

Vilniaus pedagoginis universitetas
Gamtos mokslų fakultetas

Irena Vitėnienė

BIOLOGINĖ CHEMIJA

Metodinė priemonė

Vilnius, 1999

UDK 577(075.8)
Vi325

Metodinė priemonė apsvastyta Gamtos mokslų fakulteto taryboje 1999 02 01,
protokolas Nr. 22

Recenzavo dr. J. R. Stundžia

PRATARMĖ

Biologinės chemijos mokymas yra svarbus rengiant chemijos ir biologijos mokytojus. Biologinė chemija - pagrindas, gilinantis į biologinių sistemų esmę. Tai eksperimentinis mokslas, tyrinėjantis gyvuosiuose organizmuose randamas medžiagas, jų struktūras, savybes. Šiuolaikinis biologas turi būti ir biochemikas. Biochemija padeda suprasti augalų, gyvūnų, žmonių fiziologiją; jos skyriai (angliavandeniai, baltymai ir kt.) įtraukti ir į mokyklų programas.

Ši mokymo priemonė, skirta chemijos ir biologijos specialybių studentams, padės rasti atsakymus į kai kuriuos biochemijos kurso metu nagrinėjamus klausimus, o atlikti esminiai bandymai padės papildyti teorines žinias. Kadangi laboratoriniams darbams skirtas laikas yra ribotas, ši metodinė priemonė padės studentams lengviau juos atlikti. Ji taip pat gali būti naudinga būsiesiems chemijos ir biologijos mokytojams demonstruojant bandymus pamokų metu.

1. ANGLIAVANDENIAI

Angliavandeniai plačiai paplitę gamtoje ir yra labai svarbi augalinių bei gyvulių ląstelių sudedamoji dalis. Pagal cheminę prigimtį angliavandeniai yra polioskialdehidai arba polioksiketonai. Jie organizmuose atlieka įvairias funkcijas: yra energijos šaltinis metabolizmo procesų metu, įeina į kitų klasių junginių (nukleino rūgščių, kofaktorių) sudėtį, yra pagrindinis augalų ir bakterijų sienelių komponentas.

Angliavandeniai pagal struktūrą skirstomi į paprastuosius ir sudėtinius.

Paprastieji angliavandeniai arba monosacharidai turi nevienodą anglies atomų skaičių grandinėje: 3 C atomai - triozės, 4 C atomai - tetrozės, 5 C atomai - pentozės ir t.t. Gamtoje labiausiai paplitusios pentozės (ksilozė, arabinozė, ribozė, dezoksiribozė, ribuliozė) ir heksozės (gliukozė, galaktozė, fruktozė).

Sudėtiniai cukrai arba polisacharidai sudaryti iš daugelio vienodų ar skirtingų monosacharidų molekulių, sujungtų glikozidinėmis jungtimis. Hidrolizuojant rūgštimis arba fermentais, jie skyla iki monosacharidų. Polisacharidai skiriasi ir pagal juos sudarančių monosacharidų konfigūraciją, pvz.: krakmolą, glikogeną sudaro α -gliukozės molekulių liekanos, celiuliozę sudaro α -gliukozės ir β -gliukozės molekulių liekanos, inuliną - fruktozės molekulių liekanos.

Monosacharidų (cukrų) karbonilinėms grupėms būdingos stiprios redukcinės savybės, elektrono-donorinių grupių prijungimo reakcijos: prie karbonilinės grupės gali prisijungti viena iš tos pačios molekulės OH grupių, susidaro ciklinis pusiauacetalis. Ši ciklinė forma yra pusiausviroje su laisva aldehidine ar ketonine grupe. Pentozės ir heksozės gali ciklizuoti, o sudėtingi monomerai - sudaryti stabilius polimerus.

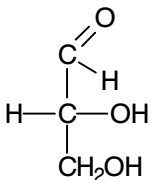
Cukrai turi keletą chiralinių centrų, todėl įvairūs izomerai vadinami skirtingai, pvz., gliukozė, manozė ir galaktozė - tai trys iš aštuonių galimų aldoheksozių stereoizomerų.

Angliavandeniai dalyvauja įvairiose fermentacijos reakcijose: sviesto, pieno, acto ir kt. Gyvulių organizmuose jie lengvai oksiduojasi, teikdami daug energijos.

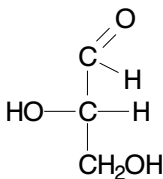
1.1. MONOSACHARIDAI IR DISACHARIDAI

Monosacharidai - tai daugiahidroksiliai alkoholiai, turintys aldehidines arba ketonines grupes.

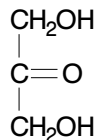
Monosacharidai, kurių sudėtyje yra trys anglies atomai: glicerolio aldehidas (aldotriozė) ir dioksiacetonas (ketotriozė). Gliceraldehidas turi vieną asimetrinį centrą, todėl gali būti dviejose enantiometrinėse formose - D- ir L-:



D-gliceraldehidas



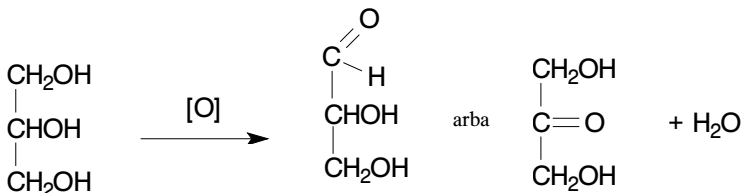
L-gliceraldehidas



dioksiacetonas

1.1.1. MONOSACHARIDŲ GAVIMAS. FIŠERIO REAKCIJA

Monosacharidus galima gauti oksiduojant daigiahidroksilius alkoholius - gli-cerolį, manitą ir kt.:



REAGENTAI: glicerolis, 10% sodos tirpalas, bromo vanduo.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įlašinama 5 lašai glicerolio, įpilama 2 ml 10% sodos tirpalo ir 1 ml Br₂ vandens. Mišinys truputį pašildomas degiklio liepsnoje, kol išnyksta geltona bromo spalva.

Aldehidinės grupės atsiradimas įrodomas Tromerio reakcija (gautas tirpalas pašarminamas iki šarminės terpės, įpilama vario sulfato tirpalo, palaukiama, kol iškrenta nuosėdos, mišinys pašildomas degiklio liepsnoje, žr. 1.1.2.1.).

Užrašykite reakcijos lygtį. Kaip keitėsi spalvos? Kokios spalvos nuosėdos iškrito?

1.1.2. REAKCIJOS, ĮRODANČIOS CUKRŲ REDUKUOJANČIAS SAVYBES

Angliavandenių aldehidinės ir ketoninės grupės šarminėje terpėje lengvai oksiduojasi, redukuodamos kai kuriuos metalus: sidabrą, varį (susidaro CuOH - geltonos spalvos nuosėdos, Cu₂O - oranžinės nuosėdos), bismutą, geležį ir kt.

1.1.2.1. Tromerio reakcija

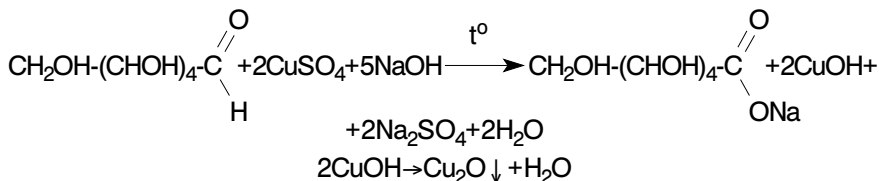
REAGENTAI: 1% gliukozės (ar kitos aldozės), 10% NaOH, 1% CuSO₄ tirpalai.

DARBO EIGA.

1. Į mėgintuvėlį įpilama 2 ml gliukozės tirpalo, 10% NaOH iki šarminės ter-

pės (tikrinama indikatoriniu popierėliu) ir keli lašai CuSO_4 tirpalo; mišinys šildomas degiklio liepsnoje, kol užverda.

Kokių spalvų ir kokie junginiai susidaro šios reakcijos metu?



2. Kontrolinė reakcija atliekama taip pat, tik į mišinį vietoje gliukozės įpilama vandens.

Kokios spalvos nuosėdos susidarė?

1.1.2.2. Felingio reakcija

Ši reakcija panaši į Tromerio reakciją. Skiriasi nuo jos tuo, kad į mišinį kartu su NaOH ir CuSO_4 pridedama Segneto druskos, kuri sujungia $\text{Cu}(\text{OH})_2$ perteklių ir todėl nesusidaro nuosėdos.

REAGENTAI: 1% gliukozės tirpalas, Felingio tirpalas.

I Felingas: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6,9278 g/100 ml H_2O)

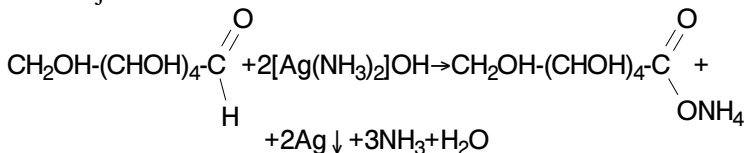
II Felingas: Segneto druska (34,6 g), NaOH (14 g), ištirpinta 100 ml H_2O .

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama po 1 ml Felingio I ir II tirpalų, 1-2 ml gliukozės ir mišinys šildomas degiklio liepsnoje, kol užverda. Tirpalo spalva tampa oranžine.

1.1.2.3. Sidabro veidrodžio reakcija

REAGENTAI: 1% gliukozės, 3% AgNO_3 , 10% NaOH , konc. amoniako tirpalai.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama po 1 ml sidabro nitrato ir natrio šarmo tirpalų. Iškrinta sidabro oksido nuosėdos, kurios ištirpinamos atsargiai lašinant amoniaką ir pakratant mišinį įlašinus kiekvieną lašą. Į gautą amoniakinį sidabro oksido tirpalą įlašinama 1-2 ml gliukozės tirpalo ir mišinys atsargiai, nemaišant, šildomas vandens vonioje.



Ką matote ant mėgintuvėlio sienelių?

Pastaba. Mėgintuvėlis turi būti labai švarus, priešingu atveju iškrinta pilkos sidabro nuosėdos.

1.1.2.4. Muro testas aldehidinei grupei

Šildant cukrus, turinčius aldehidinių grupių, šarminėje terpėje susidaro tamsiai rudos spalvos karamelės kvapo polimerizacijos produktai.

REAGENTAI: 1-5% gliukozės, 10% NaOH tirpalai, sacharozės milteliai.

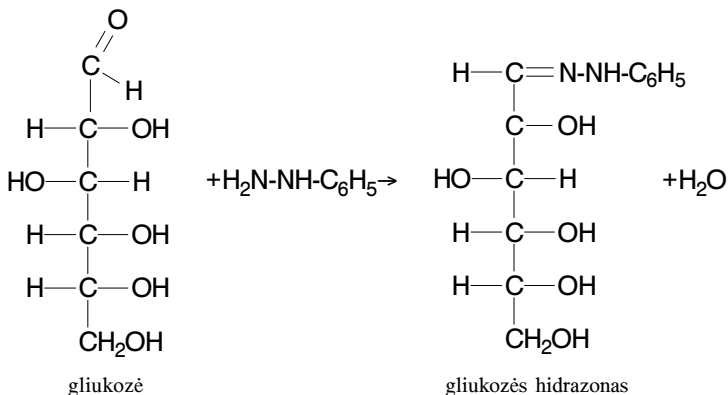
DARBO EIGA.

1. Į mėgintuvėlį įpilama 2-3 ml gliukozės tirpalo ir tiek pat natrio šarmo tirpalo, sumaišoma. Mišinys šildomas degiklio liepsnoje, kol užverda. Kokią spalvą matote? Kokį kvapą jaučiate? (Kvapą geriau jaučiamas į mišinį įpylus 10% H_2SO_4).
2. Į deginimo šaukštelį įberiama žiupsnelis sacharozės ir kaitinama degiklio liepsnoje. Sacharozė dervėja. (Šaukštelį tuoj pat nuplaukite.)

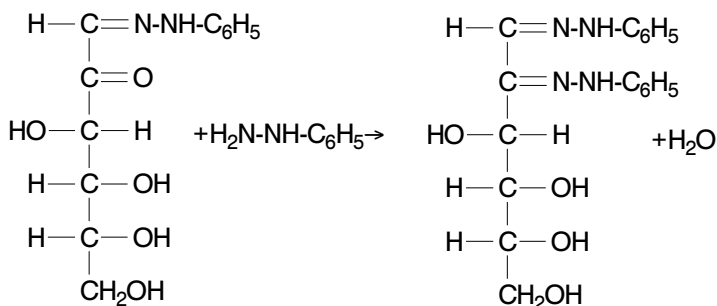
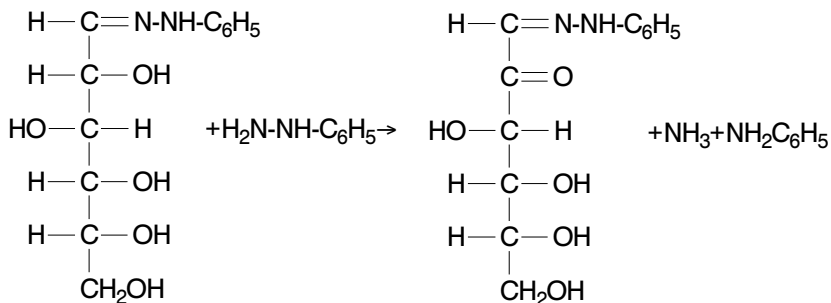
1.1.2.5. Ozazonų susidarymas iš monosacharidų

Gliukozė, jungdamasi su fenilhidrazinu, sudaro hidrazoną ir ozazoną:

- a) jei reakcija vyksta alkoholiniame tirpale, nedalyvaujant rūgščiai, susidaro hidrazonas:

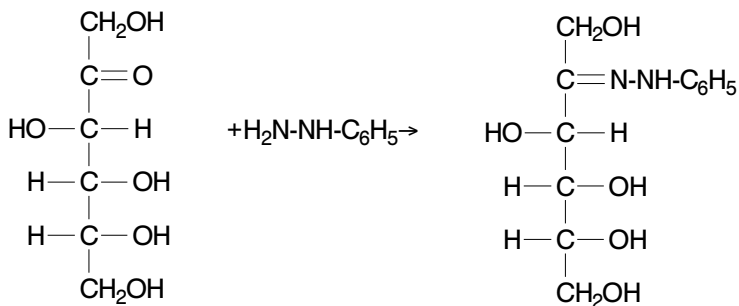


b) jei reakcija vyksta rūgščiame tirpale, susidaro ozazonas:

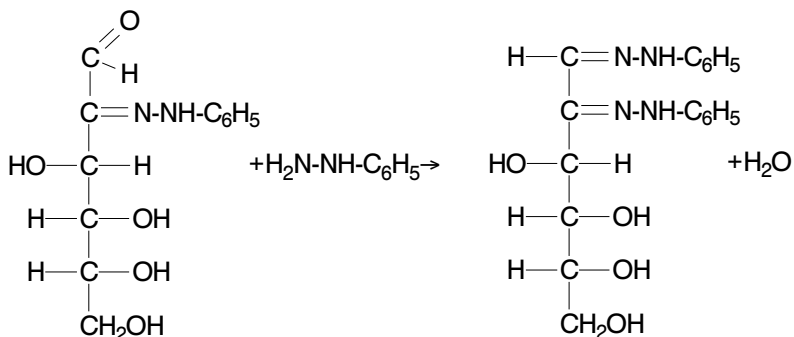
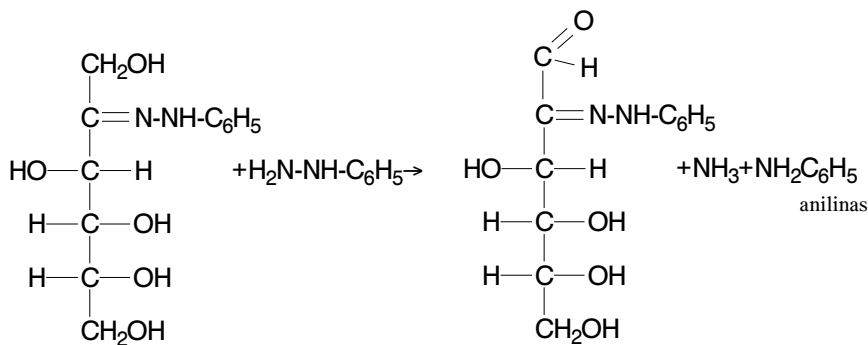


gliukozės ozazonas

Fruktozės ozazono susidarymas:



fruktozė



fruktozės ozazonas

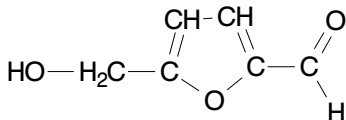
Gliukozė ir fruktozė, reaguodamos su fenilhidrazinu, sudaro vienodos struktūros ir formos ozonų kristalus. Kitų monosacharidų pvz., galaktozės, ozazonai skiriasi. Pagal ozonų kristalų formą galima spręsti, iš kokių monosacharidų jie kilę.

REAGENTAI: 5% gliukozės (ar kito monosacharido) tirpalas, sotus natrio acetato tirpalas (CH_3COONa), sotus fenilhidrazino tirpalas arba sausas mišinys (fenilhidrazino chloridas ir natrio acetatas, masių santykis 1:2).

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml monosacharido tirpalo, 2 ml fenilhidrazino ir 2 ml natrio acetato tirpalų (arba žiupsnelis sauso mišinio). Dažnai purtant mėgintuvėlį, mišinys šildomas verdančio vandens vonioje 10-20 min. Lėtai vėsinant susidaro geltonos spalvos kristalai. Pažiūrėję pro mikroskopą, nupieškite juos sąsiuvinyje.

1.1.2.6. Selivanovo reakcija ketoheksozėms atpažinti

Veikiant koncentruota druskos rūgštimi ir šildant, fruktozė netenka trijų vandens molekulių ir virsta oksimetilfurfurolu, kuris veikiamas rezorcino nusidažo raudonai vyšnine spalva.



oksimetilfurfurolas

REAGENTAI: 1-5% fruktozės, gliukozės, laktozės ir sacharozės tirpalai, konc. HCl, rezorcinas.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlius įpilama po 1 ml visų cukrų tirpalų, po tiek pat konc. druskos rūgšties ir po kelis kristaliukus rezorcino (arba po 1 ml jau paruošto Selivanovo reagento - rezorcino, ištirpinto HCl). Mėgintuvėliai pažymimi ir 5-10 min. laikomi verdančio vandens vonioje.

Kokiomis spalvomis nusidažė cukrai? Kodėl? Rezultatus užrašykite.

1.1.2.7. Reakcijos hidroksilinėms grupėms pažinti

Monosacharidai ir disacharidai, jungdamiesi su vario jonais, sudaro mėlynos spalvos sacharatus.

REAGENTAI: glicerolis, 5% gliukozės, 10% CuSO₄, 10% NaOH tirpalai.

DARBO EIGA.

1. Į vieną mėgintuvėlį įpilama keli lašai glicerolio, 1 ml NaOH, keli lašai CuSO₄ tirpalų;
2. Į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml gliukozės, 1 ml NaOH ir keli lašai CuSO₄ tirpalų.

1.1.2.8. Fruktozės kiekybinė analizė

Selivanovo pasiūlyta reakcija naudojama fruktozės bei jos esterių (fruktozės monofosfato ir difosfato) kokybinei ir kiekybinei analizei.

REAGENTAI: 1% rezorcino 95% etilo alkoholyje, 30% HCl ($\rho = 1,15 \text{ g cm}^{-3}$) tirpalai, 0,05-0,1 mg cm⁻³ standartinis fruktozės tirpalas 1N druskos rūgštyje (apsaugo fruktozę nuo skilimo).

DARBO EIGA.

1. Kalibracinė kreivė: į 4 mėgintuvėlius įpilama atitinkamai 0,1, 0,2, 0,3, ir 0,5 ml standartinio fruktozės tirpalo, į kiekvieną įpilama iki 1 ml distiliuoto vandens; po to įpilama po 1 ml rezorcino ir po 1 ml 30% HCl tirpalų, visas

gerai išmaišoma, mėgintuvėliai 8 min. termostatuojami 80°C temperatūros vandens vonioje (vienu metu visi turi vienodai kaisti); mėgintuvėliai išimami iš termostato, atšaldomi vandenyje ir kolorimetruojami.

2. Kontrolei naudojami tie patys rezorcino ir druskos rūgšties tirpalai, tik vietoj fruktozės tirpalo pilama 1 ml vandens;
3. Užduotis - nustatyti duoto fruktozės tirpalo koncentraciją.

SKAIČIAVIMAS. Fruktozės kiekis apskaičiuojamas, palyginus gautas absorbcijos reikšmes su kalibracinės kreivės duomenimis. Abscisių ašyje X pažymima tirpalo tankio reikšmė (spektrofotometro duomenys, OD), ordinačių ašyje Y pažymima standartinio tirpalo koncentracija (mg cm^{-3}). Per gautus taškus brėžiama kalibracinė kreivė. Ištyrus duotą fruktozės tirpalą spektrofotometru, pagal kalibracinę kreivę nustatoma jos koncentracija. Bangos ilgis 500 nm, kiuvetė - 0,5 cm.

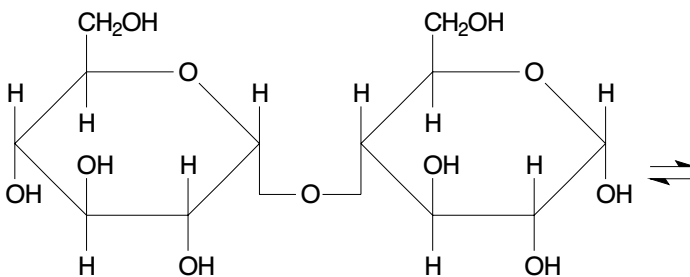
Norint apskaičiuoti fruktozės kiekį, esantį fruktozės difosfate, reikia gautą po spektrofotometravimo reikšmę padauginti iš koeficiento 1,9. (Fruktozės difosfato spalvos intensyvumas sudaro tik 52,5% laisvos fruktozės spalvos intensyvumo ($100/52,5 = 1,9$)).

Darbą reikia atlikti labai kruopščiai, naudojant švarius, sausus mėgintuvėlius.

