсій в кожній з двох пробірок.

2. Омилення жиру. Жири під впливом лугів гідролізуються з утворенням мила і гліцерину.

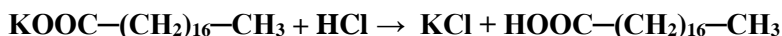
Обладнання і реактиви. Колба ємністю 50 мл, піпетки, нагрівач, олія, 50 %-ний спиртовий розчин гідроксиду калію або натрію.



Хід роботи. У колбу з 1 мл олії додають 20 мл спиртового розчину гідроксиду калію або натрію, вміст колби перемішують і кип'ячать впродовж 60 хвилин. Після омилення розчин розводять до об'єму 20 мл дистильованою водою і в такий спосіб одержують розчин калієвого або натрієвого мила (калієвих або натрієвих солей жирних кислот).

3. Утворення вільних жирних кислот

При додаванні до мила концентрованої соляної кислоти утворюються вільні жирні кислоти



Обладнання і реактиви. Пробірки, піпетки, розчин калієвого мила (використовують отриманий раніше при омиленні жиру), концентрована соляна кислота.

Хід роботи. У пробірку з 2 мл розчину калієвого мила додають 0,5 мл концентрованої соляної кислоти. Жирні кислоти, що утворюються при цьому, нерозчинні у воді і будуть збиратися у верхній частині вмісту пробірки.

4. Утворення нерозчинних кальцієвих мил

При додаванні до розчину калієвого мила розчину солей кальцію утворюються нерозчинні солі жирних кислот



Обладнання і реактиви. Пробірки, піпетки, розчин калієвого мила (використовують отриманий раніше при омиленні жиру), 5 %-ний розчин хлориду кальцію.

Хід роботи. У пробірку з 2 мл розчину калієвого мила вносять 1 мл розчину хлориду кальцію. При цьому спостерігають утворення нерозчинних кальцієвих мил.

Визначення фізико-хімічних констант жирів

1. Визначення кислотного числа жиру.

Кислотністю жиру або кислотним числом жиру називається

число міліграмів їдкою калію, яке необхідне для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру.

Обладнання і реактиви. Колби ємністю 50 мл, піпетки, бюретки, спирт, що нейтралізований за фенолфталеїном, 0,1 моль/л розчин гідроксиду калію, 0,1%-ний розчин фенолфталеїну, риба'ячий жир (соняшникова олія).

Хід роботи. До 1 г жиру (олії) додають 5 мл спирту нейтралізованого за фенолфталеїном, декілька крапель розчину фенолфталеїну, вміст ретельно перемішують для максимального розчинення вільних жирних кислот і титрують розчином гідроксиду калію до появи не зникаючого після збовтування рожевого забарвлення (забарвлення не повинно зникати протягом 0,5-1 хвилини).

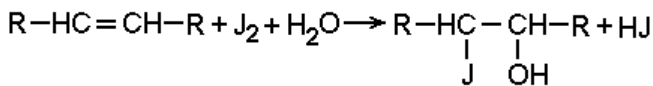
Кількість КОН, мг, або кислотне число (N_a), що пішло на титрування вільних жирних кислот в 1 г олії, буде дорівнювати

$$N_a = V \cdot E \cdot f / m$$

де V — об'єм 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію, витраченого на титрування досліджуваної проби, мл; E — кількість КОМ (5,61 мг), що еквівалентна 1 мл 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію; f — поправочний коефіцієнт на титр 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію; m — наважка жиру, г.

2. Визначення йодного числа жиру. Йодним числом жиру називається число грамів йоду, що прореагувало з 100 г жиру. Це число вказує на вміст у жирі ненасичених жирних кислот.

