

Dariusz Latowski
Elżbieta Jarosz-Krzemińska
Anna Kostka

MATERIAŁY DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH
Z **BIOCHEMII**

dla studentów Ochrony Środowiska na AGH



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



ROZDZIAŁ PIERWSZY: OBLICZENIA BIOCHEMICZNE

Roztworem nazywamy mieszaninę co najmniej 2 składników, które przez dłuższy czas nie ulegają rozdzieleniu. Jedną z substancji w roztworze pełni funkcję rozpuszczalnika, druga jest substancją rozpuszczoną. Pojęciem **stężenia roztworu** określa się ilość substancji rozpuszczonej w określonej jednostce objętości lub masy roztworu. W laboratorium biochemicznym najczęściej stężenia roztworów wyrażane się w stężeniach procentowych (%) lub molowych (mol/dm^3).

Stężenia procentowe to liczba części rozpuszczonej substancji na 100 części roztworu. W zależności od tego o jakim rodzaju części mowa stężenie procentowe można wyrazić na 3 sposoby:

- stężenie procentowe **wagowo-wagowe** (% w/w lub m/m), czyli liczba części masowych substancji rozpuszczonej w 100 tych samych częściach masowych roztworu, np. liczba gramów substancji rozpuszczonej w 100 g roztworu;
- stężenie procentowe **wagowo-objętościowe** (% w/v lub m/v), czyli liczbę części masowych substancji rozpuszczonej w 100 częściach objętościowych roztworu, np. liczba gramów substancji rozpuszczonej w 100 ml roztworu;
- stężenie procentowe **objętościowo-objętościowe** (% v/v), czyli liczbę części objętościowych substancji rozpuszczonej w 100 tych samych częściach objętościowych roztworu, np. liczba ml substancji rozpuszczonej w 100 ml roztworu.

Podstawową jednostką masy w układzie SI jest kilogram (kg), którego wzorzec przechowywany jest w Międzynarodowym Biurze Miar i Wag w Sèvres koło Paryża. Ze względu na wielkość naważek, z jakimi mamy do czynienia w chemii, czy biochemii, w naukach tych najczęściej operuje się, jako jednostką masy, gramem (g). Z tego też powodu w obliczeniach chemicznych widząc zapis % (w/w) rozumiemy liczbę gramów odważonej substancji rozpuszczonej w 100 g roztworu.

Podstawową jednostką objętości w układzie SI jest m^3 , ale w praktyce najczęściej stosuje się dm^3 , czyli 1 liter (l) lub cm^3 , czyli 1 ml. Z tego też powodu zapis % (w/v), czy % (v/v) oznacza odpowiednio liczbę gramów substancji rozpuszczonej w 100 ml roztworu, a w drugim przypadku liczbę ml substancji zawartą w 100 ml roztworu. W naukach ścisłych stosuje się także odpowiednio pod- i nadwielokrotności podanych jednostek.

1. Sporządzanie roztworów o określonym stężeniu procentowym

W celu sporządzenia roztworu o danym stężeniu procentowym należy odważyć odpowiednią liczbę gramów danej substancji, następnie rozpuścić ją w niewielkiej objętości rozpuszczalnika i uzupełnić do żądanej objętości lub masy całego roztworu.

UWAGA! Jeśli w zadaniach o roztworach nie podany jest rodzaj rozpuszczalnika, należy traktować roztwory jako roztwory wodne.

2. Sporządzanie roztworów o określonym stężeniu molowym

W celu przygotowania roztworu o określonym stężeniu molowym należy obliczoną liczbę moli substancji rozpuścić w mniejszej objętości rozpuszczalnika i następnie uzupełnić rozpuszczalnikiem do podanej objętości końcowej.

UWAGA! Sporządzając roztwory z wykorzystaniem substancji płynnych objętości nie należy obliczać z różnicy objętości substancji wyjściowych, bowiem ostateczna objętość roztworu nie musi być równa sumie objętości roztworów początkowych, użytych do mieszania. Związane jest to ze zjawiskiem **kontrakcji**, czyli zmiany objętości roztworu lub mieszaniny na skutek reakcji chemicznych lub oddziaływań międzycząsteczkowych, pomiędzy składnikami mieszaniny. W przypadku roztworów i mieszanin chemicznych, w których nie zachodzą reakcje chemiczne zjawisko kontrakcji prowadzi przeważnie do **zmniejszenia** objętości mieszaniny, głównie z powodu obniżonej ruchliwości jej cząstek.

3. Przeliczanie stężeń

UWAGA! Przy przeliczaniu stężeń, często korzysta się z gęstości roztworu. Trzeba pamiętać, że wielkość ta informuje ile g waży 1 cm³ (1 ml) roztworu. Trzeba też pamiętać, że stężenia procentowe stężonych kwasów podawane są w procentach wagowo/wagowych.

4. Rozcieńczanie roztworów

W każdym przypadku rozcieńczania stężonych roztworów wodą można opierać się na zależności, że iloczyn stężenia (wyrażonego zarówno w %, jak i w mol/dm³) i objętości V (ml, l), lub ilości roztworu w gramach jest wielkością stałą, czyli:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

gdzie:

c₁ – stężenie roztworu 1

V₁ – objętość roztworu 1

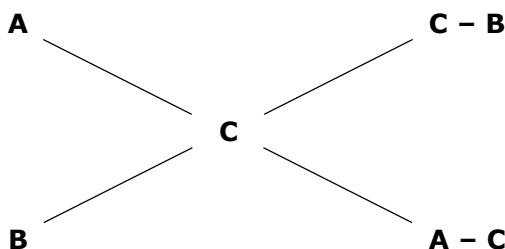
c₂ – stężenie roztworu 2

V₂ – objętość roztworu 2

5. Mieszanie roztworów

W przypadku mieszania ze sobą roztworów tej samej substancji o różnych stężeniach wyjściowych w celu otrzymania roztworu o żądanym stężeniu i objętości, można posłużyć się tzw. schematem krzyżowym. Metoda ta pozwala obliczyć ile g lub ml danych roztworów należy zmieszać ze sobą w celu otrzymania roztworu o żądanym stężeniu.

Układa się zatem wartości liczbowe stężeń roztworów w kwadracie, gdzie po lewej stronie umieszcza się liczby wyrażające stężenia roztworów wyjściowych: **A** i **B** (w narożnikach kwadratu), na przecięciu przekątnych pisze się żądane stężenie sporządzanego roztworu **C**, natomiast po przekątnej kwadratu umieszcza się wartość różnicy odpowiednio pomiędzy **C – B** oraz **A – C** (odejmuje się zawsze od liczby większej liczbę mniejszą). Otrzymane wartości wskazują zatem w jakim stosunku masowym lub objętościowym należy zmieszać ze sobą roztwory wyjściowe w celu otrzymania żądanego roztworu **C**.



ROZDZIAŁ DRUGI: ROZTWORY BUFOROWE

Roztwory buforowe, zwane też krócej buforami to mieszaniny:

- **słabego kwasu** i **sol** powstałej w reakcji tego słabego kwasu z mocną zasadą;
- **słabej zasady** i **sol** powstałej w reakcji tej słabej zasady z mocnym kwasem;
- **dwóch wodorosoli** tego samego kwasu różniących się znacznie zdolnością dysocjacji.

Roztwory buforowe cechuje zdolność utrzymywania niezmienną, lub zmiennej w niewielkim stopniu wartości pH w pewnym przedziale pH, charakterystycznym dla danego typu buforu. Przykładowo, bufor octanowy o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$ wykazuje właściwości buforujące, czyli zachowuje stałą wartość pH w zakresie pH od 3,6 do 5,6. Można więc sporządzić bufor octanowy o stężeniu 1 mol/dm^3 , o wybranym pH z wcześniej wspomnianego zakresu np. bufor o pH 3,8 i mimo iż do tak sporządzonego buforu dodawać będziemy kwasu lub zasady to pH tego buforu przez długi czas pozostanie niezmienną. Ta zdolność przeciwstawiania się zmianom pH po wprowadzeniu kwasu lub zasady do roztworu buforowego nazywa się **pojemnością buforową**. Stosunek liczby moli jonów H_3O^+ lub OH^- wprowadzonych do roztworu buforowego o objętości jednego litra do spowodowanych przez te jony zmian pH tego roztworu jest miarą pojemności buforowej buforu, czyli innymi słowy pojemność buforowa to taka ilość kwasu, lub zasady, która jest potrzebna do zmiany pH roztworu o jednostkę.

Roztwory buforowe w biochemii odgrywają bardzo istotną rolę zarówno w stosowanych metodach analitycznych, jak i w procesach zachodzących w organizmach żywych. W metodach analitycznych zapewniają np. optymalne warunki do wyznaczania aktywności badanych enzymów, pozwalają na poprawne przeprowadzenie wielu oznaczeń tak jakościowych, jak i ilościowych, są niezbędne w izolacji białek, kwasów nukleinowych, czy organelli komórkowych. Bufory znajdują też ogromne zastosowanie w hodowlach tkankowych. Odpowiednie pH pożywek w hodowlach *in vitro* umożliwia optymalne wchłanianie składników odżywczych a tym samym właściwy wzrost i rozwój hodowanych komórek, tkanek, narządów, czy organizmów.