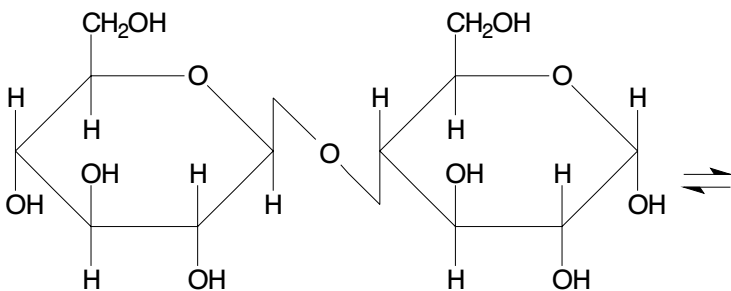
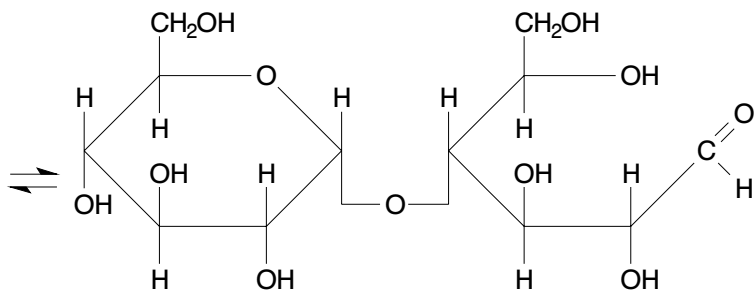
1.1.3. DISACHARIDŲ SAVYBĖS IR SPECIFINĖS REAKCIJOS

Disacharidus sudaro dvi monosacharidų molekulės, susijungusios glikozidine jungtimi. Pagal monosacharidų molekulių jungimosi būdą disacharidai turi redukuojančias grupes arba jų neturi:

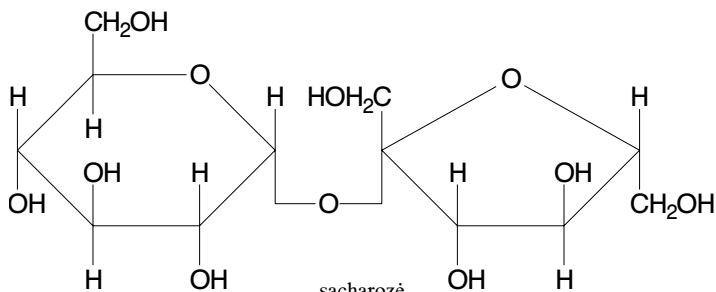
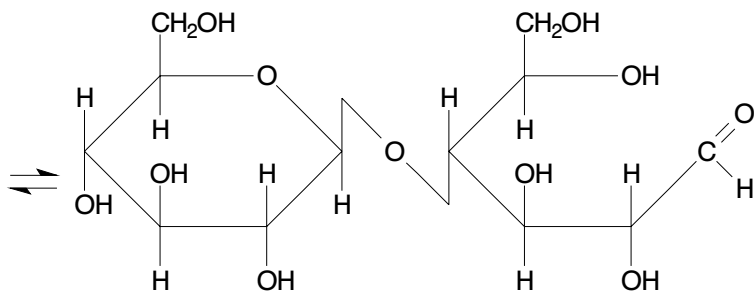
- maltozės ir laktozės molekulėse yra laisvos aldehydinės grupės, todėl joms būdingos redukcinės savybės;
- sacharozė neturi nei laisvos aldehydinės, nei ketoninės grupės, todėl negali būti reduktoriumi.



maltozė



laktozè



MALTOZĖ - salyklinis cukrus, sudarytas iš dviejų α -D-gliukozės molekulių, sujungtų $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidine jungtimi.

LAKTOZĖ - pieno cukrus, sudarytas iš α -D-galaktozės ir α -D-gliukozės molekulių, sujungtų $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidine jungtimi.

SACHAROZĖ sudaryta iš α -D-gliukozės ir α -D-fruktozės molekulių, sujungtų $\alpha(1\rightarrow2)$ glikozidine jungtimi. Ši jungtis susidaro tarp dviejų anomerinių anglies atomų. Molekulė negali pereiti į atviros grandinės formą, negali atsirasti ir laisva aldehidinė ar ketoninė grupė, todėl sacharozei nebūdingos redukcinės savybės.

1.1.3.1. Disacharidų redukcinės savybės

REAGENTAI: 1-5% sacharozės, maltozės ir laktozės, 1-5% CuSO_4 , 10% NaOH tirpalai.

DARBO EIGA. Į tris mėgintuvėlius pilama po 1 ml visų disacharidų tirpalų, NaOH iki šarminės terpės ir po kelis lašus CuSO_4 , kol iškris mėlynos nuosėdos. Mėgintuvėliai pašildomi degiklio liepsnoje (Tromerio reakcija, žr. 1.1.2.1.).

Kur reakcija nevyko? Kodėl? Užrašykite reakcijų lygtis.

1.1.3.2. Sacharozės hidrolizė

REAGENTAI: 10% HCl (arba 10% H_2SO_4), 10% NaOH, 5% CuSO_4 tirpalai.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 3 ml sacharozės tirpalo ir 1 ml druskos rūgšties tirpalo. Mišinys pavirinamas degiklio liepsnoje, po to pašarminamas NaOH tirpalu (iki šarminės terpės), įlašinami keli lašai CuSO_4 ir mišinys pašildomas degiklio liepsnoje (Tromerio reakcija, žr. 1.1.2.1.).

Kokios reakcijos vyksta mėgintuvėlyje?

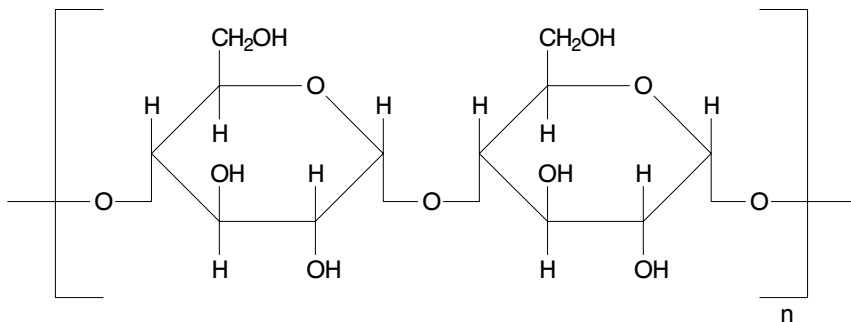
1.1.3.3. Spalvinė sacharozės atpažinimo reakcija

REAGENTAI: 5% sacharozės, 5% NaOH, 2% $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ tirpalai.

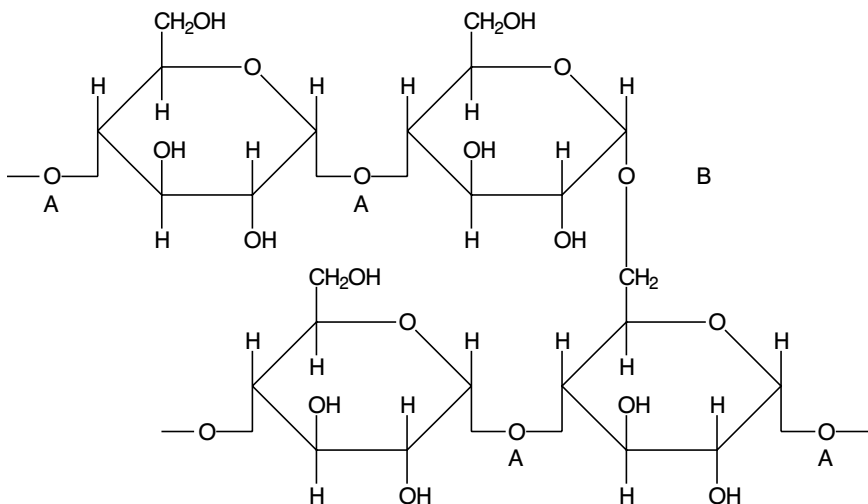
DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 2 ml sacharozės, 1 ml NaOH ir keli lašai kobalto nitrato tirpalų. Mišinys nusidažo violetine spalva.

1.2. POLISACHARIDAI

POLISACHARIDAI - tai monosacharidų polimerai. Jie skiriasi vienas nuo kito molekuline mase ir struktūrinėmis ypatybėmis. Visais atvejais monosacharidai gali būti α -formos ar β -formos, sujungti $(1\rightarrow2)$, $(1\rightarrow3)$, $(1\rightarrow4)$ ar $(1\rightarrow6)$ glikozidinėmis jungtimis, sudaryti linijinę arba šakotą polimerinę struktūrą. Jų bendra formulė $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. Augaluose paplitę polisacharidai - krakmolas, celiuliozė. Gyvulinės kilmės ląstelėse pagrindinis polisacharidas - glikogenas, savo struktūra panašus į krakmolą. Polisacharidams nebūdingos redukcinės savybės.



Pasikartojanti maltozės grandis linijinėje krakmolo grandinėje



Šakojimosi vieta amilopektine ir glikogene:

A - $\alpha(1 \rightarrow 4)$ - glikozidinė jungtis, B - $\alpha(1 \rightarrow 6)$ - glikozidinė jungtis.

1.2.1. KRAKMOLAS. JO SAVYBĖS. HIDROLIZĖ RŪGŠTIMI

Kraskolas yra pagrindinis rezervinis polisacharidas augalinėse ląstelėse, besikaupiantis grūdelių pavidalu. Grūdelio apvalkalėlį sudaro α -amilozė, o jo viduje yra amilopektinas. α -amilozė - tai linijinė grandinė, sudaryta iš tūkstančių α -D-gliukopiranozės molekulių liekanų. Amilopektinas turi daugybę atsišakojimų kas 20-30 α -D-gliukoazės liekanų. Jo molekulinė masė siekia dešimt milijonų.

Kraskmolą šaltame vandenyje netirpsta, o karštame - brinksta, sudarydamas kleisterį. Jodo molekulės adsorbuojamos kraskmolo molekulių paviršiuje, todėl mišinys nusidažo mėlyna spalva. Šildant ar virinant adsorbcinės jėgos silpnėja, mėlyna spalva nyksta. Kraskmolą hidrolizuoja veikiamas rūgštimis ar fermentais. Skystinant kraskmolui, susidaro tarpiniai produktai - dekstrinai, maltozė. Galutinis hidrolizės produktas - gliukozė.

1.2.1.1. Kraskmolo kleisterio gavimas

REAGENTAI: kraskmolą, distiliuotą vanduo.

DARBO EIGA. 200-250 ml tūrio konusinėje kolbutėje užvirinama 150 ml distiliuoto vandens. Mėgintuvėlyje nedideliame vandens kiekyje (2-3 ml) suspenduojamas žiupsnelis kraskmolo ir supilamas į verdantį vandenį. Gaunamas skaidrus, opalescencinis tirpalas.

1.2.1.2. Kraskmolo koloidinės savybės

REAGENTAI: kraskmolo kleisteris, kristalinis amonio sulfatas, etilo alkoholis.
DARBO EIGA.

1. Į vieną mėgintuvėlį įpilama 2 ml kraskmolo kleisterio ir pridedama amonio sulfato iki sotaus tirpalo. Susidaro netirpios kraskmolo nuosėdos.
2. Į kitą mėgintuvėlį įpilama 2 ml kraskmolo kleisterio, įlašinama keli lašai etilo alkoholio. Iškrenta nuosėdos.

1.2.1.3. Kraskmolo spalvinės savybės

REAGENTAI: kraskmolo kleisteris, Liugolio tirpalas (2 g KI ir 1 g kristalinio jodo ištirpinti 50 ml distiliuoto vandens) C_2H_5OH .

DARBO EIGA.

1. Į mėgintuvėlį įpilama 2 ml šalto kraskmolo kleisterio, įlašinama keli lašai Liugolio tirpalo. Kokia spalva atsirado?
Mišinys mėgintuvėlyje vieną kitą minutę pavirinamas degiklio liepsnoje, po to atšaldomas pakišus po šalto vandens srove. Kaip ir kodėl keičiasi mišinio spalvos?
2. Į kitą mėgintuvėlį įpilama 2 ml kraskmolo kleisterio, įlašinama keli etilo alkoholio ir Liugolio tirpalo lašai. Kokia spalva nusidažė mišinio mėgintuvėlyje?

1.2.1.4. Kraskmolo hidrolizė

Kraskmolą hidrolizuoja, susidarant tarpiniams produktams (kraskmolą → amilodekstrinai → eritrodekstrinai → akrodekstrinai → maltozė → gliukozė), kuriuos Liugolio tirpalas nudažo atitinkamomis spalvomis (mėlyna → violetinė →

raudona → ruda). Maltozės ir gliukozės Liugolio tirpalas nedažo (geltona yra jodo spalva).

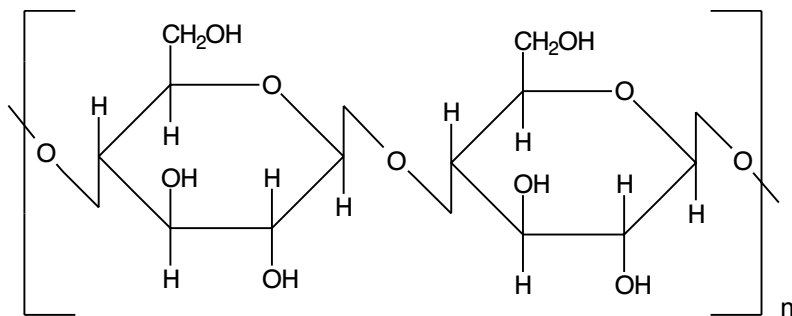
REAGENTAI: 100 ml krakmolo kleisterio, 10% H_2SO_4 , 10% NaOH, 5% $CuSO_4$ tirpalai.

DARBO EIGA.

1. Į 200 ml tūrio konusinę kolbutę įpilama 100 ml krakmolo kleisterio ir 10 ml sieros rūgšties. Mišinys virinamas degiklio liepsnoje (kolbutė padedama ant liepsnos sklaidytuvo) ir kas 2-4 min. imami 2 ml tūrio mėginiai, į kuriuos įlašinama po 2-3 lašus Liugolio tirpalo. Stebėkite susidariusių dekstrinų spalvų kitimą. Užrašykite, kokiomis spalvomis nusidažo aukščiau išvardyti dekstrinai.
2. Atlikite Tromerio reakcijas su nehidrolizuotu ir visiškai hidrolizuotu krakmolu: į vieną mėgintuvėlį įpilkite 1 ml nehidrolizuoto, į kitą - hidrolizuoto krakmolo, į abu mėgintuvėlius įpilkite NaOH iki šarminės terpės bei $CuSO_4$, kol atsiras mėlynų nuosėdų. Abu mėgintuvėlius šildykite liepsnoje, kol mišiniai užvirs. Rezultatus užrašykite ir paaiškinkite.

1.2.2. CELIULIOZĖ

CELIULIOZĖ (ląsteliena) - augaluose plačiai paplitęs polisacharidas. Gliukozės liekanos sujungtos $\beta(1 \rightarrow 4)$ glikozidinėmis jungtimis. Iš dalies hidrolizuojant, celiuliozė skyla iki disacharido celobiozės:



Celobiozės grandis celiuliozėje

Celiuliozė netirpsta vandenyje, bet tirpsta vario druskų amoniakiniuose tirpaluose. Molekulinė masė 50 000-400 000. Celiuliozės neveikia fermentai, skaidantys krakmolą bei glikogeną, ją hidrolizuoja kai kurių mikroorganizmų fermentai. Medvilnėje yra iki 90% celiuliozės.

1.2.2.1. Celiuliozės tirpumas

REAGENTAI: Šveicerio reagentas (CuCO_3 , ištirpintas amoniake), praskiesta HCl .

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 4 ml Šveicerio reagento, įmetamas mažas gabalėlis vatos. Mišinys maišomas, kol praskaidrėja, gaunamas klampus skystis.

Į kitą mėgintuvėlį įpilama dalis šio mišinio, 2 ml distiliuoto vandens ir lašinama praskiesta druskos rūgštis, kol išnyksta spalva. Celiuliozė iškrinta drebučių pavidalu.

1.2.2.2. Celiuliozės hidrolizė

REAGENTAI: filtruojamasis popierius, 70% H_2SO_4 .

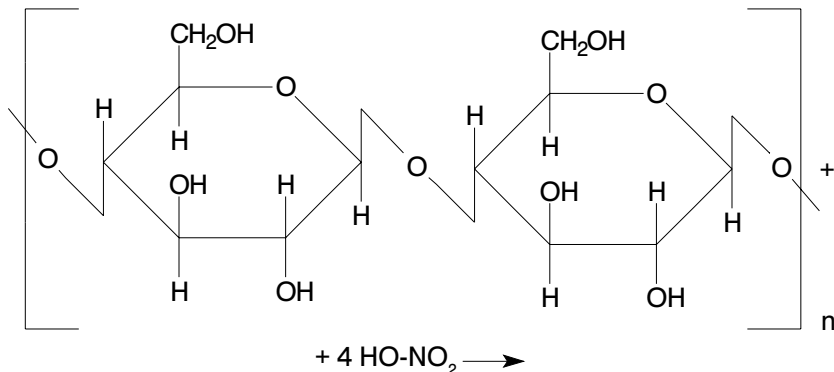
DARBO EIGA. Grūstuvėlyje apie 0,5 g filtruojamojo popieriaus sutrinama su 3 ml sieros rūgšties; mišinys perkeliamas į mėgintuvėlį ir, į jį įpylus apie 0,5 ml distiliuoto vandens, virinamas degiklio liepsnoje. Dalis mišinio nupilama į kitą mėgintuvėlį ir Tromerio reakcija tikrinama ar hidrolizė yra visiška (į hidrolizatą įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO_4 , kol atsiras mėlynų nuosėdų; mišinys pašildomas degiklio liepsnoje, žr. 1.1.2.1.).

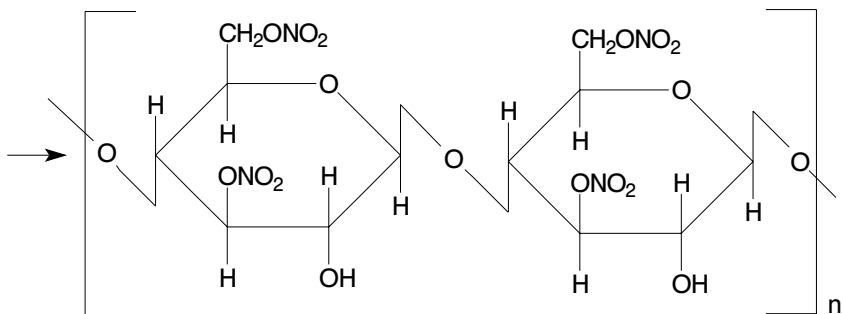
1.2.2.3. Celiuliozės nitrinimas

REAGENTAI: konc. HNO_3 , konc. H_2SO_4 , vata.

DARBO EIGA. Stiklinaitėje atsargiai sumaišoma 4 ml konc. HNO_3 ir 8 ml konc. H_2SO_4 . Labai įkaitęs mišinys atvėsinamas, į jį panardinamas ir 5 min. palaikomas mažas gabalėlis vatos. Po to vata pincetu atsargiai perkeliama į stiklinaitę su vandeniu. Nuplovus, ji supešiojama pirštais, nuspaudžiama filtruojamuoju popieriumi ir išdžiovinama. Išdžiūvusi vata, laikoma pincetu, degiklio liepsnoje smarkiai plyksteli.

Atlikote celiuliozės nitrinimo reakciją.





Piroksilinas

1.2.2.4. Celiuliozės triacetato gavimas

REAGENTAI: acto rūgšties anhidridas, konc. acto rūgštis, konc. H_2SO_4 , vata.

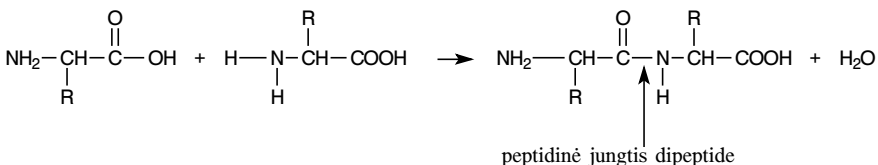
DARBO EIGA. Stiklinaitėje atsargiai sumaišoma po 5 ml acto rūgšties, acto rūgšties anhidrido, 1-2 ml koncentruotos sieros rūgšties, įmetamas gabalėlis vatos. Stiklinė atvėsinama šaltame vandentiekio vandenyje. Mišinys pamaišomas stiklinė lazdele ir šildomas vandens vonioje, kol ištirpsta vata, po to maža srovele pilamas į stiklinę su šaltu vandeniu. Iškrinta pluoštinės nuosėdos. Vyksta reakcija, analogiška nitrinimo reakcijai. Užrašykite reakcijos lygtį.

2. BALTYMAI. AMINORŪGŠTYS

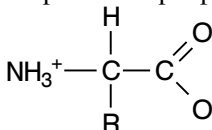
Baltymai arba proteinais (gr. protos - pirminis) yra svarbiausi organiniai junginiai gyvojoje materijoje, atliekantys pagrindinį vaidmenį jai funkcionuojant. Visi fiziniai bei cheminiai procesai, vykstantys gyvoje ląstelėje, katalizuojami baltymų - fermentų. Kiti baltymai, kaip svarbūs ląstelės struktūriniai, imuninės sistemos komponentai, hormonai, dalyvauja susitraukime, jų dėka perduodama genetinė informacija.

Baltymai pagal sudėtį skirstomi į paprastuosius ir sudėtinius. Paprastieji baltymai sudaryti tik iš aminorūgščių. Sudėtiniuose baltymuose, be aminorūgščių, yra įvairios cheminės prigimtys prostetinės grupės: lipidai (baltymai - lipoproteidai), nukleininės rūgštys (nukleoproteidai), angliavandeniai (gliukoproteidai) ir kt.

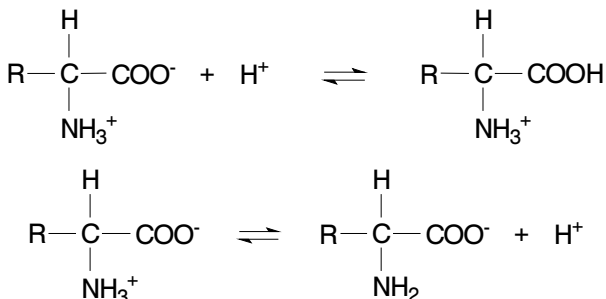
Visi baltymai sudaryti iš to paties 20 α -aminorūgščių rinkinio. Šie monomeriniai vienetai (aminorūgštys) turi savybių, būdingų polimerizuotis linkusioms molekulėms: turi mažiausiai dvi chemines grupes, sugėbančias reaguoti ir sudaryti kovalentines jungtis. Šios grupės yra amino ($-\text{NH}_2$) ir karboksilinė ($-\text{COOH}$), o jungtis, kurios dėka susidaro baltymo molekulė, vadinama *peptidine jungtimi*. Tokio tipo reakcijų pusiausvyrą vandeninėje terpėje pasislinkusi laisvų aminorūgščių susidarymo kryptimi, todėl peptidų sintezė nevyksta tiesiogiai, t.y. paprastai atskilus vandens molekulei:



Dipeptidas taip pat turi aminogrupę ir karboksilinę grupę, kurios yra reaktyvios, todėl gali prisijungti kitos aminorūgštys, sudarydamos naujas peptidines jungtis. Taip susidaro polipeptidas (baltymas).



Aminorūgštys turi keletą bendrų savybių: tirpaluose esti daugiausia dipolių jonų (cviterijonų) pavidalo, turi mažiausiai vieną asimetrinį C atomą ir skiriamos į izomerų grupes: D- ir L-. Aminorūgštys viena nuo kitos skiriasi šoninių grandinių (R) struktūra. Tos grandinės gali būti hidrofobinės, hidrofiliinės, rūgštinės, bazinės, neutralios. Jos nulemia daugelį fizinių ir cheminių baltymų savybių. Dipoliai jonai funkcionuoja kaip rūgštys (protonų donoriai) arba kaip bazės (protonų akceptorai):



Aminorūgšties molekulės formos (anijoninės, katijoninės, dipolinės) dominavimas priklauso nuo tirpalo pH. Tirpalo pH reikšmė, kuriai esant jonas elektriniame lauke nejuda, vadinama izoelektriniu tašku (pI). Šiuo atveju teigiamų ir neigiamų jonų krūvis aminorūgštyse vienodas.

Aminorūgštys, besijungdamos į grandinę, netenka vandens molekulės, todėl polimerinėje grandinėje jos vadinamos aminorūgščių liekanomis, o ši aminorūgščių grandinė - pirmine baltymo struktūra. Baltymams būdinga tretinė struktūra. Ją sukuria aminorūgščių grandinė, kurią stabilizuoja nekovalentinės sąveikos tarp -NH ir -CO grupių, kai kurių aminorūgščių liekanų R-grupių. Baltymų specifinės biologinės funkcijos priklauso nuo konformacijos. Ją suardžius, baltymai praranda biologinį aktyvumą. Baltymas, turintis funkcionalią konformaciją, vadinamas *natyviu*.

Kai baltymą veikia tokie fiziniai faktoriai kaip temperatūra, pH, kai kurių organinių medžiagų vandeniniai tirpalai, vyksta jo denatūracija. Denatūruotas baltymas tampa neaktyvus.

Baltymai skiriasi molekulių forma. Globulinių baltymų molekulės yra sferinės arba elipsinės formos. Jie tirpsta vandenyje, lengvai difunduoja. Globulinių baltymų grupei priklauso beveik visi fermentai, transportiniai baltymai, antikūnai, maistiniai baltymai. Fibrilinių baltymų molekulės siūlinės, ištemptos išilgai ašies, jų ilgis gali būti kelis kartus didesnis už skersmenį. Jie dažniausiai netirpsta vandenyje. Fibrilinių baltymų grupei priklauso jungiamojo audinio, susitraukimo (aktinas, miozinas), sausgyslių (kolagenas), plaukų, ragų (keratinai) baltymai.