Визначення йодного числа ґрунтується на реакції приєднання йоду по місцю подвійного зв'язку, що протікає за рівнянням :



Обладнання і реактиви. Дві конічні колби ємністю 50 мл, піпетки, бюретки, риба'ячий жир (соняшникова олія), спиртовий 0,1 моль/л розчин йоду, 1 %-ний розчин крохмалю, 0,05 моль/л розчин гіпосульфїту натрію ($Na_2S_2O_3$).

Хід роботи. У першу колбу поміщають наважку жиру (олії) 0,1-0,2 г (досліджувана проба), у другу — 0,1-0,2 мл води (контрольна проба), додають по 10 мл спиртового розчину йоду

і перемішують. Через 15 хвилин вміст колб відтитрують розчином гіпосульфїту натрію спочатку до появи слабко-жовтого забарвлення, а потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, титрують до зникнення синього забарвлення.

Йодне число (N_j) обчислюють за формулою

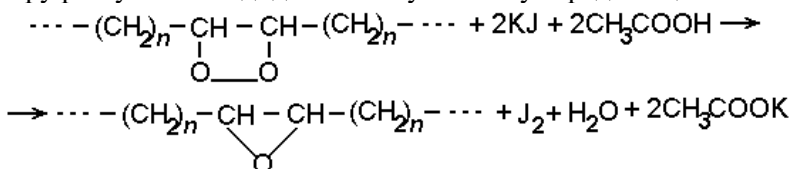
$$(N_j) = (B-A) \cdot f \cdot E \cdot 100 / (m \cdot 1000),$$

де $B-A$ — різниця результатів титрування контрольного і дослідного зразків 0,05 моль/л розчином гіпосульфїту натрію, мл; f — поправочний коефіцієнт на титр 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; E — кількість J_2 (12,69 мг), що еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; m — наважка досліджуваного жиру, г.

3. Визначення перекисного числа в прогірклому жирі.

Перекисним числом жиру називається число мілілітрів розчину гіпосульфїту натрію ($Na_2S_2O_3$), яке необхідне для титрування вільного йоду, що виділився при окисненні йодиду калію пероксидними угрупованнями 1 г жиру.

Метод ґрунтується на здатності пероксидних угруповань жиру реагувати з йодидом калію у кислому середовищі



Оскільки можливе утворення йоду при окисленні йодиду калію киснем повітря, необхідно проводити контрольні проби.

Обладнання і реактиви. Дві конічні колби ємністю 50 мл, піпетки, бюретки, крапельниці, риб'ячий жир (олія), насичений розчин йодиду калію, хлороформ, 0,005 моль/л розчин гіпосульфїту натрію, 1 %-ний розчин крохмалю, льодяна оцтова кислота.

Хід роботи. У першу колбу поміщають наважку жиру (олії) 1 г (досліджувана проба), у другу — 1 мл води (контрольна проба). Потім в обидві колби додають по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 6 мл хлороформу і 1 мл свіжовиготовленого насиченого розчину йодиду калію. Після цього вміст колб струшують протягом 5 хвилин і титрують розчином

гіпосульфїту натрію, попередньо додавши 10 крапель розчину крохмалю як індикатора.

Перекисне число (N_p), мл, обчислюють за формулою

$$N_p = (B - A) \cdot f,$$

де (B-A) — різниця результатів титрування дослідного і контрольного зразків 0,005 моль/л розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; f — поправочний коефіцієнт на титр 0,005 моль/л розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

3. ОБМІН БІЛКІВ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ І БІЛКИ

Мета роботи. Засвоїти методику якісного визначення амінокислот, ознайомитись з методом визначення ізоелектричної точки білків.

1. Нінгідринова реакція

У результаті взаємодії α -амінокислоти з нінгідрином (трикетогідриндегідратом) утворюється забарвлена комплексна сполука. При нагріванні при температурі 70 °C α -амінокислоти окиснюються нінгідрином і піддаються окиснювальному дезамінуванню з утворенням аміаку та декарбоксилуванню з утворенням альдегіду і вуглекислого газу, а нінгідрин при цьому відновлюється.