W organizmie człowieka za utrzymywanie równowagi kwasowo-zasadowej odpowiedzialne są bufory krwi, do których należą:

- bufor wodorowęglanowy $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$;
- bufor fosforanowy $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$;
- białczanowi, czyli białka $[\text{białko}^-]/[\text{białko-H}]$;
- hemoglobinianowy $\text{HbO}_2^-/\text{HbO}_2-\text{H}$;
- amonowy $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$

1. Sporządzanie roztworów buforowych

Odczynniki: $0,2 \text{ mol/dm}^3$ roztwór CH_3COOH , $0,2 \text{ mol/dm}^3$ roztwór CH_3COONa

Wykonanie: Korzystając z tabeli 2.1 sporządzić 100 ml buforu octanowego poprzez pobranie i zmieszanie odpowiednich objętości roztworów wyjściowych elektrolitów w wąskiej, wysokiej zlewce o pojemności 150 ml. Do mieszania zastosować mieszadło magnetyczne.

Tabela 2.1 Bufor octanowy wg Walpole'a (pH = 3,6-5,6)

kwasy octowy [ml]	octan sodowy [ml]	pH
18,5	1,5	3,6
17,6	2,4	3,8
16,4	3,6	4,0
14,7	5,3	4,2
12,6	7,4	4,4
10,2	9,8	4,6
8,0	12,0	4,8
5,9	14,1	5,0
4,2	15,8	5,2
2,9	17,1	5,4
1,9	18,1	5,6

2. Dokonanie pomiaru pH otrzymanego buforu

Wykonanie:

1. Przygotować mieszadło magnetyczne, wąską zlewkę o pojemności 150 ml, pH-metr, pipetę Pasteura, tryskawkę z wodą destylowaną i bibułę.
2. Przed przystąpieniem do dokonania pomiaru pH za pomocą pH-metru konieczne jest zawsze jego wykalibrowanie.
3. Po poinstruowaniu przez prowadzącego wykalibrować pH-metr, zmierzyć pH otrzymanego w poprzednim ćwiczeniu buforu i porównać otrzymany wynik z wynikiem przewidywanym.

3. Przygotowanie buforu metodą ciągłej kontroli pH

Odczynniki: 0,2 mol/ dm³ roztwór CH₃COOH, 0,2 mol/dm³ roztwór CH₃COONa

Wykonanie:

1. Przygotować mieszadło magnetyczne, wąską zlewkę o pojemności 150 ml, pH-metr, pipetę Pasteura, tryskawkę z wodą destylowaną i bibułę.
2. W zlewce umieścić zastosowaną w pierwszym ćwiczeniu objętość wyjściowego roztworu CH₃COOH.
3. Za pomocą pH-metru zmierzyć pH umieszczonego w zlewce roztworu.
4. W zlewce umieścić element mieszający a zlewkę ustawić na włączonym mieszadle magnetycznym.
5. W zlewce zanurzyć elektrodę (**ostrożnie, aby nie uległa uszkodzeniu!**).
6. Do oddzielnej zlewki odmierzyć 100 ml roztworu CH₃COONa.
7. Ciągłe kontrolując pH dodawać pipetą Pasteura odmierzony roztwór CH₃COONa aż do uzyskania pH zadanego przez prowadzącego w pierwszym ćwiczeniu.
8. Zmierzyć zużytą objętość roztworu CH₃COONa.
9. Obliczyć stosunek objętości kwasu octowego do objętości CH₃COONa zużytej w celu uzyskanie buforu o określonym pH. Wynik porównać z danymi z tabeli 2.1.

4. Pomiar pH wybranych płynów ustrojowych

Wykonanie: Zgodnie ze wskazówkami prowadzącego dokonać pomiaru pH surowicy, moczu, roztworu śliny (przygotować zgodnie ze wskazówkami prowadzącego).

Zaliczenie: Po uprzednim podpisaniu wyników przez prowadzącego porównać i przedyskutować otrzymane wyniki z danymi literaturowymi.

5. Pomiar pH wybranych składników odżywczych

Wykonanie: Zgodnie ze wskazówkami prowadzącego dokonać pomiaru pH mleka, jogurtu, soku owocowego, naparu kawy i herbaty.

Zaliczenie: Na podstawie uzyskanych wyników uporządkować badane roztwory według wzrastającego pH. Wyjaśnić obserwowane różnice pH.

	metionina	Met	M	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$
	fenyloalanina	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H} \end{array}$
	tryptofan	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$
	prolina	Pro	P	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ / \quad \backslash \\ \text{HOOC}-\text{CH} \quad \text{CH}_2 \\ \backslash \quad / \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$
HYDROFILOWE OBOJĘTNE	seryna	Ser	S	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
	treonina	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{OH} \\ \quad / \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
	cysteina	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
	tyrozyna	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
	asparagina	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{O} \\ \quad // \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$

	glutamina	Gln	Q	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$
HYDROFILOWE KWAŚNE	kwask asparaginowy	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C} \\ \quad \quad \quad // \quad \quad \quad \backslash \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
	kwask glutaminowy	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C} \\ \quad \quad \quad // \quad \quad \quad \backslash \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$
HYDROFILOWE ZASADOWE	lizyna	Lys	K	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$
	arginina	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad // \quad \quad \quad \backslash \\ \text{H} \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	histrydina	His	H	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_4\text{H}_3\text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$

1. Wykrywanie i identyfikacja aminokwasów

1.1. Reakcje grup aminowych

1.1.1. Reakcja z ninhydryną

Podstawa teoretyczna: Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają deaminacji i dekarboksylacji przekształcając się w odpowiedni aldehyd a w wyniku reakcji powstaje ponadto amoniak, dwutlenek węgla i zredukowana ninhydryna. Zredukowana ninhydryna reaguje następnie z amoniakiem i inną cząsteczką ninhydryny tworząc niebieskofioletkowy kompleks zwany purpurą Ruhemanna. Prolina daje kompleks o barwie żółtej, gdyż zamiast grupy aminowej zawiera grupę iminową.

Odczynniki: 0,1 % roztwór glicyny, 0,1 % roztwór ninhydryny w 50 % etanolu, roztwór białka

Wykonanie:

1. Przygotować trzy probówki.
2. W jednej probówce umieścić około 1 cm³ 0,1 % roztworu glicyny, dodać około 0,5 cm³ roztworu ninhydryny i ogrzewać do zmiany zabarwienia, zaobserwować wynik.
3. W drugiej probówce umieścić około 1 cm³ roztworu białka, dodać około 0,5 cm³ roztworu ninhydryny i ogrzewać do zmiany zabarwienia, zaobserwować wynik.
4. W trzeciej probówce przygotować próbę ślepą tzn. zamiast roztworu glicyny dodać odpowiednią objętość wody, porównać wyniki.

1.1.2. Reakcja z kwasem azotowym(III)

Podstawa teoretyczna: Pod wpływem kwasu azotowego(III) wolne α-aminokwasy ulegają deaminacji i są zamieniane w odpowiednie α-hydroksykwasy. Wydziela się również azot cząsteczkowy. W połowie pochodzi on z grupy aminowej aminokwasu, a w połowie z kwasu azotowego(III). Ponieważ kwas azotowy(III) jest nietrwały, jest on wytwarzany w środowisku reakcji *ex tempore* (znieca, bez przygotowania) i bezpośrednio wchodzi w reakcję z aminokwasem.

Jeśli w układzie, gdzie tworzy się kwas azotowy(III) brak aminokwasu to kwas azotowy(III) rozpada się do tlenków azotu(II) i (IV) oraz wody. Kwas azotowy(III) reaguje tylko z grupami aminowymi przy węglu α. Przez pomiar objętości wydzielonego azotu reakcja ta może służyć do ilościowej analizy aminokwasów.

Odczynniki: 10 % NaNO₂, lodowaty (100 %) CH₃COOH, 0,1% roztwór glicyny

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki: w jednej wykonać próbę ślepą a w drugiej próbę badaną.
2. **Próba ślepa:** w jednej probówce umieścić około 1 cm³ 10 % roztworu NaNO₂ i dodać około 1 cm³ lodowatego CH₃COOH; oba płyny wymieszać, dokonać obserwacji.
3. **Próba badana:** w drugiej probówce zmieszać około 1 cm³ 10 % roztworu NaNO₂ i około 2 cm³ 0,1 % roztworu glicyny a następnie dodać około 1 cm³ lodowatego CH₃COOH, zawartość probówki wymieszać, dokonać obserwacji, porównać wyniki.

1.1. Reakcje wybranych grup bocznych

1.2.1. Reakcja cystynowa (wykrywanie grup –SH cysteiny)

Podstawa teoretyczna: W wyniku ogrzewania cysteiny w środowisku silnie zasadowym dochodzi do deaminacji aminokwasu i uwolnienia siarki w postaci jonów siarczkowych. Jony siarczkowe reagują następnie z octanem ołowiu(II) dając nierozpuszczalną sól – siarczek ołowiu(II), wypadającą z roztworu w postaci czarnego osadu.

Odczynniki: 0,3 % roztwór cysteiny, 30 % roztwór NaOH, 5 % roztwór Pb(CH₃COO)₂, roztwór białka

Wykonanie:

1. Przygotować trzy probówki.
2. W jednej probówce umieścić: około 1 cm³ 0,1 % roztworu cysteiny, około 2 cm³ 30 % roztworu NaOH, dodać kilka kropel 5 % roztworu Pb(CH₃COO)₂; zawartość probówki wymieszać i ogrzewać do wrzenia przez kilka minut.
3. W drugiej umieścić około 1 cm³ roztworu białka i dalej postępować jak w punkcie drugim.
4. Próbę ślepą przygotować analogicznie, jak pierwszą probówkę, dodając zamiast roztworu cysteiny taką samą objętość wody destylowanej.
5. Dokonać obserwacji, porównać wyniki.