Sintetinių polipeptidų tyrimai, baltymų rentgenostruktūrinė analizė rodo, kad be kai kurių aminorūgščių (alanino, gliutamino, leucino) neįmanomas α -spiralinės susidarymas. Kitos aminorūgštys pvz.: valinas, metioninas, izoleucinas, dažniau aptinkamos β -struktūroje, o glicinas, prolinas, asparaginas - ties grandinės išlinkimu (posūkiu). Todėl manoma, kad baltymų konformacija priklauso nuo aminorūgščių sekos polipeptidinėje grandinėje. M. Levitt ir C. Chotia (1976), remdamiesi 31 baltymo struktūrų tyrimu, suskirstė baltymus į 4 struktūrines grupes: α -bal-

tymai, kur vyrauja α -spiralinė struktūra (hemoglobinas, mioglobinas); baltymai, sudaryti iš sluoksniuotų β -struktūrų (konkavalinas A, rubredoksinas); $(\alpha+\beta)$ -baltymai, kuriuose yra ir α -spiralės, ir β -struktūros (papainas, termolizinas); α/β baltymai, kuriuose α -spiralizuotos ir β -struktūrų sritys išsidėsto viena po kitos.

Aminorūgščių seka baltymo grandinėje yra paveldima, o baltymo funkcija priklauso nuo šios sekos. Todėl vienas iš pagrindinių biochemikų uždavinių - visapusiškas baltymų struktūrų tyrimas.

2.1 BALTYMŲ FIZINĖS IR CHEMINĖS SAVYBĖS

2.1.1. BALTYMŲ NUSODINIMO REAKCIJOS

Denatūracija - sudėtingas procesas, todėl neįmanoma vienareikšmiai apibūdinti sąveikos tarp baltymo ir denatūruojančio agento, sukeliančio baltymo molekulės konformacinius pakitimus. Tačiau žinoma, kad denatūruojantys agentai suardo natyvaus baltymo nekovalentinę struktūrą. Vieni baltymai dėl nedidelių konformacijos pakitimų nepraranda biologinio aktyvumo, kiti, labai jautrūs, greitai jį praranda.

Denatūracijos metu baltymo molekulė "išsivynioja", įgyja kamuoliuko formą. Joje nėra nekovalentinių sąveikų tarp atomų ir grupių, o visos molekulės erdvinės struktūros gali lengvai kontaktuoti su tirpiklio molekulėmis. Baltymo molekulėje beveik nėra α -spiralinių, β -konformacijos sluoksnių ir kitų periodinių struktūrų. Keičiasi baltymo fizinės savybės: klampumas, šviesos sugertis.

Bevandeniai tirpikliai, matyt, denatūruoja baltymus tokiu pat būdu, suardydami hidrofobines sąveikas. Detergentai su polipeptidais gali sudaryti stabilius kompleksus, pakeisdami molekulių struktūras.

Ištirpinti baltymai dažniausiai denatūruoja 50-60°C temperatūroje. Tačiau kai kurie fermentai praranda aktyvumą -30-0°C temperatūroje. Temperatūros sukelta denatūracija gali būti grįžtama, tačiau dažniausiai baltymas agreguoja ir susidaro nuosėdos. Denatūracijos priežastis gali būti ir pH pakitimai. Dauguma baltymų stabilūs gana siauroje pH reikšmių srityje.

Baltymų nusodinimo reakcijos gali būti dviejų rūšių: grįžtamosios ir negrįžtamosios. Grįžtamųjų reakcijų metu baltymai mažai pakinta, išlieka aktyvūs, nuosėdos vėl gali ištirpti. Tai išsūdyimo reakcijos. Grįžtamosios baltymų nusodinimo reakcijos vyksta ir trumpai veikiant etanolio ar acetonu žemoje temperatūroje.

Negrįžtamųjų reakcijų metu baltymai labai pakinta, denatūruoja, netenka aktyvumo, pakinta molekulių struktūra. Taip baltymus veikia sunkiųjų metalų druskos, alkaloidų reagentai, rūgštys, aukšta temperatūra.

Šildant baltymai denatūruoja, tampa netirpūs, pasikeičia molekulių struktūra.

Vis dėlto, kai kurie baltymai, trumpai pavirinus, nekoaguliuoja (ribonukleazė). Koaaguliaciją skatina druskos, pH. Geriausiai baltymai koaguliuoja izoelektriniame taške.

Labai rūgščiuose tirpaluose baltymų micelės tampa teigiamos, šarminiuose - neigiamos, todėl tokiuose tirpaluose virinami baltymai nenusėda. Jie gali koaguliuoti tik pridėjus kurios nors neutralios druskos.

Įvairios organinės rūgštys skirtingai veikia baltymus. Trichloracto ir sulfosalicilo rūgštys - specifiniai reagentai, nusodinantys baltymus, bet ne jų skilimo produktus ar aminorūgštis. 2,5-5% trichloracto rūgšties tirpalai naudojami baltymams pašalinti iš biologinių skysčių.

Koncentruotos mineralinės rūgštys (išskyrus HNO_3) negrįžtamai nusodina baltymus, šių tirpalų susilietimo vietoje atsiranda amorfinių nuosėdų. Dėl rūgščių (išskyrus HNO_3) pertekliaus tirpsta iškritusios baltymų nuosėdos. Stiprios mineralinės rūgštys slopina silpnų organinių rūgščių disociaciją ir trukdo baltymams nusėsti.

Įvairūs baltymai nusodinami skirtingų koncentracijų etilo alkoholiu. Tirpalas turi būti neutralus ar šiek tiek rūgštus. Vyksta baltymo dalelės dehidratacija, o į baltymo tirpalą pridėjus NaCl , nuosėdos susidaro greičiau. Druskos jonai panaikina dalelių krūvį, o tai sumažina baltymų tirpalo stabilumą: baltymų dalelės sulimpa, padidėja ir iškrinta nuosėdos. Jei nuosėdos greitai išfiltruojamos, baltymus vėl galima ištirpinti vandenyje. Ilgai veikiant baltymus alkoholiu, jie denatūruoja ir tampa netirpūs.

Švino, vario, gyvsidabrio ir kitų sunkiųjų metalų druskos su baltymais sudaro vandenyje netirpius junginius, todėl baltymai naudojami kaip šių metalų druskų priešnuodžiai.

Alkaloidai, taninas, pikrino rūgštis, geležies heksacianidai reaguoja su baltymuose esančiomis heterociklinėmis (pirolo, indolo, imidazolo) grupėmis, sudarydami netirpius junginius. Iškrinta baltymų nuosėdos.

Baltymų tirpalą paveikus pakankamos koncentracijos šarminių bei žemės šarminių metalų druskomis (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4), baltymų dalelės dehidratuojasi, atsiranda nuosėdų. Norint išsūdyti įvairius baltymus frakcijomis, reikia naudoti skirtingų koncentracijų tas pačias druskas. Amonio sulfatas neutraliuose vandeniuose tirpaluose išsūdo beveik visus baltymus: globulinai nusėda pusiau prisotintame (NH_4)₂ SO_4 tirpale, albuminai - visiškai prisotintame.

REAGENTAI: NaCl (kristal.), MgSO_4 (kristal.), konc. HCl , konc. H_2SO_4 , konc. HNO_3 , 3% trichloracto rūgšties, 5% sulfosalicilinės rūgšties, 5% CuSO_4 1% acto rūgšties, kiaušinio baltymo, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, fenolio, tanino, NaOH tirpalai, etilo alkoholis, pikrino rūgštis.

DARBO EIGA

1. Į 2 mėgintuvėlius įpilama po 2 ml baltymo tirpalo. Į vieną iš jų pridedama NaCl , į kitą - MgSO_4 iki sočių tirpalų (kol druskos nebetirps). Atsiranda nuosėdų. Tirpalai išfiltruojami, filtratai šiek tiek parūgštinami acto rūgštimi.

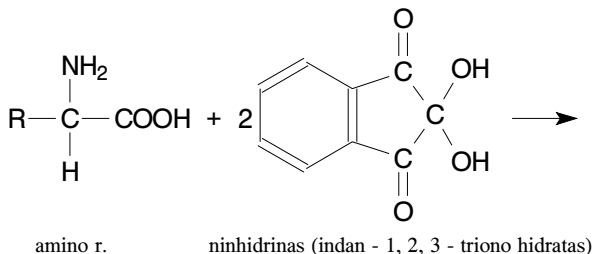
2. Į 3 mėgintuvėlius įpilama po 2 ml baltymo tirpalo; pirmasis mėgintuvėlis pašildomas degiklio liepsnoje; į antrąjį mėgintuvėlį įlašinama acto rūgštis tirpalo ir pašildoma; į trečiąjį įpilama 1 ml NaOH tirpalo ir pašildoma.
3. Į 3 mėgintuvėlius įpilama po 1 ml koncentruotų azoto, sieros ir druskos rūgščių ir atsargiai, per sienelę, kad nesusimaišytų skysčiai, įpilama po 1 ml baltymo tirpalo. Ką matote skysčių susilietimo riboje? Mėgintuvėlius papurtykite.
4. Į 2 mėgintuvėlius įpilama po 2 ml baltymo tirpalo; į vieną iš jų įlašinami keli lašai trichloracto rūgštis, į kitą - sulfosalicilo rūgštis.
5. Į 2 mėgintuvėlius įpilama po 2 ml baltymo tirpalo; į vieną iš jų įpilama 1 ml CuSO_4 tirpalo, į kitą - $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ tirpalo.
6. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo ir 1 ml fenolio tirpalo.
7. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo, pridėjama truputį kristalinio NaCl ir 2-3 ml etilo alkoholio.
8. Į 2 mėgintuvėlius įpilama po 1 ml baltymo tirpalo, parūgštinama keliais lašais acto rūgštis; į vieną iš jų įlašinami keli lašai pikrino rūgštis, į kitą - tanino tirpalo.

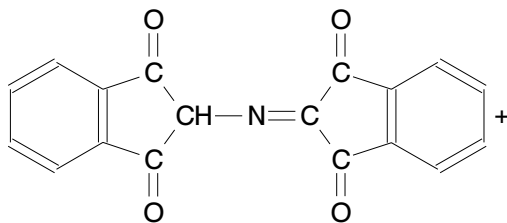
Visais atvejais paaiškinkite, kas vyksta mėgintuvėliuose.

2.1.2. SPECIFINĖS AMINORŪGŠČIŲ REAKCIJOS

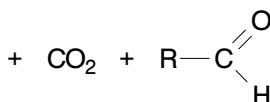
Baltymus veikiant proteolitiniais fermentais (pepsinu, tripsinu), šildant su rūgštimis ar šarmais, jie skyla - hidrolizuoja. Baltymus iš dalies hidrolizuojant, susidaro tarpiniai skilimo produktai - peptonai, peptidai, o visiškos hidrolizės metu - laisvos aminorūgštys.

Aminorūgštys su ninhidrinu sudaro melsvos ar violetinės spalvos junginius. Ši reakcija naudojama atliekant aminorūgščių kiekybinę analizę, bet nėra specifinė, nes spalvoti produktai gaunami ir naudojant kitus aminogrupę turinčius junginius. Kai α -aminorūgštyje šalia aminogrupės yra karboksilinė grupė, sąveikaujant jai su ninhidrinu išsiskiria CO_2 .

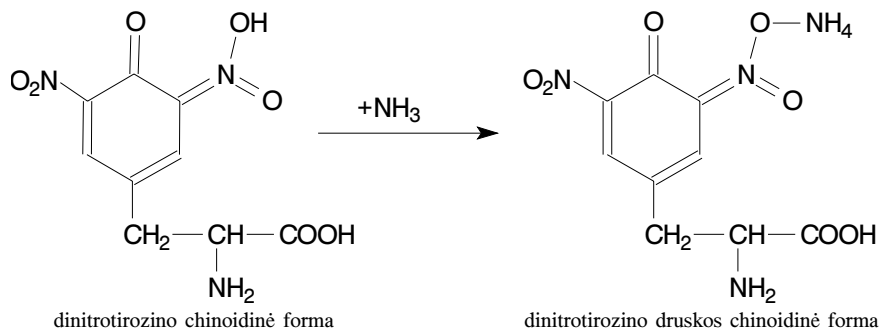
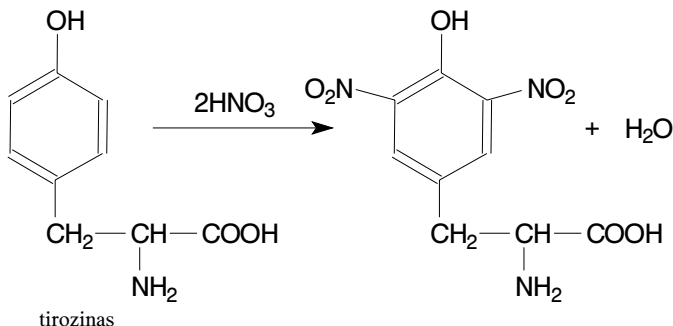




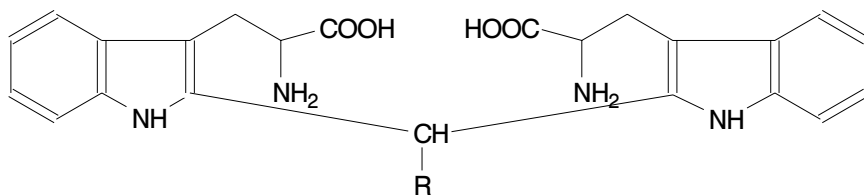
“Ruemano mėlynai-violetinis”



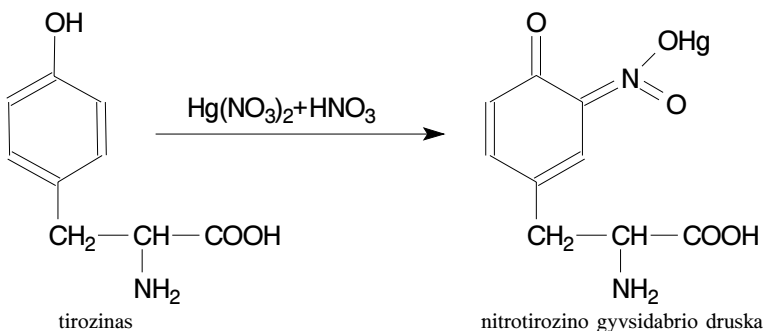
Reaguojant su koncentruota azoto rūgštimi, susidaro baltymuose esančių aminorūgščių - tirozino, triptofano, fenilalanino - geltonos spalvos nitro junginių. Esant amoniako pertekliui jie virsta oranžinės spalvos chinoidinės struktūros druskomis:



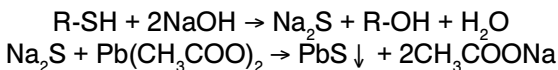
Triptofanas rūgštinėje terpėje reaguoja su daugeliu aldehydų, susidaro spalvoti kondensacijos produktai. Bendra jų struktūra tokia:



Baltymai, turintys tirozino, reaguoja su Milono reagentu, susidaro rausvos spalvos nuosėdos. Atliekant reakciją su tirozino ar polipeptidų tirpalu, nuosėdos nesusidaro, bet atsiranda rausva spalva. Tai nėra specifinė tirozino reakcija, nes su Milono reagentu reaguoja fenoliai bei alkoholiai, turintys fenolinę grupę.



Sieros turinčioms aminorūgštims - cistinui, cisteinui - būdinga reakcija su natrio šarmu ir švino acetatu:



2.1.2.1. Reakcija su ninhidrinu

REAGENTAI: 0,2% spiritinis ninhidrino, 1% baltymo, 0,1% aminorūgšties tirpalai.

DARBO EIGA. Į vieną mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo, į kitą - 1 ml aminorūgšties tirpalo. Po to į abu mėgintuvėlius įlašinama po 5 lašus ninhidrino tirpalo. Mišiniai pašildomi degiklio liepsnoje. Kokia spalva atsiranda?

2.1.2.2. Ksantoproteino reakcija

REAGENTAI: 1% baltymo tirpalas, konc. HNO_3 , konc. NH_3 .

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo, 2-3 lašai azoto rūgšties, mišinys atsargiai šildomas degiklio liepsnoje. Kokios spalvos nuosėdos susidaro?

Mišinys atvėsintas, pripilama amoniako iki šarminės terpės. Kaip pasikeitė spalva?

2.1.2.3. Milono reakcija

REAGENTAI: Milono reagentas (gyvsidabrio nitritai ir nitratai, ištirpinti koncentruotoje azoto rūgštyje), 1% baltymo tirpalas.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo ir keli lašai Milono reagento. Mišinys atsargiai šildomas degiklio liepsnoje. Kaip keičiasi nuosėdų spalva šildant?

2.1.2.4. Reakcijos triptofanui pažinti

1. Reakcija su glioksilo rūgštimi (jos visada yra ledinėje acto rūgštyje)

REAGENTAI: 1% baltymo tirpalas, ledinė acto rūgštis, konc. H_2SO_4 .

DARBO EIGA. Į 1 ml baltymo tirpalo (gali būti baltymo gabaliukas) pripilama 1 ml ledinės acto rūgšties, mišinys šildomas kol baltymas ištirps. Atvėsinama ir atsargiai, palei sienelę, įpilama sieros rūgšties. Skysčių susilietimo vietoje atsiranda geltonos spalvos žiedas.

2. Reakcija su oksimetilfurfuroliu, paremta oksimetilfurfurolo susidarymu iš sacharozės

REAGENTAI: 1% baltymo tirpalas, 1% sacharozės tirpalas, konc. H_2SO_4 .

DARBO EIGA. 1 ml baltymo tirpalo sumaišoma su keliais lašais sacharozės ir atsargiai, palei sienelę, įpilama sieros rūgšties. Skysčių susilietimo vietoje atsiranda violetinės spalvos žiedas.

3. Reakcija su formaldehidu.

REAGENTAI: 1% baltymo tirpalas, praskiestas formaldehido tirpalas, konc. H_2SO_4 .

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo, pripilama praskiesto formaldehido, atsargiai, palei sienelę, įpilama sieros rūgšties. Skysčių susilietimo vietoje atsiranda baltos spalvos žiedas.

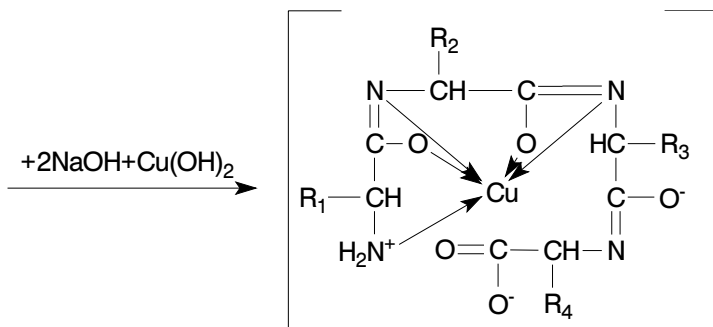
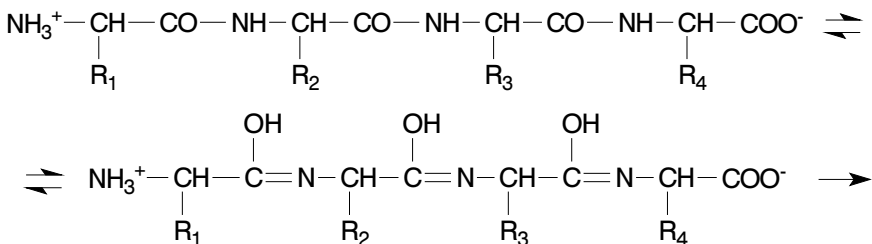
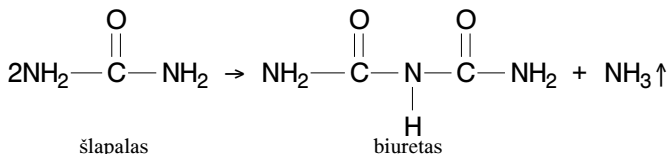
2.1.2.5. Sieros turinčių junginių reakcija

REAGENTAI: 10% NaOH, 5% $Pb(CH_3COO)_2$, 1% baltymo tirpalai.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama po 1 ml baltymo, natrio šarmo ir švino acetato tirpalų. Mišinys, šildomas degiklio liepsnoje tamsėja, atsiranda juodos spalvos nuosėdų. Užrašykite reakcijos lygtį.

2.1.3. PAPRASTIEJI BALTYMAI. BALTYMŲ HIDROLIZĖ

Šarminėje terpėje, pridėjus vario duskų, biuretas (šlapalas), oksamidas ($NH_2-CO-CO-NH_2$), baltymai ir polipeptidai sudaro spalvotas kompleksines druskas.



Violetinės spalvos polipeptidų ir baltymų Cu-Na kompleksinė druska (biureto kompleksas)

Reakcija labai jautri, naudojama atliekant kokybinę ir kiekybinę baltymų analizę, vyksta esant praskiedimui 1:10000.

REAGENTAI: 1% kiaušinio baltymo, 10% NaOH, 1% CuSO₄, 20% H₂SO₄ tirpalai, šlapalas.

DARBO EIGA.

1. Į mėgintuvėlį įberiamas žiupsnelis šlapalo, pakaitinamas degiklio liepsnoje. Šlapalas lydosi, išsiskiria NH₃, pasigamina biureto. Į atvėsintą mėgintuvėlį įpilama truputį NaOH ir keli lašai vario sulfato (biureto reakcija);
2. Į kitą mėgintuvėlį įpilama 1 ml baltymo tirpalo, natrio šarmo (iki šarminės reakcijos) ir keli lašai vario sulfato tirpalo (biureto reakcija);
3. Į 100 ml tūrio konusinę kolbutę įpilama 3-5 ml baltymo tirpalo ir 20 ml 20% sieros rūgšties. Kolbutę užkemšama kamščiu su grįžtamuoju oro šaldytuvu, įtvirtinama laboratoriniame stove, virinama ant liepsnos sklaidytu-

vo 1-1,5 val. Ar hidrolizė visiška, tikrinama biureto reakcija: į 1 ml hidrolizato įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO_4 .
Visais atvejais rezultatus užrašykite ir paaiškinkite.

2.1.4. SUDEĖTINIAI BALTYMAI. NUKLEOPROTEIDAI. NUKLEOPROTEIDŲ HIDROLIZĖ

Kasos, blužnies, kepenų ląstelėse, mielėse yra daug nukleoproteidų. Jų randama ir citoplazmos struktūriniuose elementuose - mikrosomose, mitochondrijose. Molekulinė masė siekia keletą milijonų daltonų. Nukleoproteidai netirpsta vandenyje, lengvai nusėda tirpalą parūgštinus (pH 5), tirpsta praskiestuose šarmuose. Nukleoproteidus virinant praskiestose rūgštyse, atskyla baltymas, o nukleino rūgštis skyla į sudedamąsias dalis: purino ir pirimidino bazes, pentozę ir fosforo rūgštį.

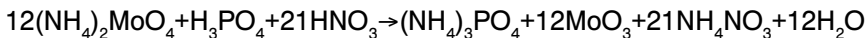
REAGENTAI: presuotos arba džiovintos mielės, 5% H_2SO_4 , amonio molibdato tirpalas azoto rūgštyje $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, konc. NH_3 , 5% AgNO_3 .

DARBO EIGA. Apie 3-4 g presuotų mielių (džiovintų - 1 g) 100 ml tūrio konusinėje kolbutėje užpilama 30-40 ml 5% sieros rūgštimi. Kolbutė užkemšama grįžtamuoju oro šaldytuvu, įtvirtinama laboratoriniame stovė virš liepsnos sklaidytuvo ir atsargiai virinama 1-1,5 val. Po to mišinys filtruojamas ir po 1 ml gauto hidrolizato pilama į 4 mėgintuvėlius:

I mėgintuvėlyje atliekama biureto reakcija: į hidrolizatą įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO_4 .