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

У присутності органічних розчинників, на яких виготовляють розчин нінгідрину (ацетон, етанол) можливе протікання побічних реакцій з утворенням сполуки, що містить своєму складі радикал (R) амінокислоти. Наявність радикалу амінокислоти в складі цієї сполуки обумовлює різне забарвлення (червоне, жовте, блакитне) сполук, що виникають при реакції амінокислот з нінгідрином.

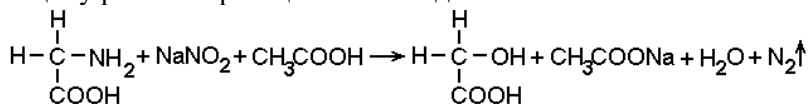
Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, які містять α -аміногрупу і характерна як для деяких карбонових, так і для циклічних амінокислот. У реакції гліцину з нінгідрином утворюється комплексна сполука, яка має синьо-фіолетовий колір.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, крапельниці, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, штатив для пробірок, 1 %-ний водний розчин гліцину, 0,1 %-ний розчин нінгідрину в 95 %-ному розчині ацетону

Хід роботи. В пробірку вносять 5 крапель розчину гліцину і дві краплі розчину нінгідрину. Вміст пробірки добре перемішують на водяній бані при температурі 70 °С впродовж 5 хвилин. У пробірці з'являється синьо-фіолетове забарвлення.

2. Реакція з азотистою кислотою

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



Обладнання і реактиви. Пробірки, крапельниці, штатив для пробірок, 1%-ний водний розчин гліцину, 5 %-ний розчин нітриту натрію, концентрована оцтова кислота.

Хід роботи. У пробірку вносять 5 крапель розчину гліцину, 5 крапель розчину нітриту натрію, 2 краплі концентрованої оцтової кислоти і обережно змішують суміш. Спостерігається виділення газу.

3. Утворення комплексної солі купруму

При нагріванні амінокислоти з карбонатом купруму (II) утворюється сполука купруму, яка має синій колір.

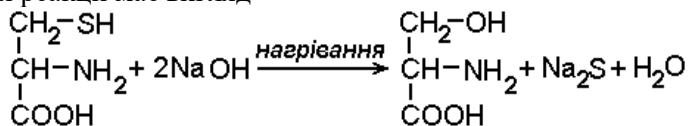
Обладнання і реактиви. Пробірки, штатив для пробірок, пробіркотримач, спиртівка, 1 %-ний водний розчин гліцину, сухий карбонат купруму (II).

Хід роботи. В пробірку вносять 1 мл розчину гліцину, а на кінчику лопатки - сухий карбонат купруму (II). Суміш нагрівають у полум'ї спиртівки до кипіння. Розчин забарвлюється в синій колір.

4. Реакція Фоля на "слабкозв'язану" сірку цистеїну і цистину

При кипінні цистеїну і цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, котрий в

лужному середовищі утворює сульфід натрію. Для цистеїну рівняння реакції має вигляд



Утворений сульфід натрію можна виявити за допомогою іонів важких металів, наприклад, іонів свинцю, що утворюють з йонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для виявлення сульфїду сірки можна використати ацетат свинцю, котрий при взаємодії з гідроксидом натрію утворює плумбіт натрію. В свою чергу плумбіт натрію, реагуючи з сульфїдом натрію, зумовлює утворення сульфїду свинцю.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, штатив з пробірками, піпетки градуйовані, водяна баня, годинник, 0,01-ний водний розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10 %-ного розчину ацетату свинцю додають 10 %-ний розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, який утворився), концентрований розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. У пробірку вносять 1 мл розчину цистеїну, 2 мл концентрованого розчину гідроксиду натрію і 1 мл реактиву Фоля. Суміш добре перемішують і кип'ячать на водяній бані 2 хвилини. Через 3-5 хвилин випадає бурий або чорний осад сульфїду свинцю.