1.2.2. Reakcja Sakaguchi'ego (wykrywanie reszt guanidyny w argininie)

Podstawa teoretyczna: Jest to bardzo czuła reakcja, pozwalająca na wykrycie mikrogramowych ilości argininy w próbce. Jest też bardzo specyficzna. W środowisku zasadowym i w obecności bromianu sodu lub potasu działających jako silny utleniacz, związki zawierające resztę guanidyny reagują z α -naftolem dając barwne pochodne, niestety nietrwałe, gdyż dalej ulegające utlenianiu pod wpływem ciągle obecnego w próbce utleniacza. Pochodne te można stabilizować przez dodatek około 1 cm³ 40 % roztworu mocznika. Arginina jest nie tylko aminokwasem białkowym, ale też ważnym składnikiem cyklu mocznikowego: z niej powstaje mocznik.

Odczynniki: roztwór białka, 20 % roztwór NaOH, 2 % alkoholowy roztwór α -naftolu, woda bromowa

Wykonanie:

1. Przygotować trzy próbki.
2. W pierwszej umieścić 1 cm³ roztworu białka, w drugiej, jako próbie ślepej 1 cm³ wody destylowanej.
3. Do wszystkich próbek dodać 1 cm³ roztworu NaOH i 2-3 krople roztworu α -naftolu a następnie dobrze wymieszać i wprowadzić kroplę wody bromowej.
4. Porównać wyniki.

1.2.3. Reakcja Pauly'ego (wykrywanie pierścienia imidazolowego histydyny)

Podstawa teoretyczna: Histydyna dzięki obecności w swojej cząsteczce pierścienia imidazolowego, w obecności węgla(IV) sodu zapewniającego odczyn zasadowy, ulega reakcji sprzężenia z kwasem p-diazobenzenosulfonowym, tworząc pomarańczowy barwnik.

Odczynniki: 0,5 % roztwór histydyny, 0,5 % roztwór kwasu sulfanilowego w 2 M HCl, 0,5 % roztwór NaNO₂, Na₂CO₃ *in subst.*

Wykonanie:

1. Przygotować dwie próbki.
2. W jednej próbce umieścić około 5 cm³ 0,5 % roztworu kwasu sulfanilowego i chłodząc próbkę zimną wodą dodać 0,5 cm³ 0,5 % roztworu NaNO₂.
3. Zalkalizować powstały roztwór dodając Na₂CO₃ *in subst.* (aż do uzyskania lekko żółtego zabarwienia) i wlać 1 cm³ 0,5 % roztworu histydyny. Zaobserwować wynik.
4. W drugiej próbce wykonać próbę ślepa, zamiast histydyny dodając odpowiednią objętość wody
5. Porównać wyniki.

2. Ilościowe oznaczanie glicyny metodą miareczkowania formolowego (reakcja Sörensena)

Podstawa teoretyczna: Podczas miareczkowania roztworu glicyny (podobnie jak każdego innego aminokwasu) roztworem NaOH, z grupy $-\text{NH}_3^+$ glicyny oddysocjują jony H⁺, a jon obojnaczy aminokwasu przechodzi w karboanion. Uwolnione jony H⁺ oddziałują z jonami OH⁻, ale mogą również przyłączać się do powstałych wcześniej w czasie miareczkowania grup $-\text{NH}_2$ odtwarzając grupy $-\text{NH}_3^+$. Istnienie w roztworze cząsteczek glicyny wyłącznie z grupami $-\text{NH}_2$, ma miejsce dopiero wówczas, gdy roztwór ten osiąga pH powyżej 12. Nie są znane takie

wskaźniki alkacymetryczne (wskazujące alkaliczne pH roztworu przez zmianę zabarwienia), które by zmieniały barwę przy tak wysokiej wartości pH.

Fenoloftaleina jest wskaźnikiem alkacymetrycznym, który przechodzi z formy bezbarwnej (w środowisku kwaśnym lub obojętnym) do czerwonej (w środowisku zasadowym). Jej zakres pH zmiany barwy to 8,2-10,0. Tak więc i fenoloftaleina nie pozwala wykryć momentu, gdy wszystkie cząsteczki glicyny posiadają już tylko grupy -NH_2 , czyli występują w postaci karboanionów.

Problem ten można jednak ominąć blokując uwolnione od jonów H^+ reszty -NH_2 glicyny. W tym celu do roztworu glicyny dodaje się roztwór formaldehydu o pH odpowiadającym dolnej granicy rejestrowanego przez fenoloftaleinę, czyli około 8,3. Gdy dodamy roztwór formaldehydu o takim pH do roztworu glicyny zawierającym już dopiero co zabarwioną na różowo fenoloftaleinę, pod wpływem dodawanego roztworu NaOH, to wówczas nastąpi zablokowanie wszystkich w danej chwili wolnych od jonów H^+ reszt aminowych glicyny. Za zablokowanie tych właśnie reszt odpowiedzialny jest formaldehyd, który reaguje z grupami -NH_2 , a nie reaguje z grupami -NH_3 .

Ponieważ jony H^+ nie będą mogły ponownie wiązać się z grupami -NH_2 , które zostały zablokowane, dodatek formaldehydu spowoduje obniżenie pH roztworu glicyny. W obecności formaldehydu uwolnione z grupy -NH_3^+ jony H^+ nie będą już mogły łączyć się z resztami -NH_2 , a jedynie z nie zablokowanymi grupami -COO^- tego aminokwasu co umożliwi oznaczenie ilościowe glicyny metodą miareczkowania roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny. W takich warunkach końcowy punkt miareczkowania z pH 12 przesuwa się do pH 9, co odpowiada utrzymującej się kilka minut różowej barwie roztworu zawierającego fenoloftaleinę.

Odczynniki: wodne roztwory glicyny o nieznanym stężeniu, handlowy roztwór formaldehydu, 0,1 mol/dm³ roztwór NaOH, fenoloftaleina

Wykonanie:

1. Przygotować biuretę, dwie kolby płaskodenne o objętości 100 ml każda, lejek i cylinder miarowy o pojemności 10 ml.
2. Biuretę napełnić roztworem NaOH.
3. W pierwszej kolbie umieścić 10 ml formaldehydu, dodać kilka kropel fenoloftaleiny, po wymieszaniu miareczkować roztworem NaOH do uzyskania lekko różowego zabarwienia tj. pH około 8,5.
4. W drugiej kolbie przygotować 10 ml zadanego roztworu glicyny, dodać kilka kropel fenoloftaleiny i wprowadzać kroplami NaOH, aż do uzyskania lekko różowego zabarwienia tj. pH ok. 8,5.
5. Zanotować zużytą objętość 0,1 M roztworu NaOH.
6. Zawartość pierwszej kolby przelać do drugiej, wymieszać, wyjaśnić zaobserwowany wynik.
7. Wymieszaną zawartość obu kolb miareczkować 0,1 M roztworem NaOH aż do uzyskania lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez kilka minut.

Opracowanie wyników: z ilości ml zużytego na miareczkowanie 0,1 M roztworu NaOH obliczyć zawartość glicyny (w mg) oraz znając objętość miareczkowanego roztworu podać jego stężenie (mol/l).

ROZDZIAŁ CZWARTY: PEPTYDY I BIAŁKA

1. Peptydy

Aminokwasy mają zdolność do reagowania ze sobą poprzez grupę karboksylową jednej reszty aminokwasowej z grupą aminową drugiej reszty aminokwasowej, z wytworzeniem wiązania peptydowego (amidowego). Wiązanie peptydowe jest sztywnym układem płaskim, gdyż swobodna rotacja wokół osi wiązania C–N jest zahamowana, a odległość pomiędzy atomami C i N jest krótsza od odległości typowej dla wiązania pojedynczego. Przyczyną opisanego faktu jest występowanie w roztworze dwóch, pozostających w równowadze, struktur rezonansowych.

Peptydy są to makrocząsteczki zbudowane z nie więcej niż 100 reszt aminokwasowych połączonych wiązaniem peptydowym. W organizmach pełnią różnorodne funkcje fizjologiczne i biochemiczne, m.in. jako ważne elementy metabolizmu komórkowego, peptydowe hormony, a także jako antybiotyki, toksyny i alkaloidy. Peptydy zbudowane z nie więcej niż 10 reszt aminokwasowych to oligopeptydy, natomiast polimery o dłuższych łańcuchach to polipeptydy.

2. Białka (proteiny)

Białka, zwane również proteinami, są to makrocząsteczki zbudowane z więcej niż 100 reszt aminokwasowych, połączonych wiązaniami peptydowymi. Ich masa przekracza 10 000 daltonów (Da) i może osiągać wartość milionów Da. W organizmach pełnią ważne i różnorodne funkcje. Jedną z ważniejszych jest funkcja katalityczna, czyli przyspieszanie szybkości reakcji biochemicznych. Takie białka to enzymy. U zwierząt i ludzi są głównymi cząsteczkami budulcowymi. Skóra, sierść, włosy, paznokcie, mięśnie zbudowane są z białek. Olbrzymia różnorodność białek spotykanych w żywych organizmach wynika ze zmienności składu oraz sekwencji aminokwasów budujących łańcuchy polipeptydowe, a także z obecnością innych, nieaminokwasowych ugrupowań. W skład cząsteczki białkowej wchodzi około 20 różnych L- α -aminokwasów, zwanych aminokwasami białkowymi.