II mėgintuvėlyje atliekama Tromerio reakcija: į hidrolizatą įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO_4 , kol iškris mėlynos nuosėdos. Mišinys šildomas degiklio liepsnoje, kol užvirs. Iškrinta oranžinės Cu_2O nuosėdos.

III mėgintuvėlyje atliekama reakcija fosforo rūgščiai pažinti: į hidrolizatą įpilama amoniako iki šarminės terpės (tikrinti indikatoriumi), 1 ml molibdeno reagento, mišinys virinamas degiklio liepsnoje. Iškrinta geltonos nuosėdos.



IV mėgintuvėlyje atliekama reakcija purino bazėms pažinti: į hidrolizatą įpilama amoniako iki šarminės reakcijos (tikrinti indikatoriumi) ir 1 ml sidabro nitrato. Po kelių minučių iškrinta gelsvai rausvos sidabro-purino bazių (adenino, guanino) nuosėdos.

2.1.5. BALTYMŲ IZOELEKTRINIO TAŠKO NUSTATYMAS

REAGENTAI: 0,2 mol/l Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l citrinos rūgšties, 1% želatinos tirpalai, etilo alkoholis.

DARBO EIGA. Į 6 sunumeruotus mėgintuvėlius labai tiksliai pipete supilami lentelėje nurodyti natrio fosfato ir citrinos rūgšties tirpalai.

Mėg. Nr.	0,2 mol/l Na_2HPO_4 , ml	0.1 mol/l Citrinos r., ml	pH	Želatina, spiritas, ml	Susidrumstimo laipsnis
I	0,1	0,9	3,8	0,5+2	
II	0,2	0,8	4,15	0,5+2	
III	0,5	0,5	4,75	0,5+2	
IV	0,8	0,2	5,35	0,5+2	
V	0,9	0,1	5,75	0,5+2	
VI	vanduo	vanduo			

Susidrumstimo laipsnio žymėjimai:

(-) nesusidrumstė

(+) mažai susidrumstė

(++) labiau susidrumstė

(+++) labiausiai susidrumstė

Paiškokite, kodėl susidrumstė baltymo tirpalas ir kas vyksta izoelektriniame taške.

2.1.6. AMINORŪGŠČIŲ NUSTATYMAS POPIERIAUS CHROMATOGRAFIJOS BŪDU

Augalinės kilmės spalvotų pigmentų frakcionavimas ant įvairių kietų adsorbentų pirmą kartą buvo aprašytas 1903 m. Tada ir paaiškėjo, kad žaliųjų lapų ekstraktuose yra du žali pigmentai (chlorofilai a ir b) ir keletas geltonų pigmentų (karotinoidų). Metodas pavadintas chromatografija (gr. *chromo* - spalva, *graphien* - rašau).

Terminas *chromatografija* vartojamas bet kuriam medžiagų skirstymo metodu vadinti, kurio esmė - ištirpintų medžiagų judėjimas kietu turinčiu poras nešėju, nepriklausomai nuo prigimties jėgų, padedančių molekulėms išsiskirti. Šiuo metu sukurta daug chromatografijos metodų: jonų mainų, dujinė, skystinė, afininė, adsorbcinė (popieriaus, aliuminio oksido, silikagelio, medžio anglies ir kt.), gel-filtracija.

Medžiagų pasiskirstymas adsorbento paviršiuje vyksta dėl skirtingų vandenilių, hidrofobinių jėgų ir sąveikų. Popieriaus chromatografija - vienas iš efektyviausių analitinių skystinės chromatografijos metodų, plačiai taikomas biochemijoje.

Tirpiklis, kapiliarinių jėgų dėka judėdamas popieriumi, su savimi neša ir tiriamas medžiagas. Medžiagų judėjimas priklauso nuo jų cheminės prigimties ir nuo tirpumo judrioje bei nejudrioje fazėse. Judri fazė - tai įvairios tirpiklių sistemos (butanolis:vanduo:ledinė acto rūgštis; fenolis:vanduo:amoniakas ir kt.). Nejudri fazė sudaryta iš popieriaus celiuliozės ir vandens. Kuo didesnis frakcionuojamų medžiagų tirpumas judrioje fazėje ir kuo mažesnis nejudrioje, tuo greičiau medžiaga juda su organinio tirpiklio frontu. Vis dėlto nėra tokio tirpiklio, kurio dėka būtų galima išskirstyti visas 20 aminorūgščių. Jas galima išskirstyti tik taikant dvikryptę chromatografijos metodą. Dvikryptė chromatografija - tai įprastos plonasluoksnės chromatografijos rūšis. Iš pradžių užneštas mišinys frakcionuojamas viena kryptimi, po to atliekama atitinkama cheminė reakcija ir junginiai frakcionuojami kita kryptimi. Nemodifikuoti junginiai juda kitaip negu modifikuoti.

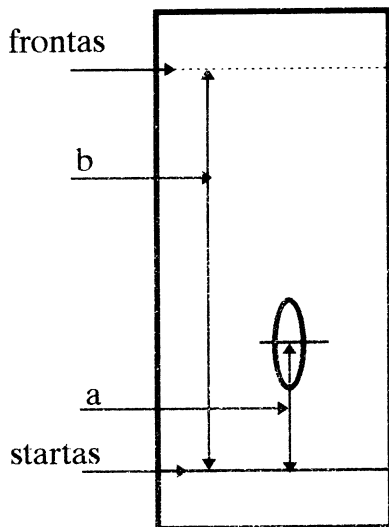
Pagal judančios fazės judėjimo kryptį, popieriaus chromatografija gali būti kylanči, besileidžianti ir žiedinė. Aminorūgščių išsidėstymo vietos nustatomos panaudojant ninhidrino tirpalą. Nukleozidai ir nukleotidai chromatogramoje randami ultravioletinių spindulių šviesoje: jie adsorbuoja ultravioletinius (UV) spindulius ir šių medžiagų lokalizacijos vietoje bus matomos tamsios dėmės. Medžiagų pasiskirstymas apibūdinamas koeficientu R_f , kuris išreiškia atstumą nuo užnešimo vietos (starto) iki medžiagos lokalizacijos vietos (a) ir nuo starto iki tirpiklio judėjimo fronto (b) santykį:

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

Pasiskirstymo koeficientas būdingas visoms aminorūgštims, nukleozidams, nukleotidams ir priklauso nuo chromatografijos sąlygų: popieriaus rūšies, tirpiklių sistemos, temperatūros, chromatografijos tipo ir t.t.

REAGENTAI: tirpiklis chromatografijai: butilo alkoholis, ledinė acto rūgštis, vanduo sumaišoma santykiu 4:1:5 ir dalijamajame piltuve kratoma 3 min., po to leidžiama nusistovėti, apatinis sluoksnis pašalinamas, viršutinis sluoksnis naudojamas chromatografijai, 0,5% ninhidrinas, ištirpintas acetono, ledinės acto rūgšties, vandens mišinyje santykiu 95:1:4, aminorūgštys (x_1, x_2, x_3, x_4), ištirpintos 10 ml vandens su 3 lašais butilo alkoholio.

DARBO EIGA. Į platų sausą cilindrą įpi-



lama 3 ml tirpiklio chromatografijai. Iš chromatografinio popieriaus iškerpama juostelė (siauresnė ir trumpesnė už cilindrą). Ant juostelės 8 mm atstumu nuo jos galo pieštuku nubrėžiama starto linija ir ant jos kapiliaru užlašinami skirtingų aminorūgščių lašeliai. Dėmelės išdžiovinamos. Kitu galu juostelė užkabinama ant kamštyje įtaisyto kabliuko ir juostelės kraštelis 3-5 mm įmerkiamas į cilindre esantį tirpiklį. Chromatografija vyksta, kol tirpiklis juostele pakyla beveik iki viršutinio jos krašto (turi likti apie 5 mm). Juostelė išimama, pieštuku pažymima tirpiklio fronto linija, išdžiovinama, apipurškiama ninhidrino tirpalu, vėl išdžiovinama džiovavimo spintoje. Išryškėja aminorūgščių dėmelės.

Išmatuojami atstumai (a ir b) ir apskaičiuojami tiriamų aminorūgščių pasiskirstymo koeficientai R_f .

2.1.7. BALTYMŲ DIALIZĖ

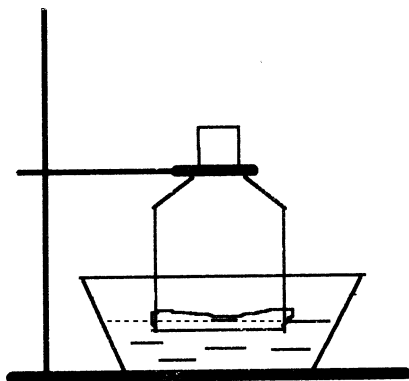
Dializė ir ultrafiltracija atliekama, naudojant plonas pusiau pralaidžias membranas, pvz., celiuliozės acetato (celofano), turinčio 1-10 nm skersmens poras (dažniausiai 5 nm). Tokia membrana praleidžia mažas molekules, o stambias sulaiko. Dializės greitis priklauso nuo difuzijos, kuri gali pagreitinėti dėl tirpalo maišymo, o filtracijos greitis priklauso nuo slėgių, esančių abipus membranos, skirtumo.

REAGENTAI: baltymo tirpalas, NaCl (kristal.), 10% HNO_3 , 1% AgNO_3 , 1% CuSO_4 , 10% NaOH.

DARBO EIGA. Į 3-5 ml baltymo tirpalo įberiamas žiupsnelis NaCl, mišinys supilamas į dializatorių, kuris įdedamas į stiklinaitę su distiliuotu vandeniu (dializatoriaus membrana turi liesti vandens paviršių). Dializuojama apie 1 val. Po to tiriamas mažų molekulių (NaCl) ir stambių molekulių (baltymo) pasiskirstymas dializuojamame tirpale ir dializate:

- imama po 1 ml dializuojamo tirpalo ir dializato, atliekama biureto reakcija (į abu tirpalus įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO_4);
- atliekama Cl jonų atpažinimo reakcija: į 1 ml tiriamo tirpalo (dializuojamo tirpalo ir dializato) pripilama po lašą azoto rūgšties ir sidabro nitrato; iškrinta baltos spalvos nuosėdos.

Bandymų rezultatus užrašykite ir paaiškinkite.



2.2. MAKROMOLEKULIŲ FRAKCIONAVIMO IR STRUKTŪROS TYRIMO METODAI

Nustatant bet kokios medžiagos struktūrą, pirmiausia ją reikia išskirti iš mišinių, esančių audiniuose, ląstelėse. Dažnai šių medžiagų koncentracija būna labai maža. Toliau medžiagos molekulės suardomos, gauti fragmentai išskiriami, gryninami, identifikuojami, atliekama kiekybinė analizė. Šie duomenys apibendrinami, fragmentai surenkami į visumą ir tokiu būdu nustatoma makromolekulės struktūra.

2.2.1. LĄSTELIŲ FRAKCIONAVIMAS

Tiriamu objektu gali būti audinys, mikroorganizmų ląstelės, sukoncentruotos centrifuguojant ir kt. Audinys smulkinamas homogenizatoriuje, mikroorganizmų ląstelės ardomos ultragarsu, aukšto slėgio presu, trinant su stiklo milteliais ar kvarco smėliu. Labai svarbu parinkti tinkamos sudėties ir pH buferinį tirpalą. Baltymai ekstrahuojami vandeniniais nedidelės joninės jėgos druskų tirpalais. Tirpumą galima padidinti silpnais detergentų tirpalais, nepoliniais tirpikliais. Gautas homogenatas centrifuguojamas, atskiriami ląstelių fragmentai ir kitos “nuolaužos”. Tirpale virš nuosėdų yra įvairių tirpių baltymų, fermentų, mažo molekulinio svorio junginių.

Ši ir kitos procedūros, paprastai atliekamos 4°C temperatūroje, nenaudojami ekstremalių pH reikšmių buferiniai tirpalai.

2.2.2. FRAKCIONAVIMAS, PRIKLAUSANTIS NUO SKIRTINGO KOMPONENTŲ TIRPUMO

Daugelį balastinių baltymų arba tiriamą baltymą iš tirpalo galima nusodinti pakeitus tirpumo sąlygas, pvz., keičiant pH ar druskų koncentraciją (išsūdant). Labai efektyvus amonio sulfato koncentracijos didinimas: globulinai nusėda esant 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentracijai. Tokiu būdu išskiriama reikiama frakcija, kuri gryninama toliau. Šis metodas plačiai taikomas kaip pirmas gryninimo etapas.

Kai kurie angiavandeniai (celiuliozė, glikogenas) patvarūs virinant šarmuose, tokiu būdu galima pašalinti visus kitus mišinio komponentus. Lipidai iš audinių ekstrahuojami nepoliniais tirpikliais, pvz., chloroformo ir metanolio mišiniu (1:2).

2.2.3. FRAKCIONAVIMAS, PANAUDOJANT KOMPONENTŲ PASISKIRSTYMĄ SKIRTINGOSE FAZĖSE

Šio metodo bendras pavadinimas - chromatografija (žr. 2.1.6.)

Viena iš fazių gali būti milteliai arba smulkios dalelės, kuriomis užpildomas stiklinis vamzdelis (kolonėlė) arba plonu sluoksniu padengiama stiklinė plokštelė. Jei tirinama medžiaga netirpsta kietoje fazėje, bet adsorbuojasi jos paviršiuje, chromatografija vadinama adsorbicine. Adsorbentu gali būti aliuminio oksidas ir kt.

Kolonėlę užpildžius silikageliu, sugebančiu adsorbuoti didelį kiekį vandens, komponentų frakcionavimas vyksta dėl jų pasiskirstymo vandeninėje fazėje, imobilizuotoje ant silikagelio, ir vandenyje, tekančiame per kolonėlę. Frakcionuojant lipidus, silikagelis ar aliuminio oksidas prisotinami nepoliniu tirpikliu, o judri fazė - poliniu tirpikliu.

Plačiai taikoma popieriaus chromatografija, kai nejudanti fazė yra specialus vandenį adsorbuojantis popierius, ir plonasluoksni chromatografija, kai vietoj popieriaus naudojamas silikagelis, dengiantis stiklinę plokštelę.

Frakcionuojant lakias medžiagas, lakius lipidus, monosacharidus, aminorūgštis, steroidų junginius taikoma dujinė chromatografija. Metodas paremtas medžiagų pasiskirstymu judrioje dujinėje fazėje ir nejudrioje kietoje fazėje gana aukštoje temperatūroje. Šiuo atveju naudojama stiklinė ar metalinė 1-2 m ilgio, 0,2-1 cm skersmens kolonėlė, užpildyta labai smulkiu kietu nešėju (diatomitu), prisotintu nelakiais skysčiais (silikoniniais tepalais, stambiamolekulinių alkoholių ir dvibazių rūgščių esteriais). Chromatografuojama specialioje kameroje aukštoje temperatūroje (170-225°C). Mišinys, užneštas ant viršutinės kolonėlės dalies, greit išgaruoja, ir garai, kartu su inertinių dujų (argono, helio, azoto) srautu juda kolonėle. Mišinio komponentų judėjimo greičiai priklauso nuo pasiskirstymo tarp dujų ir nelakaus skysčio koeficientų. Išfrakcionuoti junginiai, išeinantys iš kolonėlės, aptinkami taikant fizinius-cheminius metodus, rezultatai užrašomi saviraščiu ant diagrafos juostos pikais. Kiekvieno piko plotas proporcingas atitinkamo junginio koncentracijai. Komponentai identifikuojami taikant standartų metodą. Aptinkami nograminiai junginių kiekiai.

Labai svarbi biocheminiuose tyrimuose yra afininė chromatografija (angl. *affinity* - giminingumas). Metodas paremtas specialių adsorbentų, specifiskai sąveikaujančių ir sulaikančių tam tikrą makromolekulių rūšį, panaudojimu. Afininė chromatografija taikoma išskiriant fermentus, imunoglobulinus, lektinus, receptorinius ir kitus baltymus, sugebančius specifiskai susijungti su mažomis molekulėmis.

Metodo principas: ligandas L, specifiskai sąveikaujantis su išskiriamu baltymu, stipriai sujungiamas su netirpiu nešėju N. Gautas adsorbentas N-L suspenduojamas tam tikrame buferyje ir juo užpildoma kolonėlė. Per kolonėlę leidžiamas mišinys, kuriame yra mus dominantis baltymas B. Baltymas B nekovalentinių sąveikų dėka susijungia su specifiniu adsorbentu.



Jei mišinyje nėra kitų baltymų, specifiskai sąveikaujančių su imobilizuotu li-

gandu, tai visi jie (išskyrus B) praeis pro kolonėlę nesulaikomi. Praplovus kolonėlę buferiu, sujungtas baltymas eliuojamas tirpalu, sukeliančiu specifinio kompleksu (N-L...B) disociaciją.

Ligando cheminė prigimtis priklauso nuo išskiriamo baltymo prigimties. Jei iš mišinio išskiriamas baltymas yra fermentas, tai ligando struktūra turi būti panaši į fermentinės reakcijos produktą arba konkurentinį inhibitorių, kadangi šiuo atveju vyksta specifinė sąveika tarp ligando ir fermento aktyvaus centro.

2.2.4. FRAKCIONAVIMAS, PRIKLAUSANTIS NUO MOLEKULIŲ DYDŽIO

Dializė ir ultrafiltracija (žr. 2.1.7.)

Sudėtingesnis metodas yra gel-filtracija. Kolonėlė užpildoma dekstranu, kurį sudaro angliavandenių grandinės, turinčios daugybę skersinių ryšių ir yra supresuotos į granules (sefadeksas). Kiekviena granulė turi trimatę struktūrą. Tinkelio tankis priklauso nuo sefadekso rūšies. Į granulės vidų gali patekti mažos molekulės, bet didesnės nepatenka. Praleidžiant pro tokią kolonėlę įvairių dydžių molekulių mišinį, mažos molekulės difunduoja į gelio vidų, todėl sulėtėja jų judėjimo greitis, o stambios molekulės praeina neužkliūdamos, pvz.: sefadeksas G-25 nesulaiko nieko, išskyrus mažo molekulinio svorio druskas ir paprastus ciklinius cukrus, todėl naudojamas mišiniams nudruskinti, sefadeksas G-200 turi gerokai daugiau skersinių ryšių, todėl naudojamas frakcionuojant makromolekules, kurių molekulinė masė yra 5000-200000. Makromolekulėms labai didelę reikšmę turi forma. Asimetrinės molekulės, kitaip negu tokio pat dydžio sferinės molekulės, dažnai nepatenka į vidinę gelio fazę, todėl juda greičiau.

2.2.5. CENTRIFUGAVIMAS

Įvairūs frakcionavimo metodai susiję su preparatinių centrifugų panaudojimu. Molekulių sedimentacijos greitis, veikiant išcentrinei jėgai, priklauso nuo jų formos ir dydžio.

Atliekant pirminį ląstelių fragmentų išskyrimą, pakanka trumpalaikio centrifugavimo skirtingais greičiais. Norint gauti labai švarų preparatą, būtina centrifuguoti tankio gradientu, pvz., frakcionuojant RNR, besiskiriančias sedimentacijos konstantomis, centrifuginiame mėgintuvėlyje sukuriamas sacharozės tirpalo gradientas: nuo 25% (mėgintuvėlio dugne) iki 5% (paviršiuje). Po to paviršius atsargiai padengiamas RNR preparato sluoksniu ir centrifuguojama labai dideliu greičiu keletą valandų. RNR mišinys išsiskirsto į keletą juostų, kurias stabilizuoja sacharozės gradientas. Mėgintuvėlio dugnas praduriamas ir lašais surenkamos frak-

cijos. Makromolekulės, tokios kaip DNR, dažnai centrifuguojamos CsCl gradientė. Šiuo atveju galima atskirti viengrandę DNR nuo dvigrandės.

Vienas iš baltymų molekulinės masės nustatymo metodų yra sedimentacijos greičio nustatymas. Dalelių nusėdimo greitis, veikiant išcentrinėms jėgoms, priklauso nuo šių jėgų dydžių: nuo dalelės dydžio, formos, jos tankio ir tirpiklio klampumo. Taikant šį metodą pasiekama išcentrinė jėga 400 000 kartų viršija Žemės traukos jėgą, todėl galima frakcionuoti tik gana stambias molekules. Sedimentacijos proceso metu centrifuginiame mėgintuvėlyje keičiasi baltymo koncentracija ir po tam tikro laiko nusistovi aiški riba tarp tirpiklio ir baltymo tirpalo. Šios ribos matavimai leidžia nustatyti sedimentacijos konstantą, kuri yra molekulinės masės funkcija.

Sedimentacijos greitį galima stebėti taikant kelis metodus. Vienas iš jų: per kiuvetę leidžiamas UV šviesos spindulys (230-290 nm) ir registruojamas jo sugėrimas nuo viršutinės tirpalo ribos kiuvetėje iki dugno. Sugėrimo dydis proporcingas baltymo koncentracijai. Sedimentacijos koeficientas turi laiko dimensiją, skaičiuojamas jėgos vienetui ir paprastai sudaro 10^{-13} sek. Sedimentacijos koeficiento matavimo vienetas vadinamas svedbergu (S): $1\text{ S} = 10^{-13}$ sek. Sedimentacijos greitis priklauso nuo tirpiklio ir ištirpintų dalelių tankių skirtumo. Jei dalelių tankis mažesnis už tirpiklio, jos išplaukia į paviršių.

Daug patogesnis yra sedimentacijos pusiausvyros metodas. Taikant jį, centrifuguojama tol, kol pasiekama baltymo pasiskirstymo pusiausvyra visoje kiuvetėje, t. y. nevyksta pastebimas baltymo judėjimas kiuvetėje, kadangi jo judėjimas dugno link, veikiant išcentrinei jėgai, išlaiko pusiausvyrą su dalelių judėjimu viršun, priklausančiu nuo difuzijos. Tokia pusiausvyra būdinga kiekvienam baltymui ir priklauso nuo jo molekulinės masės. Pasiekus pusiausvyrą, baltymo koncentracija matuojama visoje kiuvetėje (panaudojant optinę sistemą) ir pagal tam tikras formules apskaičiuojama molekulinė masė.

2.2.6. FRAKCIONAVIMAS, REMIANTIS ELEKTROS KRŪVIU

Biologinės makromolekulės - baltymai, nukleininės rūgštys, polisacharidai - turi tam tikrą elektros krūvį. Dalelės bendras krūvis priklauso nuo H^+ jonų koncentracijos terpėje ir gali keistis, sąveikaujant su mažos molekulinės masės jonais ar kitomis molekulėmis. Elektros lauke įkrautų dalelių judėjimas anodo ar katodo link, priklauso nuo jų suminio krūvio. Toks procesas vadinamas elektroforeze. Judėjimo greičių skirtumai - mišinių frakcionavimo pagrindas. Baltymai turi skirtingus izoelektrinius taškus, titravimo kreives, todėl skiriasi ir judrumu elektros lauke, esant bet kokiai pH reikšmei.

Elektroforezė - nesudėtingas procesas, gali būti atliekamas buferiu sudrėkinto-

je filtruojamojo popieriaus juostelėje, celiuliozės acetato, agaro, agarozės, poliakrilamido gelio sluoksnyje, poliakrilamido ar polisacharido gelio kolonėlėje. Atsižvelgiant į keliamus tikslus, gali būti naudojama elektros įtampa nuo kelių voltų iki 2-3 tūkstančių voltų. Baltymų mišinio tirpalo užlašinamas lašas ar išliejamas sluoksnis, o atlikus elektroforezę, frakcijos aptinkamos optinėmis sistemomis arba dažant specifiniais dažais. Elektroforezė poliakrilamido gelyje su natrio dodecilsulfatu (DSN) plačiai taikoma polipeptidų molekulinėms masėms nustatyti. Baltymai, veikiami DSN, denatūroja, disocijuoja į subvienetus, molekulė "išsivynioja" ir su DSN sudaro kompleksus. Toks kompleksas turi suminį neigiamą krūvį, didesnę nei aminorūgščių liekanų šoninių grandinių krūvis. Kompleksai esti lazdelės formos, turi beveik vienodą neigiamą krūvį, tenkantį masės vienetui, todėl elektroforezės metu juda greičiu, atvirkščiai proporcingu molekulės masei.