5. Ксантопротейнова реакція

В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін), під дією азотної кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

У реакції гідроксиду натрію з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, яка має оранжевий колір.

Обладнання і реактиви. Пробірки, штатив, піпетки градуйовані, спиртівка, 0,01%-ний водний розчин тирозину, концентрована азотна кислота, 10 %-ний розчин гідроксиду натрію.

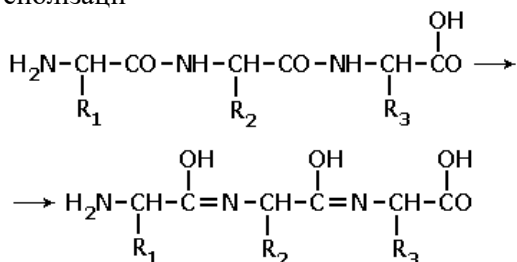
Хід роботи. В пробірку вносять 3 мл розчину тирозину і 1 мл концентрованої азотної кислоти. Суміш обережно нагрівають

до появи жовтого забарвлення. Після охолодження в пробірку додають розчин гідроксиду натрію до появи оранжевого забарвлення.

6. Біуретова реакція на виявлення пептидних зв'язків у білках

Білки (поліпептиди) у лужному розчині в присутності сульфату купруму (II) утворюють комплексні сполуки купруму, зафарбовані в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від числа пептидних зв'язків у молекулі білка.

Спочатку пептидні групи білка зазнають у лужному середовищі енолізації



Енольна форма поліпептиду взаємодіє з гідроксидом купруму (II) і утворює зафарбований у синьо-фіолетовий колір комплекс.

Продукти неповного гідролізу білка (пептиди) дають у біуретовій реакції червоне або рожеве забарвлення.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, розведений 1 %-ний розчин яєчного білка, 10 %-ний розчин гідроксиду натрію (або калію), 1 %-ний розчин сульфату купруму (II).

Хід роботи. В пробірку до 3 мл розчину яєчного білка додають 1 мл розчину гідроксиду натрію, 1-2 краплі розчину сульфату купруму (II) і перемішують. Вміст пробірки забарвлюється у червоно-фіолетовий колір.

7. Кольорові реакції з білками на виявлення карбонових амінокислот

Для виявлення за допомогою кольорових реакцій залишків карбонових амінокислот, що входять до складу білків, використовують характерні для цих амінокислот кольорові

реакції. Так, при виявленні α -амінокислот використовують нінгідринову реакцію, для виявлення залишку аргініну – реакцію Сакагучі, залишків цистину і цистеїну – реакцію Фоля.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, штатив для пробірок, піпетки градуйовані, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1 %-ий розчин яєчного білка, 1 %-ний розчин нінгідрину в 95 %-ному розчині ацетону, реактив Фоля (с.17).

Хід роботи

А. Нінгідринова реакція. В пробірку до 1 мл розчину яєчного білка додають 3 краплі розчину нінгідрину. Суміш перемішують і ставлять на водяну баню при температурі 70 °С на 5 хвилин. Спостерігають утворення синьо-фіолетового забарвлення, що свідчить про присутність у молекулі білка залишків α -амінокислот.

Б. Реакція Фоля. В пробірку до 3 мл розчину яєчного білка додають 3 мл реактиву Фоля і після перемішування кип'ятять на водяній бані впродовж 2 хвилин. Після охолодження спостерігають утворення бурого або чорного осаду, що свідчить про наявність у молекулі білка залишків цистеїну і цистину.