Białka dzieli się zarówno ze względu na ich rozmieszczenie w organizmie, pełnione funkcje, jak i budowę oraz własności fizykochemiczne. Spośród protein wewnątrzkomórkowych wyróżnia się białka cytoplazmatyczne, a także występujące specyficznym w poszczególnych organellach oraz błonach. Z kolei białka wydzielane pozakomórkowo pełnią w ustroju rozmaite funkcje strukturalne, fizjologiczne i biochemiczne.

Uwzględniając rolę pełnioną przez białka w organizmie, wyróżnia się między innymi proteiny budulcowe, zapasowe, enzymatyczne, regulacyjne, transportujące, ochronne, receptorowe, kurczliwe, onkotyczne, a także białka układu odpornościowego, hormony białkowe, toksyny, czynniki wzrostu i różnicowania komórek.

3. Wykrywanie wiązania peptydowego (reakcja biuretowa)

Podstawa teoretyczna: Reakcja biuretowa (odczyn Piotrowskiego) jest reakcją charakterystyczną na obecność wiązań peptydowych. Warunkiem jej zajścia jest obecność przynajmniej dwóch wiązań peptydowych w cząsteczce, co spełnione jest w przypadku najprostszego związku – biuretu (dimocznika), od którego pochodzi nazwa tej reakcji. W środowisku zasadowym wiązania peptydowe ulegają tautomeryzacji z utworzeniem form enolowych. Z formami enolowymi jony Cu^{2+} dają kompleksy, w których tworzą się dwa wiązania z atomami tlenu i cztery wiązania koordynacyjne z atomami azotu. Powstający kompleks w przypadku białek ma intensywną fioletową barwę, a w przypadku peptydów, czerwoną.

Odczynniki: roztwór białka, 10 % roztwór NaOH, 1 % roztwór CuSO₄

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki.
2. W jednej z nich umieścić około 2 ml roztworu białka, dodać taką samą objętość 10 % roztworu NaOH i parę kropel 1 % roztworu CuSO₄. Zaobserwować wynik.
3. W drugiej probówce wykonać tę samą reakcję, ale dla próby ślepej (zamiast roztworu białka dodać taką samą objętość wody destylowanej). Zaobserwować wynik.
4. Porównać i wyjaśnić otrzymane wyniki.

4. Denaturacja białek

Podstawa teoretyczna: Charakterystyczna dla danego białka natywna struktura przestrzenna może ulec uszkodzeniu pod wpływem zadziałania określonych czynników fizycznych i chemicznych: wysokiej temperatury, promieniowania UV, obecności soli metali ciężkich, detergentów, mocnych zasad i kwasów nieorganicznych a także kwasów i rozpuszczalników organicznych. Czynniki te powodują zerwanie wiązań niekowalencyjnych, stabilizujących strukturę białkową. Proces zniszczenia struktury IV, III oraz II-rzędowej, przy jednoczesnym zachowaniu oryginalnej sekwencji aminokwasów (struktury I-rzędowej), nazywany jest denaturacją i wiąże się z częściową lub całkowitą utratą właściwości biologicznych oraz zmianą charakterystyki fizykochemicznej białka. Mechanizm denaturacji białka jest zróżnicowany, gdyż odmienne czynniki denaturujące mogą wpływać na zerwanie różnych typów wiązań. Zdenaturowane białko często koaguluje, zwłaszcza w warunkach pH zbliżonych do pI. W pH wyższym od pI, białka wykazują wypadkowy ładunek ujemny i stają się podatne na reakcje z kationami metali ciężkich (Pb²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Hg⁺), tworząc z nimi nierozpuszczalne i trwałe kompleksy. Z kolei w pH niższym od pI białka przyjmują formę kationową i tworzą z niektórymi kwasami organicznymi (np. kwasem sulfosalicylowym, pikrynowym, trichlorooctowym) nierozpuszczalne związki. Niekiedy zdarza się, że denaturacja jest procesem odwracalnym i po usunięciu czynnika denaturującego oraz zapewnieniu odpowiednich warunków, białko odzyskuje natywną konformację przestrzenną (renaturacja).

Odczynniki: roztwór białka, 1 % roztwory: HgCl₂, Pb(NO₃)₂ oraz AgNO₃, 95 % roztwór etanolu

Wykonanie:

1. **Wpływ metali ciężkich:** Przygotować trzy probówki, w każdej umieścić około 2 cm³ roztworu białka. Do poszczególnych probówek dodawać kroplami: do pierwszej roztwór HgCl₂, do drugiej roztwór Pb(NO₃)₂ a do trzeciej AgNO₃. Zaobserwować i zinterpretować wyniki.
2. **Wpływ etanolu:** krótkotrwałe działanie etanolu powoduje wytrącanie białka z roztworu, ale nie powoduje denaturacji. Zachodzi ona dopiero po dłuższym czasie działania etanolu i w wyższej temperaturze (20-30 °C). W dwóch probówkach umieścić po około 1 cm³ roztworu białka i trzy razy tyle roztworu etanolu: zaobserwować wynik. Do pierwszej probówki dodać wody, wymieszać, zaobserwować wynik. Drugą probówkę zostawić na około godzinę a po tym czasie dodać wody i zaobserwować wynik. Wszystkie wyniki porównać i zinterpretować.
3. **Wpływ temperatury:** w probówce umieścić około 2 cm³ roztworu białka i ogrzewać do wrzenia. Zaobserwować i zinterpretować wynik.

ROZDZIAŁ PIĄTY: ENZYMY

Enzymy to biokatalizatory. Przedrostek *bio* pochodzi od greckiego słowa *bios* oznaczającego życie a katalizator to substancja chemiczna przyspieszająca przebieg reakcji chemicznej. Można więc powiedzieć, że enzymy to z jednej strony katalizatory reakcji podtrzymujących życie, a z drugiej że są to katalizatory wytwarzane przez organizmy żywe. Pod względem chemicznym enzymy należą do białek, choć znane są biokatalizatory będące RNA i określane jako **rybozymy**, a nawet DNA zwane **DNAzymami**. Nazwa enzymy pozostała zarezerwowana tylko dla biokatalizatorów będących białkami.

Zasadniczą częścią cząsteczki enzymu jest centrum aktywne, do którego wiąże się substrat. Niektóre enzymy to białka proste zbudowane tylko z aminokwasów (chymotrypsyna, tripsyna), inne składają się z części białkowej i niebiałkowej. Jeżeli część niebiałkowa związana jest trwale z enzymem, nosi nazwę grupy prostetycznej. Jeżeli część niebiałkowa wiąże się z enzymem odwracalnie, nazywa się ją albo kofaktorem, gdy jest to mała, nieorganiczna cząsteczka, albo koenzymem gdy jest to większa cząsteczka organiczna.

Część białkowa enzymu bez kofaktora lub koenzymu nazywana jest apoenzymem. Apoenzym, do którego została przyłączona grupa niebiałkowa to holoenzym.



Część białkowa enzymu decyduje o specyficzności substratowej a w wielu przypadkach ma wpływ na kierunek reakcji enzymatycznej. Koenzym pomaga w działaniu enzymu np. poprzez przenoszenie atomów lub grup chemicznych z donora na akceptor.

Międzynarodowa Unia Biochemiczna opracowała zasady klasyfikacji i nazewnictwa enzymów oparte na rodzaju katalizowanej reakcji i wyodrębniła w ten sposób 6 klas głównych enzymów. Są to:

1. **oksydoreduktazy** – katalizują procesy utlenienia i redukcji;
2. **transferazy** – przenoszą grupy atomów z jednej cząsteczki na drugą;
3. **hydrolazy** – katalizują reakcje hydrolizy różnych ugrupowań;
4. **liazy** – katalizują reakcje niehydrolitycznego rozszczepienia substratu;
5. **izomerazy** – katalizują odwracalne reakcje przekształceń strukturalnych cząsteczki substratu;
6. **ligazy** – odpowiedzialne za reakcje łączenia dwóch cząsteczek nowym wiązaniem z wykorzystaniem cząsteczek ATP.

W obrębie tych klas głównych wyróżnia się wiele podklas i pod-podklas, co sprawia, że każdemu ze znanych enzymów można przypisać 4 cyfry. Pierwsza z nich oznacza numer klasy głównej, druga to numer podklasy, a trzecia to numer pod-podklasy. Czwarta cyfra oznacza numer enzymu w danej pod-podklasie danej podklasy i danej klasy głównej.

2. Inhibitory

Inhibitorami enzymów określamy związki, które hamują szybkość reakcji enzymatycznej. Inhibitory mogą działać na cząsteczkę enzymu swoiście lub nieswoiście. **Inhibitory nieswoiste (niespecyficzne)** są to substancje lub czynniki fizyczne (temperatura, rozpuszczalniki organiczne, itp.), które działając na cząsteczkę zmieniają jego natywną strukturę i prowadzą do inaktywacji enzymu.