Vienas iš jautriausių baltymų bei nukleino rūgščių frakcionavimo metodų yra elektroforezė poliakrilamido gelyje. Gelio sudėtis: akrilamidas; agentas, sudarantis skersinius ryšius (N,N' -metilenbisakrilamidas); polimerinimo reakcija vyksta dalyvaujant katalizatoriui TEMED (N,N,N',N' -tetrametiletildiaminas) ir iniciatoriui (amonio persulfatas, riboflavinai, šviesa). Poliakrilamido gelis - ne tik palaidanti terpė, bet ir aktyvus molekulių frakcionavimo dalyvis: kuo didesnė akrilamido koncentracija, tuo mažesnis porų dydis gelyje. Makromolekulių judrumas gelyje atvirkščiai proporcingas porų dydžiui.

Tiriant labai didelės molekulinės masės polimerus, naudojami agarozės ir agarozės-poliakrilamido geliai arba poliakrilamido koncentracijų gradiento geliai. Šiuo atveju daugelis baltymų išsiskirsto daug geriau.

Labai svarbus metodas, susijęs su įkrautų grupių buvimu baltymuose, yra jonų mainų chromatografija. Paprastai naudojami tiriamų mišinių vandeniniai tirpalai ir kolonėlės, užpildytos jonų mainų derva - granulėmis, turinčiomis poras ir surištas jonų grupes, pvz.: $-SO_3^-$, $-COO^-$, $-NH_3^+$. Mažų molekulių frakcionavimui tinkamiausios sintetinės dervos, kurių pagrindas - skersinius ryšius turintis polistirolas. Stambių molekulių išskirstymui naudojami dekstranai (sefadeksai). Dervos, sujungiančios katijonus, vadinamos katijonitais, o sujungiančios anijonus - anijonitais.

Tarkime, norime išfrakcionuoti medžiagų AH^+ ir BH^+ mišinį, panaudojant katijonitą su funkcinėmis sulfogrupėmis. Pirmiausia jonitas plaunamas dideliu kiekiu buferio iš silpnos rūgšties ir jos natrio druskos (pH 4, Na^+ jonų koncentracija 0,1 mol/l). Gauta derva (su Na^+ jonais) užpildoma kolonėlė. AH^+ ir BH^+ - silpnos rūgštys, turinčios po vieną rūgštinę grupę. Tiriamas mišinys ištirpinamas nedideliame kiekyje to paties buferio ir užpilamas ant kolonėlės. AH^+ ir BH^+ pakeis Na^+ jonus, esančius ant jonito granulių, tokiu būdu jos atsidurs nejudrioje fazėje (ant netirpios dervos). Šios skiriamos medžiagos su katijonitu susijungia gana stipriai,

tačiau ryšys gali būti susilpnintas, pakeitus Na^+ jonų koncentraciją arba buferio pH. Buferį pašarminus iki pH 6, AH^+ iš dalies disocijuoja, susidaro A, blogai susijungiantis su jonitu. Pašarminus dar daugiau, susidaro B, taip pat blogai susijungiantis su jonitu. Ir atvirkščiai - padidinus Na^+ jonų koncentraciją, (nuo 0,1 iki 0,5 mol/l), esant pH 4, AH^+ ir BH^+ ryšys su derva susilpnėja, nes Na^+ jonai sugeba konkuruoti dėl dervos sulfogrupių.

Vadinasi, norint atskirti A ir B šioje sistemoje, reikia paruošti buferį, turintį tokią pH reikšmę ir Na^+ jonų koncentraciją, kad abi medžiagos turėtų skirtingą giminingumą jonitui - tik tokiu atveju mišinys bus išfrakcionuotas.

Panašūs procesai vyksta ir sistemose su anijonitais, tik šiuo atveju fiksuotos katijoninės grupės sujungia anijonus.

Kartais sunku parinkti sąlygas, būtinas nežinomų mišinių frakcionavimui, todėl dažniausiai naudojamas gradientinis eliuavimas, palaipsniui keičiant neorganinio jono koncentraciją ar buferio pH reikšmę.

Šiuo metu naudojami aminorūgščių analizatoriai, kuriais atliekama automatinė kiekybinė aminorūgščių analizė.

3. FERMENTAI

Biocheminės reakcijos vyksta dideliu greičiu, dalyvaujant biologiniams katalizatoriams - fermentams. Fermentai funkcionuoja visuose gyvuose organizmuose. Ląstelėms būdingi visi metaboliniai virsmai ir tai yra specifinių fermentų veikimo rezultatas. Įvairios fiziologinės funkcijos - raumenų susitraukimas, nervinių impulsų perdavimas ir kt. - susijusios su fermentų aktyvumu. Dauguma šiuo metu žinomų fermentų yra tirpūs globuliniai baltymai, nors katalitinėmis savybėmis pasižymi ir kai kurie struktūriniai baltymai, pvz., aktinas ir miozinas katalizuoja ATF hidrolizę. Fermentai (virškinimo) veikia ne tik jų susidarymo vietose, bet ir ne ląstelėse.

Visi fermentai - baltymai, todėl jiems būdingos baltymų savybės: labilumas, denatūruojami (veikiami pH, temperatūros) jie praranda aktyvumą. Fermentų veikimas priklauso nuo pH: aktyviausi jie būna gana siaurame intervale ir terpės pH pasikeitimas silpnina ar net stabdo fermentų veikimą. Fermentai pagreitina reakciją apie 10^7 kartų. Jie nepakeičia reakcijos pusiausvyros, bet katalizuoja, sumažindami jos aktyvacijos energiją. Fermentai yra labai specifiški tiek katalizuojamos reakcijos, tiek substrato, dalyvaujančio reakcijoje, atžvilgiu. Kiekvienas fermentas katalizuoja kokią nors vieną arba keletą labai panašių cheminių reakcijų. Fermentai yra labai specifiški arba jiems būdingas absoliutus specifiskumas. Pavyzdžiui, proteolitiniai fermentai skiriasi substratinio specifiskumu: subtilizinas, sintetinamas tam tikrų bakterijų rūšių, hidrolizuoja peptidinę jungtį, nepriklausomai nuo šalia esančių šoninių grandinių prigimties; tripsinas hidrolizuoja peptidines jungtis, kurias sudaro tik lizino ar arginino karboksilinės grupės; trombinas, dalyvaujantis kraujo krešėjime, dar specifiskesnis už tripsiną, hidrolizuoja peptidines jungtis, kurias sudaro arginino karboksilinė grupė ir glicino aminogrupė; DNR-polimerazė I yra nepaprastai specifiskas fermentas, katalizuojantis 4 rūšių nukleotidų susijungimą į grandinę, t. y. DNR sintezę. Į DNR grandinę klaidingai įtraukiamas nukleotidas gali būti ypač retai.

Daugelio fermentų aktyvumas yra reguliuojamas. Kai kurie iš jų yra sintetinami kaip neaktyvūs pirmtakai ir aktyvūs tampa tik fiziologiškai reikiamoje vietoje tam tikru laiku, pvz., kasoje sintetinamas neaktyvus fermentas tripsinogenas, kuriame hidrolizavus tam tikrą peptidinę jungtį, žarnose jis tampa tripsinu - aktyviu fermentu. Kiti fermentinio aktyvumo reguliavimo mechanizmai: kovalentinė modifikacija, alosterinė sąveika.

Fermentai atlieka įvairių energijos rūšių transformaciją: fotosintezės metu šviesos energija paverčiama cheminių jungčių energija; mitochondrijose mažo molekulinio svorio junginių, patenkančių su maistu, laisvoji energija virsta ATF energija, o ATF jungčių energija panaudojama daugelio procesų metu.

Kai kurie specifiniai mažo molekulinio svorio junginiai ir jonai sugeba inhibuoti (slopinti) fermentus. Negrįžtamo slopinimo metu inhibitorius labai stipriai kovalentiškai susijungia su fermentu, disociacija vyksta nepaprastai lėtai, fermentas visiškai praranda aktyvumą. Grįžtamam slopinimui būdingas greitas pusiausvyros tarp fermento ir inhibitoriaus nusistovėjimas. *Konkurentinis* inhibitorius trukdo substratui susijungti su aktyviu fermento centru. Jis sulėtina reakciją, sumažindamas fermento molekulių skaičių, susirišančių su substratu. Jei inhibitorius susijungia ne tik su laisvu fermentu, bet ir su fermento-substrato kompleksu, slopinimas vadinamas *nekonkurentiniu*. *Nekonkurentinio slopinimo* metu inhibitorius sumažina fermento “apsisukimų skaičių”. Daugeliu atvejų *nekonkurentinis* inhibitorius savo struktūra skiriasi nuo substrato. Todėl manoma, kad inhibitorius susijungia su alosteriniu fermento centru, t.y. centru, kuris skiriasi nuo substrato sujungimo centro, ir fermento aktyvumo sumažėjimą lemia jo trimatės struktūros pakitimai, kuriuos sukelia inhibitoriaus prisijungimas, darantis įtaką šalia esančiam aktyviam centrui.

Konkurentinis slopinimas gali būti sustabdytas padidinus substrato koncentraciją, tuo jis skiriasi nuo *nekonkurentinio slopinimo*. Kokio nors junginio susijungimas su alosteriniu centru kartais padidina fermento aktyvumą. Tokie junginiai vadinami *aktyvatoriais*.

Dauguma fermentų yra sudėtiniai baltymai. Fermentas, vadinamas cholofermentu, gali suskilti į baltyminių komponentų - apofermentą ir nebaltyminę dalį - kofaktorių. Kai kurių fermentų sudėtyje yra metalai, dalyvaujantys palaikant natūrią konformaciją. Sudėtingi organiniai kofaktoriai, vadinami *kofermentais*, fermentų reakcijose dalyvauja kaip atomų ar funkcinių grupių donorai ar akceptoriai.

Šiuo metu iš gyvų ląstelių yra išskirta šimtai fermentų, daugelis jų išvalyti, išgryninti, iškristalinti. Kai kurie fermentai aptikti tik jų katalitinio aktyvumo dėka, bet jie neišskirti iš gyvų ląstelių ir neišgryninti.

3.1. FERMENTINĖ KRAKMOLO HIDROLIZĖ. FERMENTŲ TERMOLABILUMAS, SPECIFIŠKUMAS

Krakmolą galima hidrolizuoti rūgštimis ir fermentais.

Fermentams pažinti specifinių reagentų nėra. Apie fermento buvimą sprendžiama iš to, ar jis veikia substratą. Substrato pakitimas arba jo skilimo produktai atpažįstami iš specifinių reakcijų, pvz., amilazės paveiktas krakmolą nereaguoja su jodu, o jo skilimo produktai - maltozė, gliukozė - redukuoja metalų hidroksidus (žr. *Angliavandeniai*).

Plačiai paplitusios α -amilazės hidrolizuoja krakmolo polisacharidines grandines taškuose, esančiuose toli nuo grandinės galų, ir susidaro trumpesnės grandinės turintys produktai - dekstrinai, paprastieji cukrai. α -amilazės aptinkamos augaluo-

se, gyvulių organizmuose. Vienas aktyvus šios klasės fermentas randamas žmogaus seilėse (kai kurių žmonių seilėse šio fermento nėra). Visoms α -amilazėms būtini Cl⁻ jonai, veikiantys kaip aktyvatoriai, tačiau jų vaidmuo fermento veikimo mechanizme dar neišskus.

REAGENTAI: seilių tirpalas (burnoje palaikyti distiliuoto vandens), 1% krakmolo kleisterio, Liugolio, 10% NaOH, 1% CuSO₄ tirpalai, sacharozės tirpalas (pasiruošti patiems).

DARBO EIGA.

1. Imami 2 mėgintuvėliai. Į vieną iš jų įpilama po 1 ml krakmolo kleisterio ir distiliuoto vandens, į kitą - po 1 ml krakmolo kleisterio ir praskiestų seilių. Tirpalai mėgintuvėliuose sumaišomi, mėgintuvėliai šildomi 37-40°C temperatūros vandens vonioje apie 10 min. Inkubacijos metu 3-4 kartus atliekama reakcija su Liugolio tirpalu: ant baltos keraminės plokštelės užlašinamos dvi eilės Liugolio tirpalo lašų, ant jų stiklinėmis lazdelėmis iš mėgintuvėlių lašinami tiriamų tirpalų lašai. Aprašykite, kas vyksta mėgintuvėliuose ir kaip kinta lašelių spalva.

Pasibaigus inkubacijai, stebėkite opalescenciją mėgintuvėliuose. Su tirpalais iš abiejų mėgintuvėlių atliekama Tromerio reakcija (įpilama NaOH iki šarminės terpės ir CuSO₄, kol iškrinta mėlynos nuosėdos; mišinys pašildomas degiklio liepsnoje, žr. 1.1.2.1.). Rezultatus paaiškinkite.

2. Imami 2 mėgintuvėliai. Į vieną mėgintuvėlį įpilama po 1 ml krakmolo kleisterio ir praskiestų seilių, į kitą - po 1 ml krakmolo kleisterio ir virintų praskiestų seilių. Abu mėgintuvėliai inkubuojami 37-40°C temperatūros vandens vonioje apie 10 min. Reakcijų eiga mėgintuvėliuose stebima tikrinant mėginius Liugolio tirpalu ant baltos plokštelės. Kas vyksta mėgintuvėliuose ir kodėl? Pasibaigus inkubacijai, su tirpalais iš abiejų mėgintuvėlių atliekama Tromerio reakcija (žr. 1.1.2.1.).
3. Imami 2 mėgintuvėliai. Į vieną iš jų įpilama po 1 ml krakmolo kleisterio ir praskiestų seilių, į kitą - po 1 ml sacharozės tirpalo ir praskiestų seilių. Abu mėgintuvėliai inkubuojami 37-40°C temperatūros vandens vonioje apie 10 min. Inkubacijos metu reakcijos eiga stebima, tikrinant mėginius Liugolio tirpalu ant baltos plokštelės. Su tirpalais iš abiejų mėgintuvėlių atliekama Tromerio reakcija (žr. 1.1.2.1.). Rezultatus užrašykite ir paaiškinkite.

3.2. PH ĮTAKA FERMENTŲ VEIKIMUI. SEILIŲ AMILAZĖS OPTIMALIAUS pH NUŠTATYMAS

REAGENTAI: 1% krakmolo kleisteris, Liugolio tirpalas, fosfatinis buferis: 0,2 M Na₂HPO₄ ir 0,1 M citrinos rūgštis; 40 kartų praskiestos seilės (pasiruošti patiems).

DARBO EIGA. Paruošiamos dvi eilės sunumeruotų mėgintuvėlių (po 5 kiekvienoje). Į pirmoje eilėje esančius mėgintuvėlius įpilama po 0,2 ml seilių tirpalo, į antroje eilėje esančius mėgintuvėlius - po 0,2 ml distiliuoto vandens. Po to į kiekvieną mėgintuvėlį (abiejose eilėse) įlašinama fosfatinio buferio ir citrinos rūgšties tirpalų, kaip nurodyta lentelėje:

Mėgintuvėlio Nr.	Na ₂ HPO ₄ lašai	Citrinos r. lašai	pH
I	6	4	5,8
II	7	3	6,3
III	8	2	6,9
IV	9	1	7,5
V	10	-	8,2

Po to į visus mėgintuvėlius įpilama po 0,2 ml krakmolo kleisterio, mišinys sumaišomas. Mėgintuvėliai vienu metu statomi į 38°C temperatūros vandens vonią ir inkubuojami 15-20 min.

Pasibaigus inkubacijai, mėgintuvėliai atšaldomi vandenyje. Į kiekvieną mėgintuvėlį įlašinama po 1-2 lašus Liugolio tirpalo (lašinama, kol tirpalo spalva tampa aiški), mišinys sumaišomas ir kolorimetruojamas (šviesos filtras nr. 6; 0,5 cm storio kiuvetė). Amilazės aktyvumą rodo ekstinkcijos kontroliniuose mėgintuvėliuose ir ekstinkcijos bandymų mėgintuvėliuose skirtumas:

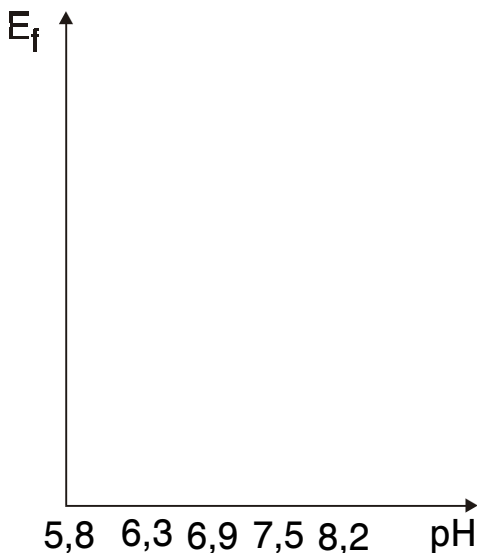
$$E_f = E_k - E_{\text{band.}}$$

E_f - ekstinkcija, atitinkanti tiriamo tirpalo fermentinį aktyvumą;

E_k - ekstinkcija kontroliniuose mėgintuvėliuose;

$E_{\text{band.}}$ - ekstinkcija bandymų mėgintuvėliuose.

Remiantis gautais duomenimis, braižomas grafikas "Amilazės aktyvumo priklausomybė nuo pH":



3.3. AKTYVATORIŲ IR INHIBITORIŲ ĮTAKA AMILAZĖS AKTYVUMUI

REAGENTAI: 0,3% NaCl, 0,3% CuSO₄, Liugolio tirpalai, 1% krakmolo kleisteris, seilės.

DARBO EIGA. Paruošiamos 3 eilės mėgintuvėlių (po 8 mėgintuvėlius kiekvienoje; geriausia juos sunumeruoti, kad nesusimaišytų inkubuojant). Į visus mėgintuvėlius įpilama po 1 ml distiliuoto vandens. Į visose eilėse esančius pirmuosius mėgintuvėlius įpilama po 1 ml nepraskiestų seilių ir viskas gerai sumaišoma. Tada iš kiekvienoje eilėje esančių pirmųjų mėgintuvėlių po 1 ml tirpalo perpilama į antruosius mėgintuvėlius ir t. t. Tokiu būdu seilės skiedžiamos ir visuose kituose mėgintuvėliuose. Iš aštuntųjų kiekvienoje eilėje esančių mėgintuvėlių 1 ml tirpalo išpilama. Kiekviename mėgintuvėlyje tirpalas labai gerai sumaišomas pipetuojant.

Į visus pirmosios (kontrolinės) eilės mėgintuvėlius pripilama po 1 ml distiliuoto vandens, viskas sumaišoma.

Į visus antrosios eilės mėgintuvėlius pripilama po 1 ml NaCl tirpalo, viskas sumaišoma.

Į visus trečiosios eilės mėgintuvėlius pripilama po 1 ml CuSO₄ tirpalo, viskas sumaišoma.

Tada į visus mėgintuvėlius pripilama po 2 ml krakmolo kleisterio: pirmiausia į pirmuosius kiekvienos eilės mėgintuvėlius, po to - į antruosius, trečiuosius ir t. t. Viskas gerai sumaišoma, mėgintuvėliai statomi į 38-40°C temperatūros vandens vonią ir inkubuojami 15-20 min. Pasibaigus inkubacijai, mėgintuvėliai išimami ir atšaldomi vandentiekio vandenyje (reakcija sustabdoma). Į visus mėgintuvėlius įlašinama po 1-3 lašus Liugolio tirpalo.

Stebėkite spalvų pakitimus mėgintuvėliuose. Rezultatus užrašykite ir paaiškinkite.

3.4. DEHIDROGENAZINIO KOMPLEKSO INHIBAVIMAS CF JONAIŠ

Dehidrogenazės priklauso fermentų oksidoreduktazių klasei, aptinkamos visose gyvulinėse, augalinėse ląstelėse, mikroorganizmuose. Katalizuoja vandenilio atskilimą, oksiduodamos įvairius substratus: pieno rūgštį (laktatdehidrogenazė), obuolių rūgštį (malatdehidrogenazė), įvairius aldehydus (aldehiddehidrogenazė), spiritus (alkoholdehidrogenazė) ir kt.

REAGENTAI: bulvė, NaCl, NaI, KClO₃ (kristaliniai).

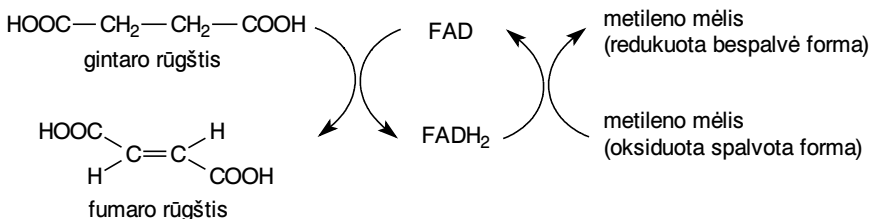
DARBO EIGA. Bulvė supjaustoma į 4 dalis. Pirmoji dalis paliekama kontrolei,

antroji apibarstoma NaCl, trečioji - NaI, ketvirtoji - KClO_3 . Po 15-20 min. NaCl apibarstyta bulvės dalis lieka nepakitusi, o kitos dalys patamsėja.

3.5. SUKGINATDEHIDROGENAZINIO AKTYVUMO KONKURENTINIS SLOPINIMAS

Sukcinatdehidrogenazė - specifinis fermentas, randamas aerobinių ląstelių mitochondrijose, bakterinių ląstelių oksidacinėse membranose. Šio fermento kofermentas - FAD, kovalentine jungtimi prijungtas prie baltyminės dalies.

Sukcinatdehidrogenazė (flavoproteidas) oksiduoja gintaro rūgštį iki fumaro rūgšties. Gintaro ir fumaro rūgštys savo struktūra labai panašios, todėl konkuruoja dėl aktyvaus fermento centro. Nebūdama substratu, fumaro rūgštis užima fermento aktyvų centrą, todėl slopina jo aktyvumą.



REAGENTAI: raumens homogenatas, vazelino aliejus, 1 % fumaro rūgštis, 1 % gintaro rūgštis, 1 % metileno mėlis.

DARBO EIGA. Apie 5 g raumens (pašalinus riebalinį audinį) smulkiai supjaustoma (arba sukarpoma žirkklėmis), grūstuvėlyje sutrinama ir, užpylus 20 ml distiliuoto vandens, homogenizuojama, kol susidaro vientisa masė. Į 3 sunumeruotus mėgintuvėlius įdedama po 3-4 ml raumens homogenato ir pripilama: į pirmąjį - 0,4 ml vandens, į antrąjį - 0,2 ml vandens ir 0,2 ml fumaro rūgšties, į trečiąjį - 0,4 ml fumaro rūgšties. Į visus tris mėgintuvėlius įpilama po 1 ml gintaro rūgšties, po 2-3 lašus metileno mėlio ir, gerai viską sumaišius, po 3-4 lašus vazelino aliejaus. Mėgintuvėliai šildomi 40°C temperatūros vandens vonioje. Po 3-5 min pirmajame mėgintuvėlyje beveik visiškai išnyksta mėlyna spalva, antrajame mėgintuvėlyje sumažėja spalvos intensyvumas, o trečiajame mėgintuvėlyje spalva nesikeičia.

3.6. PIENO RIEBALŲ SKILIMAS VEIKIANT LIPAZEI

Hidrolizuojantis neutraliems riebalams, susidaro trys riebalų rūgščių molekulės ir viena glicerolio molekulė. Šią reakciją augalinėse ir gyvulinėse ląstelėse katalizuoja fermentai lipazės.