8. Кольорові реакції з білками на виявлення циклічних амінокислот

Для виявлення залишків циклічних амінокислот у складі молекули білка за допомогою кольорових реакцій використовують характерні для цих амінокислот реакції. Так, при виявленні залишків ароматичних амінокислот використовують ксантопротеїнову реакцію, залишків тирозину – реакцію Мілона, залишків триптофану – реакції Адамкевича та Вуазене, залишків гістидину і тирозину – реакцію Паулі.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, штатив для пробірок, піпетки градуйовані, крапельниці, термометр лабораторний, ванночка з льодом, годинник, 1 %-ний розчин яєчного білка, концентрована сірчана кислота, 10 %-ний розчин карбонату натрію, 2,5 %-ний розчин формальдегіду, 1 %-ний розчин сульфанілової кислоти в 5 %-ому розчині соляної кислоти, 0,5 %-ний розчин нітриту натрію.

Хід роботи.

А. Реакція Вуазене. У пробірку вносять 2 мл розчину яєчного білка і 1 краплю розчину формальдегіду. До отриманої суміші, ретельно перемішуючи, додають обережно краплями 6 мл концентрованої сірчаної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Через 10 хвилин у пробірку вливають, перемішуючи, 10 крапель розчину нітриту натрію. Спостерігається утворення синьо-фіолетового забарвлення.

Б. Реакція Паулі. У пробірку вносять 1 мл розчину сульфанілової кислоти в розчині соляної кислоти, 2 мл розчину нітриту натрію і після ретельного перемішування 2 мл розчину яєчного білка і 6 мл розчину карбонату натрію. Після перемішування суміш забарвлюється у вишнево-червоний колір.

9. Визначення ізoeлектричної точки білків

Визначення ізoeлектричної точки білків ґрунтується на здатності білків під дією осаджувачів, що викликають їх дегідратацію, при значенні рН середовища, що відповідає їх ізoeлектричній точці, легко осаджуватися.

Обладнання і реактиви. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, 1 %-ний розчин желатину, 0,1 і 1 моль/л розчини оцтової кислоти, 0,1 моль/л розчин ацетату натрію, 96 %-ний етиловий спирт або 95 %-ний ацетон, дистильована вода.

Хід роботи. У 6 пробірок поміщають відповідну кількість мл розчинів оцтової кислоти, ацетату натрію, дистильованої води і желатину, що вказані в таблиці 1. Вміст кожної пробірки перемішують. Потім в усі пробірки повільно по стінці доливають по 2 мл спирту або ацетону. Через 30 хвилин визначають ізoeлектричну точку. Вона буде відповідати рН пробірки з максимальним ступенем помутніння.

4. ЯКІСНІ ТА КІЛЬКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ

Мета роботи. Засвоїти методику якісного визначення вмісту окремих водорозчинних і жиророзчинних вітамінів.

1. Якісні реакції на вітамін В₁ (тіамін)

А. Реакція з діазореактивом. В основі реакції полягає здатність вітаміну В₁ у лужному середовищі з діазореактивом (суміш солянокислого або сірчанокислого розчину сульфанілової кислоти з розчином нітриту натрію) утворювати складну комплексну сполуку оранжевого або червоного кольору.

Обладнання і реактиви. Штатив з пробірками, піпетки, скальпель, розчин сульфанілової кислоти (1%-ний), 5 %-ний розчин нітриту натрію, 10%-ний розчин бікарбонату натрію, тіамін у порошок, або 5% його розчин.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл розчину сульфанілової кислоти і 1 мл розчину нітриту натрію. Утворюється діазореактив. Сюди ж вносять невелику кількість (на кінчику скальпеля) порошок або 0,5 мл розчину тіаміну і по стінці пробірки обережно додають 1 мл розчину Na₂CO₃.

На межі двох рідин з'являється кільце оранжевого або червоного кольору.

Б. Реакція окиснення тіаміну у тіохром

Вітамін В₁ в лужному середовищі під дією гексоціано-III феррату калію окиснюється у тіохром – пігмент жовтого кольору, який в ізобутиловому спирті дає інтенсивну синю флюоресценцію.

Обладнання і реактиви. Джерело ультрафіолетового випромінювання (флюороскоп), штатив з пробірками, піпетки, тіамін в концентрації 5 мкг в 1 мл, 1%-ний розчин K₃Fe(CN)₆, 30%-ний розчин NaOH, ізобутиловий спирт.