Inhibitory swoiste (specyficzne) oddziałujące z miejscem aktywnym enzymu to związki reagujące z grupami bocznymi aminokwasów znajdujących się w miejscu aktywnym enzymu i powodującymi jego inaktywację. Przykładem tego rodzaju inhibitorów mogą być związki reagujące z grupami sulfhydrylowymi tworząc disiarczki lub merkaptidy. Następną grupą inhibitorów swoistych są związki reagujące z kofaktorami. Do tej grupy zaliczyć można cyjanki

reagujące z jonami żelazowymi i żelazawymi wchodzącymi w skład grupy prostetycznej oksydazy cytochromowej – reakcja ta blokuje proces oddychania komórkowego – czy też reakcję fluorków z enzymami aktywowanymi jonami magnezu.

Z uwagi na mechanizm hamowania reakcji enzymatycznej inhibitory dzielimy na:

- **kompetycyjne** – wykazujące podobieństwa strukturalne z substratem i współzawodniczące z substratem o centrum aktywne enzymu. Inhibitory kompetycyjne należą do inhibitorów odwracalnych, zmniejszających powinowactwo do enzymu. Stała K_m rośnie, V_{max} nie ulega zaś zmianie. Miarą efektywności działania tych inhibitorów jest stała inhibicji K_i , która liczbowo odpowiada stałej dysocjacji kompleksu enzymu z inhibitorem, czyli im niższa wartość K_i , tym silniejsza reakcja hamowania.
- **niekompetycyjne** – nie wykazujące podobieństwa strukturalnego z substratem, łączące się z cząsteczką enzymu poza centrum aktywnym, tworząc kompleks enzym-inhibitor. Do tego kompleksu może (lub nie) przyłączać się substrat, ale reakcja katalizy nie zachodzi. Stała K_m nie zmienia się, a szybkość V_{max} ulega zmniejszeniu.
- **mieszane** – są to inhibitory, które obniżają powinowactwo enzymu do substratu zwiększając K_m i jednocześnie obniżają szybkość maksymalną V_{max} .

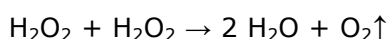
3. Przygotowanie wyciągu ziemniaczanego

Wykonanie:

1. Umyć, obrać i utrzeć na tarce ziemniaka.
2. Miazgę ziemniaczaną otoczyć gazą i zanurzyć w zlewce zawierającej około 200 ml wody destylowanej.
3. Przetrzymać w wodzie przez chwilę łagodnie mieszając.
4. Po wyciągnięciu miazgi odczekać chwilę w celu opadnięcia osadu.
5. Płyn z nad osadu zdekantować.

4. Wykrywanie katalazy

Podstawa teoretyczna: Katalaza należy do enzymów hemoproteinowych i rozkłada nadtlenek wodoru zgodnie z równaniem chemicznym reakcji:



Powoduje więc ona rozkład toksycznego nadtlenku wodoru do wody i tlenu. Można to zaobserwować polewając wodą utlenioną (3 % wodny roztwór nadtlenku wodoru) zranione miejsca. Wówczas obserwuje się pienie wody utlenionej spowodowane gwałtownym wydzielaniem tlenu powstającego w wyniku rozkładu nadtlenku wodoru katalizowanego przez enzym zwany **katalazą**. Jest to enzym występujący zarówno u zwierząt, jak i roślin.

Odczynniki: wyciąg ziemniaczany (z poprzedniego punktu), 3 % roztwór H_2O_2

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki.
2. W obu umieścić po około 2 ml wyciągu ziemniaczanego.
3. Do jednej dodać około 1 ml 3 % roztworu H_2O_2 i zaobserwować wynik.
4. Zawartość drugiej probówki ogrzać do wrzenia i po ochłodzeniu dodać 1 ml 3 % roztworu H_2O_2 .
5. Zaobserwować wyniki i porównać z wynikiem uzyskanym dla probówki pierwszej. Wyjaśnić różnicę.

5. Stopniowy rozkład skrobi przez amylazę

Podstawa teoretyczna: Skrobia to cukier złożony z wielu cząsteczek glukozy. Ma więc budowę łańcuchową. Skrobia tworzy z jodem barwne połączenia. W takich połączeniach jedna cząsteczka jodu przypada na 6 reszt glukozy. Amylaza to enzym należący do hydrolaz.

Występuje np. w ślinie. Powoduje ona rozrywanie wiązań łączących cząsteczki glukozy. Dzięki obecności jodu można tą reakcję obserwować, gdyż im krótszy łańcuch reszt glukozy, tym barwa mniej intensywna. Od fioletowej przechodzi poprzez niebieskofioletową do czerwonej, a kiedy w roztworze są już tylko dwucukry i monocukry, roztwór staje się bezbarwny.

Odczynniki: świeżo sporządzony 1 % roztwór skrobi, 0,002 % roztwór jodu w jodku potasu

Przygotowanie roztworu amylazy śliny: przepłukać usta ciepłą wodą, następnie pobrać łyk wody do ust i po kilku minutach wypłuć do zlewki, czynność tę powtórzyć kilkakrotnie aż uzyska się powyżej 10 ml roztworu amylazy.

Wykonanie:

1. Do probówki odmierzyć 7 ml świeżo przyrządzonego roztworu skrobi i 7 ml otrzymanego roztworu amylazy śliny.
2. Dokładnie wymieszać a następnie probówkę umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 40 °C na około 5 minut.
3. W tym czasie przygotować pipetę o pojemności 1 ml i 10 probówek. W każdej probówce umieścić po 2 ml roztworu jodu w jodku potasu.
4. Po upływie 5 minut z probówki zawierającej skrobię i enzym pobierać co pół minuty 1 ml roztworu i umieszczać w kolejnych wcześniej przygotowanych probówkach. Obserwować zabarwienie.

ROZDZIAŁ SZÓSTY: CUKROWCE

Cukrowce, zwane też sacharydami lub węglowodanami to związki organiczne złożone z węgla, wodoru i tlenu, których podstawową jednostką budulcową są monosacharydy, zwane inaczej cukrami prostymi. Cukry proste natomiast to wielowodorotlenowe aldehydy lub ketony. Zawierają od trzech do ośmiu atomów węgla w cząsteczce. Najczęściej jednak spotykane są pentozy i heksozy, czyli cukry proste zbudowane z pięciu i sześciu atomów węgla. Jeśli zawierają grupę aldehydową to zaliczamy je do **aldoz**, jeśli grupę ketonową to do **ketoz**. Do najpopularniejszych w przyrodzie pentoz należy aldopentozą wchodząca w skład np. DNA, zwana deoksyrybozą, czy obecna w RNA ryboza. Heksozy są najpowszechniej reprezentowane przez aldoheksozę, jaką jest glukoza i ketoheksozę, jaką jest fruktoza. Monosacharydy, oprócz najprostszej ketotriozy (dihydroksyacetonu), zawierają jeden lub kilka atomów węgla asymetrycznego. Obecność ośrodków asymetrycznych powoduje występowanie zjawiska skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego, którego miarą jest skręcalność właściwa. W zależności od liczby asymetrycznych atomów węgla w cząsteczce, danemu wzorowi sumarycznemu odpowiada liczba stereoizomerów określana wzorem 2^n , gdzie n jest liczbą atomów węgla asymetrycznego. Wśród stereoizomerów wyróżnia się dwa szeregi: D i L. Litery D (*dextro*) i L (*laevo*) opisują konfigurację przy węglu asymetrycznym położonym najdalej od węgla grupy karbonylowej. Występujące w organizmie człowieka cukrowce to głównie przedstawiciele szeregu konfiguracyjnego D. Monosacharydy mające 5 lub więcej atomów węgla w cząsteczce mogą występować w formach pierścieniowych (półacetalowych). W wyniku powstania takiego pierścienia powstaje też nowa grupa hydroksylowa zwana hydroksylem półacetalowym. Pentozy i ketoheksozy ulegają cyklizacji tworząc pierścień zwany **furanozowym** a aldoheksozy pierścień zwany **piranozowym**. Utworzenie formy pierścieniowej powoduje pojawienie się w cząsteczce dodatkowego ośrodka asymetrii zwanego węglem anomerycznym. U aldoz jest to pierwszy a u ketoz drugi atom węgla. Izomery różniące się ułożeniem podstawników przy tym anomerycznym atomie węgla nazywamy **anomerami**. Istnieją dwa anomery: alfa i beta. Jeżeli łańcuchowa forma D zamknie się w pierścień a jej hydroksyl półacetalowy będzie zwrócony na dół, to jest to **anomer alfa**, jeśli do góry to **beta**. Przy formie L odwrotnie. Monosacharydy mogą łączyć się ze sobą wiązaniem O-glikozydowym (utworzonym w wyniku oddziaływania dwóch hydroksyli, przy czym mogą to być zarówno hydroksyle alkoholowe, jak i półacetalowe). W wyniku takiego połączenia powstają cukrowce złożone, wśród których wyróżniamy zarówno dwucukry (np. sacharozę), oligosacharydy (zbudowane z od trzech do dziesięciu reszt cukrów prostych), jak i polisacharydy (jak np. skrobia, czy obecny w mięśniach i wątrobie zwierząt i człowieka glikogen). Cząsteczki polisacharydów mogą być nierozgałęzione (np. celuloza, amyloza) lub rozgałęzione (np. amylopektyna, glikogen).