Pagrindinė riebalų skilimo vieta - plonosios žarnos. Dvylikapirštėje žarnoje maistą veikia tulžies ir kasos sultys. Tulžis stimuliuoja lipidų emulgavimą ir soliubilizaciją. Lipidai netirpsta vandenyje, todėl hidrolitiniai fermentai gali veikti tik ties riebalų lašelių ir vandeninės fazės riba. Reakcijos greitis priklauso nuo šios ribos ploto: kuo smulkesni riebaliniai lašeliai, tuo didesnis plotas, kuriame gali veikti fermentai.

Tulžies ir kasos sultys yra šiek tiek šarminės, jos neutralizuoja rūgščių skrandžio turinį. Neutralioje aplinkoje tulžies rūgštys (taurocholinė, glikocholinė) veikia kaip emulgatoriai. Šių paviršinio aktyvumo medžiagų ir peristaltikos dėka maisto lipidai emulguojami vandeninėje terpėje ir tai skatina lipolizę.

Maistui patekus į dvylikapirštę žarną, hormonai skatina kasos sulčių ir tulžies sekreciją. Kasos sultyse yra lipazės pirmtakas, kuris aktyvuojamas, susidarant kompleksui su kolipaze.

Lipazės hidrolizės greičiui neturi įtakos nei riebalų rūgščių nesotumo laipsnis, nei grandinės ilgis. Hidrolizę greitina Ca^{2+} jonai, su riebalų rūgštimis sudarydami netirpius muilus, taip pat sumažina inhibuojantį rūgščių poveikį fermentams, apriboja acilglicerolių resintezę, paslinkdami reakcijos pusiausvyrą hidrolizės link.

REAGENTAI: kasos audinys, glicerolis, tulžis, pienas, 0,1M NaOH, fenolftaleinas, smėlis.

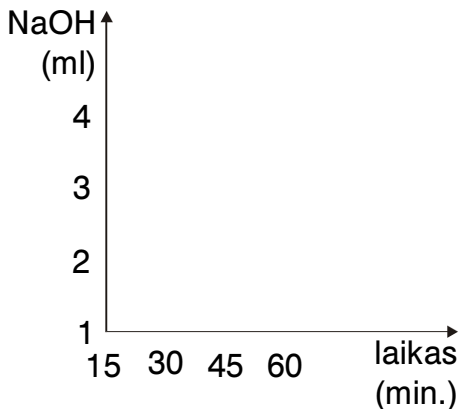
DARBO EIGA. 3-5 g kasos audinio sutrinama su 10-15 ml vandens ir glicerolio mišiniu (5:1), kol susidaro vientisa masė. Kad geriau susitrintų, pridėdama trinto stiklo arba smėlio. Gauta masė centrifuguojama. Skystis virš nuosėdų vadinamas *nuopilu*.

Sumeneruojamos keturios 100 ml talpos konusinės kolbutės (Nr. 1-4). Į pirmąsias dvi kolbutes (Nr. 1,2) įpilama po 2 ml nuopilo ir 50 ml pieno. Į kolbutę Nr. 1 įlašinami 2-3 lašai tulžies. Abi kolbutės inkubuojamos 37-40°C temperatūros vandens vonioje 15 min. Į kitas dvi kolbutes (Nr. 3,4) įpilama po 10 ml distiliuoto vandens ir po 2-3 lašus fenolftaleino.

Pasibaigus inkubacijai, iš kolbutės Nr. 1 imama 10 ml pieno, supilama į kolbutę Nr. 3 ir titruojama 0,1 M NaOH; iš kolbutės Nr. 2 imama 10 ml pieno, supilama į kolbutę Nr. 4 ir titruojama 0,1 M NaOH. Kolbos su pienu visą laiką laikomos vandens vonioje.

Taip titruojama 4 kartus kas 15 min. Remiantis gautais duomenimis, braižomas grafikas:

Rezultatus parašikinkite.



3.7. ANGLIAVANDENIŲ APYKAITOS FERMENTAI

Virškinimo metu žinduolių virškinimo trakte fermentais hidrolizuojami pagrindiniai maisto komponentai - angliavandeniai, riebalai, baltymai, kurie skyla į sudedamąsias dalis. Šis procesas būtinas, kad vyktų maisto medžiagų pasisavinimas, nes ląstelės, dengiančios žarnyno sienes, sugeba įsiurbti ir perduoti į kraują tik nedideles molekules: polisacharidai ir netgi disacharidai pasisavinami tik po jų visiškos hidrolizės virškinamojo trakto fermentais, kol susidaro monosacharidai: krakmolas ir glikogenas skaldomi, kol susidaro D-gliukozė. Disacharidus hidrolizuoja fermentai, esantys žarnų epitelinių ląstelių išoriniame paviršiuje. Sacharozė, veikiant fermentui sacharazei (invertazei), hidrolizuojama, kol susidaro D-gliukozė ir D-fruktozė.

Sacharozė sintetinama visuose žaliuosiuose augaluose - chloroplastuose ir kitose vietose, kur kaupiasi krakmolas. Ji yra pagrindinė cukrų transportinė forma, kadangi sukuria mažesnę osmotinę slėgį negu toks pat monosacharido kiekis. Chemiškai sacharozė yra inertinė, tačiau gerai hidrolizuojasi rūgščioje aplinkoje. Fermentas sacharazė randamas aukštesniuose augaluose ir grybuose. Kai kuriose bakterijose sacharozę skaido sacharozofosforilazė, susidaro gliukozo-1-fosfatas, kuris gali būti panaudojamas kaip substratas katabolizmo procesuose.

REAGENTAI: presuotos (arba džiovintos) mielės, smėlis, 5% sacharozės, 10% NaOH, 1% CuSO_4 , prask. H_2SO_4 , 0,1 N NaOH, 0,1 N I_2 , 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ tirpalai, krakmolo kleisteris.

DARBO EIGA. 3-4 g presuotų (arba 1 g džiovintų) mielių grūstuvėlyje sutrinama su smėliu, pripilama 30 ml distiliuoto vandens. Mišinys perpilamas į konusinę kolbutę ir paliekamas stovėti termostate (arba vandens vonioje) 20-30°C temperatūroje 1 val. Pasibaigus inkubacijai, masė perpilama į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama kelias minutes. Nuopile yra fermentas sacharazė.

1. Į du mėgintuvėlius pripilama po 1 ml sacharazės tirpalo (nuopilo). Vieno mėgintuvėlio turinys pavirinamas ir atšaldomas. Tada į abu mėgintuvėlius pripilama po 2 ml šviežiai paruošto 5% sacharozės tirpalo ir inkubuojama 40°C temperatūroje 10 min. Pasibaigus inkubacijai, abiejuose mėgintuvėliuose atliekama Tromerio reakcija: pripilama NaOH (iki šarminės terpės!) ir CuSO_4 (kol iškris mėlynos nuosėdos), mišinys pašildomas degiklio liepsnoje. Rezultatus paaiškinkite.
2. Į tris 100 ml talpos konusines kolbutes įpilama po 5 ml sacharozės tirpalo ir po 1 ml sacharazės (invertazės) tirpalo. Visos kolbutės inkubuojamos skirtingose temperatūrose: 10°C (šaldytuve), 37°C, 70°C (vandens voniose) 10-15 min. Po to nustatoma, kiek cukraus buvo invertuota (žr. 3.8.).

3.8. GLIUKOZĖS NUSTATYMAS PAGAL VILŠTETERĮ

Šiuo metodu galima nustatyti gliukozę esant fruktozei ir sacharozei. Oksiduojasi tik gliukozės aldehydinė grupė.

Į visas kolbutes įpilama po 15 ml 0,1 N I_2 tirpalo ir, energingai maišant, lėtai, per 2-3 min., supilama 22 ml 0,1 N NaOH (1,5 karto daugiau nei I_2 tirpalo). Palai-koma 15 min., tamsoje (spintelėje), po to parūgštinama H_2SO_4 (tikrinti indikatoriu-mi) ir I_2 likutis titruojamas 0,1 N $Na_2S_2O_3$, indikatorius - krakmolo kleisteris.

SKAIČIAVIMAS:

$$M(C_6H_{12}O_6) = 180 \text{ g/mol}$$

Sujungto I_2 kiekis (ml) perskaičiuojamas g ir padauginama iš koeficiento 0,7088.

$$M(I_2) = 253,94 \text{ g/mol}$$

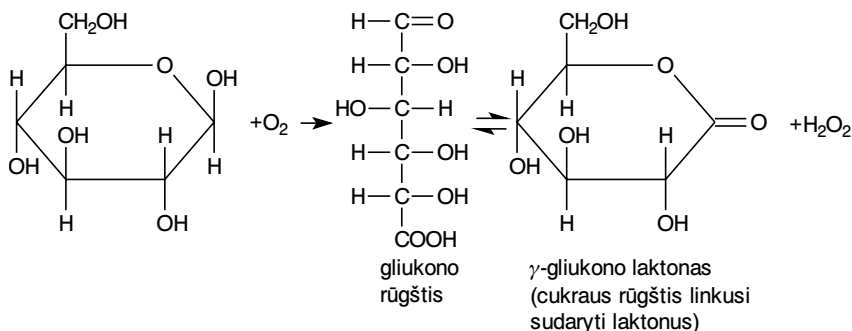
$$X = \frac{12,655 \cdot a \cdot 180}{253,94} = 12,655 \cdot a \cdot 0,7088 = \dots \text{mg}$$

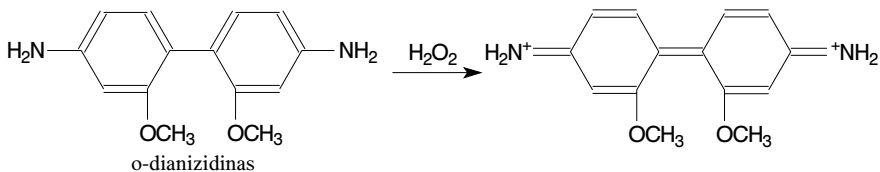
a - iš 15 ml I_2 atimti nutitruotų $Na_2S_2O_3$ ml kiekį, pvz., jei nutitruojama 3 ml $Na_2S_2O_3$, tai $15 - 3 = 12$; t. y. $a = 12$.

3.9. GLIUKOZĖS NUSTATYMAS TAIKANT O-DIANIZIDINĮ METODĄ

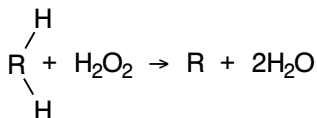
Fermentas gliukozooksidazė specifiškas β -D-gliukozei ir naudojamas kiekybi-nei gliukozės analizei.

Gliukozė aerobinės oksidacijos metu, dalyvaujant gliukozooksidazei, oksiduo-jasi, kol susidaro gliukono rūgštis. Reakcijos metu išsiskiriančio vandenilio perok-sido kiekis lygus oksiduotos gliukozės kiekiui. Į mišinį įdėjus fermento peroksida-zės, kuris katalizuoja o-dianizidino oksidaciją vandenilio peroksidu, susidaro spal-votas junginys. Spalvos intensyvumas priklauso nuo oksiduoto gliukozės kiekio ir yra nustatomas spektrofotometriškai.

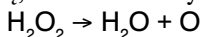




Fermentas - peroksidazė - sudėtinis baltymas, aktyviame centre turintis Fe (III) joną, sujungtą su keturių pirolo žiedų liekanomis, ir yra hemoproteidas. Šis fermentas perneša vandenilį nuo substrato į vandenilio peroksidą:



arba skaldo vandenilio peroksidą, išsiskiriant aktyviam atominiam deguoniui:



REAGENTAI: kristalinė gliukozė, tris-gliukozooksidazinis reagentas (20 mg gliukozooksidazės ir 0,5 mg peroksidazės ištirpinama 50 ml 0.5 M tris-buferyje, pH 7, pridedama 0,5 ml 1% o-dianizidino tirpalo 96% etanolyje ir tris-buferiu skiedžiama iki 100 ml), 1% o-dianizidino tirpalas (30 mg dianizidino šildant ištirpinama 3 ml 96% etanolyje).

DARBO EIGA. Paruošiamas 100 mg/ml koncentracijos pradinis gliukozės tirpalas (analitinėmis svarstyklėmis pasveriamas 50 mg gliukozės, tirpinama distiliuotame vandenyje ir praskiedžiama iki 500 ml).

STANDARTINIAI TIRPALAI

Mėgintuvėlio Nr.	Gliukozės tirpalo (100 mg/ml) kiekis (ml)	Distiliuoto vandens kiekis (ml)	Gliukozės kiekis, esantis mėgintuvėlyje (mg)
I	0,1	0,4	10
II	0,2	0,3	20
III	0,3	0,2	30
IV	0,4	0,1	40
V	0,5	-	50

1. Į kiekvieną paruoštą mėgintuvėlį įpilama po 3 ml tris-gliukozooksidazinio reagento (V mėg.);
2. Kartu paruošiamas kontrolinis mėgintuvėlis, į kurį įpilama 0.5 ml distiliuoto vandens ir 3 ml tris-gliukozooksidazinio reagento.

3. Nustatoma gliukozės koncentracija nežinomos koncentracijos tirpaluose (užduotis).

Visi mėgintuvėliai 25 min. inkubuojami 37°C temperatūroje. Spalvos intensyvumas matuojamas spektrofotometru (bangos ilgis 420 nm, kiuvetė 0,5 cm).

Gliukozės koncentracija apskaičiuojama, palyginus gautas absorbcijos reikšmes su kalibracinės kreivės duomenimis. Abscisių ašyje (X ašyje) pažymima tirpalo tankio reikšmė (spektrofotometro duomenys, OD), o ordinačių ašyje (Y ašyje) pažymimas gliukozės kiekis (mg) standartiniuose tirpaluose. Per gautus taškus brėžiama kalibracinė kreivė. Ištyrus duotą nežinomos koncentracijos tirpalą spektrofotometru, pagal kalibracinę kreivę nustatomas gliukozės kiekis jame.

3.10. TIROZINO OKSIDACIJA ORO DEGUONIMI DALYVAUJANT TIROZINAZEI

Oksidazėmis vadinami fermentai, oksiduojantys atitinkamus substratus molekulinio (oro) deguonimi. Veikiant vienoms oksidazėms, iš molekulinio deguonies susidaro vanduo, veikiant kitoms - vandenilio peroksidas. Visos oksidazės yra metaloproteidai: jų prostetinėse grupėse yra vario arba geležies.

Geriausiai ištirtos oksidazės yra monofenoloksidazės, polifenoloksidazės, citochromoksidazė ir kt.

Tirozinazė yra tipiška oksidazė. Jos yra grybuose, bulvėse, grūduose, cukriniuose runkeliuose ir kt. Tirozinas, veikiamas šio fermento, virsta tamsios spalvos junginiu, panašiu į plaukų, odos pigmentus - melaninus.

REAGENTAI: 0,1% tirozino tirpalas, žalia bulvė.

DARBO EIGA. Bulvė nuskutama, sutarkuojama (arba smulkiai supjaustoma), sudedama į grūstuvę, užpilama 10 ml distiliuoto vandens, gerai sumaišoma (jei bulvė buvo supjaustyta - sutrinama). Mišinys filtruojamas į mėgintuvėlį.

Į du mėgintuvėlius įpilama po 1 ml filtrato. Vieno mėgintuvėlio turinys pavirinamas 1-2 min. ir atšaldomas. Po to į abu mėgintuvėlius įlašinama po 5-10 lašų tirozino tirpalo ir, kartais supurtant, mėgintuvėliai inkubuojami 15 min. 37-40°C temperatūros vandens vonioje.

Jei yra tirozinazės, tirpalas įgyja iš pradžių rausvą, vėliau - rudą ar net juodą spalvą.

3.11. PEROKSIDAZĖ

Peroksidazė (žr. 3.9.) paplitusi augaluose, ypač daug jos yra krienuose. Gyvulinuose audiniuose beveik nerandama, labai nedideliais kiekiais aptinkama tik leukocituose ir piene.

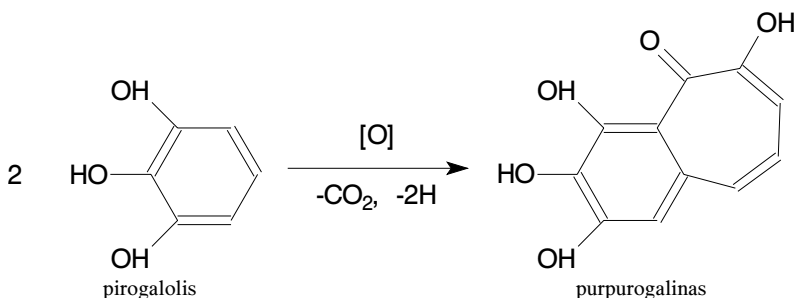
REAGENTAI: 1% pirogalolio, 2% H_2O_2 tirpalai, krienų ekstraktas (krieno šaknies gabalėlis sutarkuojamas, masė užpilama dist. vandeniu ir gerai išmaišoma).

DARBO EIGA. Į 4 mėgintuvėlius įpilama po 1 ml pirogalolio tirpalo, tada:

- į pirmąjį mėgintuvėlį įlašinama 2 lašai vandenilio peroksido ir 1 ml distiliuoto vandens;
- į antrąjį mėgintuvėlį įpilama 1 ml krienų ekstrakto, turinčio aktyvios peroksidazės;
- į trečiąjį mėgintuvėlį įlašinama keli lašai vandenilio peroksido, įpilama 1 ml krienų ekstrakto;
- į ketvirtąjį mėgintuvėlį įlašinama keli lašai vandenilio peroksido ir 1 ml pavirinto krienų ekstrakto.

Stebėkite ir paaiškinkite spalvų pasikeitimą.

Peroksidazė oksiduoja pirogalolį:



Jei yra peroksidazės, susidaro geltonai rudos purpurogalino nuosėdos.

Mėgintuvėlio Nr.	Substratas (pirogallolio tirpalas, ml)	Vandenilio akceptorius	Fermentas (krienų ekstr., ml)	Spalva	Išvados
I	1	H_2O_2	-		
II	1	-	1		
III	1	H_2O_2	1		
IV	1	H_2O_2	1*		

1*- pavirintas krienų ekstraktas.

4. HORMONAI

Hormonai - tai cheminiai tarpininkai, koordinuojantys daugialąstelinio organizmo ląstelių veiklą. Terminą *hormonai* pirmą kartą pavartojo 1904 m. Viljamas Beilisas ir Ernestas Starlingas (William Bayliss, Ernst Starling), aprašydami sekretino, išskiriamo dvylikapirštės žarnos ir stimuliuojančio kasos sulčių sekreciją, veikimą. Jie suformulavo tris išvadas: 1) hormonai - specifinių audinių (liaukų) sintetamos molekulės; 2) hormonai išskiriami tiesiai į kraują; 3) hormonai specifiniu būdu keičia tam tikrų jautrių audinių (ląstelių - taikinių) aktyvumą. Hormonai nėra nei fermentai, nei kofermentai, jie reguliuoja jau vykstančius procesus. Pagal cheminę prigimtį jie skirstomi į tris grupes: 1) nedidelės molekulės, aminorūgščių dariniai (adrenalinas, tiroksinas), 2) baltymai ar polipeptidai (tireotropinis hormonas), 3) steroidai, cholesterolio dariniai (estrogenas, progesteronas). Hormonai specifiskai veikia fermentų ar kitų baltymų sintezę, keičia fermentinės katalizės greitį ir ląstelių sienelių pralaidumą.

Kurio nors hormono trūkumas arba perteklius priklauso nuo atitinkamos liaukos (antinksčių, kasos, hipofizio, skydliaukės ir kt.) funkcijos sutrikimo. Tai susiję su daugeliu ligų: cukrinis diabetas išsivysto sutrikus kasos liaukos funkcijai, necukrinis diabetas - sutrikus užpakalinės hipofizio dalies veiklai ir kt. Endokrininių liaukų funkcijas kontroliuoja centrinė nervų sistema.

4.1. KOKYBINĖS ADRENALINO REAKCIJOS

Adrenalinas - antinksčių šerdinės dalies hormonas, kuris kaupiasi tam tikrose granulėse (membrana apsuptose struktūrose). Veikiant nerviniams impulsams, iš granulių išsiskiria adrenalinas, kuris patenka į tarpląstelinę erdmę, o toliau - į kraują. Įprasta adrenalino koncentracija kraujyje 10^{-10}M , bet dėl nervinių impulsų poveikio (nerimo, pasiruošimo kovai) koncentracija per kelias sekundes padidėja 1000 kartų. Adrenalinas, pagreitindamas širdies veikimą, pakeldamas kraujo spaudimą, paruošia organizmą ekstremalioms situacijoms. Jis stimuliuoja glikogeno skilimą kepenyse, padidina gliukozės kiekį kraujyje, aprūpina raumenis "kuru", reikalingu darbui anaerobinėmis sąlygomis. Chemines adrenalino savybes nulemia pirokatechino žiedas. Adrenaliną greitai oksiduoja oro deguonis, susidaro raudonos spalvos junginys - adrenochromas, kuris virsta tamsiu pigmentu - melaninu. Adrenalinas reaguoja su FeCl_3 , susidaro žalios spalvos junginiai; su diazoreagentu sudaro raudonos spalvos junginius.

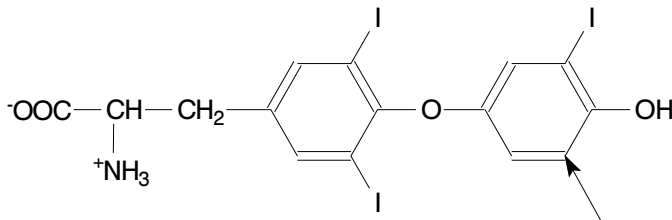
REAGENTAI: adrenalino tirpalas (1 : 1000), 1% FeCl_3 , 10% acto rūgšties, 1% sulfanilinės rūgšties, 5% NaNO_2 , 10% Na_2CO_3 , 1% KIO_3 ir 4% NaOH tirpalai.

DARBO EIGA.

1. Į vieną mėgintuvėlį įlašinama 2-3 lašai adrenalino tirpalo ir 1 lašas geležies chlorido tirpalo. Įlašinkite 1 lašą natrio šarmo tirpalo ir stebėkite, kaip keičiasi spalva: mišinys nusidažo ryškiai žaliai, vėliau pagelsta; įlašinus šarmo, tirpalas parausta, o vėliau paruduoja.
2. Į kitą mėgintuvėlį įlašinama po 3-4 lašus šių reagentų: sulfanilinės rūgšties, NaNO_2 , adrenalino ir Na_2CO_3 tirpalų. Mišinys nusidažo raudonai.
3. Į trečią mėgintuvėlį įlašinama po 3-4 lašus adrenalino, KIO_3 , acto rūgšties tirpalų ir pašildoma. Mišinys nusidažo violetine spalva.

4.2. SKYDLIAUKĖS HORMONAI

Skydliaukė išskiria du hormonus: L-tiroksiną ir L-trijodtironiną. Šie hormonai yra tirozino dariniai, sintetinami dalyvaujant daugeliui fermentų. Sintezė prasideda nuo L-tirozino liekanų jodinimo. Reakcijai būtinas jodas - nepakeičiamas mikroelementas, kurį į skydliaukę atneša kraujas. Tireoidiniai hormonai stimuliuoja metabolizmą kepenyse ir raumenyse. Jie susijungia su baltymais-receptoriais, per juos patenka į ląstelių branduolį ir, veikdami specifinius genus, skatindami tam tikrų fermentų sintezę, kartu pagreitina apykaitą organizme.



trijodtironinas

tiroksine šioje padėtyje yra ketvirtas I atomas

REAGENTAI: tireoidinas (tabletės), 10% NaOH, 10% H_2SO_4 , 10% KIO_3 tirpalai, 1% krakmolo kleisteris, indikatorinis popierėlis.

DARBO EIGA. Grūstuvėje sutrinama 1 tireoidino tabletė. Milteliai suberiami į 50 ml tūrio konusinę kolbutę, pripilama 5 ml natrio šarmo tirpalo, 5 ml distiliuoto vandens ir mišinys virinamas 10-15 min degiklio liepsnoje ant ugnies sklaidytuvo. Hidrolizatas atvėsინamas iki kambario temperatūros.

Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml hidrolizato, parūgštinama sieros rūgštimi (tikrinti indikatoriumi), įlašinama po 3-5 lašus krakmolo kleisterio ir kalio jodato tirpalų. Išsiskyręs jodas nudažo krakmolo tirpalą mėlynai.

5. LIPIDAI. LIPOIDAI

Lipidai - labai didelė įvairių medžiagų grupė. Visų jų bendra savybė - tirpumas nepoliniuose tirpikliuose. Dauguma lipidų sudaryti iš keleto viena su kita susijusių molekulių. Kai kurios iš jų - karboninių rūgščių linijinės grandinės, susidarancios sudėtingų polimerizacijos reakcijų metu. Tokios molekulės yra hidrofobinės, tačiau turi mažiausiai vieną polinę grupę, kuria susijungia su kitais komponentais. Lipidai, turintys polines ir nepolines grupes, aptinkami membranose ir atskiria vandeningą terpę nuo hidrofobinės viduląstelinės srities. Atsižvelgiant į sudėtį, struktūrą, vaidmenį organizme, lipidus galima klasifikuoti į paprastuosius ir sudėtinius.

Paprastieji lipidai - junginiai, sudaryti iš dviejų komponentų. Tai aukštesniųjų riebalų rūgščių ir glicerolio esteriai, aukštesnieji ir policikliniai spiritai. Šiai grupei priklauso riebalai (aukštesniųjų riebalų rūgščių ir aukštesniųjų alkoholių esteriai), steroidai (aukštesniųjų riebalų rūgščių ir policiklinių alkoholių, sterolių, esteriai).

Sudėtinių lipidų molekulės yra sudarytos iš daugelio komponentų: fosfolipidai sudaryti iš aukštesniųjų riebalų rūgščių, glicerolio ar kitų daugiahidroksilių alkoholių, fosforo rūgšties ir įvairios prigimties azotinių bazių liekanų; į glikolipidų sudėtį įeina aukštesniųjų riebalų rūgščių, daugiahidroksilių alkoholių, angliavandenių liekanos ir kt.

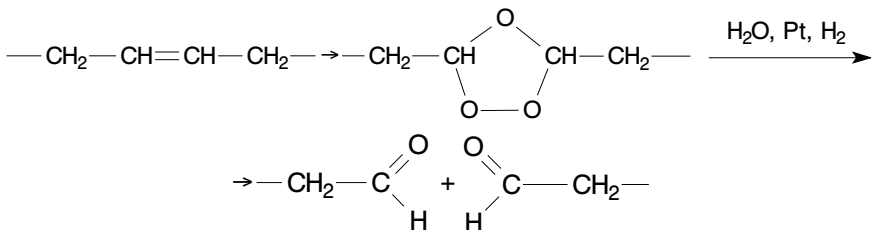
Šiuo metu atrastos naujos lipidų grupės, kuriuos sudaro ir paprastieji, ir sudėtiniai lipidai. Dioliai lipidai - dihidroksilių alkoholių, aukštesniųjų alkoholių ir aukštesniųjų riebalų rūgščių eteriai ir esteriai, dažniausiai dar turintys fosforo rūgšties, azotinės bazės ir angliavandenilio liekaną. Ornitino lipidai sudaryti iš aukštesniųjų riebalų rūgščių liekanų ir aminorūgščių ornitino arba lizino, kartais į jų sudėtį įeina 2 anglies atomus turintys alkoholiai. Ornitino lipidai būdingi mikroorganizmams.

Paprastieji ir sudėtiniai lipidai yra lengvai muilinami. Iš gamtinės medžiagos organiniais tirpikliais išekstrahavus lipidus, suminiame ekstrakto visada esti nemuilinamų lipidų frakcija. Ją sudaro laisvosios riebalų rūgštys, aukštesnieji ir policikliniai alkoholiai (steroliai), sterolių dariniai (steroidai) ir kiti junginiai. Kai kurie autoriai nemuilinamus lipidus išskiria į atskirą grupę.

Su daugeliu organinių junginių (baltymais, angliavandeniais) lipidai sudaro kompleksus, įeinančius į citoplazminių ir bakterinių membranų, ląstelių dalelių sudėtį.

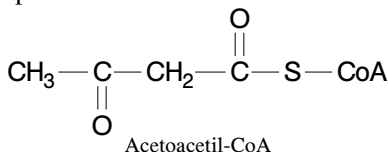
Riebalų rūgštys laisvos aptinkamos labai retai, tačiau, sudarydamos esterines arba amidines jungtis, yra įvairių klasių lipidų ar lipidų apykaitos tarpinių produktų sudedamosios dalys. Biologiškai svarbios riebalų rūgštys esti monokarboninės, t.y. turi vieną jonizuojamą karboksilinę grupę ir nepolinę, nešakotą, acik-

linę angliavandenilio grandinę. Riebalų rūgštys paprastai turi lyginį atomų skaičių, angliavandenilinė grandis yra prisotinta arba turi vieną ar kelias dvigubas jungtis. Riebalų rūgštims būdingos esterifikacijos reakcijos, kuriose dalyvauja karboksilinė grupė, o nesočiosioms - halogeno ar vandenilio prijungimas, oksidavimas. Veikiant oro deguoniui, vyksta lėta savaiminė oksidacija. Manoma, kad šiuo atveju dvigubas jungtis veikia peroksidai: susidaro nestabilūs hidroperoksidai, o jiems sklyant - ketorūgštys ir oksirūgštys. Dvigubų jungčių oksidaciją pagreitina ozonas O_3 : iš pradžių susidarę nestabilūs ozonidai vėliau hidrolizuojasi iki aldehydų:

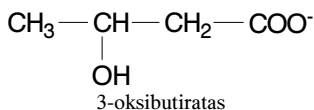


Ši reakcija naudojama nustatant dvigubos jungties vietą rūgšties grandinėje. Ozonolizės metu gauti fragmentai identifikuojami.

Oksidacijos metu, sklyant lyginį anglies atomų skaičių turinčioms riebalų rūgštims, tarpinis produktas yra 4 anglies atomus turintis acetoacetyl-CoA. Šis junginys gali būti pirmtakas izoprenoidinių junginių sintezėje (cholesterolio) arba skliti į dvi acetyl-CoA molekules ir įeiti į trikarboninių rūgščių ciklą. Be to, acetoacetatas yra svarbus kraujo komponentas.



Acetoacetatas yra β -ketorūgštis, galinti lengvai dekarboksilintis ir virsti acetonu arba galinti būti redukuota, veikiant fermentui NADH - priklausomai dehidrogenazei ir virsti L-3-oksibutiratu:



Visi trys junginiai - acetoacetatas, acetonas ir 3-oksibutiratas - žinomi kaip ketoniniai kūnai. Jų koncentracija kraujyje didėja badaujant arba esant patologiniams pakitimams, pvz., cukriniam diabetui. Besivystanti ketozė pavojinga, ka-

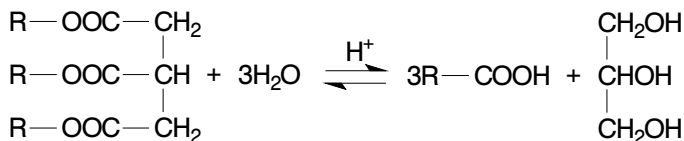
dangi ketoninių kūnų susidarymą lydi vandenilio jonų atsipalaidavimas ir todėl rūgštėja kraujas. Kai trūksta angliavandenių maiste (badaujant), kaloringumas priklauso nuo lipidų. Pereinant nuo mišraus maitinimosi prie turtingo lipidais racio- no, vystosi ketozė: organizme kaupiasi ketoniniai kūnai.

Labiausiai paplitę gamtoje neutralieji riebalai. Tai riebalų rūgščių ir glicerolio esteriai. Glicerolio viena, dvi ar visos trys -OH grupės gali būti esterifikuotos riebalų rūgštimis, susidaro monoacilgliceroliai, diacilgliceroliai ar triacilgliceroliai.

Neutralieji riebalai - silpni amfifilai, t. y. turi polines hidrofilines ir nepolines hidrofobines angliavandenilines grupes. Riebalai netirpūs vandenyje, tačiau plaukiant juos su vandeniniais detergentų (tulžies, rūgščių, baltymų, muilų) tirpalais, emulguojasi. Riebalai gerai tirpsta nepoliniuose tirpikliuose. Kuo daugiau riebaluose nesočiųjų trumpą anglies atomų grandinę turinčių riebalų rūgščių, tuo jie tirpesni ir lydosi žemesnėje temperatūroje.

Žmogaus poodinis sluoksnis turtingas sočiųjų riebalų rūgščių, o kepenų riebaluose daugiau nesočiųjų riebalų rūgščių. Pieno ir sviesto riebaluose yra daug trumpą anglies atomų grandinę turinčių riebalų rūgščių.

Hidrolizuojant neutraliuosius riebalus, susidaro trys riebalų rūgščių molekulės ir glicerolio molekulė:



Ši reakcija verdančiame vandenyje vyksta labai lėtai, bet daug greičiau vyksta esant H^+ ar OH^- jonams. Augaluose ir gyvuliniuose organizmuose šią reakciją katalizuoja fermentai, vadinami esterazėmis arba lipazėmis.

Neutraliųjų riebalų hidrolizė vadinama muilinimu: reakcijos metu išsilaisvinę karboksilat-jonai ($\text{R}-\text{COO}^-$) su kationais sudaro muilus. Reakcija negrįžtama, galutiniai produktai - muilai ir glicerolis - tirpsta vandenyje, netirpsta nepoliniuose tirpikliuose, pvz., eteriye. Ši savybė dažniausiai naudojama lipidų chemijoje mišinams frakcionuoti.

Steroidai yra paprastesni muilinami lipidai. Tačiau gamtoje daug didesnė nemuilinamų lipidų, sterolių, grupė. Žmogaus organizme tik 10% sterolių esterifikuota, o 90% yra laisvieji steroliai ir sudaro nemuilinamų lipidų frakciją. Sterolių ir steroidų santykis įvairiuose organizmo audiniuose ir skysčiuose skirtingas: kepenyse jų kiekis vienodas, tulžyje esti tik laisvieji steroliai. Sterolių molekulė - kondensuotų žiedų sistema, kurios pagrindas - ciklopentanperhidrofenantrenas arba steranas. Pastebėta, kad kuo primityvesnis organizmas, tuo daugiau įvairių sterolių randama jame. Žmogui būdingas tik vienas sterolis - cholesterolis.

Visi steridai, kaip ir steroliai - kietos, bespalvės medžiagos, gamtoje aptinkamos kompleksuose, į kurių sudėtį įeina baltymai. Jų pagrindinės funkcijos: sterolių, steridų ir steroidų transportavimas, biologinių membranų formavimas. Gana dideli sterolių ir steridų kiekiai randami žmogaus nerviniuose audiniuose, bet jų funkcija ir reikšmė dar nepakankamai ištirtinėta. Gyvūnų organizmuose steroliai oksiduojasi, sudarydami didelę grupę junginių, vadinamų steroidais. Vienas iš tokių darinių - cholinės rūgštys - pagrindinė tulžies sudedamoji dalis, nuo kurios priklauso riebalų rūgščių pasisavinimas gyvūnų ir žmonių organizmuose.

Fosfolipidai - sudėtiniai lipidai. Įvairiuose fosfolipiduose yra trys pagrindiniai daugiachidroksiliai alkoholiai: glicerolis, mioinozitas ir sfingozinas. Pagal tai fosfolipidai skirstomi į tris grupes: glicerofosfolipidus, inozitfosfolipidus ir sfingofosfolipidus. Dažniausiai fosfolipiduose randamos azotinės bazės yra etanolamino dariniai: cholinai, serinai, riebalų rūgštys (palmitino, stearino, linoleno, arachidono, neuroono ir kt.). Fosfolipidai - į riebalus panašios bespalvės kietos medžiagos. Jos gerai tirpsta benzene, petroleterijoje, chloroforme, netirpsta acetone. Vandenyje netirpsta, bet sudaro patvarias emulsijas. Randami gyvulių ir žmonių organizmuose, ypač daug jų nerviniame audinyje. Lengvai sudaro junginius su baltymais - fosfolipoproteinus, kurie dalyvauja formuojant ląstelės apvalkalėlio ir viduląstelinės membranas.

5.1. RIEBALŲ EMULGAVIMAS

REAGENTAI: praskiestas kiaušinio baltymo tirpalas (1:20), tulžis, 10% NaOH, 10% Na_2CO_3 tirpalai, muilo tirpalas (1 ml aliejaus 0,2 g KOH, 1 ml H_2O ir 3 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ šildoma kolbutėje vandens vonioje, kol praskaidrėja, pripilama 40 ml vandens ir suplakama), aliejus.

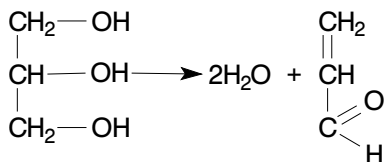
DARBO EIGA. Į 6 mėgintuvėlius įlašinama po 2-3 lašus aliejaus ir po 10 lašų detergentų (į kiekvieną mėgintuvėlį skirtingų): baltymo, šarmo, natrio karbonato, muilo, tulžies ir vandens (į kontrolinį mėgintuvėlį). Mėgintuvėliai suplakami.

Palyginus su kontroliniu mėgintuvėliu, nustatoma, kuri emulsija patvariausia.

5.2. KOKYBINĖS REAKCIJOS LIPIDAMS PAŽINTI

5.2.1. AKROLEINO TESTAS

Šildant glicerolį su kalio ar natrio hidrosulfatu arba kitais vandens atėmėjais, vyksta glicerolio dehidratacija. Susidaro nesotus aldehidas akroleinas - labai aštraus kvapo lakus skystis.



REAGENTAI: aliejus, kiaušės taukai, sviestas, mineralinė alyva, K (arba Na) hidrosulfatas (kristal.).

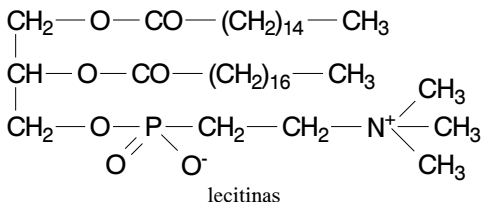
DARBO EIGA. Į atskirus mėgintuvėlius įdedama po mažą gabaliuką arba įlašinama po kelis lašus riebalų arba aliejaus, įberiama po žiupsnelį KHSO_4 kristalų, viskas sumaišoma ir atsargiai pašildoma. Jaučiamas akroleino kvapas.

5.2.2. SUDANO TESTAS

REAGENTAI: etanolis, kraujo serumas, 0,1 % sudano spiritinis tirpalas (50 ml 60% etanolio ištirpinti 50 mg sudano 2 (arba 3), išfiltruoti).

DARBO EIGA: Ant filtruojamojo popieriaus užlašinamas kraujo serumo lašas, popierėlis išdžiovinamas, dedamas į stiklinę ir užpilamas sudano tirpalu. Po 30 min. dažas nupilamas, popierėlis du kartus nuplaunamas praskiestu etanolio (1:4). Serumo lašo vietoje atsiranda rausva lipoproteidų ir chilomikronų dėmė.

5.3. LECITINO NUSTATYMAS KIAUŠINIO TRYNYJE



REAGENTAI: sausas kiaušinio trynys, etanolis, acetonas, spiritinis CdCl_2 tirpalas (1,6 g CdCl_2 /100 ml etanolio).

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įdedama apie 0,1 g sauso kiaušinio trynio, užpilama 3-5 ml karšto etanolio ir 5-10 min. stipriai kratoma. Mišinys ataušinamas, leidžiama nusistovėti. Skaidrus viršutinis sluoksnius (ekstraktas) nupilamas į sausą mėgintuvėlį (arba išfiltruojamas).

1. Į sausą mėgintuvėlį įlašinama po kelis lašus acetono ir ekstrakto.
2. 1 ml ekstrakto sumaišoma su 1-2 ml vandens (išskrinta nuosėdos).
3. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml ekstrakto ir keli lašai spiritinio kadmio chlorido tirpalo. Išskrinta lecitino-kadmio chlorido nuosėdos.

5.4. CHOLESTEROLIO KOKYBINĖS REAKCIJOS

5.4.1. SALKOVSKIO REAKCIJA

REAGENTAI: gyvulių smegenys, chloroformas arba anglies tetrachloridas (CCl_4), konc. H_2SO_4 , sausas gipsas, acto rūgšties anhidridas.

DARBO EIGA. Grūstuvėlyje sutrinama 3-5 g smegenų su 6-10 g gipso. Tiršta masė paskleidžiama ant stiklo ir išdžiovinama 40°C temperatūroje (arba labai atsargiai virš degiklio liepsnos). Išdžiovinta masė nuskutama, suberiama į ekstrakcinę mėgintuvėlį, užpilama organiniu tirpikliu ir 5-10 min. stipriai plakama. Mišiniui leidžiama nusistovėti, skaidrus viršutinis sluoksnis (ekstraktas) nupilamas į sausą mėgintuvėlį ir naudojamas reakcijoms cholesterolui pažinti: į 1 ml ekstrakto atsargiai per sienelę įpilama 1 ml konc. H_2SO_4 , sluoksniai atsiskiria, organinio tirpiklio sluoksnis nusidažo raudonai.

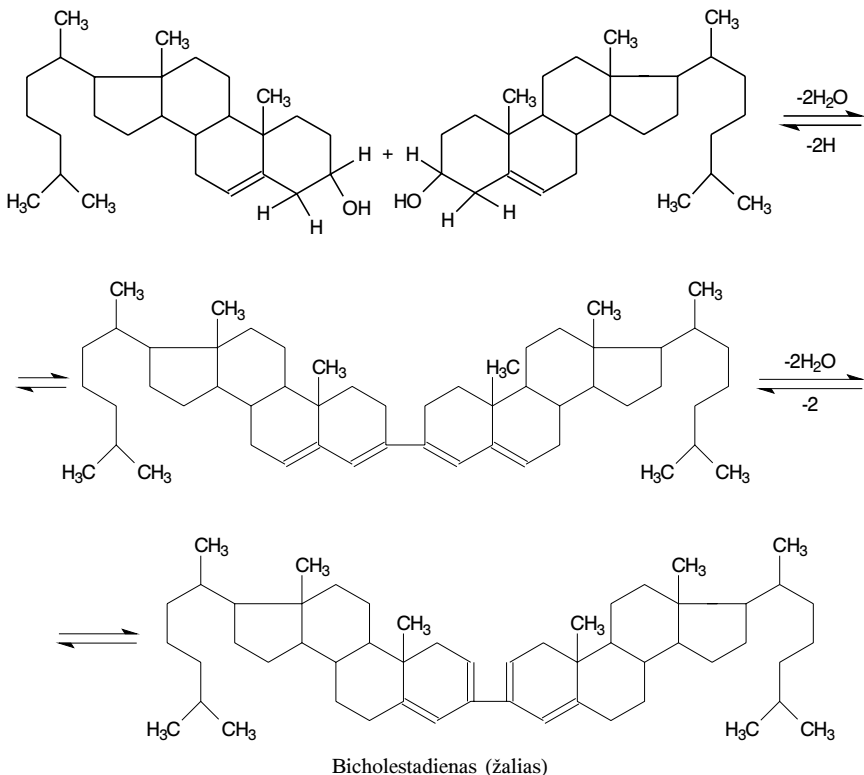
5.4.2. LIBERMANO-BUCHARDO REAKCIJA

REAGENTAI: konc. H_2SO_4 , acto rūgšties anhidridas, cholesterolio ekstraktas (žr. 5.4.1.).

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml cholesterolio ekstrakto, 10 lašų acto rūgšties anhidrido, viskas atsargiai sumaišoma, įlašinama 1-2 lašai konc. H_2SO_4 , sumaišoma.

Stebėkite, kaip keičiasi tirpalo spalvos (raudona - mėlyna - žalia). Jei cholesterolio daug, tai mišinys iš karto tampa žalias.

Paveikus sieros rūgštimi, cholesterolis dehidratuojasi ir oksiduojasi, dvi cholesterolio molekulės netenka dviejų vandens molekulių ir per anglies atomą, esantį trečioje padėtyje, susijungia tarpusavyje. Susidaro bicholestadienas.



5.5. TULŽIES ĮTAKA VANDENS PAVIRŠIAUS ĮTEMPČIAI

REAGENTAI: dist. vanduo, tulžis, sieros milteliai.

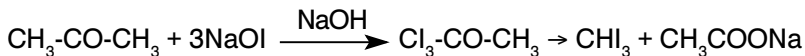
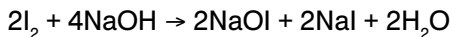
DARBO EIGA. Į du mėgintuvėlius įpilama po 5 ml dist. vandens. Į antrąjį mėgintuvėlį įlašinama 5 lašai tulžies ir į abu mėgintuvėlius įberima po žiupsnelį sieros miltelių. Suplakite ir užrašykite, ką matote mėgintuvėliuose. Koks tulžies poveikis?

5.6. KETONINIAI KŪNAI

REAGENTAI: šlapimo ir acetono mišinys (tiriamas tirpalas), 10 N natrio nitroprusido tirpalas (šviežias), 10% NaOH, 80% acto rūgštis, Liugolio tirpalai, 25% amoniako tirpalas.

DARBO EIGA.

1. Imami du mėgintuvėliai: į vieną iš jų įpilama tiriamo mišinio, į kitą - 3 ml dist. vandens. Į abu mėgintuvėlius įlašinama po 5 lašus Liugolio ir natrio šarmo tirpalų, viskas sumaišoma. Kontrolinis mėgintuvėlis lieka skaidrus, bandomajame iškrenta būdingo kvapo jodoformo nuosėdos:



2. Imami du mėgintuvėliai: į vieną iš jų įpilama 3 ml tiriamo tirpalo, į kitą - 3 ml dist. vandens. Į abu mėgintuvėlius įlašinama po 5 lašus natrio nitroprusido ir įpilama po 1,5 ml natrio šarmo tirpalų. Bandomajame mėgintuvėlyje esantis mišinys nusidažo oranžiniai raudona spalva. Į abu mėgintuvėlius įpylus po 3 ml acto rūgšties, bandomajame mėgintuvėlyje (su acetonu) esančio mišinio spalva tampa tamsiai raudona.
3. Į mėgintuvėlį įpilama 3 ml tiriamo tirpalo, 1,5 ml acto rūgšties, 3 lašai natrio nitroprusido ir atsargiai, per sienelę, užpilamas amoniako tirpalo sluoksnis. Skysčių susilietimo vietoje atsiranda violetinės spalvos žiedas.

6. VITAMINAI

Kazimieras Funkas 1912 m. suformulavo *vitaminų teoriją*: kai nėra maiste gyvybei svarbių medžiagų, žmogus serga pelagra, rachitu, cinga, beri-beri. K. Funkas manė, kad šios medžiagos - aminorai, todėl jas pavadino vitaminais, t. y. “gyvybei būtinais aminais”. Vėlesni tyrimai parodė, kad tokių būtinų mikroelementų yra daug, bet ne visi jie yra aminorai.

Šiuo metu žinoma 17 būtinų vitaminų, kad organizmas normaliai augtų ir vystytųsi. Manoma, kad sveiko žmogaus vystymuisi reikalingi ir iki šiol neatrasti maiste esantys mikrokomponentai.

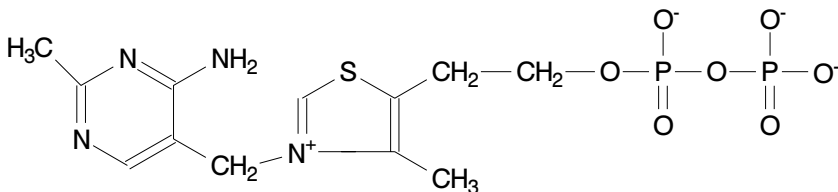
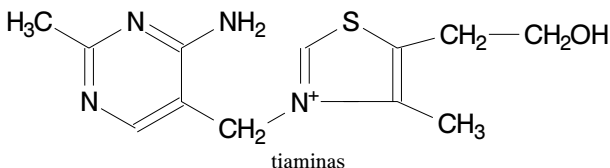
Vitaminai skirstomi į dvi grupes: vandenyje tirpius (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , B_{15} , C, U, PP, H, P, paraaminobenzoinė rūgštis, pantoteno rūgštis, folio rūgštis) ir riebaluose tirpius (A, D, E, K). Vitaminų trūkumas maiste ar nepakankamas jų pasisavinimas organizme sukelia hipovitaminozę, avitaminozę, jų perteklius - hipervitaminozę.