Хід роботи. До 1 мл розчину вітаміну В₁ додають 2 мл суміші (1 мл розчину K₃Fe(CN)₆ і 1 мл розчину NaOH), ретельно перемішують і залишають на три хвилини. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту, енергійно і рівномірно струшують протягом 2 хв. Ізобутиловий екстракт тіохрому в

ультрафіолетових променях має інтенсивну синю флуоресценцію. Це дуже чутлива специфічна реакція.

2. Якісні реакції на вітамін В₂ (рибофлавін)

Реакція відновлення рибофлавіну. При додаванні металічного цинку до концентрованої соляної кислоти виділяється водень, який відновлює жовтий рибофлавін спочатку до родофлавіну (проміжна сполука) червоного кольору, а потім у безбарвний лейкофлавін.

Обладнання і реактиви. Пробірки, піпетки, концентрована HCl, металічний цинк, 0,025%-ний розчин вітаміну В₂.

Хід роботи. У пробірку наливають 1 мл розчину вітаміну В₂, 0,5 мл концентрованої соляної кислоти і занурюють шматочок металічного цинку. Водень, який виділяється реагує з рибофлавіном, відновлюючи його, і рідина поступово забарвлюється у рожевий колір, а потім знебарвлюється. При збовтуванні знебарвленого розчину лейкофлавін знову окиснюється киснем повітря у рибофлавін.

3. Якісні реакції на вітамін В₆ (піридоксин)

Реакція з хлоридом феруму (III). При взаємодії піридоксину з розчином хлориду феруму рідина забарвлюється у червоний колір внаслідок утворення комплексної солі типу феноляту феруму.

Обладнання і реактиви. Пробірки, піпетки, водний розчин (1%-ний) вітаміну В₆, 1%-ний розчин FeCl₃.

Хід роботи. У пробірці змішують 1 мл водного розчину піридоксину і 2 краплі розчину хлориду феруму. Суміш струшують. Спостерігають забарвлення рідини у червоний колір.

4. Якісні реакції на вітамін С (аскорбінову кислоту)

Аскорбінова кислота здатна легко вступати в окисно-відновні реакції і відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, гексаціано-(III) ферат калію, нітрат аргентуму, метиленовий синій. При цьому окиснена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синій колір) і метиленовий синій відновлюються до безбарвних лейкосполук, а K₃Fe(CN)₆ відновлюється до K₄Fe(CN)₆, який з йонами 3-валентного феруму дає сіль Fe₄[Fe(CN)₆]₃ і сине або

зелене забарвлення. Реакція відновлення метиленового синього відбувається за рівнянням (рис. 1).

Обладнання і реактиви: Штатив із пробірками, крапельниці, піпетки градуйовані, термостат, 0,1 %-ний розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 10 %-ний розчин соляної кислоти, 0,1 %-ний розчин аскорбінової кислоти, 0,01 %-ний розчин метиленового синього, 10 %-ний розчин карбонату натрію, 1 %-ний розчин гексоціано-(III) ферату калію $K_3Fe(CN)_6$, 1 %-ний розчин хлориду феруму (III).

Хід роботи

А. Реакція з 2,6-дихлорфеноліндофенолом

У пробірку вносять 0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 1-2 краплі розчину соляної кислоти і краплями розчин аскорбінової кислоти. Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу знебарвлюється.