Jedną z podstawowych funkcji węglowodanów jest uruchamianie i magazynowanie energii (glukoza, skrobia, glikogen). Węglowodany pełnią ponadto inne, bardzo zróżnicowane funkcje: strukturalną (celuloza, chityna), odgrywają rolę w procesach rozpoznania międzykomórkowego, adhezji komórek, biorą udział w regulacji transportu przez błony komórkowe i cytoplazmatyczne, czy w utrzymaniu właściwych stosunków wodnych w komórce.

1. Wykazanie charakteru alkoholowego monosacharydów

Podstawa teoretyczna: Słodki smak monosacharydów pochodzi od zawartych w ich cząsteczkach grup hydroksylowych. Grupy te nadają również monosacharydom charakter alkoholowy, który można potwierdzić i wykryć przez obserwację właściwości kompleksujących cukrów prostych. Powstający osad wodorotlenku miedzi(II) w obecności cukrowca ulega rozpuszczeniu ze względu na powstały związek kompleksujący miedź.

Odczynniki: 1 % roztwór glukozy, 1 % roztwór siarczanu(VI) miedzi(II), 0,2 mol/dm³ roztwór NaOH

Wykonanie:

1. Umieścić w probówce około 3 ml roztworu NaOH i około 0,2 ml roztworu siarczanu miedzi(II).
2. Zlać nadsącz i dodawać do pozostałego osadu kroplami roztwór glukozy jednocześnie wstrząsając probówką, aż do rozpuszczenia osadu.

2. Reakcje ogólne na wykrywanie cukrowców

2.1. Próby kondensacyjne

Podstawa teoretyczna: Pod wpływem stężonych kwasów (siarkowy i solny), cukry ulegają dehydratacji do odpowiednich pochodnych furfuralowych. Heksozy tworzą w tych warunkach 5-hydroksymetylenofurfural natomiast pentozy – furfural. Powstałe pochodne furfuralowe mogą reagować z fenolami, chinonami lub aminami aromatycznymi. W wyniku kondensacji ze związkami aromatycznymi powstają barwne produkty kondensacji. Reakcje te stanowią podstawę dla identyfikacji i oznaczeń ilościowych cukrowców.

2.1.1. Próba Molisha

Podstawa teoretyczna: Próba opiera się na reakcji odpowiedniej pochodnej furfuralowej z α -naftolem. Wówczas w mieszaninie na granicy faz powstaje połączenie triarylometanowe o czerwono-fioletowym zabarwieniu. Odczyn jest mało specyficzny, ponieważ dają go nie tylko rozpuszczalne cukrowce, ale również ugrupowania karbonylowe i niektóre kwasy karboksylowe.

Odczynniki: 1 % roztwory cukrów, odczynnik Molischa (5 % etanolowy roztwór α -naftolu), stężony (98 %) H_2SO_4

Wykonanie:

1. Przygotować cztery probówki.
2. Do pierwszej dodać około 1 ml wody destylowanej (próba ślepa), do pozostałych po 1 ml roztworu odpowiedniego cukrowca: pentozy, heksozy, sacharozy (disacharyd).
3. Do wszystkich probówek dodać kilka kropel odczynnika Molischa, a następnie podwarstwić 2 ml stężonego H_2SO_4 (**ostrożnie, po ściankach skośnie pochylonej probówki!**).

2.1.2. Próba antronowa

Podstawa teoretyczna: Próba opiera się na reakcji odpowiedniej pochodnej furfuralowej z odczynnikiem antronowym. Najszybciej z antronem reagują heksozy – wówczas powstaje związek o zielononiebieskiej barwie. Próba ta więc pozwala odróżnić heksozy od innych cukrów prostych. Próba antronowa może być stosowana w oznaczeniach ilościowych cukrowców.

Odczynniki: 1 % roztwory cukrów, odczynnik antronowy (0,2 g antronu w 100 ml stężonego (65 %) H_2SO_4)

Wykonanie:

1. Przygotować cztery probówki.
2. Do pierwszej dodać około 1 ml wody destylowanej (próba ślepa), do pozostałych po 1 ml odpowiedniego cukrowca: pentozy, heksozy, sacharozy (disacharyd).
3. Do wszystkich probówek dodać około 1 ml odczynnika antronowego a następnie zawartość probówek dokładnie wymieszać. Porównać zabarwienie mieszanin reakcyjnych.

3. Właściwości redukcyjne cukrów

Podstawa teoretyczna: Otwarte struktury łańcuchowe występują w roztworze wodnym w znikomej ilości. Zazwyczaj łańcuchy ulegają cyklizacji, tworząc struktury pierścieniowe.

Jednakże w środowisku zasadowym albo silnie kwaśnym, formy pierścieniowe cukrów przechodzą w formy łańcuchowe. Aktywna, wolna grupa aldehydowa (lub ketonowa) redukuje niektóre jony metali. W trakcie redukcji, cukry ulegają utlenieniu do odpowiednich kwasów cukrowych (np. aldozy do kwasów aldonowych). Właściwości redukujące wykazują wszystkie monosacharydy i niektóre disacharydy, takie jak maltoza i laktoza. Takich właściwości nie wykazują natomiast polisacharydy i disacharydy (np. sacharoza), których wiązanie glikozydowe tworzone jest z udziałem dwóch węgli acetylowych, czyli takie cukry, w których żaden z pierścieni nie może przejść do formy łańcuchowej i uwolnić wykazującej właściwości redukujące grupy aldehydowej, bądź ketonowej. Właściwości redukujące cukrów stanowią podstawę wielu oznaczeń analitycznych.

3.1. Próba lustra srebrnego (Tollensa)

Podstawa teoretyczna: W środowisku zasadowym, wolne ugrupowania karbonylowe redukują jony Ag^{1+} do Ag^0 . Dodawany AgNO_3 w środowisku reakcji tworzy nierozpuszczalny w wodzie wodorotlenek srebra, a więc jony srebrne nie są dostępne w roztworze. Aby mogły być dostępne i zredukowane przez cukier, dodaje się nadmiaru amoniaku, który przeprowadza nierozpuszczalny w wodzie wodorotlenek srebra w rozpuszczalny w wodzie wodorotlenek diamina srebra. W ten sposób jony srebrne mogą być dostępne dla cukru i w podwyższonej temperaturze ulegać redukcji.

Odczynniki: 1 % roztwory cukrów, 0,1 mol/dm³ roztwór AgNO_3 , $\text{NH}_3 \text{ aq}$

Wykonanie:

1. Przygotować trzy probówki.
2. W każdej probówce umieścić około 5 ml roztworu AgNO_3 i dodawać kroplami amoniak, aż powstający osad AgNO_3 ulegnie rozpuszczeniu.
3. Następnie: w pierwszej umieścić około 1 ml wody destylowanej (próba ślepa), do drugiej dodać około 1 ml dowolnego monosacharydu a do trzeciej 1 ml sacharozy.
4. Zawartość każdej probówki wymieszać, probówki umieścić w zlewce z ciepłą wodą i ogrzewać na niewielkim płomieniu.

3.2. Reakcja Trommera

Podstawa teoretyczna: Wiele reakcji redukcyjnych cukrowców opiera się na redukcji kationów miedzi Cu^{2+} do Cu^{1+} . Tworzący się w środowisku zasadowym niebieski osad $\text{Cu}(\text{OH})_2$ wchodzi w reakcję z grupami OH cukrowca, dając rozpuszczalny w wodzie kompleks barwy ciemnoniebieskiej, uwalniając w ten sposób do roztworu jony miedzi Cu^{2+} . Jony miedzi Cu^{2+} ulegają najpierw redukcji do Cu^{1+} występującego w rozpuszczalnym wodorotlenku CuOH , który podczas ogrzewania traci wodę i przechodzi w barwny, nierozpuszczalny w wodzie tlenek miedzi(I).

Odczynniki: 1 % roztwory cukrów, 1 % roztwór CuSO_4 , 0,2 mol/dm³ roztwór NaOH

Wykonanie:

1. Przygotować trzy probówki.
2. W pierwszej umieścić około 2 ml wody destylowanej (próba ślepa), do drugiej dodać około 2 ml dowolnego monosacharydu a do trzeciej 2 ml sacharozy.
3. Do każdej probówki dodać około 2 ml NaOH a następnie kroplami roztwór CuSO_4 , dopóki wydzielający się osad przechodzi do roztworu.
4. Zawartość każdej probówki wymieszać a następnie ogrzać.

4. Polisacharydy

4.1. Wykrywanie skrobi

Podstawa teoretyczna: Skrobia na skutek reakcji z cząsteczkami jodu barwi się na kolor niebieski. Barwa kompleksu zależy od struktury przestrzennej łańcucha polisacharydu, gdyż cząsteczki jodu wnikają do wnętrza tworzonej przez skrobię spirali. Na jeden skręt takiej spirali tworzonej przez 6 cząsteczek glukozy przypada jedna cząsteczka jodu. Kompleks jodu z amylozą ma inną barwę niż z amylopektyną. Oba te związki są homoglikanami, czyli polisacharydami zbudowanymi z jednego rodzaju reszt monosacharydów, w tym wypadku z glukozy, ale różnią się stopniem rozgałęzienia łańcucha. Amyloza nie jest rozgałęziona, a amylopektyna posiada rozgałęzienia. Zabarwienia kompleksu nie obserwuje się w wysokich temperaturach, gdyż w takich warunkach spiralnie skręcony łańcuch skrobi ulega rozprostowaniu.