Organizme randami maži vitaminų kiekiai, jų nustatymo metodai sudėtingi.

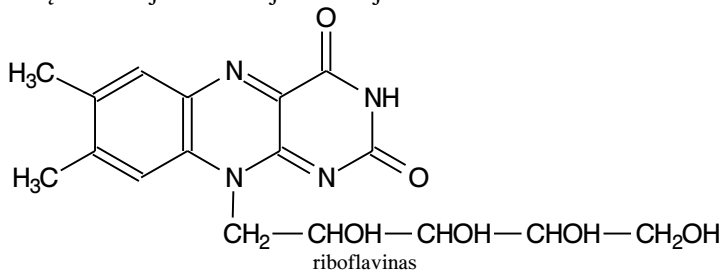
6.1. VANDENYJE TIRPŪS VITAMINAI

6.1.1. VITAMINAS B_1 (TIAMINAS)

Pirmąkart tiaminas išskirtas 1926 m., o po kelerių metų nustatyta jo struktūra ir atlikta cheminė sintezė. Tiamino molekulė turi biciklinę sistemą - pirimidino ir tiazolo žiedus.



linė sistema. Riboflaviną įeina į dviejų kofermentų sudėtį: FMN (flavinmononukleotidą) ir FAD (flavinadenindinukleotidą), sudaro aktyviąją grupę fermentų, dalyvaujančių oksidacijos-redukcijos reakcijose.



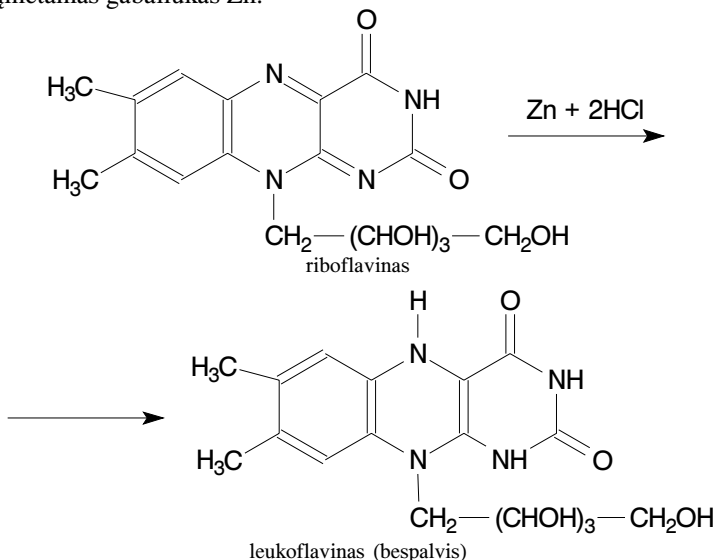
Riboflaviną - geltonos spalvos milteliai, šiek tiek tirpstantys vandenyje, jautrūs šarminei aplinkai ir ultravioletiniams spinduliams, termostabilūs.

Kai organizmui trūksta šio vitamino, sutrinka regėjimas, suskyla, pasidengia geltonais šašais lūpų gleivinė. Toliau šis procesas apima visą lūpų paviršių ir veido dalį, išbrinksta liežuvis, lūžinėja ir netenka blizgesio nagai, žmogus plinka.

Žmogaus organizme riboflavina sintetina žarnyno mikroflora. Šio vitamino sintezę slopina riebalai ir riebus maistas, sulfanilamidiniai preparatai.

REAGENTAI: riboflavino tirpalas, konc. HCl, metalinis Zn.

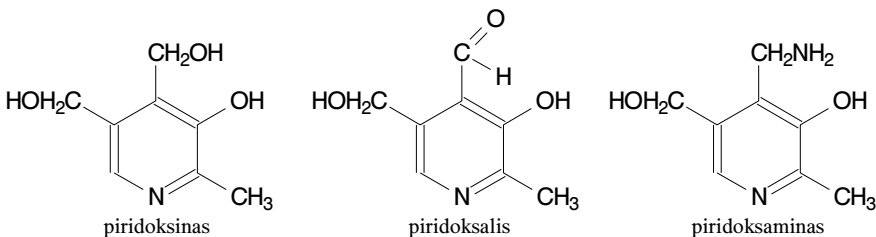
DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įlašinama 10 lašų riboflavino tirpalo, 5 lašai konc. HCl ir įmetamas gabaliukas Zn.



Redukuojamas riboflaviną tampa raudonos spalvos rodoflavinu, vėliau - bespalviu leukoflavinu.

6.1.3. VITAMINAS B₆ (PIRIDOKSINAS)

Piridoksinas išskirtas ir susintetintas 1938 m., o 1944 m. buvo identifikuotas aminas (piridoksaminas) ir aldehidas (piridoksalis). Piridoksalį galima gauti švelniomis sąlygomis oksiduojant piridoksiną, o piridoksaminą galima gauti iš piridoksolio, šildant jį su gliutamino rūgštimi (transamininimas). Piridoksalis fosforinamas virsta fosfopiridoksaliu (FP), kuris yra kofermentas fermentų, dalyvaujančių aminorūgščių dekarboksilinimo procese, taip pat įeina į peramininimo reakcijas katalizuojančių fermentų sudėtį. Vitamino B₆ formos: piridoksalis, piridoksinas ir piridoksaminas.



Šie junginiai biologinėse sistemose lengvai virsta vienas kitu. Aktyvi vitamino forma - piridoksalfosfatas arba jo amino forma - piridoksalamino fosfatas.

Kai trūksta šio vitamino maiste, sutrinka organizmo baltymų apykaita, prasideda dermatitas, egzema, uždegimas.

REAGENTAI: 5% piridoksino, 5% FeCl₃ tirpalai.

DARBO EIGA. Į mėgintuvėlį įpilama 10 lašų piridoksino ir 2 lašai geležies chlorido tirpalų, pašildoma. Mišinys nusidažo raudona spalva.

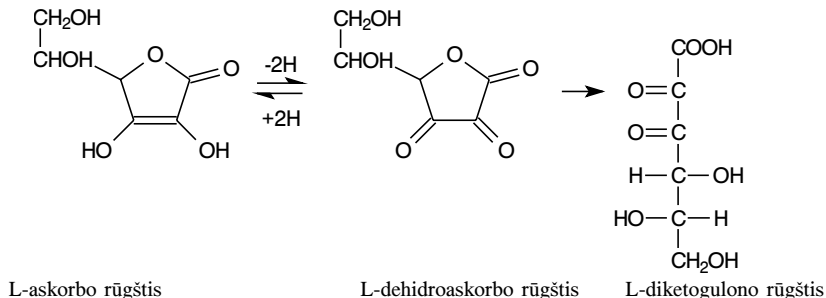
6.1.4. VITAMINAS C (ASKORBO RŪGŠTIS)

Vitaminas C - balti, vandenyje tirpūs milteliai, neatsparūs virinimui, oksidacijai, skylančys šarminėje aplinkoje, tačiau patvarūs rūgščioje terpėje.

Vitaminą C su maistu turi gauti tik žmonės, primatai ir jūrų kiaulytės. Kiti žinduoliai sugeba jį sintetinti patys. Vitamino C, palyginus su kitais vitaminais, paros dozė yra gana didelė: rekomenduojama 30-70 mg/dienai. Tačiau Polingas siūlo vartoti net 0,25-10 g per dieną. Jo manymu, askorbo rūgštis padeda apsisaugoti nuo peršalimo ligų ar susilpninti jų progresavimą. Kita vertus, nors askorbo rūgštis veikia kaip antioksidantas, dalyvaujant trivalentės geležies jonams, ji skatina lais-

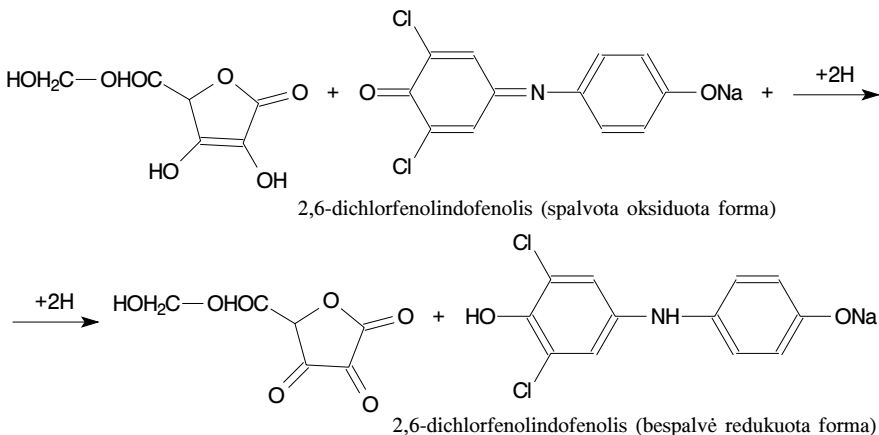
vųjų radikalų susidarymą, kurių per dideli kiekiai gali sukelti nepageidaujamus reiškinius organizme.

Askorbo rūgšties funkcijos nėra visiškai ištyrinėtos. Askorbo rūgščiai būdingos redukcinės savybės, ji sugeba lengvai oksiduotis iki dehidroaskorbo rūgšties, kuri šarminėje terpėje yra nepatvari, laktono žiedas hidrolizuoja, susidaro diketogulono rūgštis:



Dehidroaskorbo rūgštis lengvai redukuojasi veikiant H_2S , cisteinu, gliutathionu. Askorbo rūgšties redukcinės savybės panaudojamos atliekant jo kiekybinę analizę titruojant 2,6-dichlorfenolindofenoliu.

Askorbo rūgštis - silpna rūgštis, sudaranti kompleksinius junginius su geležies jonais. Ji pagreitina geležies pašalinimą iš feritino, todėl yra svarbi vykstant aminorūgšties tirozino biosintzei, nukleino rūgščių apykaitai, baltymų sintzei, būtinyje organizmo biologiniuose oksidacijos procesuose, dalyvauja cholesterolio apykaitoje. Bandymų su jūrų kiaulytėmis metu nustatyta, kad esant didelei askorbo rūgšties koncentracijai, lengviau gyja žaizdos.



Šviežios daržovės ir vaisiai yra pagrindiniai askorbo rūgšties šaltiniai. Verdant, konservuojant ir kitais būdais apdorojant maistą, suyra dalis askorbo rūgšties. Vitaminas išlieka šaldytuose produktuose. Gyvuliniuose produktuose šio vitamino gana mažai, o verdant jis visiškai suyra.

Kai trūksta vitamino C, prasideda kraujavimas minkštosiose kūno vietose, raumenyse, poodyje, parausta dantų smegenys, atsiranda opų, ima kristi dantys, žmogus suserga skorbutu. Negydant ištinka mirtis.

Kadangi dabar žinoma vitamino C sandara ir sintezės būdai, jis ne tik išskiriamas iš gamtos produktų, bet ir sintetinamas iš L-sorbozės.

REAGENTAI: 0,1 % vitamino C, 45 % $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 % $FeCl_3$, 10 % HCl, 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio tirpalai.

DARBO EIGA

1. Į vieną mėgintuvėlį įpilama 10 lašų vitamino C, 2 lašai raudonosios kraujos druskos ir 3 lašai geležies chlorido tirpalų. Mišinys tampa žalias, po to iškrinta mėlynos nuosėdos;
2. Į mėgintuvėlį įpilama vitamino C tirpalo, parūgštinama 2 lašais druskos rūgšties, purtant mėgintuvėlį, lašinamas 2,6-dichlorfenolindofenolio tirpalas. Pastarojo spalva išnyksta. Oksidavusis visam vitaminui C, tirpalas nusidažo šviesiai rausva spalva.

6.1.5. VITAMINO C KIEKYBINĖ ANALIZĖ

REAGENTAI: 3 % HCl, 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio tirpalai, vaisius arba daržovė, turinti vitamino C (nespaltvota).

DARBO EIGA. Į porcelianinę lėkštelę įpilama 10 ml druskos rūgšties, lėkštelė statoma ant svarstyklių ir sureguliuojama pusiausvyra. Pasverama 5 g tiriamo vaisiaus ar daržovės, kuri pjaustoma mažais gabalėliais (galima tarkuoti) ir dedama į rūgštį. Mišinys perpilamas į grūstuvę, viskas gerai sutrinama, pripilama dar 35 ml druskos rūgšties, viskas sumaišoma, filtruojama per vatą. 10 ml filtrato įpilama į 50 ml tūrio konusinę kolbutę ir titruojama 2,6-dichlorfenolindofenoliu, kol mėginys nusidažo šviesiai rausva spalva. Titruojama 3 kartus, apskaičiuojamas vidurkis.

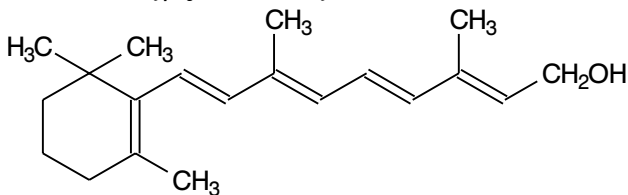
SKAIČIAVIMAS. 0,088 mg vitamino C atitinka 1 ml 0,001 N 2,6-dichlorfenolindofenolio. Tarkime, kad pastarojo sunaudota 3 ml. Vadinas, 10 ml ekstrakto bus 0,264 mg ($0,088 \times 3 = 0,264$) mg vitamino C, o 50 ml ekstrakto bus 1,320 mg ($0,088 \times 3 \times 5 = 1,320$) vitamino C, t.y. tiek vitamino C bus 5 g tiriamo vaisiaus arba daržovės. Taip sužinoma, kiek vitamino C yra tiriamajame objekte:

$$\begin{aligned} 5 \text{ g} - 1,32 \text{ mg} & \quad \text{vit. C} \\ 100 \text{ g} - x & \quad \text{vit. C} \\ x = 26,4 \text{ mg\%} & \quad \text{vit. C} \end{aligned}$$

6.2. RIEBALUOSE TIRPŪS VITAMINAI

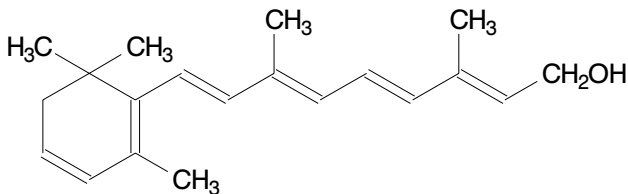
6.2.1. VITAMINAS A (RETINOLIS)

Vitaminas A atrastas dvidešimtaisiais šio amžiaus metais ir išskirtas iš žuvies kepenų. Vitaminai A_1 (retinolis) ir A_2 (3-dehidroretinolis) yra polipreniniai spirtai, susidarantys skylant 40 anglies atomų turinčiam β -karotinui ar kitiems karotinoidams, turintiems vieną β -jonono žiedą.

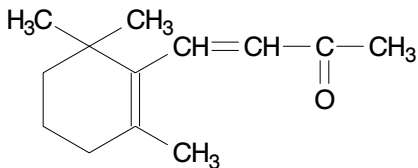


retinolis (vit. A_1)

Atitinkamas aldehidas vadinamas retinaliu, atitinkama karboninė rūgštis - retinoline rūgštimi.



3-dehidroretinolis (vit. A_2)



β -jononas

Karotinai - augalinės kilmės produktai, o vitaminas A susidaro tik gyvuliniuose audiniuose, kur aptinkamas kaip laisvo spirito ir palmitino ar kitos riebalų rūgšties esteris. Tai vienas iš nedaugelio vitaminų, kurio gana dideli kiekiai gali kauptis kepenų ląstelėse.

Vitaminas A palaiko įvairių, ypač epitelinių, ląstelių normalią veiklą ir dalyvauja regėjimo organų funkcijoje. Kai trūksta vitamino A, sausėja oda ir plaukai,

atsiranda konjunktyvitas, susilpnėja atsparumas infekcijoms. Ankstyvas avitaminozės požymis yra vištakumas.

Kaip veikia vitaminas A, dar nežinoma. Manoma, kad retinolis, jungdamasis su baltymų aminogrupėmis, sudaro šifo bazes, kaip tai yra regėjimo pigmentuose. Galbūt jis dalyvauja oksidacijos-redukcijos reakcijose. Kraujo plazmoje vitaminas A pernešamas kartu su retinolių surišančiu baltymu. Nustatyta, kad norint palaikyti normalią vitamino A koncentraciją kraujyje, būtinas cinkas. Dvigubų jungčių sistemą karotinoiduose lengvai oksiduoja oro deguonis ir vitaminas A praranda aktyvumą. Maisto produktuose nuo oksidacijos jį apsaugo antioksidantai (vitaminas E).

Per didelis vitamino A kiekis žmogui taip pat pavojingas: sutrinka augimas, atsiranda patologiniai kaulų pakitimai, o didelė vienkartinė dozė sukelia stiprų apsinuodijimą. Manoma, kad poliarinių gyvūnų kepenys nuodingos dėl labai didelio vitamino A kiekio.

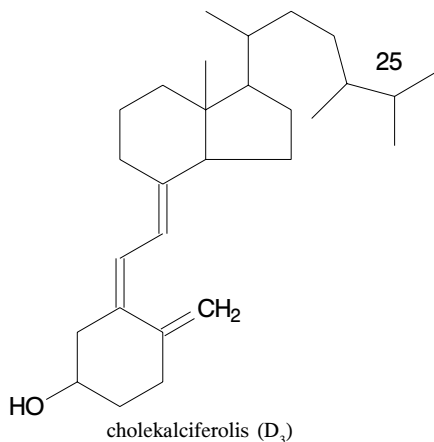
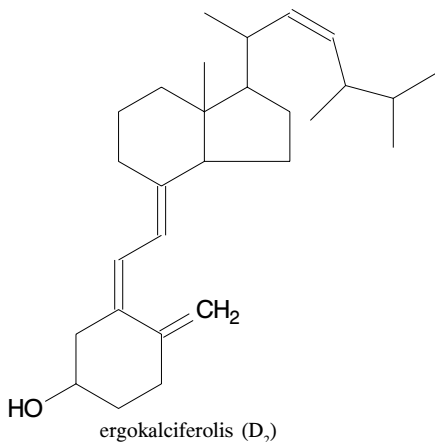
REAGENTAI: 10 % žuvies taukai arba vitamino A aliejinis tirpalas, aliejus, 1% SbCl_3 chloroforminis tirpalas, konc. H_2SO_4 .

DARBO EIGA

1. Ant baltos keraminės plokštelės užlašinama po lašą žuvies taukų (arba vitamino A aliejinio tirpalo), aliejaus, o ant abiejų lašų užlašinama po lašą SbCl_3 chloroforminio tirpalo. Esant vitaminui A, atsiranda žalia spalva.
2. Ant baltos plokštelės užlašinama po lašą žuvies taukų (arba vitamino A aliejinio tirpalo), aliejaus, o ant abiejų lašų užlašinama po lašą konc. sieros rūgšties. Esant vitaminui A, atsiranda mėlyna, vėliau - violetinė ir pagaliau rausva spalva.

6.2.2. VITAMINAS D (KALCIFEROLIS)

Seniai pastebėta, kad rachitu serga vaikai, gyvenantys nelabai saulėtose klimatinėse zonose. Eksperimentinį rachitą galima sukelti, maitinant žiurkes kalcio neturinčiu maistu, tačiau tokį maistą pašvitinus ultravioletiniais spinduliais, rachitas nesivysto. Buvo nustatyta, kad jautrus ultravioletiniams spinduliams yra 7-dehidrocholesterolis. Pašvitinus mielių ergosteriną, susidaro keletas izomerinių darinių. Vienas jų - kalciferolis - turi priešrachitinių savybių ir vadinamas vitaminu D_2 . Ilgiau pašvitinus kalciferolį, šis inaktyvuoja. Junginys, dėl UV spindulių poveikio susidaręs iš 7-dehidrocholesterolio, pavadintas vitaminu D_3 arba cholekalciferoliu. Produktas, iš pradžių vadintas vitaminu D_1 , pasirodė esąs kalciferolių ir sterinų mišinys, todėl šiuo metu šis pavadinimas nevartojamas.



Vitaminas D_3 pernešamas į kepenis, kur, veikiant mitochondrinei fermentinei sistemai, virsta 25-oksikalciferoliu, o šis inkstuose hidrolizuojamas ir susidaro 1,25-dioksicholecalciferolis. Šis junginys sustiprina Ca^{2+} pernešimą žarnyne. Rachitu, kurio negalima pagydyti vitaminu D, susergama dėl inkstų nesugebėjimo sintetinti 1,25-dioksicholecalciferolio.

Rachitas - tai augančių kaulų liga, kuria sergant nevyksta paskutinė kaulų formavimosi stadija. Iškrypsta kojų, krūtinės ir stuburo kaulai. Avitaminoze sergama ir dabar, ypač žiemą, pavasarį, kada gaunama mažiau saulės spindulių, rečiau būnama gryname ore, be to, ir maiste šio vitamino esti mažiau. Vitaminas D - sezoninis vitaminas.

Šio vitamino yra žuvų taukuose, kiaušinio trynyje, svieste, piene, grietinėje, tačiau kol kas neaišku, kodėl šio vitamino yra daug žuvų kepenų taukuose. Kadanigi vitaminas D susidaro tik saulės spinduliais apšvietus sterinus, į žuvų kepenis vitaminas galbūt patenka su maistu, t. y. augaliniu ir gyvuliniu planktonu, esančiu vandens paviršiuje. Vis dėlto, ištyrus planktoną nustatyta, kad jame nėra vitamino D. Kodėl taip yra, dar neaišku.

REAGENTAI: 10% žuvies taukų arba vitamino D aliejinis tirpalas, Br_2 chloroforminis tirpalas, anilino hidrochloridas (kristal.).

DARBO EIGA.

1. Į mėgintuvėlį įpilama 1 ml žuvies taukų (arba 1-2 lašai aliejinio vit. D tirpalo ir 1 ml aliejaus) ir įberiama keli kristalėliai anilino hidrochlorido. Sumaišius šildoma kol užvirs, ir, nuolat purtant, verdama 1-2 min. Susidaro emulsija, kuri iš pradžių būna geltona, vėliau tampa žalia ir pagaliau - raudona. Emulsijai išsisluoksniavus, apatinis sluoksnis būna raudonos spalvos.
2. Ant baltos keraminės plokštelės užlašinamas lašas vit. D aliejinio tirpalo ir tiek pat chloroforminio bromo tirpalo. Mišinys įgyja žalsvai melsvą spalvą.

LITERATŪRA

1. Филипович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. - М., 1982.
2. Malachovskis A. Jaunasis biochemikas eksperimentuoja. - V., 1984.
3. Мецлер Дю. Биохимия. - М., 1980.
4. Šaltenienė E. Vitaminai. - V., 1982.

TURINYS

PRATARMĖ	3
1. ANGLIAVANDENIAI	4
2. BALTYMAI. AMINORŪGŠTYS	19
3. FERMENTAI	38
4. HORMONAI	50
5. LIPIDAI. LIPOIDAI	52
6. VITAMINAI	60
LITERATŪRA	69

Irena Vitėnienė
BIOLOGINĖ CHEMIJA
Metodinė priemonė

Tir. 150 egz. 4,5 sp. l. Užsak. Nr. 86
Išleido Vilniaus pedagoginis universitetas
Studentų g. 39, LT-2034 Vilnius
Maketavo ir spausdino VPU leidykla
T. Ševčenkos g. 31, LT-2009 Vilnius
Kaina sutartinė