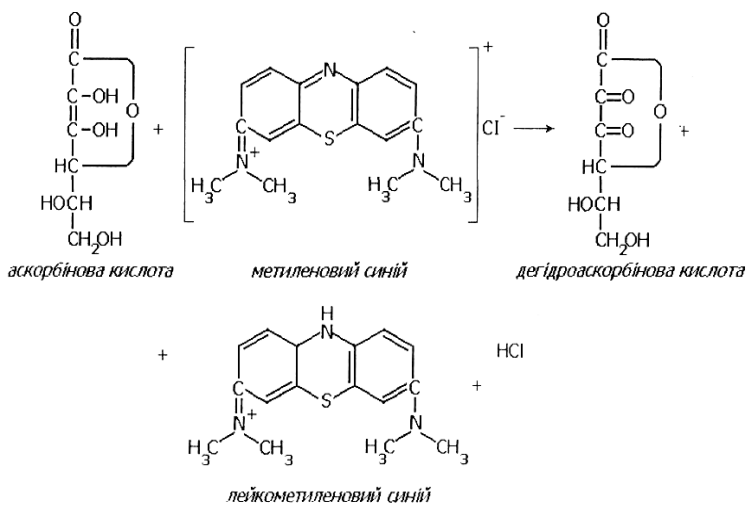


Рис. 1. Реакція відновлення метиленового синього

Б. Реакція з метиленовим синім

У дві пробірки вносять по 1 краплі розчину метиленової сині і по одній краплі розчину карбонату натрію. У першу вливають 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, у другу - 5 крапель води і ставлять обидві пробірки в термостат при

температурі 37°-40° С. Через певний час у пробірці з розчином аскорбінової кислоти рідина знебарвлюється.

В. Реакція з гексаціано-(ІІІ) ферратом калію

До 1 мл розчину аскорбінової кислоти додають 1 мл розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 0,5 мл розчину $FeCl_3$. Спостерігають утворення синьо-зеленого розчин хлориду феруму (ІІІ).

5. Якісні реакції на вітамін А (ретинол)

Вітамін А в бензольному розчині з концентрованою сірчаною кислотою утворює комплекс, забарвлений у синій колір, а при реакції з сульфатом феруму (ІІ) у кислому середовищі дає червоно-рожеву сполуку.

Обладнання і реактиви. Штатив з пробірками, крапельниці, 0,05%-ний масляний розчин вітаміну А у хлороформі або розчин риб'ячого жиру в хлороформі у співвідношенні 1:5, концентрована сірчана кислота, льодяна оцтова кислота, насичена сульфатом феруму (ІІ).

Хід роботи

А. Реакція Друммонда. У пробірку до 2-3 крапель розчину вітаміну А додають 2-3 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки забарвлюється у синій колір, який через деякий час переходить у фіолетовий або бурий.

Б. Реакція з сульфатом феруму (ІІ). У пробірку до 2-3 крапель розчину риб'ячого жиру в хлороформі або масляного розчину вітаміну А в хлороформі додають 5-6 крапель льодяної оцтової кислоти, насиченої сульфатом феруму (ІІ), 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. З'являється блакитне забарвлення, яке поступово переходить у червоно-рожеве. Каротини дають при цій реакції зелене забарвлення.

6. Якісні реакції на вітамін D (кальциферол, холекальциферол)

При нагріванні хлороформного розчину вітаміну D або риб'ячого жиру з сумішшю аніліну і концентрованої соляної кислоти розчин забарвлюється у червоний колір. Розчин вітаміну D або риб'ячий жир з розчином бром у хлороформі набуває зелено-блакитного кольору.

Обладнання і реактиви. Штатив з пробірками, крапельниці, водяна баня, хлороформний розчин вітаміну D,

хлороформ, аніліновий реактив – анілін з концентрованою HCl (15:1), розчин бром у хлороформі (1:60).

Хід роботи.

А. Реакція з аніліном. У суху пробірку до 1-2 крапель риб'ячого жиру або розчину вітаміну D в хлороформі і вносять 1 краплю анілінового реактиву. Після перемішування утворена емульсія жовтого кольору при нагріванні набуває червоного кольору. Через 1-2 хв емульсія розділяється на два шари, з яких нижній забарвлений у інтенсивний червоний колір.

Б. Реакція з бромом. У пробірку до 2-4 крапель розчину вітаміну D в хлороформі або риб'ячого жиру додають 4-5 крапель розчину бром у хлороформі. Суміш у пробірці забарвлюється поступово у зелено-блакитний колір.

7. Якісні реакції на вітамін К (філохінони, менахінони)

Спиртовий розчин вітаміну К в лужному середовищі з диетилмалоновим ефіром дає червоно-фіолетове забарвлення, а в присутності диетилдитіокарбому в цих умовах утворює сполуку, забарвлену в блакитний колір. При наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір, що обумовлено утворенням 1-метил-2-феніламінонафтохінону.

Обладнання і реактиви. Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниці, 1 %-ний розчин диетилмалонового ефіру, 1 %-ний розчин гідроксиду калію, спиртовий розчин вітаміну К, 5 %-ний розчин диетилдитіокарбому, 4 %-ний спиртовий розчин гідроксиду натрію, розчин аніліну, 0,05 %-ний спиртовий розчин вікасолу.

Хід роботи

А. Реакція з диетилмалоновим ефіром. У пробірку до 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 0,5 мл розчину диетилмалонового ефіру і 0,1 мл розчину гідроксиду калію. Утворюється червоно-фіолетове забарвлення.

Б. Реакція з диетилдитіокарбому. У пробірку до 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 2 мл розчину диетилдитіокарбому і 0,5 мл розчину гідроксиду натрію в етанолі. Розчин набуває блакитного забарвлення.

В. Реакція з аніліном. У пробірку з 1 мл спиртового розчину вікасолу додають 2 краплі аніліну. Після перемішування вміст пробірки забарвлюється в червоний колір.

8. Якісні реакції на вітамін Е (токоферол)

Взаємодія α -токоферолу з концентрованою азотною кислотою призводить до забарвлювання реакційної суміші у червоний колір. Це зумовлено тим, що продукт окиснення α -токоферолу має хіноїдну структуру. При взаємодії з хлоридом залізом (III) α -токоферол окиснюється до α -токоферилхінону – сполуки, забарвленої у червоний колір.

Обладнання і реактиви. Штатив з пробірками, крапельниці, піпетки, 0,1%-ний спиртовий розчин α -токоферолу, концентрована азотна кислота, 1%-ний розчин хлориду феруму (III).

Хід роботи.

А. Реакція з азотною кислотою. У суху пробірку вносять 5 крапель спиртового розчину вітаміну Е і додають 1 мл концентрованої HNO_3 . Пробірку інтенсивно струшують і спостерігають поступову появу червоного забарвлення.

Б. Реакція з хлоридом феруму. У суху пробірку вносять 0,5 мл спиртового розчину α -токоферолу, потім 0,5 мл розчину $FeCl_3$ і старанно перемішують вміст пробірки. Спостерігають появу червоного забарвлення.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія : навч. посіб. К. : Вища школа, 1995. 536 с.
2. Гроховська Ю. Р. Біохімія гідробіонтів : навч.-метод. посіб. Рівне : НУВГП, 2008. 180 с.
3. Губський Ю. І. Біологічна хімія : підручник для вищих медичних закладів. Київ-Тернопіль : Укрмедкнига, 2000. 508 с.
4. Кононський О. І. Біохімія тварин: підручник для підготовки фахівців в аграрних вищих навчальних закладах II-IV рівнів акредитації. К. : Вища школа, 2006. 454 с.
5. Лисиця А. В. Біохімія: Практикум : навч. посіб. Суми : Університетська книга, 2009. 240 с.
6. Фізіологія риб : практикум / П. А. Дехтярьов та ін. К. : Вища школа, 2001. 128 с.
7. Чайченко Г. М., Цибенко В. О., Сокур В. Д. Фізіологія людини і тварин. К. : Вища школа, 2003. 463 с.
8. Шевряков М. В., Яковенко Б. В., Явоненко О. Ф. Практикум з біологічної хімії : навч.-метод. посіб. Суми : Університетська книга, 2003. 204 с.