Odczynniki: 1 % roztwór kleiku skrobiowego, odczynnik Lugola (jod w roztworze jodku potasu)

Wykonanie:

1. Do około 1 ml roztworu skrobi dodać kilka kropel płynu Lugola.
2. Zaobserwować i wyjaśnić wynik.
3. Zawartość probówki podgrzać.
4. Zaobserwować i wyjaśnić wynik.
5. Zawartość probówki ochłodzić.
6. Zaobserwować i wyjaśnić wynik.

ROZDZIAŁ SIÓDMY: KWASY NUKLEINOWE

Kwasy nukleinowe są wielkocząsteczkowymi związkami odgrywającymi główną rolę w przechowywaniu i przekazywaniu informacji genetycznej. Są one obok białek podstawowymi składnikami wszystkich komórek.

Występują głównie w jądrze komórkowym, cytoplazmie, jak również w mitochondriach i chloroplastach. Wyróżnia się **kwasy deoksyrybonukleinowe (DNA)**, biorący udział wyłącznie w przechowywaniu informacji genetycznej we wszystkich organizmach żywych (za wyjątkiem rotawirusów; wirusów RNA) oraz **kwasy rybonukleinowe (RNA)**, które uczestniczą w procesach ekspresji genów oraz biosyntezy białek.

Kwasy nukleinowe to polimery składające się z połączonych ze sobą reszt **nukleotydów**. Nukleotyd składa się z **nukleozydu**, czyli reszty cukrowej połączonej z zasadą azotową i od jednej do dwóch reszt kwasu fosforowego(V). Resztą cukrową jest zawsze jedna z pentoz, tj. ryboza (β -D-ryboza) lub deoksyryboza (2-deoksy-D-ryboza).

Jeżeli w skład nukleotydu wchodzi reszta rybozy, jest on nazywany **rybonukleotydem** lub po prostu nukleotydem. Jeżeli nukleotyd zawiera deoksyrybozę nazywamy go zawsze **deoksyrybonukleotydem**. W zależności od tego z jakich nukleotydów zbudowane są kwasy nukleinowe dzielimy je na kwasy rybonukleinowe (RNA), gdy zawierają reszty rybonukleotydów i deoksyrybonukleinowe (DNA), gdy są polimerami deoksyrybonukleotydów.

Zasady azotowe wchodzące w skład nukleotydów są heterocyklicznymi związkami organicznymi, będącymi pochodnymi PURYNY: **adenina (A)** i **guanina (G)** lub PIRYMIDYNY: **cytozyna (C)**, **tymina (T)**; występująca tylko w deoksyrybonukleotydach) lub **uracyl (U)**; zasada występująca tylko w rybonukleotydach). Dodatkowo w DNA organizmów wyższych występuje w niewielkiej ilości również 5-metylocytozyna, natomiast w RNA oprócz wymienionych wcześniej uracylu, cytozyny, guaniny i adeniny występują ponadto inne, rzadziej spotykane i zmodyfikowane zasady azotowe.

Reszty zasad azotowych w nukleotydach połączone są z resztą cukrową wiązaniem **N-glikozydowym**. Wiązanie to ma zawsze konfigurację β i tworzy się pomiędzy $C^{1'}$ cukru i N^9 puryny lub N^1 pirymidyny.

Nukleozyd łączy się z kolei z resztami fosforanowymi wiązaniem estrowym. Fosforany połączone są z hydroksem 5' reszty rybozy lub deoksyrybozy tworząc związki zwane nukleozydo-5-mono- (di- lub tri-) fosforanami lub inaczej 5'-nukleotydami. Warto jednak nadmienić, że w środowisku naturalnym spotykane są również nukleozydo-3'-monofosforany, np. wśród produktów rozkładu kwasów nukleinowych lub będące składnikami ważnych metabolicznie związków jak np. koenzymu A. Jednak tylko nukleozydo-5'-fosforany są wykorzystywane w organizmie do biosyntezy kwasów nukleinowych. Ponieważ jednak grupa 5'-hydroksylowa jest najczęściej estryfikowana, w nazewnictwie 5'-nukleotydów pomija się symbol 5' (np. AMP oznacza adenozyno-5'-monofosforan). Przypadku deoksyrybonukleotydów przed trójliterowym skrótem dodaje się „d” od deoksyrybozy, np. dATP.

1. Hydroliza kwasów nukleinowych

Podstawa teoretyczna: Hydrolizę kwasów nukleinowych można przeprowadzać na dwa sposoby: przy pomocy degradacji chemicznej lub enzymatycznej. Całkowita hydroliza enzymatyczna polega na stosowaniu specyficznych nukleaz (przecinających wiązanie 3'5'-fosfodiesterowe), glikozydaz (hydrolizujących wiązanie N-glikozydowe) oraz fosfataz (przecinające wiązanie estrowe). Natomiast hydroliza chemiczna preparatów kwasów nukleinowych najczęściej przeprowadzana jest w środowisku kwaśnym. DNA ulega bowiem degradacji jedynie w środowisku kwaśnym, podczas gdy RNA ulega jej zarówno w środowisku kwaśnym jak i zasadowym. Wynika to z różnicy w budowie poszczególnych kwasów

nukleinowych. Kwas RNA posiadający grupę OH przy węglu C^{2'} rybozy, pod wpływem mocnych zasad hydrolizuje do mieszaniny 2' i 3'-monofosfonukleozydów. DNA natomiast ze względu na brak grupy 2'-hydroksylowej i tym samym braku możliwości tworzenia cyklicznych fosforanów nukleozydów w środowisku zasadowym, wykazuje większą odporność na hydrolizę, co ostatecznie tłumaczy jego bardziej stabilny charakter w porównaniu do RNA. W laboratorium do celów całkowitej hydrolizy chemicznej kwasów nukleinowych powszechnie stosuje się mocne kwasy mineralne (np. HClO₄, HCl lub H₂SO₄), które podgrzewa się w temperatury 100 °C przez okres 1 h.

Odczynniki: 1 % wodne roztwory DNA i RNA (preparaty handlowe), 1 mol/dm³ H₂SO₄

Wykonanie:

1. Do 2 probówek odmierzyć odpowiednio 5 ml roztworu DNA i 5 ml roztworu RNA.
2. Dodać 5 ml H₂SO₄ i następnie gotować na wrzącej łaźni przez okres 60 minut.
3. Otrzymany hydrolizat oziębic i przechować do dalszych eksperymentów.

2. Wykrywanie cukrów

2.1. Wykrywanie rybozy – próba Biala

Podstawa teoretyczna: Pentozy i fosfopentozy występujące w nukleotydach purynowych, lecz nie pirymidynowych, podczas ogrzewania z odczynnikiem Biala tworzą furfural. Próba opiera się zatem na reakcji odpowiedniej pochodnej furfuralowej z orcyną. Orcyna w roztworze zawierającym FeCl₃ (odczynnik Biala) tworzy produkt kondensacji o barwie niebiesko-zielonej (w przypadku pentoz) i żółtobrazowej (w przypadku heksoz). W tych warunkach deoksyryboza reaguje 10-krotnie słabiej niż ryboza, dlatego odczyn barwny dla DNA nie występuje. Odczyn Biala może zatem stanowić podstawę oznaczeń ilościowych rybozy w materiale biologicznym np. rybozy powstałej w wyniku hydrolizy kwasów nukleinowych. Służy także do odróżniania pentoz od heksoz.

Odczynniki: hydrolizat RNA, 0,5% roztwór orcyny w stężonym (37 %) HCl, 10 % FeCl₃ (odczynnik Biala)

Wykonanie:

1. Do probówki zawierającej 1 ml odczynnika Biala dodać kilka kropel FeCl₃ i 0,5 ml hydrolizatu RNA a następnie ogrzać do wrzenia.
2. Obserwujemy niebiesko-zielone zabarwienie, charakterystyczne dla pentoz.

2.2. Wykrywanie deoksyrybozy – metoda Dischego

Podstawa teoretyczna: Deoksyryboza ogrzana w środowisku stężonego kwasu siarkowego oraz octowego tworzy aldehyd hydroksylewulinowy, który reagując z difenylaminą tworzy kompleks barwy niebieskiej. Metoda Dischego pozwala odróżnić kwas DNA od RNA, ponieważ RNA nie tworzy kompleksu barwnego w tych warunkach, podobnie jak deoksyryboza związana z zasadami pirymidynowymi.

Odczynniki: hydrolizat RNA i DNA, odczynnik Dischego (1 g difenylaminy rozpuszczono w 2,75 ml stężonego (98 %) kwasu siarkowego i uzupełniony do 100 ml lodowatym (100 %) kwasem octowym)

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki.
2. W pierwszej umieścić 1 ml hydrolizatu RNA, w drugiej natomiast 1 ml hydrolizatu DNA.
3. Do każdej z probówek dodać po 2 ml odczynnika difenylaminowego (Dischego), wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 5-10 min.
4. Pojawienie się niebieskiego zabarwienia próby świadczy o obecności deoksyrybozy.

3. Wykrywanie zasad azotowych

3.1. Wykrywanie obecności zasad azotowych

Podstawa teoretyczna: Zasady azotowe reagują z jonami Ag^+ lub Cu^+ , powodując wytrącanie się osadu nierozpuszczalnych soli miedziawych lub srebrowych, w zależności od użytego roztworu.

Odczynniki: hydrolizat RNA i DNA, stężony (30 %) amoniak, 1 % roztwór AgNO_3

Wykonanie:

1. Przygotować dwie próbówki.
2. W pierwszej umieścić 1 ml hydrolizatu RNA, w drugiej natomiast 1 ml hydrolizatu DNA.
3. Do każdej z probówek dodać kilka kropli (około 6) stężonego amoniaku tak, aby odczyn próbki był lekko alkaliczny (odczyn kontrolować papierkiem wskaźnikowym).
4. Jeśli roztwór jest nieklarowny należy go przesączyć a następnie dodać 0,3 ml 1 % roztworu AgNO_3 .

3.2. Wykrywanie tyminy

Podstawa teoretyczna: Ćwiczenie na wykrywanie tyminy służy przede wszystkim odróżnieniu obu typów kwasów nukleinowych. Opiera się ono na zasadzie tworzenia przez tyminę z diazową pochodną kwasu sulfanilowego kompleksu o barwie czerwono-różowej. Dodatek hydroksyloaminy, w środowisku zasadowym wzmacnia dodatkowo barwę kompleksu.

Odczynniki: hydrolizat RNA i DNA, 1,1 % (w/v) roztwór Na_2CO_3 , odczynnik diazowy: diazo I + diazo II, 3 mol/dm³ roztwór NaOH, 20 % (w/v) roztwór hydroksyloaminy

Wykonanie:

1. Do dwóch probówek odmierzyć po 2,5 ml roztworu Na_2CO_3 i po 1 ml odczynnika diazowego.
2. Zawartość wymieszać i dodać po 0,5 ml hydrolizatu kwasów nukleinowych.
3. Zawartość obu probówek dokładnie wymieszać.
4. Następnie po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do obu probówek dodać po 1 ml roztworu NaOH i 2-3 krople roztworu hydroksyloaminy.
5. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i po upływie 5 min obserwować zabarwienia roztworów.

4. Wykrywanie reszt kwasu fosforowego(V)

Podstawa teoretyczna: Jony fosforanowe łączą się z molibdenianem amonowym w obecności HNO_3 , powodując wytrącanie żółtego osadu, czyli nierozpuszczalnego fosfomolibdenianu amonu.

Odczynniki: hydrolizat RNA i DNA, stężony (65 %) kwas azotowy, 2,5 % roztwór molibdenianu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25 g molibdenianu amonu rozpuścić w około 200 ml H_2O , przenieść do litrowej kolby miarowej zawierającej 50 ml 10N H_2SO_4 , uzupełnić wodą do kreski)

Wykonanie:

1. 1 ml hydrolizatu DNA i RNA zalać 0,5 ml stężonego kwasu azotowego i 2 ml roztworu molibdenianu amonu.
2. Ogrzać do wrzenia.
3. Roztwór zabarwia się na żółto a następnie po ostygnięciu pojawia się żółty osad, świadczący o obecności fosforu w próbce.

ROZDZIAŁ ÓSMY: LIPIDY

Lipidy to różnorodne pod względem budowy związki organiczne **nierozpuszczalne w wodzie lub tworzące w niej emulsje, ale dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach niepolarnych**. W organizmach żywych lipidy spełniają ważne funkcje biochemiczne i fizjologiczne: (1) stanowią materiał energetyczny, (2) są materiałem budulcowym błon biologicznych, (3) wiążąc kowalencyjnie białka odpowiednio orientują je w błonach komórkowych, (4) pełnią funkcje hormonów i międzykomórkowych informatorów, (5) są nośnikami witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, (6) stanowią materiał ochronny i izolacyjny.

Lipidy dzielimy na:

1. **lipidy proste** – kwasy tłuszczowe, tłuszcze właściwe (acyloglicerole), woski i steroidy (sterydy), które z kolei dzielimy na sterole (np. cholesterol), hormony sterydowe i kwasy żółciowe;
2. **lipidy złożone** – fosfolipidy, glikolipidy lub (ze względu na zawartą resztę alkoholu) glicerolipidy, sfingolipidy.

Ze względu na pochodzenie naturalnych lipidów, można je podzielić na lipidy roślinne i zwierzęce. Ze względu na stan skupienia wśród lipidów wyróżniamy oleje i tłuszcze stałe. Ponieważ lipidy charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych, ale słabą w wodzie, izoluje się je najczęściej z odwodnionych tkanek. Do ekstrakcji używa się rozpuszczalników typu: benzen, eter, chloroform. Stosunkowo łatwo można wyekstrahować acyloglicerole, trudniej fosfolipidy i glikolipidy, które często występują w kompleksach z białkami. Mimo podobnej rozpuszczalności lipidy różnią się znacznie strukturą chemiczną. Choć większość z nich to estry, mogą występować jako związki acykliczne, bądź pierścieniowe. Oprócz wiązania estrowego niektóre tłuszcze posiadają również wiązanie amidowe (sfingolipidy) bądź eterowe (plazmalogeny). W celu rozdzielenia tłuszczów stosuje się m.in. chromatografię gazowo-cieczową oraz cienkowarstwową.

1. Badanie rozpuszczalności tłuszczów w różnych rozpuszczalnikach

Podstawa teoretyczna: Tłuszcze są nierozpuszczalne w wodzie, ze względu na obecność 16-18 węglowych kwasów o długich, apolarnych łańcuchach. Dobrze natomiast rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych.

Odczynniki: 96 % etanol, aceton, chloroform, olej spożywczy

Wykonanie:

1. Przygotować cztery suche probówki i umieścić w nich kilka kropel oleju.
2. Do pierwszej probówki dodać około 2 ml wody destylowanej i zawartość wymieszać.
3. Do drugiej dodać około 2 ml etanolu i zawartość wymieszać.
4. Do trzeciej dodać około 2 ml acetonu i zawartość wymieszać.
5. Do czwartej dodać około 2 ml chloroformu i zawartość wymieszać.
6. Porównać rozpuszczalność oleju w różnych rozpuszczalnikach.

2. Badanie składu tłuszczów właściwych

2.1. Wykrywanie glicerolu – próba akroleinowa

Podstawa teoretyczna: Akroleina, czyli aldehyd kwasu akrylowego, powstaje w wyniku odwodnienia glicerolu w wysokiej temperaturze i w obecności czynników odciągających wodę.

Reakcja daje pozytywny wynik dla lipidów prostych oraz lipidów złożonych zawierających glicerol.

Odczynniki: glicerol, KHSO_4 in subst., olej spożywczy

Wykonanie:

1. Przygotować dwie suche probówki.
2. W jednej z nich umieścić około 1 ml glicerolu, szczyptę krystalicznego KHSO_4 (środek odwadniający) i ogrzewać.
3. W drugiej umieścić 1 ml oleju, szczyptę krystalicznego KHSO_4 i ogrzewać.
4. Porównać zapach powstałych w obu probówkach substancji.
5. Glicerol wchodzący w skład tłuszczów właściwych ulega odwodnieniu i przekształca się w toksyczną **akroleinę** o charakterystycznym zapachu.

2.2. Wykrywanie wyższych kwasów tłuszczowych (otrzymywanie mydła)

Podstawa teoretyczna: Wyższe kwasy tłuszczowe tworzą sole zwane mydlami.

Odczynniki: tłuszcz (smalec), 30 % roztwór NaOH, 96 % etanol

Wykonanie:

1. W zlewce zagotować około 25 ml wody destylowanej.
2. W parownicze umieścić grudkę smalcu wielkości orzecha laskowego.
3. Parowniczkę z tłuszczem umieścić na siatce ceramicznej i ogrzewać na niewielkim płomieniu, aż do roztopienia tłuszczu.
4. Do parowniczki dodać około 5 ml roztworu NaOH i kilka kropel etanolu.
5. Mieszając bagietką ogrzewać na niewielkim ogniu, aż do wytworzenia mydła.
6. Otrzymane mydło rozpuścić w zagotowanej wcześniej wodzie.

3. Właściwości mydeł

Podstawa teoretyczna: Mydła obniżają napięcie powierzchniowe wody i ułatwiają rozpuszczanie w niej tłuszczów, dzięki czemu usuwają brud.

Odczynniki: olej roślinny, roztwór mydła otrzymany w poprzednim punkcie

Wykonanie:

1. Przygotować dwie probówki.
2. Do obu probówek dodać po około 4 ml wody destylowanej i kilka kropel oleju.
3. Zawartość probówek wytrząsnąć i zaobserwować wynik.
4. Do jednej z probówek dodać około 1 ml otrzymanego wcześniej roztworu mydła.
5. Zawartość probówek wytrząsnąć i zaobserwować wynik.

LITERATURA:

1. Bereta J., Koj A. 2009: **Zarys biochemii**, Seria Wydawnicza WBBiB
2. Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L. 2009: **Biochemia**, PWN
3. Hames D. B., Hooper N. M. 2006: **Biochemia. Krótkie wykłady**, PWN
4. Kłyszajko–Stefanowicz L. (red.) 1999, 2003: **Ćwiczenia z biochemii**, PWN
5. Kopcewicz J., Lewak S. 2002, 2005: **Podstawy fizjologii roślin**, PWN
6. Kozik A., Turyna B. 1999: **Molekularne podstawy biologii**, Wydawnictwo „ZamKor”
7. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. 1994: **Biochemia Harpera**, Wydawnictwa Lekarskie PZWL



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja bezpłatna, współfinansowana ze środków Unii Europejskiej
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego