

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

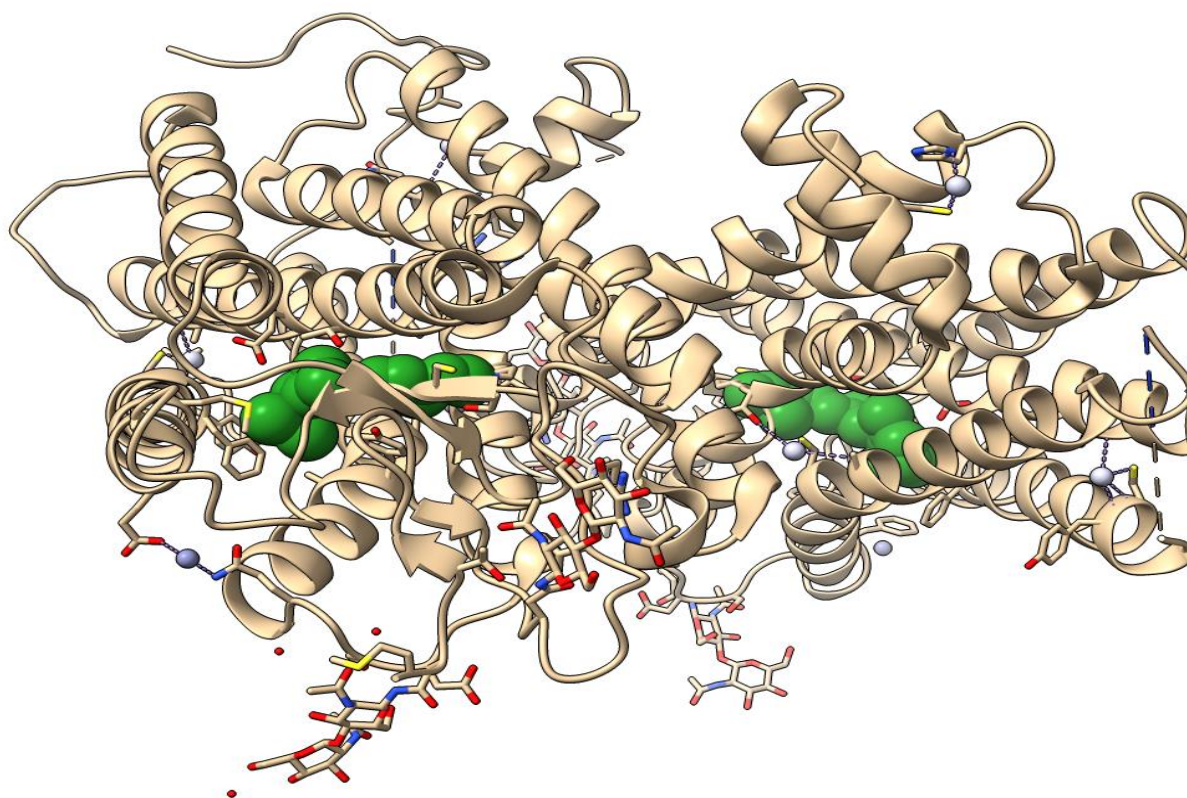


¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
Природно-математички
факултет
Департман за хемију,
биохемију и заштиту животне
средине



ПРАКТИКУМ ИЗ БИОХЕМИЈЕ за студијски програм – Основне струковне студије Оптометрије

Емилија Свирчев, Татјана Мајкић, Милош Свирчев

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
Природно-математички факултет
Департман за хемију, биохемију и заштиту животне
средине

Емилија Свирчев, Татјана Мајкић, Милош Свирчев

ПРАКТИКУМ ИЗ БИОХЕМИЈЕ

за студијски програм – Основне струковне студије Оптометрије

Назив практикума: Практикум из биохемије за студијски програм – Основне струковне студије Оптометрије

Аутори: др Емилија Свирчев, доцент
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
др Татјана Мајкић, доцент
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
др Милош Свирчев, ванредни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду

Рецензенти: др Ивана Беара, редовни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду
др Бојана Благојевић, доцент
Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

Издавач: Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду

Главни и одговорни уредник: др Срђан Рончевић, редовни професор
декан Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду

Практикум из биохемије за студијски програм – Основне струковне студије Оптометрије (електронско издање) је одобрен за употребу одлуком Наставно-научног већа Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду на седници одржаној 14.11.2024. године (решење број 0602-07-461/24-8 од 20.11.2024).

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

577.1(075.8)(076)

СВИРЧЕВ, Емилија, 1979-

Практикум из биохемије [Електронски извор] : за студијски програм - Основне струковне студије Оптометрије / Емилија Свирчев, Татјана Мајкић, Милош Свирчев. - Нови Сад : Природно-математички факултет, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, 2024

Начин приступа (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/svircev_majkic_svircev_praktikum_iz_bi_ohemije_za_studije_optometrije.pdf. - Опис заснован на стању на дан 3.12.2024. -

Библиографија.

ISBN 978-86-7031-708-6

1. Свирчев, Милош, 1979- [аутор]
а) Биохемија -- Практикуми

COBISS.SR-ID 158315017

Предговор

**„Истински пут до знања је експеримент.“
William Blake**

„Практикум из биохемије за студијски програм – Основне струковне студије Оптометрије“ је помоћни уџбеник, пре свега за студенте прве године Оптометрије, Природно-математичког факултета у Новом Саду, али може да служи и за студенте других студијских група или сродних факултета на којима се изучава Биохемија.

Основна намена овог практикума је повезивање теоријских и практичних аспеката наставе, у циљу лакшег савладавања градива. Намера је била да се практикум конципира тако да студенти са лакоћом понављају градиво, кроз примену теоријског знања на практичним примерима и овладају вештинама рада у лабораторији. На основу дугогодишњег рада са овом групом студената уочено је да студенти долазе са различитим предзнањем, и да су многи завршили средње школе у којима нису имали хемију, па смо кроз овај вид писања практикума, навели и основне појмове који су неопходни за разумевање хемијских реакција, јединица мерења, припреме раствора, рада на спектрофотометру и сл., а који нису предвиђени планом и програмом из предмета Биохемија, али служе као неопходна допуна студентског предзнања. Искрено се захваљујемо рецензентима др Ивани Беара, редовном професору Природно-математичког факултета у Новом Саду и др Бојани Благојевић, доценту Пољопривредног факултета у Новом Саду на корисним сугестијама и уложеном времену за прегледање рукописа овог практикума.

Надамо се да ће лабораторијске вежбе из овог практикума омогућити студентима да лакше савладају градиво предмета Биохемија и да стекну корисно знање и вештине.

Аутори

Садржај

Предговор.....	4
Овера рада	7
1. УВОД У ЛАБОРАТОРИЈСКИ РАД.....	7
Основни биохемијски појмови.....	15
2. ЛИПИДИ	17
Задачи 1	17
Теоријски део 1	17
Експериментални део 1	22
Задачи 2	27
Теоријски део 2.....	27
Експериментални део 2	28
3. ПРОТЕИНИ.....	31
Задачи	31
Теоријски део	31
Експериментални део	36
4. УГЉЕНИ ХИДРАТИ	43
Задачи	43
Теоријски део	43
Експериментални део	47
5. КВАНТИТАТИВНО ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПИДА, ПРОТЕИНА И УГЉЕНИХ ХИДРАТА	53
Задачи	53
Теоријски део	53
Експериментални део	54
6. ЕНЗИМИ	59
Задачи	59
Теоријски део	59
Експериментални део	62
7. НУКЛЕИНСКЕ КИСЕЛИНЕ	66
Задачи	66
Теоријски део	66
Експериментални део	71
8. БИОХЕМИЈСКЕ ОСНОВЕ ПРОЦЕСА ВИДА	76
Задачи	76
Теоријски део	76
Експериментални део	79
9. МЕТАБОЛИЗАМ	81
Задачи 1	81
Теоријски део 1	81
Експериментални део 1	81
Задачи 2	87

Теоријски део 2.....	87
Експериментални део 2	89
Задачи 3	93
Теоријски део 3.....	93
Експериментални део 3	94
Литература	98
Прилог	99

Овера рада

Назив вежбе	Датум	Овера асистента:
Увод у лабораторијски рад		
Л1. Склапање тродимензионалних модела молекула липида Л2. Испитивање растворљивости уља (смеше ацилглицерола) у различитим растварачима Л3. Испитивање присуства незасићених масних киселина у различитим узорцима Л4. Сапонификација – реакција издвајања сапуна из масти или уља Л5. Стабилизација водене емулзије уља додавањем различитих емулгатора Л6. Праћење утицаја водоник пероксида и UV зрачења на интензитет липидне пероксидације и потенцијално заштитног ефекта етарских уља и витамина Е Л7. Утицај детерџената на биолошке мембране - изоловање ДНК молекула из банане		
П1. Склапање тродимензионалних модела молекула аминокиселина и олигопептида П2. Склапање тродимензионалног модела молекула родопсина, сложеног, фоторецепторског протеина П3. Денатурација протеина загревањем, киселинама и базама П4. Изоловање казеина из млека применом изоелектричног таложења П5. Доказивање присуства фосфорне киселине у казеину П6. Бојене реакције на протеине - квалитативно одређивање присуства ароматичних аминокиселина, триптофана, хистидина и аргинина у различитим узорцима		
УХ1. Квалитативне реакције на угљене хидрате – идентификација раствора угљених хидрата УХ2. Квалитативне реакције – разлике у хемијским својствима раствора кухињског шећера и меда.		
С1. Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних липида у млеку С2. Спектрофотометријско одређивање садржаја протеина методом по Лоурију С3. Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних шећера у млеку		
Е1. Утицај температуре, рН и концентрације ензима на брзину ензимске реакције Е2. Специфичност деловања α -амилазе и сахаразе Е3. Испитивање групне и апсолутне специфичност сахаразе и уреазе		
НК1. Саставаљање папирног модела молекула ДНК НК2. Прављење папирног модела молекула транспортне РНК НК3. Хидролиза нуклеинских киселина и квалитативне реакције на компоненте нуклеинских киселина		
В1. Квалитативна анализа комерцијалних препарата за очување вида		
М1. Идентификација интермедијера гликолизе и алкохолне ферментације у квасцима М2. Утицај супстрата на интензитет ферментације квасаца М3. Идентификација редукованих коензима		
М4. Значај протеаза у варењу (дигестији) протеина М5. Значај жучних киселина у варењу (дигестији) липида М6. Значај ензима α -амилазе у варењу (дигестији) скроба		

.....
ИМЕ И ПРЕЗИМЕ, број индекса

Биохемијска лабораторија је погодно место за стицање нових знања и вештина, али истовремено може да буде веома опасно место ако се у њој ради непажљиво и немарно. Да би рад био пријатан и безбедан неопходно је строго придржавање прописаних правила. Пре почетка експерименталног рада у лабораторији, неопходно је да студенти положи тест којим потврђују да су упознати са правилима безбедног рада у лабораторији.

Правила понашања у лабораторији:

1. Студент у лабораторији никада не сме да ради сам.
2. Неопходно је носити одговарајућу заштитну обућу (не сме се да се ради у отвореној обући) и заштитни мантил.
3. Неопходно је познавати својства хемикалија које се користе (токсичност, испарљивост, запаљивост, реактивност, стабилност итд.).
4. Уколико се ради са потенцијално токсичним или инфективним материјалом неопходно је носити заштитне рукавице, док је ношење заштитних наочара обавезно при раду са токсичним и испарљивим хемикалијама.
5. Огледе са токсичним и испарљивим хемикалијама неопходно је изводити у дигестору.
6. Забрањено је извођење експеримената који нису наведени у практикуму, или нису предвиђени у наведеном термину.
7. Уношење и конзумирање хране и пића у лабораторији је строго забрањено.
8. Дуга коса мора бити везана.
9. Употреба мобилног телефона у току извођења вежби није дозвољена.
10. Пре почетка огледа упознати се са начином рада инструмента који се користе.
11. Обавезно је упознати се са опасностима које могу настати током одређеног огледа и предузети одговарајуће мере предострожности.
12. Неопходно је упознати се са начином рада сигурносне опреме (дигестори, тушеви, садржај ормарића за прву помоћ) у лабораторији.
13. Све реагенс боце морају бити прописно обележене. Забрањено је користити реагенсе из необележене реагенс боце.
14. Реагенсе увек сипати пажљиво и полако, како не би дошло до просипања. Реагенсе увек сипати у претходно обележен суд (епрувету, чашу). Потребно је да сваки студент има свој маркер за обележавање.
15. Никада не додавати водене растворе у раствор концентроване киселине (ВУК – вода у киселину), већ полако додавати киселину у воду.
16. Пипетирање устима је најстроже забрањено. Увек користити пропипете.
17. Укључене електричне уређаје и реакције које су у току никада не остављати без надзора.
18. Радно место треба увек да буде уредно. Склонити хемикалије и инструменте који се тренутно не користе.
19. По завршетку рада потребно је склонити опрему, склонити и опрати коришћено посуђе, и очистити радни сто. Вежбе нису завршене док лабораторија није сређена.
20. По завршетку рада руке се перу водом и течним сапуном. Код честог прања руку, као и код употребе заштитних рукавица препоручује се употреба хидратантних крема.

Асистент задржава право да са вежби удаљи сваког студента који се не придржава наведених правила.

Већина незгода у лабораторији настаје због непажње. Много је мање вероватно да ће незгodu која може некога да повреди направити студенти који су добро припремљени за вежбе. Како због сопствене, тако и због безбедности колега, неопходно је да током рада у лабораторији

сваки појединац буде свестан потенцијалних опасности и озбиљно приступи извођењу биохемијских операција.

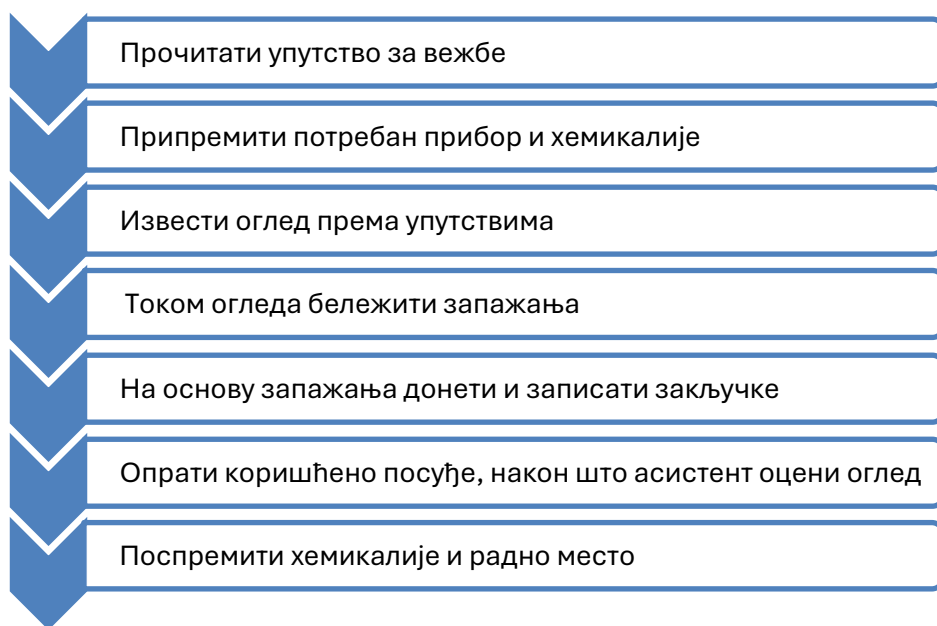
Извори опасности могу да буду хемикалије или опрема (посуђе, прибор, инструменти) који се користе.

Класификација хемикалија по опасности, ознаке, потенцијалне повреде и поступци прве помоћи су наведени у Упутству за безбедан рад у лабораторији Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, ПМФ Нови Сад, који се користи да студенти савладају правила безбедног рада у лабораторији.

Стакло је крт материјал, који се лако разбија ако падне или се са њим неправилно рукује. Због тога се са стаклом увек мора пажљиво руковати и (по потреби) носити заштитне наочаре. Стаклене апаратуре преносити са обе руке, при склапању апаратуре никада не стављати стакло и метал у директан контакт, додатно руку заштити крпом (сваки студент треба да има своју) када се узимају загрејане стаклене посуде, најчешће епрувете из воденог купатила на 100°C. Овако вреле епрувете никада не стављати директно под млаз хладне воде да не би дошло до пуцања стакла. Уколико се нешто разбије, никада не скупљати крхотине стакла руком, већ користити метлу или четку.

Као лабораторијска опрема за загревање могу да се користе пламеници, купатила (водена, уљана, пешчана), електрични уређаји (решои, сушнице, електричне пећи и сл.). На овим вежбама ће се користити првенствено водена купатила. Водено купатило за загревање на 100°C ће бити чаша (лончић) са водом коју треба загревати на решоу.

За сваку вежбу неопходно је пратити кораке описане на шеми, Слика 1.1.



Слика 1.1. Општи шематски приказ корака при извођењу огледа

Упознавање са лабораторијским посуђем

У зависности од намене, лабораторијско посуђе може да буде од стакла, порцелана или пластике. Стаклено посуђе је најчешће коришћено због своје инертности и лаког одржавања.

Хемикалије које се употребљавају на вежбама се чувају у реагенс боцама. Све реагенс боце морају бити обележене. Осим података о токсичности (Слика1.2), налепница треба да садржи: назив хемикалије, концентрацију раствора, датум припреме. **Никада не користити хемикалије из неозначених боца.** Када се извади, чеп реагенс боце увек одложити врхом на горе, да део који улази у боцу не буде у контакту са радном површином. Никада не враћати вишак реагенса назад у реагенс боцу. Након коришћења обавезно вратити боцу на место.



Слика 1.2. Ознаке различитих група опасних супстанци (пиктограми)

На вежбама из Биохемије најчешће се користи следеће стаклено посуђе: чаше, ерленмајери, нормални судови (тиквице са равним дном), епруверте, реакциони балони, левци (Слика 1.3).



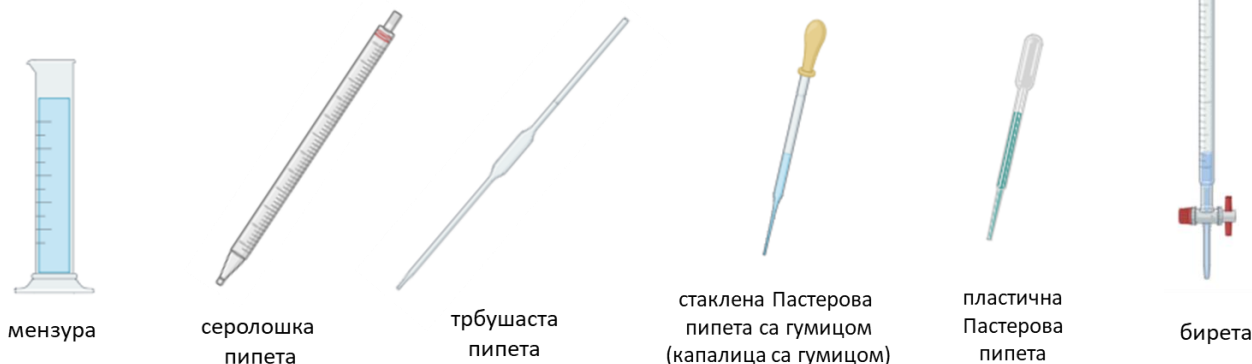
Слика 1.3. Стаклено лабораторијско посуђе

Запремина (V , *volume*) је једна од основних физичких величина, основна јединица је кубни метар (m^3), али чешће се као јединица мере користи dm^3 тј. литар (L). У биохемијској лабораторији се чешће користе мање запремине, односно вредности запремина су изражене у cm^3 или mL (Табели 1.1).

Табела 1.1. SI јединице за мерење запремине, и еквивалентне не SI јединице

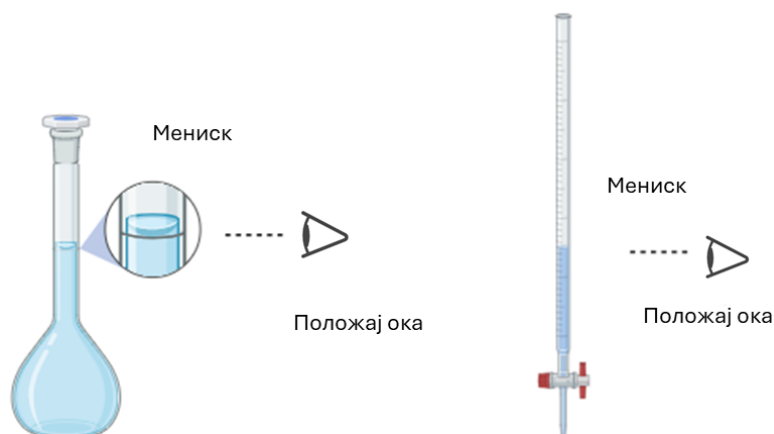
Основне и изведене SI јединице			Еквивалентна запремина у не SI систему		
назив	ознака		назив	ознака	
кубни метар	m^3	$1 m^3$	килолитар	kL / kl	$10^3 L$
кубни дециметар	dm^3	$10^{-3} m^3$	литар	L / l	1 L
кубни центиметар	cm^3	$10^{-6} m^3$	милилитар	mL / ml	$10^{-3} L$
кубни милиметар	mm^3	$10^{-9} m^3$	микролитар	$\mu L / \mu l$	$10^{-6} L$
кубни микрометар	μm^3	$10^{-12} m^3$	нанолитар	nL / nl	$10^{-9} L$

За прецизно мерење запремине користе се: **пипете са пропипетом, аутоматске пипете са** одговарајућим пластичним наставцима и **бирете** (Слика 1.4). Иако и на мензурама, чашама и ерленмајерима постоје градуисани подеоци они се могу користити само за оквирно одмеравање запремине. Наведени судови постоје у различитим величинама.



Слика 1.4. Лабораторијско посуђе за мерење запремине

Правилно одмеравање запремине, подразумева посматрање нивоа течности у суду у нивоу очију, као и то да мениск течности додирује са доње стране подеок који одговара жељеној запремини (Слика 1.5).



Слика 1.5. Правилно одмеравање запремине

Аутоматске пипете и микропипете се веома често користе у биохемијским лабораторијама. Подесиве су и предвиђене за мерење запремине течности у одређеном распону (1-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 200-2000 μL , 500 - 5000 μL) који је наведен на пипети. Пипете се никада не користе ван опсега који је наведен, а за сваку постоје наставци одговарајуће запремине.

Аутоматске пипете се користе тако што се након стављања наставка, клип пипете притисне до првог прага и држећи прст у том положају, наставка пипете урони у течност (Слика 1.6). Затим се полако отпушта клип услед чега се течност увлачи у наставка. Ако се ради са вискозним течностима попут уља, потребно је спорије и пажљивије радити. Након тога, пипета са наставком се преноси изнад суда у који се одмерава течност и клип пипете полако притисне до другог прага. Уколико садржај из наставка пређе у пипету она ће се оштетити. Због тога је забрањено држати пипету хоризонтално док је наставка на њој, или окретати пипету врхом ка горе.



Слика 1.6. Правилна употреба аутоматских пипета

Маса (m) је друга основна физичка величина, а њена SI јединица је килограм (kg). Исто као и код запремине за изражавање масе се у биохемији чешће користе мање јединице, као што су: грам (g), милиграм (mg) и микрограм (μg), Табела 1.2.

Табела 1.2. SI јединице за мерење масе

SI јединица		
назив	ознака	
килограм	kg	10^3 g
грам	g	1 g
милиграм	mg	10^{-3} g
микрограм	μg	10^{-6} g
нанограм	ng	10^{-9} g

За мерење масе, у биохемијској лабораторији се користе различити типови вага. У зависности од прецизности и масе која се мери, разликују се техничке и аналитичке ваге (Слика 1.7). Техничка вага мери са прецизношћу од 0,01 g и обично има капацитет (највећа маса коју може да измери) од 2 kg или 5 kg. За прецизнија мерења се користе аналитичке ваге. Аналитичке ваге мере са прецизношћу од 0,0001 g или чак 0,000001 g и обично имају капацитет од око 120 до 200 g. Због своје осетљивости, аналитичка вага је смештена унутар стакленог ормарића, који се обично налази у одвојеној просторији (вагаони), како би био минималан утицај спољашњих фактора. И техничке и аналитичке ваге могу да буду механичке и дигиталне, а данас су дигиталне у широј употреби. На овим вежбама ће бити коришћене дигиталне, техничке ваге.

Тачност није једнако прецизност!



Слика 1.7. Фотографије техничке и аналитичке ваге

Независно од тога која се вага користи, неопходно је следити следеће кораке:

1. Проверити да ли је вага нивелисана (да ли стоји равно, гледајући либелу у доњем десном углу) и по потреби је нивелисати померањем ножица;
2. Укључити вагу и сачекати да се на екрану појаве све 0, уколико се не појаве, потребно је тарирати вагу (дугме T);
3. Припремити посуду за мерење (супстанца која се мери се никада не ставља директно на тас ваге) и у њу одмерити потребну количину супстанце. Корисно је пре мерења темперирати супстанцу у вагаони (нарочито оне супстанце које се складиште у фрижидеру).
4. Након коришћења потребно је очистити тас ако је дошло до просипања супстанце и искључити вагу. За сва мерења обухваћена једним огледом увек се користи иста вага.

Забрањено је стављати на вагу вруће, нечисте или мокре предмете или предмете чија маса превазилази капацитет ваге.

Припрема течних раствора

Раствори су хомогене смеше две или више супстанци. Супстанца које има мање се назива растворена супстанца, док се супстанца која је у вишку назива растварач. У биохемији се као

растварач најчешће користи вода, па је уобичајено да се не наглашава када је вода растварач (нпр. раствор натријум-хлорида, мисли се на водени раствор натријум-хлорида), али се наглашава када је реч о неком другом растварачу (етанолни раствор калијум хидроксида).

За успешну реализацију експеримента неопходно је знати тачан квантитативни састав раствора. Он може да се изражава на неколико начина:

Моларна концентрација, c (mol/dm^3 или mol/L): представља број молова (n) растворене супстанце у јединици запремине (V):

$$c = n / V$$

Масена концентрација, γ (m/V или $\text{w/V } \%$) представља масу растворене супстанце по јединици запремине раствора:

$$\gamma = m_s / V$$

Масени удео (m/m или $\text{w/w } \%$) представља однос масе растворене супстанце (m_s) према укупној маси раствора (m_R), изражен као проценат.

$$\omega = m_s / m_R * 100$$

Запремински удео ($\text{V/V } \%$): представља однос запремине растворене супстанце према укупној запремини раствора, обично изражен као проценат.

Количина супстанце се рачуна као количник масе супстанце (n) и моларне масе (M) супстанце (M), $n=m/M$

Након израчунавања потребне масе супстанце, раствор се припрема тако што се на ваги измери потребна маса и квантитативно (без губитака) пренесе у одговарајући нормални суд који се затим растварачем допуни до црте на врату суда.

Прецизно и тачно мерење запремине, масе и правилна припрема раствора је од кључног значаја за добијање тачних резултата експеримената.

Поступци као што је загревање или мешање (стакленим штапићем или на магнетној мешалици) убрзавају поступак растварања. Након припреме раствора, раствор се никада не чува у нормалном суду, већ се пресица у одговарајућу **обележену** реагенс боцу.

Ако у упутству за рад није наведена потребна количина супстанце за извођење огледа, онда треба употребити веома мале количине (масе или запремине). Чврсте супстанце узимају се сувом чистом шпатулом или пластичном кашичицом специјално намењеном за ту сврху. Течне супстанце се узимају капалицом или Пастеровом пипетом.

Задаци:

1. Колико грама чврстог NaCl је потребно да се направи:

- а) 100 cm^3 $0,04 \text{ mol/dm}^3$ раствора?
- б) Изразите концентрацију и у јединицама: g/dm^3 (масена концентрација).
- в) Припремити раствор.

2. Колико грама глукозе је потребно да се направи:

- а) 20 cm^3 10% (m/V) воденог раствора глукозе?
- б) Изразите концентрацију у облику mol/dm^3 .
- в) Припремити раствор.

3. Припремити 20 cm^3 70% (V/V) раствора етанола.

4. Припремити 10 cm^3 5 mol/dm^3 Луголовог раствора.

Простор за прорачун:

Датум и овера асистента (1):

__ / __ / ____

Основни биохемијски појмови

Биомолекули су органски (и бионеоргански) молекули који изграђују ћелије и организме тј. живу материју. Четири главне класе биомолекула су протеини, нуклеинске киселине, липиди и угљени хидрати.

Биоелементи

У биомолекулима се налазе атоми 29 различитих елемената. Најзаступљенији атоми су угљеник и водоник (због тога биомолекуле називамо органским једињењима), а затим по заступљености долазе атоми кисеоника, азота, фосфора, сумпора. Ово је 6 основних биоелемената. У макроелементате се убрајају јони натријума, хлора, калијума и калцијума (Слика 1.8). Микроелементи су присутни у веома малим количинама што не умањује њихов изузетан значај за правилно функционисање организма. Назначени су у ПСЕ, Слика 1.8.

основни биоелементи и макроелементи

микроелементи

лантаноиди
актиноиди

Слика 1.8. Периодни систем елемената (ПСЕ) са назначеним: основним, макро- и микро-биоелементима

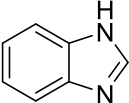
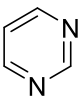
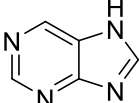
Честе комбинације атома тј. **функционалне групе** у биомолекулима, од којих зависе њихова хемијска својства, су: алкохолна, алдехидна и кето, аминок, тиолна, карбоксилна, фосфатна, угљеник-угљеник двострука веза; а од повезујућих група су то: естарска, амидна, гликозидна, фосфоанхидридна, анхидридна.

Табела 1.3. Уобичајене и повезујуће функционалне групе значајне за хемијске карактеристике биомолекула

Назив функционалне групе	Структура:	Повезујуће групе	Настаје повезивањем две функционалне групе:	Структура:
Двострука веза		естарска	карбоксилна група + алкохол	
Алкохол		фосфоестарска	алкохол + фосфорна киселина	
Алдехидна, кето		амидна	карбоксилна + аминок	
Амин		анхидридна	две киселине	
Тиолна група		фосфоанхидридна	два остатка фосфорне киселине	
Карбоксилна група		гликозидна	алкохолна + алдехидна + алкохолна	
Фосфатна група				

У састав многих биолошки значајних једињења улазе и хетероциклични прстенови, како је наведено у Табели 1.4.

Табела 1.4. Значајни хетероциклични молекули који се јављају у саставу биомолекула (са примерима)

структура молекула хетероцикла					
назив	имидазол	индол	пирролидин	пиримидин	пурин
примери биомолекула	хистидин	триптофан	пролин	цитозин, урацил, тимин	аденин, гуанин

Иако се у биохемији најчешће користе тривијални називи биомолекула, у Табели 1.5. је дат кратак подсетник како се именују основна органска једињења, а потребно је водити рачуна о дужини угљеничног низа у молекулу (метан, етан, пропан, бутан итд.) као и о присутним функционалним групама (нпр. **алкохол** са једним, два или три C-атома: **метанол**, **етанол**, **пропанол** итд.). Код биомолекула је карактеристично присуство бар две функционалне групе у молекулима (нпр. карбоксилна група и аминокиселина; алдехидна група и хидроксилне групе у молекулима моносахарида итд.) што је од пресудног значаја за могућност грађења полимерних биомолекула.

Табела 1.5. Номенклатура одабраних класа органских једињења

	алкани	алкени	алкини	алкохоли	алдехиди	кетони	киселине	амини
број C-атома		двострука веза ($>C=C<$)	трострука веза ($-C\equiv C-$)	хидроксилна група (R-OH)	алдехидна група (R-CHO)	кето група (R-CO-R)	карбоксилна група (R-COOH)	амино група (R-NH ₂)
1	метан	-	-	метанол	метанал	-	метанска киселина	метан-амин
2	етан	етен	етин	етанол	етанал	-	етанска	
3	пропан	пропен	пропин	пропанол	пропанал	пропанон	пропанска	
4	бутан						бутанска	
5	пентан						пентанска	
6	хексан						хексанска	
7	хептан						хептанска	

Метаболизам је скуп свих биохемијских реакција у ћелијама и организму. **Метаболички пут** је низ од неколико узастопних хемијских реакција. **Метаболити** су мали органски молекули (молекулске масе у интервалу од 50 до 1000 g/mol) који су полазни молекули или међупроизводи (**интермедијери**) или крајњи производи у метаболичким путевима. Један метаболит може бити интермедијер у једном метаболичком путу, али и полазно једињење за неки други метаболички пут, итд.

Задаци 1

- На основу изгледа склопљених тродимензионалних модела молекула липида извести закључаке о њиховој растворљивости и биолошким функцијама. Именовати функционалне групе присутне у молекулима.
- Применом различитих реакција, извести закључак о физичким и хемијским својствима липида. У неким огледима ће се испитивани липиди исто понашати јер се испитују њихове заједничке карактеристике, док ће у другима моћи да се уочи разлика у хемијском саставу њихових молекула.
- На примеру смеше вода–уље (нестабилна емулзија) испитати и посматрати ефикасност различитих емулгатора. Закључити која је улога емулгатора. Навести примере стабилних емулзија из свакодневног живота.

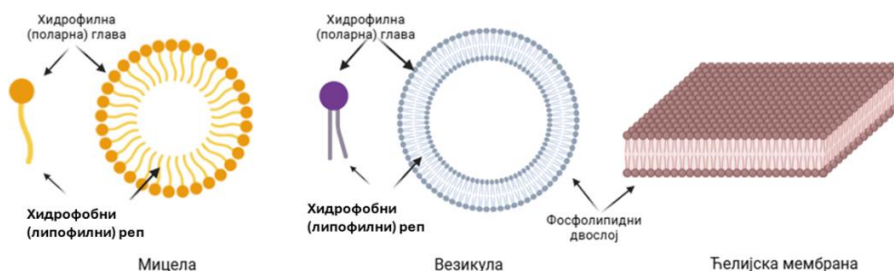
Теоријски део 1

Липиди су разноврсна група биолошки важних једињења чији су молекули или **неполарни** – садрже дугачке уљоводоничне низове, због чега су **нерастворни у води**, или **амфипатични** – садрже неполарни, али и поларни део молекула, због чега су **слабо растворни у води** и формирају агрегате типа **мицела**, **везикула** и **мембрана** (Слика 2.1). Дакле, изразита или делимична неполарност молекула јесте заједничка карактеристика липида.

неполарно $\equiv$ нерастворно у води

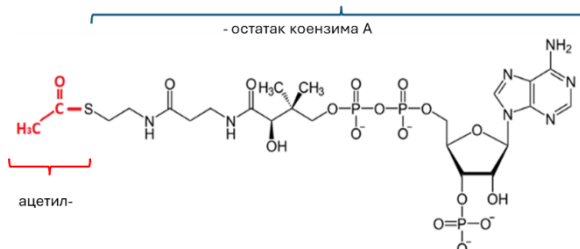
Липиди се растварају у **органским растварачима**:

- неполарним: угљоводоници (хексан, бензен, толуен, угљентетрахлорид)
- делимично поларним: хлоровани угљоводоници (хлороформ, дихлорметан)
- аprotичним поларним: кетони (ацетон), нитрили (ацетонитрил), амиди (диметилформамид), сулфоксиди (диметил сулфоксид), етри (тетрахидрофуран, диетил-етар)
- протичним поларним (али мање поларним од воде): алкохоли (етанол, изопропанол, бутанол).



Слика 2.1. Агрегати амфипатичних молекула: а) мицела б) везикула в) ћелијска мембрана

Друга заједничка карактеристика молекула липида јесте исто биосинтетско порекло. Биохемијски посматрано, молекули липида настају повезивањем активираних **ацетил група** тј. ацетил- група везаних за молекуле коензима А (Слика 2.2).



Липиди имају бројне **улоге у живим организмима**. Поједини представници липида граде ћелијске мембране, други су складиште резервне енергије тзв. метаболичко гориво, неки испољавају хормонско дејство тј. служе као сигнални молекули у међућелијској комуникацији,

неки имају витаминско дејство а неки су заштитни (штите од претераног одавања влаге, механичкој заштити органа и учествују у терморегулацији).

Класификација липида се односи на сличности у структури њихових молекула. Познато је неколико подела, а овде је наведена подела на **осапуњиве** и **неосапуњиве** липиде (Табела 2.1. и Табела 2.2). У осапуњиве липиде спадају: фосфоглицериди, сфинголипиди, триацилглицероли и воскови. У неосапуњиве се сврставају: стероидна једињења (стероли, жучне киселине, стероидни и полни хормони), витамини нерастворни у води и терпеноиди.

Табела 2.1. Подела осапуњивих липида, представници и њихова улога у организму (Слика 2.3)

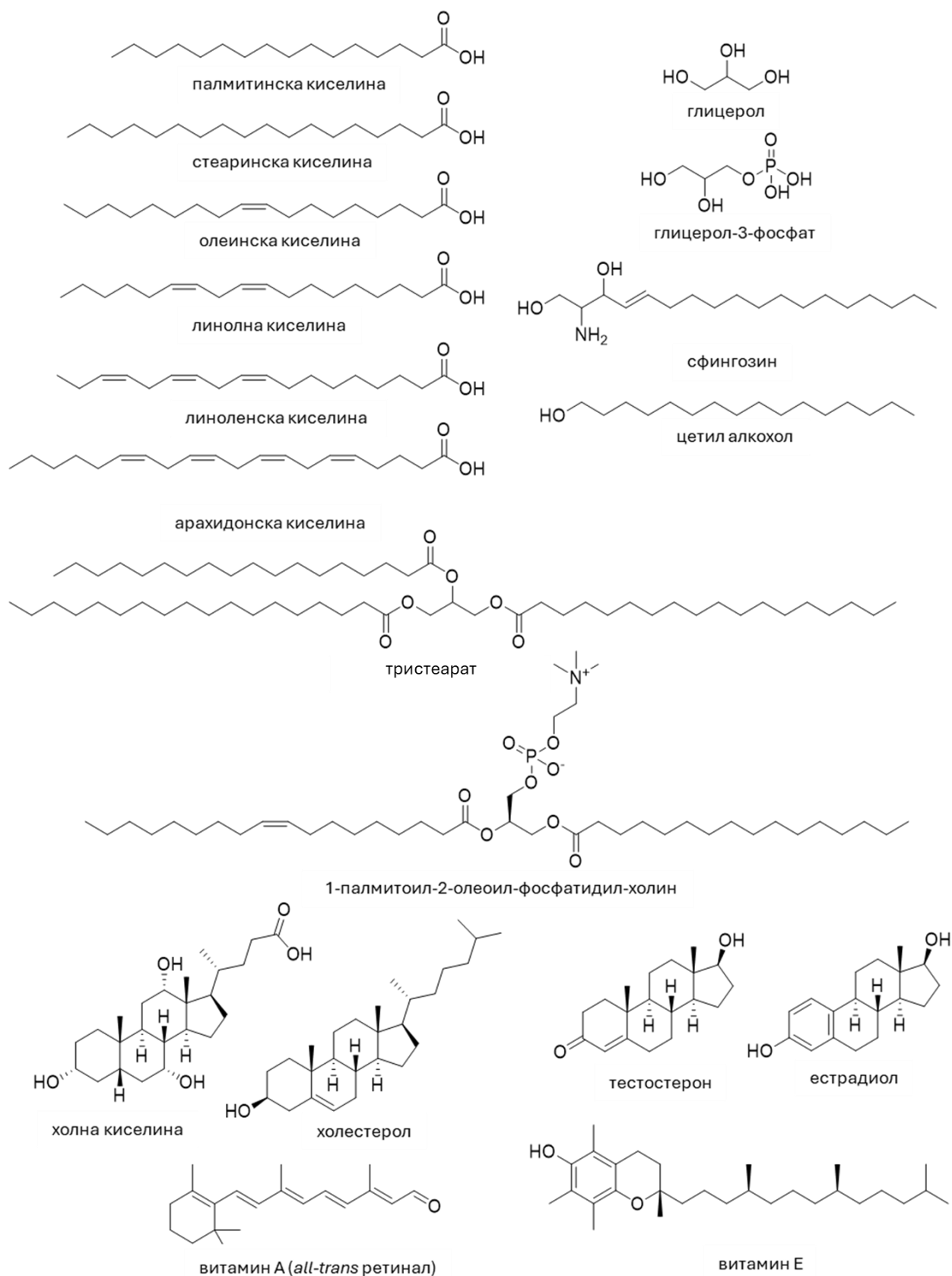
Групе	Подгрупе	Представници	Улога
Фосфоглицериди	Фосфатидил-етаноламини	1,2-дипалмитоил-фосфатидил-етаноламин	Изградња мембрана ћелијских
	Фосфатидил-холини Фосфатидил-инозитол Плазмалогени Кардиолипиди	1-олеоил-2-арахидонил-фосфатидил-холин	
Сфинголипиди	Сфингомијелини	N-палмитоил-сфингомијелин	Изградња мембрана ћелијских
	Гликофинголипиди цереброзиди ганглиозиди	N-стеароил-галактоцереброзид GM1-ганглиозид	
Ацилглицероли	Триаилглицероли Диаилглицероли Моноаилглицероли	трипалмитин, тристеарин, триолеин	Депони енергије
Воскови		естар палмитинске киселине и алкохола хексакозанола (у саставу пчелињег воска)	Заштитна улога: заштита од прекомерног одавања воде; заштита од продирања воде путем коже

Табела 2.2. Подела неосапуњивих липида, представници и њихова улога у организму

Групе	Подгрупе	Представници	Улога
Стероиди	Стероли	холестерол	Конституент ћелијске мембране, прекурсор жучних киселина и хормона Емулговање масти у дигестивном тракту Међућелијска комуникација
	Жучне киселине Хормони кортикостероиди полни анаболички	холна киселина, хенодеоксихолна кортизол, алдостерон тестостерон, естрадиол, прогестерон нандролоне, станозолол	
Витамини		А, аксерофтол	Простетична група сложеног протеина родопсина Антиоксидантна активност Битан фактор за синтезу протеина укључених у процес коагулације Значајан за одржавање здравља костију, хомеостазу калцијума и функционисање имуног система
		Е, токофероли К, антихеморагијски фактор Д, холекалцитриол	
Терпеноиди	Монотерпени Сесквитерпени Дитерпени		Улога у адаптацији биљака на променљиве услове спољашње средине Прекурсор холестерола Прекурсор витамина А
	Тритерпени Тетратерпени	Сквален β-каротен	

Основна разлика између структура молекула осапуњивих и неосапуњивих липида је да у састав молекула осапуњивих липида улази бар један остатак **масне киселине**, који се базном хидролизом ослобађа у виду сапуна.

осапуњиви ≡ дају сапуне



Слика 2.3. Структурне формуле различитих молекула липида

Масне киселине (мк) су органске, монокарбоксилне киселине нерастворне у води. Дужина угљеничног ланца може да буде од 4 до 24 угљеникова атома у низу (Табела 2.3). Мк са 4 до 10 угљеникових атома се називају **ниже масне** киселине; док су оне са 12 до 24 C-атома **више масне** киселине. Друга подела на **засићене мк** и **незасићене мк** се заснива на одсуству или

присуству двоструких C=C веза у молекулима. Природне мк имају углавном **паран број С** атома. **Есенцијалне масне киселине** су оне које садрже више двоструких C=C веза у молекулу, због чега сисари не могу да их синтетишу, већ их морају уносити исхраном. Означивање мк са ознаком **ω (омега)** односи се на бројање позиције двоструке везе са метил-краја молекула (супротни крај у односу на карбонилни С-атом).

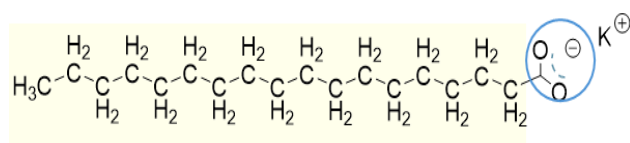
Табела 2.3. Називи и симболи одабраних масних киселина

Тривијални називи масних киселина	Хемијски (системски)	СИМБОЛ	ω-серија
лауринска	<i>n</i> -додеканска	12:0	
миристинска	<i>n</i> -тетрадеканска	14:0	
палмитинска	<i>n</i> -хексадеканска	16:0	
палмитолеинска	<i>cis</i> -9-хексадеценска	16:1 ^{Δ9}	ω-7
стеаринска	<i>n</i> -октадеканска	18:0	
олеинска	<i>cis</i> -9-октадеценска	18:1 ^{Δ9}	ω-9
линолна	<i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12-октадекадиенска	18:2 ^{Δ9,12}	ω-6
α-линоленска	<i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12- <i>cis</i> -15-октадекатриенска	18:3 ^{Δ9,12,15}	ω-3
γ-линоленска	<i>cis</i> -6- <i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12-октадекатриенска	18:3 ^{Δ6,9,12}	ω-6
арахидонска	<i>all-cis</i> -5,8,11,14-икозатетраенска	20:4 ^{Δ5,8,11,14}	ω-6
ЕПА	<i>all-cis</i> -5,8,11,14,17-икозапентаенска	20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}	ω-3
бехенска	<i>n</i> -докозанска	22:0	
ДХА	<i>all-cis</i> -докозахексаенска	22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}	ω-3
лигноцеринска	<i>n</i> -тетракозанска	24:0	
нервонска	<i>cis</i> -15-тетракозенска	24:1 ^{Δ15}	ω-9

Масне киселине се у саставу сложених липида налазе **естарски везане** за хидроксилну групу алкохола у молекулима ацилглицерола, фосфоглицерида и воскова, или амидно везане за амино групу аминокиселина у молекулима сфинголипида.

Сложени липиди се дакле дефинишу као **естри** одговарајућег **алкохола и виших масних киселина** (односно као амиди аминокиселина и једне више масне киселине, за сфинголипиде). Тако су ацилглицероли естри трохидроксилног алкохола глицерола и виших масних киселина.

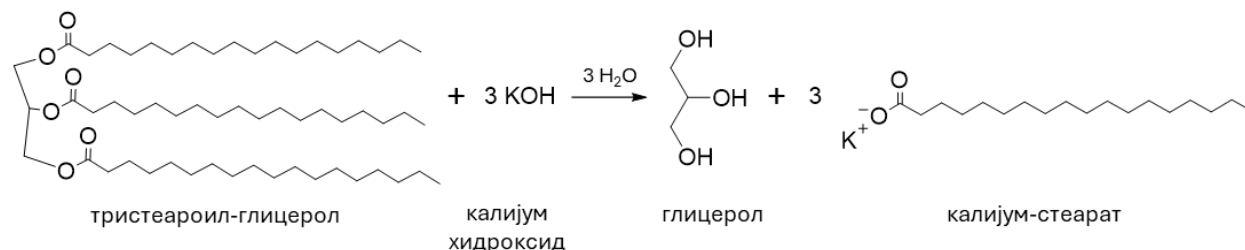
Раскидање естарских веза, реакција **хидролизе**, води ослобађању масних киселина, а ако је реакција у базној средини, **базна хидролиза**, ослобођени молекули масних киселина ће се налазити у облику сапуна (Слика 2.5).



Киселинска константа (**pK**) карбоксилне групе масних киселина је у просеку од 4,5 до 5 pH јединица, што значи да у базној средини карбоксилна група губи протон и налази се у депротонаном тј. анјонском облику.

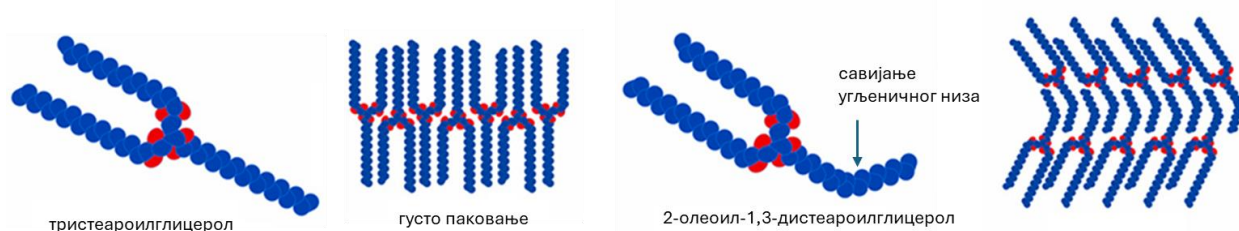
Слика 2.4. Структурна формула калијум-стеарата (молекул сапуна)

Сапуни су **соли масних киселина**, тј. молекули масних киселина у којима је карбоксилна група негативно наелектрисана (R-COO⁻) и везује се за позитивно наелектрисане катјоне, нпр. Na⁺, K⁺, Ca²⁺ (Слика 2.4).



Слика 2.5. Једначина реакције сапонификације на примеру молекула тристеароил-глицерола у раствору калијум хидроксида уз загревање

Маси и уља су смеше ацилглицерола. Различито агрегатно стање (маси су чврсте, а уља су течна) последица је различите геометрије молекула ацилглицерола који улазе у састав маси односно уља. Заправо, незасићене масне киселине имају савијен угљенични ланац по 30° по свакој присутној двострукој вези, док је код засићених мк он потпуно издужен (Слика 2.6).



Слика 2.6. Утицај геометрије молекула триацилглицерола на агрегатно стање маси и уља

Маси и уља су смеше неполарних молекула. Због тога се не мешају са водом. Мућкањем нпр. уља са водом, капљице уља се распоређују између молекула воде – што се назива дисперзним системом. Течност које има мање се назива дисперзна (диспергована) фаза, а течност које има више је континуална фаза (Слика 2.7).



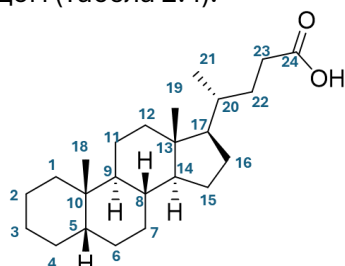
Слика 2.7. Шематски приказ две фазе код емулзија, као и утицаја емулгатора на стабилизацију дисперзног система

Дисперзни систем од две (или више) немешљивих течности је **емулзија**. Емулзије се често користе у кулинарству (нпр. мајонез, маслац, млеко, салатни дресинзи); у козметички и фармацеутској индустрији.

Да би се одржала стабилност емулзије, додају се **емулгатори**, супстанце чији молекули смањују површински напон између неполарних и поларних молекула две течности и помажу у одржавању капљица дисперговане фазе равномерно распоређеним у континуалној фази. Значајни природни емулгатори су: лецитин, моно- и ди-ацилглицероли, казеин, протеини сурутке, модификовани скроб, гуме (ксантан, гуар) итд. У козметичким производима као емулгатори највише се користе: цетил-алкохол, стеарил алкохол, глицерил-стеарат, полисорбат итд.

У нашем дигестивном тракту **улогу емулгатора** имају **жучне киселине** (жк). Ови молекули се синтетишу у ћелијама јетре, складиште у жучној кеси и потом излучују у дванаестопалачно црево где испољавају своју физиолошку функцију.

По структури, жућне киселине се могу посматрати дериватима холанске киселине (Слика 2.8), са различитим бројем (једна, две или три) хидроксилних група и њиховим различитим распоредом (Табела 2.4).



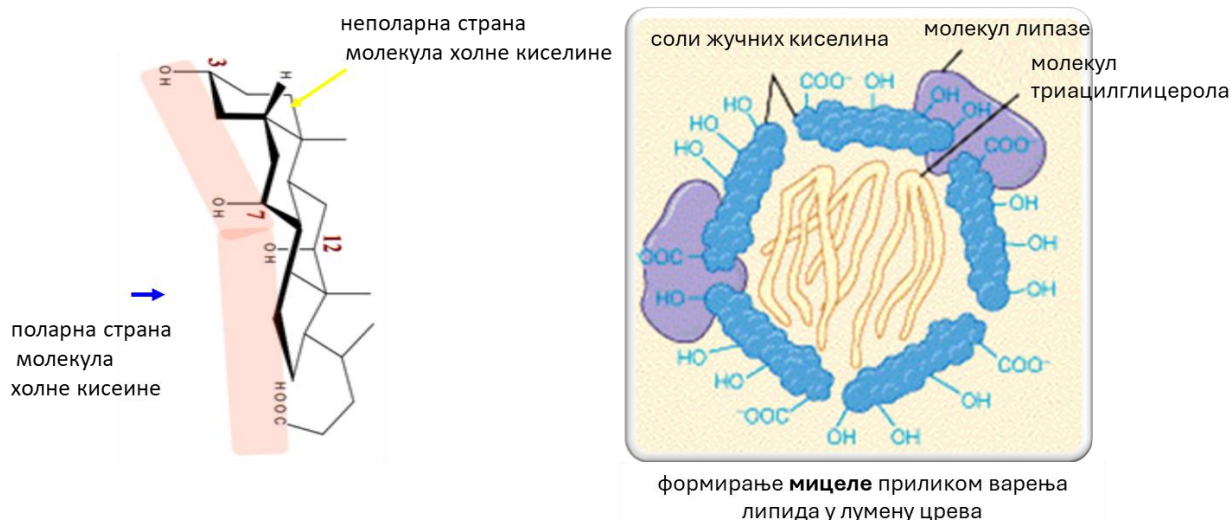
Слика 2.8. Структурна формула молекула холанске киселине

Табела 2.4. Називи и подела жучних киселина

Жучне киселине		Позиција -ОН групе		
Примарне	холна киселина	C-3	C-7	C-12
	хенодеоксихолна	C-3	C-7	
Секундарне	деоксихолна	C-3		C-12
	литохолна	C-3		C-12

Жучне киселине које настају у ћелијама јетре називају се примарне жучне киселине. У облику соли се транспортују до жучне кесе, а након оброка богатог липидима се излучују у дванаестопалачно црево, где врше функцију емулговања. Мањи део жучних киселина који са несвареним остацима хране стигне до колона, бива модификован бактеријским ензимима у одговарајуће секундарне жк, које се ресорбују из колона и допремају до јетре.

Молекули жучних киселина се оријентишу својим неполарним деловима према површинама липидних капљица. Мноштво молекула жк тако обухвата липидне капљице формирајући мицеле. Поларна страна молекула жучне киселине је окренута према воденој средини, чиме се растворљивост липидних капљица у води повећава. Овај процес се назива **емулговање**. За површину мицеле везују се потом молекули липаза, који катализују раскидање естарских веза у молекулима триацилглицерола, из којих настају диацилглицероли, моноацилглицероли и слободне масне киселине (Слика 2.9).



Слика 2.9. Механизам деловања жучних киселина у дванаестопалачном цреву

Експериментални део 1

Вежба Л1. Склапање тродимензионалних модела молекула липида

Потребан прибор: комплет за састављање хемијских модела.

У комплету за састављање хемијских модела **црном** бојом су приказани атоми угљеника (C), белом бојом атоми водоника (H), **црвеном** бојом атоми кисеоника (O), **наранџастом** бојом атоми фосфора (P) и **плавом** бојом атоми азота (N).

Задатак 1. Коришћењем модела саставити структуре молекула:

- палмитинске и линолне киселине;
- глицерола и глицерол-3-фосфата;
- 1,2,3-тристеароил-глицерола;
- лецитина;
- холестерола и холне киселине.

Задатак 2. Нацртати структуре истих молекула. Обележити поларне и неполарне делове молекула. Означити функционалне групе и написати називе. Написати улогу ових молекула.

Вежба Л2. Испитивање растворљивости уља (смеше ацилглицерола) у различитим растварачима

Методологија

Због различитих својстава ацилглицерола који улазе у састав уља, уље се раствара са различитим степеном и различитом брзином у различитим органским растварачима.

Реагенси и прибор: ацетон, етанол, медицински бензин (смеша испарљивих угљоводоника – пентана, хексана, хептана), дестилована вода, сталак са епруветама, пипете

Узорак: сунцокретоно уље

Поступак: у четири епрувете сипати по 2 cm^3 различитих растварача: 1) воде, 2) етанола 3) ацетона, 4) медицинског бензина. У сваку епрувету потом додати по $0,5\text{ cm}^3$ уља. Промућкати епрувете и констатовати у којим растварачима се уље растворило. Навести редоследом од најбољег до најлошијег растварача.

Запажање:

Вежба Л3. Испитивање присуства незасићених масних киселина у различитим узорцима

Методологија

Боја јода се разликује у поларној и неполарној средини. Мешањем Луголовог раствора (водени раствор калијум јодида и јода) са хлороформом долази до распоређивања молекула јода у обе фазе (водену и хлороформску), али је већа њихова дистрибуција у неполарном растварачу.

У овом огледу Луголов раствор се користи за поређење степена незасићености различитих узорака масти и уља. С обзиром да се наведени узорци добро растварају у хлороформу, а не растварају у води, по додатку Луголовог раствора прати се обезбојавање хлороформског слоја (доњи слој).

Обезбојавање хлороформског слоја је последица реакције адиције јода на двоструке везе присутне у остацима незасићених масних киселина у молекулима ацилглицерола. Реакција адиције јода се одвија на собној температури. Како се јод троши у реакцији тако бледи или ишчезава браон боја, а брзина ишчезавања боје је пропорционална броју двоструких веза.

Реагенси и прибор: хлороформ, дестилована вода, сталак са епруветама, пипете, Луголов раствор (2 g калијум-јодида (KI) растворити у 50 cm³ воде и додати 1 g јода (I₂) и мућкати док се не раствори. Разблажити раствор до 100 cm³).

Узорци: свињска маст, путер, ланено уље, маслиново уље, сунцокретоно уље, кокосово уље

Поступак: у шест епрувета сипати по 1 cm³ различитих узорака. У сваку епрувету потом додати 1 cm³ хлороформа и промућкати садржај епрувета. Додати по 10 капи Луголовог раствора. На основу брзине обезбојавања јода у хлороформском слоју, закључити о разликама у садржају незасићених масних киселина у молекулима ацилглицерола испитиваних узорака. Посматрати промену боје након 30 минута.

Резултате огледа упоредити са подацима из Табеле 2.5. о садржају масних киселина у различитим узорцима масти и уља. Размотрити и како степен незасићености мк утиче на брзину обезбојавања, а не само процентни садржај (удео) нмк.

Табела 2.5. Садржај различитих масних киселина у одабраним уљима и мастима

Маси/уља %	< 16:0	16:0	18:0	cis 18:1, ω-9	trans 18:1	18:2, ω-6	18:3, ω-3	ЗМК	НМК
Кокосово уље	82	18						100	/
Маслиново уље		16	2	67	1	14	/	18	82
Ланено уље		7	6	19	1	14	54	13	87
Сунцокретоно уље		6	4	27	< 1	62	/	10	90
Хладно цеђено сунцокретоно уље			5	24	2	62	/	12	88
Свињска маст		24	17	36	0,4	10	1	44	54
Путер	25	29	11	22	3	2	< 1	65	28

скраћенице: ЗМК – застићене масне киселине, НМК – незасићене масне киселине

Запажање:

Вежба Л4. Сапонификација – реакција издвајања сапуна из масти или уља

Методологија

Процес добијања сапуна из масти или уља је познат као сапонификација. То је хемијска реакција у којој се масти или уља (који су смеше ацилглицерола, а најчешће триацилглицерола) хидролизују помоћу алкалије (обично натријум-хидроксида, NaOH, или калијум-хидроксида, KOH) како би се добили сапун и глицерол (глицерин).

У зависности од намене сапуна и жељених својстава, као извор масних киселина могу да се користе различита биљна уља или животињске масти. Етарска уља (смеше испарљивих моно-, сескви- и ди- терпена) која се додају осим што побољшавају мирисна својства сапуна, својим антиоксидантним својствима доприносе продуженом року трајања производа. Глицерол који настаје као нуспроизвод сапонификације и који остаје у сапуну, делује као хумектант, обезбеђујући хидратацију.

Натријум-хидроксид је јака база и нагризајући агенс који може изазвати опекотине и треба пажљиво

Реагенси и прибор: маслиново уље, палмино уље, кокосово уље, етарско уље нане, чврсти натријум хидроксид, дестилована вода, термометар, решо, стаклена чаша, посуда за загревање, ручни миксер.

Поступак: припремити раствор натријум хидроксида растварањем 67 g NaOH у 165 g дестиловане воде. Ово растварање је егзотермна реакција те је потребно хладити посуду. У другој посуди мешати 200 g маслиновог уља, 150 g палминог уља и 150 g кокосовог уља и уз благо загревање сјединити (док не постане хомогена смеша).

Када је све добро прохлађено, раствор натријум-хидроксида и смешу уља мутити миксером док се не добије смеша густине пудинга. У току мућења додати неколико капи етарског уља нане. Смесу затим излити у одговарајуће калупе и оставити прекривено пријањајућом фолијом, неколико дана.

Запажање:

Вежба Л5. Стабилизација водене емулзије уља додавањем различитих емулгатора

Реагенси и прибор: дестилована вода, раствор калијум-хидроксида, KOH (50g/L), раствор сапуна, раствор беланцета, раствор жуманцета, пипете, стак са епруветама

Узорак: уље

Поступак: у пет епрувета сипати по 0,5 cm³ уља. У прву додати још 3 cm³ дестиловане воде; у другу 3 cm³ раствора калијуму хидроксида; у трећу 3 cm³ раствора сапуна, у четврту 3 cm³ раствора беланцета, и у пету 0,5 cm³ раствора жуманцета. Сваку епрувету енергично мућкати у току 1 минута. Посматрати стабилност добијених емулзија.

Посматрати физичке карактеристике добијених емулзија. Обрати пажњу да ли је дошло до фазне сепарације или се задржала хомогеност у целокупној запремини епрувете. Записати запажања.

Запажања. Навести која од коришћених супстанци је најбољи емулгатор.

Датум и овера асистента (2):

___/___/___

Задаци 2

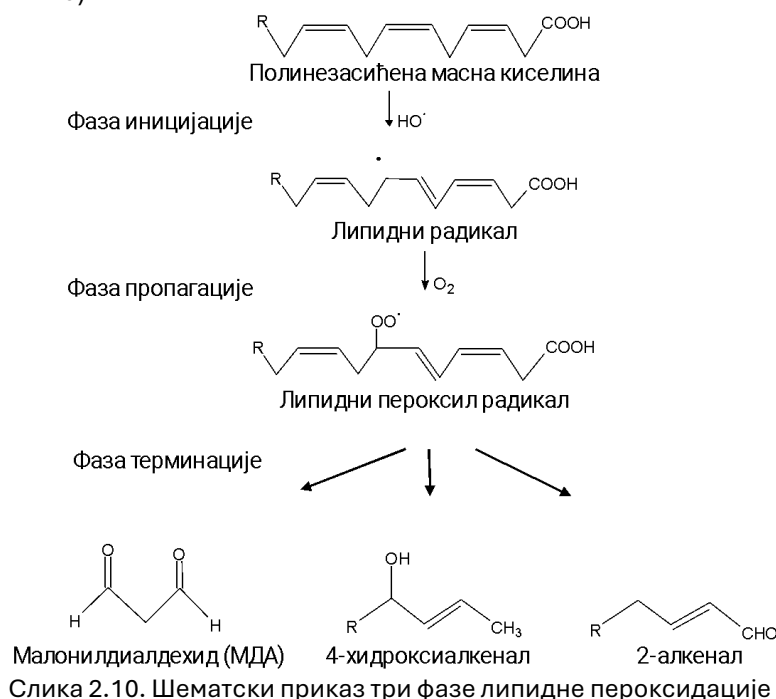
- Одредити интензитет липидне пероксидације (ЛП) у узорку ланеног уља применом ТБА теста. Упоредити интензитет ЛП са узорком уља изложеног UV зрачењу и узорком уља у који је додат водоник-пероксид, као извор слободно-радикалских форми кисеоника. Такође, испитати и потенцијално протективни ефекат етарског уља нане и витамина Е на спречавање или заустављање процеса липидне пероксидације.
- Применом сланог раствора течног детерџента изоловати ДНК молекуле из одабраног воћа (банана, кивија или јагода) и извести закључак о утицају детерџената на интегритет биолошких мембрана.

Теоријски део 2

Фосфоглицериди и сфинголипиди због амфипатичних својстава својих молекула у воденим растворима граде липидне двослоје, тј. основни су конституенти свих биолошких мембрана. У липидне двослоје мембрана уроњени су молекули протеина, стерола и угљених хидрата. Однос липида и протеина у ћелијским мембранама може да варира што је у корелацији са функцијом ћелија. Садржај липида варира од 24% до 79%; протеина од 18% до 76%, док садржај угљених хидрата не прелази 10%.

Четири основне функције ћелијске мембране су да (1) **формира баријеру** која омогућава појаву разлика у биохемијском саставу између унутрашњости ћелије и екстрацелуларног простора (или, унутрашњости ћелијских органа и цитосола). Тиме је могуће и одржавање градијента концентрације неких јона и молекула што је предуслов за (2) могућност **генерисања енергије** (у органелама попут митохондрија и хлоропласта). (3) Мембране омогућавају **селективну размену супстанци** између ћелије и њене околине, али представљају и (4) места на којима се дешава **пријем и обрада информација**, што је неопходно за међућелијску комуникацију и опстанак организма.

Незасићене МК у саставу фосфолипида тј. C=C двоструке везе у молекулима масних киселина су подложне реакцијама са слободним кисеоничним радикалима. Једном започет процес, наставља се кроз низ реакција који води оштећењу ћелијских мембрана, а назива се **липидна пероксидација**. Ове ланчане реакције су по механизму одвијања слободно-радикалске реакције, те се ЛП може поделити у три фазе: иницијација, пропација и терминација (Слика 2.10).



Липидна пероксидација започиње нападом реактивног кисеоничног радикала, нпр. хидрокси радикала, а затим следи апстраховање водоника из метилenske групе у α - положају у односу на двоструку везу НМК или додавање кисеоничног радикала, које води настанку различитих реактивних форми НМК, као што су: липидни радикал ($L\cdot$), липидни пероксил радикал ($LOO\cdot$), липидни хидропероксид ($LOOH$) и др. У фази терминације од њих постају, нерадикалске форме: малонилдиалдехид (МДА), 4-хидрокси-2-ноненал, 4-хидрокси-2-хексанал, акролеин итд.

Слободнорадикалска ланчана реакција траје док се два слободна радикала не коњугују међусобно чиме се прекида процес ланчане реакције. Такође, реакције се заустављају у присуству антиоксиданата, који хватају слободне кисеоничне радикале. Један од природних антиоксиданата је витамин Е (α -токоферол).

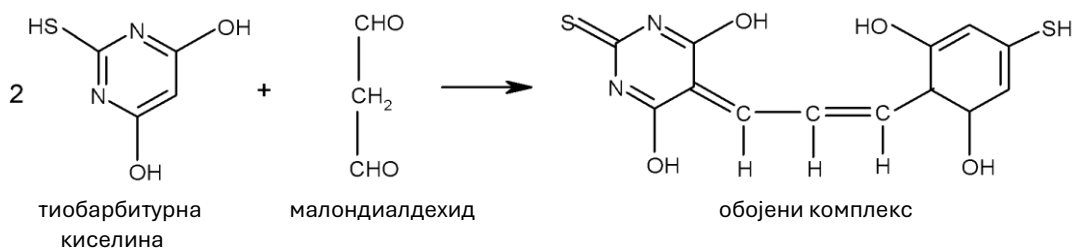
Липидној пероксидацији могу да подлегну и незасићене масне киселине из хране, што узрокује кварење хране. Да би се ова појава спречила у храну која садржи НМК додају се и синтетски антиоксиданси, као што су бутиловани хидрокси-толуен (БХТ) и бутиловани хидрокси анизол (БХА).

Експериментални део 2

Вежба Л6. Праћење утицаја водоник-пероксида и UV зрачења на интензитет липидне пероксидације и потенцијално заштитног ефекта етарских уља и витамина Е

Методологија

За праћење интензитета ЛП најчешће се користи ТБА тест. Ова метода се заснива на реакцији МДА, једног од крајњих продуката липидне пероксидације, са ТБА реагентом (раствор тиобарбитурне киселине) у којој настаје ружичасто обојен производ (Слика 2.11). Интензитет боје може да се пореди визуелно, или да се мери спектрофотометријски на 532 nm.



Слика 2.11. Једначина реакције на којој се заснива ТБА тест

Као модел систем за испитивање степена ЛП користиће се ланено уље као значај извор полинезасићених масних киселина (67%). UV зрачење, као и присуство водоник-пероксида иницирају липидну пероксидацију нмк; док са друге стране компоненте етарских уља и витамин Е, захваљујући свом антиоксидантом потенцијалу могу да успоре или зауставе овај процес.

Реагенси и прибор: сталак са епруветама, UV лампа, решо, ТБА реагент (растворити 3 g тиобарбитурне киселине, 10,4 cm³ перхлорне киселине (HClO₄), 120 g трихлорсирћетне киселине у 800 cm³ дестиловане воде).

Узорак: ланено уље, етарско уље нане, витамин Е (1 капсула комерцијалног препарата витамина Е (200 mg) по једној проби)

Поступак: у седам епрувета сипати растворе реагенаса редоследом који је дат у Табели 2.6

Табела 2.6. Редослед додавања реагенаса у вежби Л6

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5	Епрувета 6	Епрувета 7
1 cm ³ уља						
0,2 cm ³ уља	0,2 cm ³ уља	10 капи етарског уља нане	0,2 cm ³ раствора витамина Е	0,2 cm ³ уља	10 капи етарског уља нане	0,2 cm ³ раствора витамина Е
0,5 cm ³ H ₂ O	0,5 cm ³ 30% H ₂ O ₂	0,5 cm ³ 30% H ₂ O ₂	0,5 cm ³ 30% H ₂ O ₂	0,5 cm ³ H ₂ O	0,5 cm ³ H ₂ O	0,5 cm ³ H ₂ O
Инкубација на 37 °C, 20 минута	Инкубација на 37 °C у току 20 минута			Инкубација под UV лампом у току 20 минута		
0,4 cm ³ ТБА реагенса						
Загревати на 100 °C у току 10 минута						

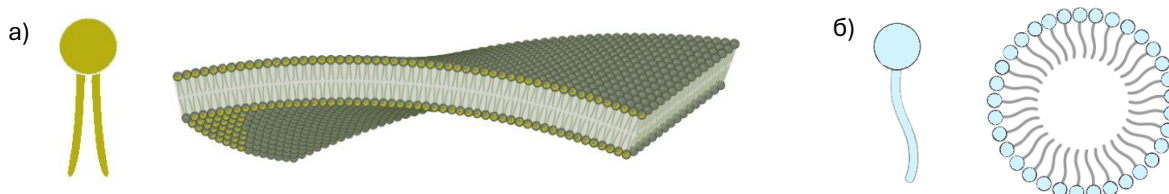
По завршетку огледа посматрати и упоредити интензитете боја у свим епруветама. Запазити колико UV зрачење утиче на повећање интензитета ЛП.

Запажање:

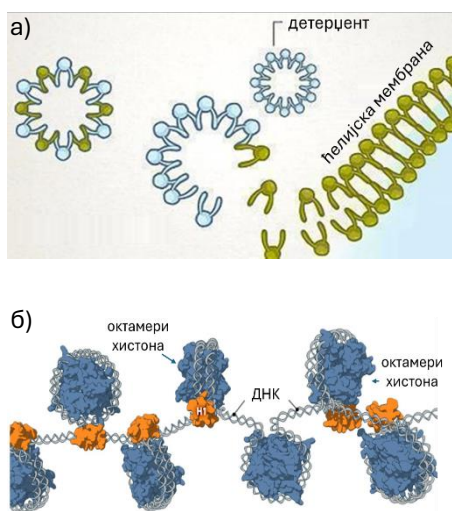
Вежба Л7. Утицај детерџената на биолошке мембране - изоловање ДНК молекула из банане

Методологија

И молекули фосфолипида (фосфоглицерида и сфинголипида) и молекули сапуна и детерџената су амфипатични молекули, али због различитог односа поларних и неполарних региона унутар молекула, у воденим растворима први формирају агрегате типа липидних двослоја, док други формирају агрегате типа липидних монослојева тј. мицела (Слика 2.12).



Слика 2.12. Агрегати липидних молекула у воденим растворима: а) фосфолипиди формирају двослоје; б) сапуни формирају мицеле



Када се неко мекано воће, нпр. банане или јагоде, помешају и гњече са сланим раствором детерџента долази до пуцања ћелијских зидова и мембрана (Слика 2.13.а), а садржај из ћелија се излива у раствор. Садржај органела се такође празни након нарушавања структуре и мембрана органела. Из ћелијског једра се ослобађају нуклеопротеински комплекси. Негативно наелектрисани остаци фосфатних киселина у молекулима ДНК привлаче молекуле протеина у комплексе (Слика 2.13.б). Додатком натријум-хлорида, јони хлора утичу на нарушавање нуклеопротеинских комплекса, на тај начин се ДНК молекули у великој мери ослобађају везаних молекула протеина. То је од значаја за изолацију молекула ДНК. По додатку хладног етанола долази до агрегације молекула ДНК и постају видљиви у облику белих нити.

Слика 2.13. а) Нарушавање интегритета липидног двослоја ћелијских мембрана у присуству молекула детерџената; б) шематски приказ паковања ДНК молекула везивањем за молекуле протеина хистона

Реагенси и прибор: две чаше, две кашике, мензура, пластична кеса са зип затварањем, левак, газа, чврсти натријум-хлорид (NaCl), етанол температуре око 4° С, течни детерџент за судове

Узорак: банане

Поступак: раствор за екстракцију припремити мешањем једне кашике (око 20 g) NaCl са 100 cm³ воде и једном кашиком течног детерџента. Добро хомогенизовати. Ставити ољуштену банану у пластичну кесу, истиснути ваздух и застворити зип. Благим покретима изгњечити банану. Потом додати и 3 кашике раствора за екстракцију, поново истиснути ваздух, добро затворити зип и гњечити прстима бар 1 минут.

Садржај кесе процедити у празну чашу кроз газу, која је стављена у левак. Пулпа нек остане на газу. Потом, низ зид чаше сипати око двоструко већу запремину хладног етанола (у односу на запремину филтрата у чаши), тако да не дође до мешања течности. ДНК из екстракта банане се издваја у облику белих нити у алкохолном слоју (горњи слој). Уронити штапић у чашу и кружним покретима намотати нити ДНК.

Изоловану ДНК чувати у фрижидеру и користити за доказивање присуства азотних база, пентоза и фосфорне киселине, у огледу (Вежба НКЗ).

Запажање:

Датум и овера асистента (3):

__/__/____

Задаци

- На основу изгледа склопљених тродимензионалних модела структура аминокиселина, трипептида и протеина уочити: а) карбоксилну и amino групу, именовати бочни низ; б) геометрију пептидне везе, утицај волуминозности бочног низа на ротацију око C-N и C-C веза; в) савијање полипептидног ланца, основне елементе секундарне структуре (α -хеликс, β -набрана плоча).
- На основу склопљеног тродимензионалног модела структуре родопсина, прокоментарисати колико има транслипидних региона, којом везом се везује молекул ретинала за протеински део родопсина.
- Испитати утицај различитих агенаса (повишена температура, додаток киселине и базе) на таложење протеина, а тиме и стабилност нативне конформације молекула протеина.
- На основу познате изоелектричне тачке казеина, изоловати казеин из млека. Доказати присуство фосфорне киселине у казеину.
- Применом различитих бојених реакција испитати аминокиселински састав различитих протеина.

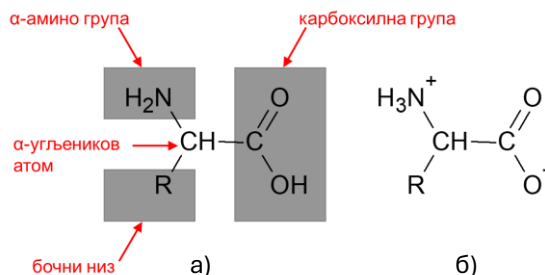
Теоријски део

Протеини (беланчевине) су супстанце чији су молекули полимери остатака протеиногених аминокиселина које су међусобно повезане амидним (пептидним) везама. Дакле, мономерне јединице протеина су **аминокиселине** у чијим структурама је заједнично присуство две функционалне групе (карбоксилне и amino групе) везане за исти α -угљеников атом, а разликују се по структури бочног низа (R), Слика 3.1.

Постоји **двадесет** протеиногених аминокиселина. Од тога је за човека **девет** аминокиселина есенцијално, те се морају унести храном. Не садрже сви протеини свих 20 аминокиселина. Они протеини који их садрже су **комплетни протеини**.

У ову категорију спада већина протеина животињског порекла, као што су месо, риба, млеко и јаја. С друге стране, биљни протеини обично имају ограничен број есенцијалних аминокиселина, а највећи проблем представља недостатак лизина и метионина. Вегетаријанци морају посебно да воде рачуна о комбинацији намирница како би задовољили потребе свог организма.

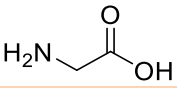
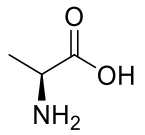
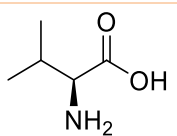
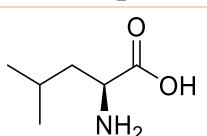
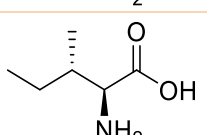
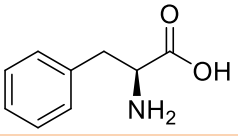
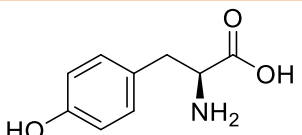
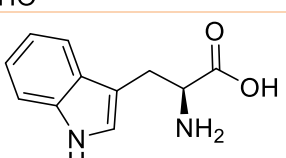
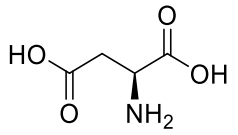
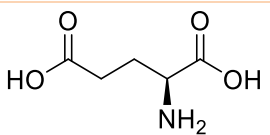
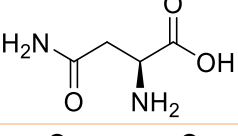
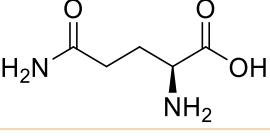
Комбиновање хране богате лизином (попут махунарки) са храном богатом метионином (попут семенки сунцокрета, лана, бразилског ораха) може помоћи у постизању уравнотеженог профила аминокиселина у **биљној исхрани**. На пример, оброк са сочивом и киноом може да обезбеди потпунији сет есенцијалних amino киселина.



Слика 3.1. а) Заједничка структурна формула протеиногених аминокиселина. б) Наелектрисање функционалних група при физиолошком рН (7,4 рН јединица).

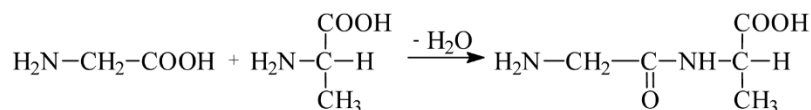
Протеини су једињења широко распрострањена у природи, а чине основне ћелијске састојке свих ћелија и живих организама. Од свих биомолекула, протеини испољавају **најшири спектар функција**. Ако су смештени у ћелијској мембрани могу бити: канали за транспорт јона, носачи, пумпе, рецептори, катализатори биохемијских реакција (ензими), маркери идентитета; у цитосолу могу бити ензими или бити укључени у пренос сигнала; у крвотоку могу имати функцију транспортера за различите молекуле (стероидне хормоне, металне јоне, липидне молекуле итд.), у еритроцитима имају функцију транспортера за кисеоник и угљен-диоксид; могу да имају функцију у контракцији мишића и покретању скелета; хормонско дејство, али могу испољавати и токсични ефекат.

Табела 3.1. Структуре формуле протеиногених аминокиселина: тривијални називи, трословне ознаке, називи функционалних група у бочном низу и подела на основу природе бочног низа, * ознака есенцијалних аминокиселина

подела по природи бочног низа	Тривијални називи, трословне и једнословне ознаке:	Структурне формуле	Назив функционалне групе у бочном низу, рК вредност
алифатичне	Глицин, Gly, G		угљоводонични низ (атом водоника)
	Аланин, Ala, A		угљоводонични низ (метил- група)
	Валин*, Val, V		угљоводонични низ (изопропил- група)
	Леуцин*, Leu, L		угљоводонични низ
	Изолеуцин*, Ile, I		угљоводонични низ
ароматичне	Фенилаланин*, Phe, F		фенил- група
	Тирозин, Tyr, Y		хидроксифенил- група, (pK=10,5)
	Триптофан*, Trp, W		индол
киселе	Аспарагинска киселина, Asp, D		β-карбоксилна група (pK=3,9)
	Глутаминска киселина, Glu, E		γ-карбоксилна група (pK=4,1)
са амидном групом	Аспарагин, Asn, N		амидна група
	Глутамин, Gln, Q		амидна група

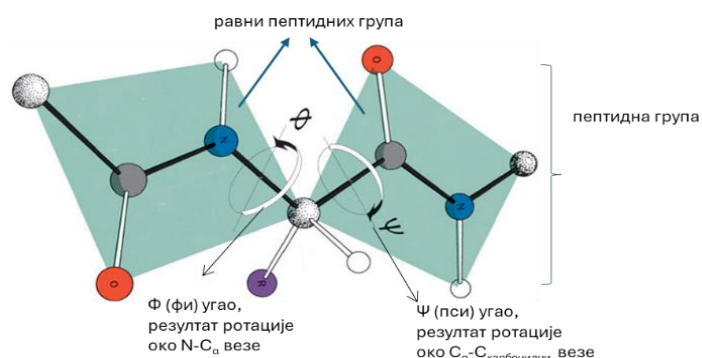
подела по природи бочног низа	Тривијални називи, трословне и једнословне ознаке:	Структурне формуле	Назив функционалне групе у бочном низу, рК вредност
са -ОН групом	Серин, Ser, S		хидроксилна група
	Треонин*, Thr, T		хидроксилна група
са сумпором	Цистеин, Cys, C		тиолна група (pK=8,3)
	Метионин*, Met, M		атом сумпора
базне	Лизин*, Lys, K		ε-амино група (pK=10,5)
	Аргинин, Arg, R		гуанидинска група (pK=12,5)
	Хистидин*, His, H		имидазол (pK=6,0)
цикличне	Пролин, Pro, P		пирролидински прстен

Пептидна веза настаје повезивањем α-карбоксилне групе једне аминокиселине са α-амино групом друге аминокиселине (Слика 3.2).



Слика 3.2. Једначина реакције формирања дипептида, глицил-аланина

Геометрија пептидне везе и различита волуминозност бочних низова различитих аминокиселина утиче на савијање полипептидног ланца и формирање одговарајуће тродимензионалне структуре молекула протеина (Слика 3.3). 3D структура је кључна за функцију протеина, а она тродимензионална структура у којој протеин испољава своју максималну биолошку активност се назива **нативна конформација**.



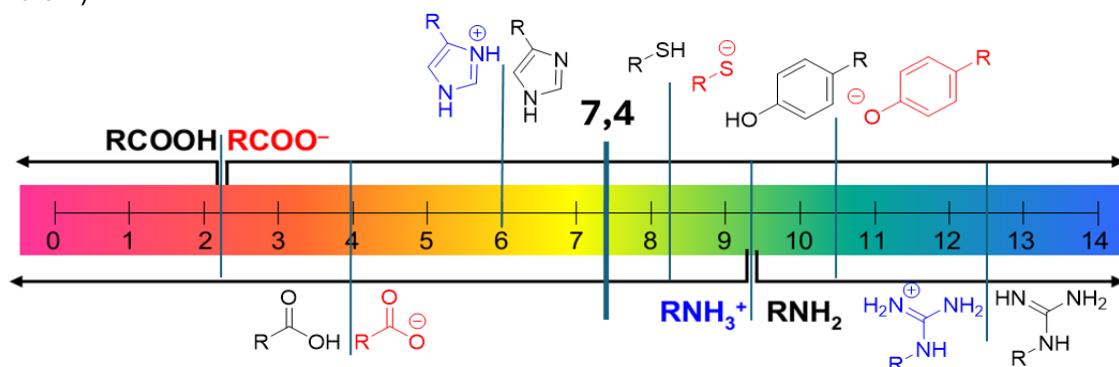
Слика 3.3. Геометрија пептидне везе. Раван пептидних група. Торзиони углови Ф и Ψ.

У ћелији при физиолошким условима ($\text{pH}=7,4$) слободне аминокиселине, пептиди и протеини се налазе у јонизованом (наелектрисаном) облику. Разлог томе јесте што ови молекули садрже функционалне групе које могу размењивати протоне са раствором. Киселе функционалне групе (α -, β - и γ -карбоксилне групе, тиолна група и фенолна хидроксилна група) могу отпуштати протоне (депротоновати се), а базне групе (α - и ε - амино групе, гуанидинска група и имидазол прстен) везују протоне тј. протонују се. У ком облику, протониваном/депротониваном или основном ће се налазити нека функционална група зависи од вредности њене киселинске константе (тј. pK вредности) и од pH вредности раствора у коме се налазе, као што је приказано на слици (Слика 3.4).

pH вредност раствора ($-\log c(\text{H}_3\text{O}^+)$) је мера киселости, тј. мера концентрације хидронијум јона у раствору.

Аналогно томе, **pK** вредност је $-\log K_k$ (K_k -киселинска константа), која је мера јачине киселине. Што је K_k већи број киселина је јача. Јаче киселине се депротонују при нижим pH вредностима раствора.

Базне функционалне групе када приме протон прелазе у облик коњуговане киселине.

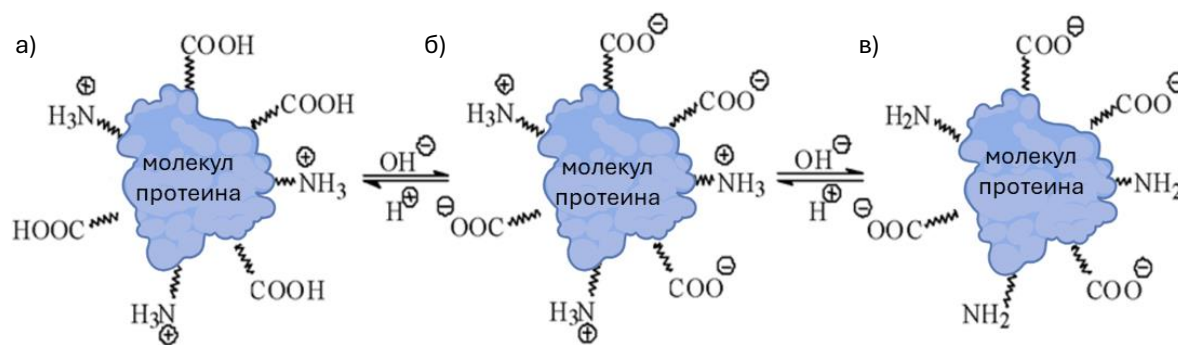


Слика 3.4. pK вредности различитих функционалних група α -карбоксилне ($\text{pK}=2$), имидазола ($\text{pK}=6$), тиолне групе ($\text{pK}=8,3$), α -амино ($\text{pK}=9$), фенолне хидроксилне групе ($\text{pK}=10,5$), гуанидинске групе ($\text{pK}=12,5$) и доминантна јонска врста при физиолошком pH ($7,4$). Црном бојом је приказан основни облик киселине или базе, плавом бојом протонивана база, а црвеном депротонивана киселина.

Пошто у састав протеина улази велики број аминокиселина (>100) молекули протеина се у воденим растворима налазе као **поливалентни јони**, јони са великим бројем позитивног и негативног наелектрисућа.

Променом pH вредности раствора протеина, може се утицати на укупно наелектрисуће на молекулима протеина. Она pH вредности раствора при којој се сви молекули неког протеина налазе у електронеутралном облику се назива **изоелектрична pH вредност** тј. **изоелектрична тачка** (ИЕТ). За сваки протеин може се одредити ИЕТ, и корисна је у лабораторијском раду са протеинима.

електронеутрални облик молекула протеина $\equiv$ једнак број позитивно и негативно наелектрисаних група на површини молекула



Слика 3.5. Различите јонизоване форме протеинских молекула (поливалентних јона)

На изоелектричној pH растворљивост протеина је најмања, јер не постоје одбојне силе између електронеутралних макромолекула, те при њиховом сударању у раствору долази до агрегације

и таложења, тзв. изоелектрично таложење. Ова чињеница се често користи за изоловање (таложење) одређеног протеина из хетерогених протеинских смеша. При рН вредностима изнад и испод ИЕТ молекули протеина имају исту врсту наелектрисања (Слика 3.5, а и в), па се међусобно одбијају и на тај начин се задржавају у раствору. На рН која је нижа од ИЕТ, молекули су у катјонској форми (позитивно наелектрисани), а на рН која је виша од ИЕТ, молекули су у анјонској форми (негативно наелектрисани).

Према облику молекула протеини се деле на глобуларне и фибриларне протеине. Да би се лакше проучавали молекули протеина дефинисани су **нивои** њихове **изградње**. Разликују се примарна, секундарна, терцијерна и код неких протеина и кватернерна структура.

Редослед аминокиселина у једном полипептидном ланцу тј. **секвенца** аминокиселина представља **примарну структуру** молекула протеина. Редослед аминокиселина утицаће на специфично увијање полипептидног ланца, јер од волуминозности бочних остатака суседних аминокиселина у низу зависи и вредност торзионих углова Φ и Ψ . Тиме, секвенца обезбеђује сваком протеину јединствену структуру, а самим тим и одговарајућу биолошку функцију.

Секундарна структура описује локално савијање полипептидне кичме, коју чине понављајући основни низ атома $-N-C_{\alpha}-C-N-C_{\alpha}-C$. Основни елементи секундарне структуре су α -хеликс и β -набрана плоча, који су присутни у великом броју у **глобуларним** протеинима. Након формирања елемената секундарне структуре долази до даљег увијања ланца, уз додатна повезивања делова молекула ковалентним (дисулфидним) и нековалентним интеракцијама (водонично везивање, јонске интеракције, Ван дер Валсове интеракције) и формира се стабилна, **терцијерна структура**. Она описује комплетну тродимензионалну структуру полипептида, укључујући и просторни распоред бочних ланаца.

Код већине протеина молекули се састоје од више истих или различитих полипептидних ланаца, од којих сваки има дефинисану терцијарну структуру. Повезивањем ових независних полипептидних ланаца, тзв. подјединица нековалентним интеракцијама формира се комплекс, који се означава као **кватернерна структура** протеина.

Денатурација протеина представља нарушавање тродимензионалне структуре молекула тј. терцијерне и секундарне структуре, док примарна остаје очувана. Денатурација се јавља услед промена у непосредној околини молекула протеина. Промене могу бити: промењена кинетика суседних молекула због повишене температуре, промена наелектрисања на молекулима протеина услед промене рН, тј. промене у концентрацији протона у непосредном окружењу молекула протеина, промена наелектрисања услед промена концентрације соли, високе концентрација неких молекула, нпр. урее, механички фактори (снашно мућкање епрувете и сл.), редукујући агенси итд. Сви ови агенси утичу на нарушавање нековалентних веза и интеракција који стабилизују секундарну, терцијерну и кватернерну структуру (јонских интеракција, водоничних веза, Ван дер Валсових интеракција), али може доћи и до раскидања дисулфидних мостова.

Делимичним разматавањем полипептидних ланаца и излагањем хидрофобних региона молекула протеина воденој средини може доћи до интеракције између већег броја хидрофобних региона суседних размотаних молекула протеина, њиховог умрежавања и формирања нерастворних структура, одн. до појаве таложења (коагулације). Дакле, појава талога је макроскопска манифестација појаве нарушавања тродимензионалног облика молекула протеина. Таложење протеина може бити реверзибилно (променом услова молекул протеина се поново враћа у нативну конформацију) или иреверзибилно (просторна структура је трајно нарушена).

Примери денатурације протеина из свакодневног живота су: печење јајета на око, када се житка маса беланцета (раствор молекула албумина) преводи у непрозирну белу масу у контакту са врелим уљем. Мућење беланцета миксером, или жицом уз настајање пене, такође је пример денатурације молекула протеина.

Експериментални део

Вежба П1. Склапање тродимензионалних модела молекула аминокиселина и олигопептида

Потребан прибор: комплет за састављање хемијских модела, савитљива жица, перле у боји.

У комплету за састављање хемијских модела **црном** бојом су приказани атоми угљеника (C), белом бојом атоми водоника (H), **црвеном** бојом атоми кисеоника (O), **наранџастом** бојом атоми фосфора (P) и **плавом** бојом атоми азота (N).

Задатак 1. Коришћењем модела саставити структуру аминокиселине чија једнословна ознака одговара првом слову имена експериментатора.

Задатак 2. На основу приказаног дијаграма различитих подела аминокиселина према карактеристикама бочног низа, одговори на следећа питања:

а) позитивно наелектрисане су (3): _____

б) негативно наелектрисане су (2): _____

в) веома мале запремине су (5): _____

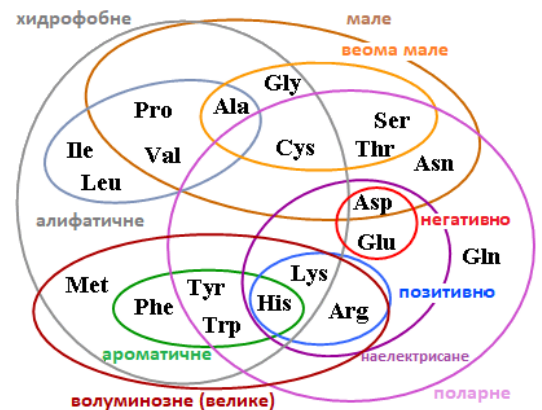
г) мале волуминозности су (4): _____

д) алифатичне аминокиселине су (5): _____

е) ароматичне аминокиселине су (4): _____

ж) поларне аминокиселине су (12): _____

з) велике волуминозности су (7): _____



Слика 3.6. Подела протеиногених аминокиселина према различитим критеријумима, представљена Веновим дијаграмом

Задатак 2. Саставити трипептид који се састоји од три различите аминокиселине чије једнословне ознаке се налазе у имену експериментатора.

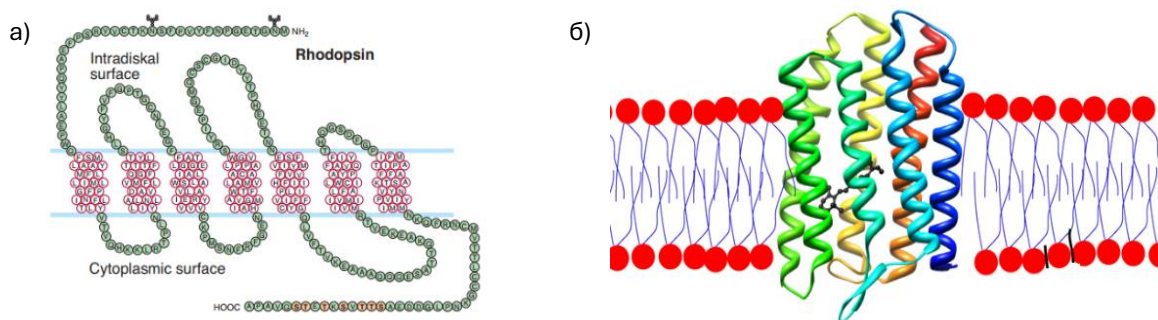
Задатак 3.

Нанизати перлице различитих боја на савитљиву жицу. Свака перлица представља једну аминокиселину. Светлије обојене перлице представљају поларне аминокиселине. Постављањем жице у одговарајући положај приказати:

- примарну структуру
- елементе секундарне структуре (α -хеликс или β -набрана плоча)
- терцијерну структуру
- кватернерну структуру

Вежба П2. Склапање тродимензионалног модела молекула родопсина, сложеног, фоторецепторског протеина

Исећи и саставити папирни тродимензионални модел структуре молекула опсина (протеинског дела родопсина). Колико има транслипидних делова? Која секундарна структура је у питању. Шта је простетична група овог протеина. Како се везује за протеински део? За који бочни остатак аминокиселине се везује витаминска компонента?



Слика 3.7. а) Примарна и секундарна структура молекула **опсина**. б) Терцијерна структура молекула **родопсина** (у централну шупљину молекула је ковалентно везан молекул ретинала)

Запажања:

Датум и овера асистента (4):

__ / __ / ____

Вежба ПЗ. Денатурација протеина загревањем, киселинама и базама

Методологија

Протеини имају стабилну 3D конформацију у одређеним физиолошким условима. Услед промене температуре, рН и јонске јачине (концентрација соли) долази до нарушавања интеракција између молекула протеина и молекула растварача што доводи до промене у структури молекула протеина и њихове денатурације. Макроскопски показатељ денатурације молекула протеина је појава талоба.

Реагенси и прибор: стакал са епруветама, водено купатило, 1% водени раствор сирћетне киселине (CH_3COOH), 10% водени раствор сирћетне киселине (CH_3COOH), 10% водени раствор натријум-хидроксида (NaOH), засићени раствор натријум-хлорида (NaCl).

Узорак: раствор албумина

Поступак: у пет обележених епрувета додати реагенсе редоследом како је наведено у табели. Након тога ставити епрувете у водено купатило на 100°C у току 10 минута. Посматрати промене и у последњем реду табеле обележити да ли се током загревања створио талоб или нема талоба. Објаснити уочене разлике.

Табела 3.2. Редослед додавања реагенаса у вежби ПЗ

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5
1 cm^3 раствора протеина				
0,5 cm^3 воде	1 кап 1% сирћетне киселине	0,5 cm^3 10% сирћетне киселине	0,5 cm^3 10% сирћетне киселине	0,5 cm^3 10% NaOH
			неколико капи засићеног раствора NaCl	
кувати у воденом купатилу на 100°C у току 10 минута				
има / нема	има / нема	има / нема	има / нема	има / нема

Запажање:

Вежба П4. Изоловање казеина из млека применом изоелектричног таложења

Методологија

Казеин се састоји од неколико типова протеина, углавном α -казеина, β -казеина и κ -казеина. Они чине 80% протеина присутних у крављем млеку. Казеини су фосфопротеиди код којих се остаци фосфорне киселине везују за серинске остатке (естарском везом). Фосфатне групе везују велике количине калцијумових јона. Због тога, молекули казеина у млеку формирају сферне агрегате који се називају мицеле, и које одржавају казеин у суспендованој форми дајући млеку белу, непрозирну боју.

Цењен је због својих нутритивних карактеристика (комплетан протеин) и споре сварљивости, па се користи као спортски суплемент. Осим у прехранбеној индустрији за производњу сира, користи се и у производњи лепка, боја и премаза.

Изоелектрична тачка казеина је 4,6 рН јединица, на којој је растворљивост казеина најмања, што се користи за његово изоловање.

Реагенси и прибор: 0,05 mol/dm³ раствор хлороводничне киселине (HCl), 0,1 mol/dm³ раствор натријум-хидроксида (NaOH), чаша (500 cm³), чаша (250 cm³), рН хартија, центрифуга, епрувете за центрифугирање.

Поступак: у чашу од 500 cm³ сипати 50 cm³ млека и постепено, уз мешање стакленим штапићем, додавати раствор хлороводничне киселине (HCl) до рН 4.6-4.8. За то је потребно око 50 cm³ киселине. При крају додавања киселине, рН вредност проверавати рН хартијом. Разблажити добијену суспензију додатком 150 cm³ дестиловане воде и оставити у фрижидеру (+4°C) до наредног термина. Декантовати раствор изнад издвојеног талоба казеина.

Уколико изостане издвајање талоба, суспензију центрифугирати 10 минута, брзином од 3500 обртаја у минути.

Запажање:

Вежба П5. Доказивање присуства фосфорне киселине у казеину

Методологија

Овај оглед се састоји из два дела: хидролизе казеина и доказивања ослобођене фосфорне киселине. Реакција између фосфорне киселине и молибдата је једна од најчешће коришћених реакција за одређивање присуства фосфата, јер настаје жуто обојени комплекс који се лако уочава.

Реагенси и прибор: 10% раствор натријум-хидроксида (NaOH), 10% раствор азотне киселине (HNO₃), сталак са епруветама, левак, филтер хартија, рН хартија.

Поступак: на талог казеина (око 1 g) добијеног у огледу П3, додати 10 cm³ 10% раствора натријум-хидроксида. Добијени раствор казеина загревати на температури кључања 15–20 минута. По завршетку хидролизе казеина епрувету охладити и садржај у њој неутралисати додавањем 10% раствора азотне киселине. Неутрализацију контролисати лакмус папиром. После неутрализације садржај профильтрирати. На 0,5 cm³ филтрата додати 2 cm³ молибденског реагенса и лагано загревати епрувету неколико минута до промене боје.

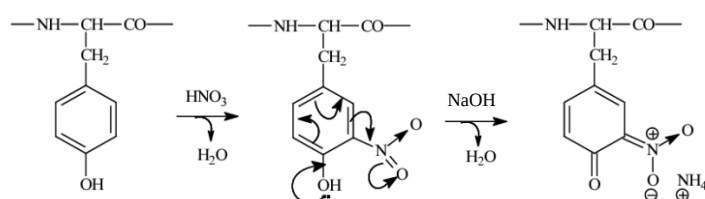
Запажање:

Вежба П6. Бојене реакције на протеине - квалитативно одређивање присуства ароматичних аминокиселина, хистидина и аргинина у различитим узорцима

Методологија

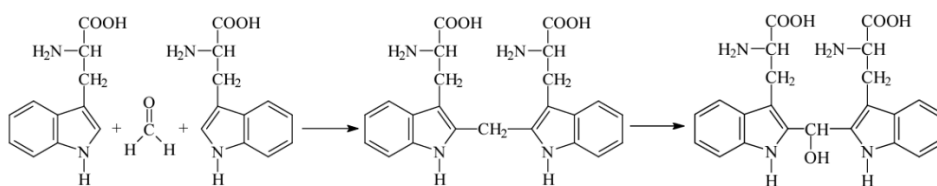
Присуство различитих функционалних група у бочним остацима аминокиселина које улазе у састав молекула протеина може се доказати применом различитих бојених реакција.

- **Ксантопротеинска** реакција је реакција нитровања ароматичног прстена у молекулима ароматичних аминокиселина са молекулима азотне киселине. У реакцији се појављује жута боја. Ако се дода натријум-хидроксид, реакциона смеша постаје базна, и формира се наранџаста хромофора у молекулу производа.



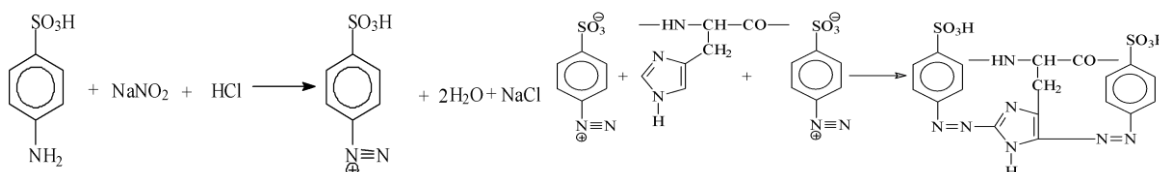
Слика 3.8. Хемијска једначина реакције нитровања и формирања наранџасте хромофоре у базној средини

- **Хопкинс-Колова** реакција добијања бис-2-триптофанилкарбинола, љубичасте боје, је реакција кондензације два индолова прстена (бочни остаци триптофана) и формалдехида, уз додатну оксидацију. На граници фаза јавља се црвено-љубичасти прстен.



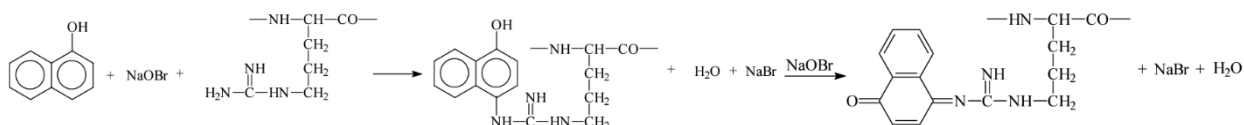
Слика 3.9. Хемијска једначина кондензације два индолова прстена и молекула формалдехида уз хидроксилацију насталог производа. Јавља се љубичасти прстен на додиру фаза.

- **Паулијева** реакција је реакција имидазоловог прстена из бочног низа остатака хистидина са диазобензосулфонском киселином која најпре настаје у реакцији сулфанилне киселине и натријум-нитрита. Настали производ је вишња-црвене боје.



Слика 3.10. Хемијска једначина реакције имидазоловог прстена са диазобензосулфонском киселином уз формирање производа вишња-црвене боје

- **Сакагучијева** реакција је реакција гуанидинске групе из молекула аргинина са α-нафтолом и натријум-хипобромитом (NaBrO) уз грађење наранџасто-црвено обојеног комплекса. У присуству гуанидинских функционалних група остатака аргинина јавља се наранџасто-црвена боја.



Слика 3.11. Хемијска једначина реакције α-нафтола и натријум-хипобромита са гуанидинском групом из молекула аргинина уз настанак производа наранџасто-црвене боје

Реагенси и прибор: 30% раствор натријум-хидроксида (NaOH), 10% раствор натријум-хидроксида (NaOH), концентрована азотна киселина (сс HNO₃), концентрована сумпорна киселина (сс H₂SO₄), глацијална сирћетна киселина (сс CH₃COOH), 10% раствор натријум-карбоната (Na₂CO₃), 0,2% раствор α-нафтола у етанолу, натријум-хипобромит (NaBrO; растворити 1g брома у 50 cm³ 5% раствора натријум-хидроксида), 0,5% раствор натријум-нитрита (NaNO₂), 1% раствор сулфанилне киселине у 5% раствору хлороводоничне киселине (HCl). Водено купатило, стакал са епруветама, градуисане пипете (1, 2 и 5 cm³), стаклени штапић.

Узорци: казеин (млеко), албумин (јаја), желатин (кувани колаген)

Ксантопротеинска реакција за доказивање присуства остатака ароматичних аминокиселина у молекулима протеина

Поступак: у 1 cm³ раствора протеина додати 5–6 капи сс HNO₃, и уочити појаву белог талога или замућења. При загревању епрувете у воденом купатилу, садржај епрувете – тј. настали талог се боји јарко жуто и скоро потпуно се раствара. Охладити смешу и пажљиво, без мућкања, додати кап по кап 30% раствор натријум-хидроксида (NaOH) до алкалне реакције.

Реакција **Хопкинс-Колова** на присуство остатака триптофана у молекулима протеина

Поступак: сипати у епрувету 1 cm³ раствора протеина и 2 cm³ глацијалне сирћетне киселине (у којој увек има одређена количина глиоксалне киселине, из које у присуству сумпорне киселине настаје формалдехид). Смешу благо загрејати, а затим охладити под млазом воде. Низ зид нагнуте епрувете додати око 1 cm³ конц. сумпорне киселине (сс H₂SO₄) пажљиво, да не дође до мешања течности.

Реакција **Паулија** на присуство остатака хистидина у молекулима протеина

Поступак: сипати у епрувету 1 cm³ 1% раствора сулфанилне киселине и додати 2 cm³ раствора натријум-нитрита (NaNO₂). Снажно промућкати садржај епрувете, а затим сипати 2 cm³ раствора протеина, промешати и додати 10% раствор натријум-карбоната (Na₂CO₃).

Реакција **Сакагучија** на присуство остатака аргинина у молекулима протеина

Поступак: сипати у епрувету 2 cm³ раствора протеина, додати 1 cm³ 10% раствора натријум-хидроксида и неколико капи раствора α-нафтола. Промућкати, додати 0,5 cm³ раствора натријум-хипобромита и поново промућкати.

Поступак: на узорцима три протеина извести бојене реакције према упутству из Табеле 3.3.

Табела 3.3. Редослед додавања реагенса у вежби П6

Ксантопротеинска р.	Хопкинс-Колова р.	Паулијева р.	Сакагучијева р.
1 cm ³ раствора протеина	1 cm ³ раствора протеина	1 cm ³ 1% раствора сулфанилне киселине	2 cm ³ раствора протеина
5–6 капи cc HNO ₃	2 cm ³ глацијалне сирћетне киселине	2 cm ³ раствора натријум-нитрита (NaNO ₂)	1 cm ³ 10% раствора натријум-хидроксида
неколико капи 30% раствор натријум-хидроксида (NaOH)	загрејати	2 cm ³ раствора протеина	неколико капи раствора α-нафтола
	1 cm ³ конц. сумпорне киселине (cc H ₂ SO ₄)	10% раствор натријум-карбоната (Na ₂ CO ₃)	0,5 cm ³ раствора натријум-хипобромита
наранџаста боја (+) жути раствор (-)	љубичасти прстен (+) безбојни раствор (-)	вишња црвена боја (+) жућкаст раствор (-)	наранџасто-црвена боја (+) жућкаста боја (-)

Добијене резултате уписати у Табелу 3.4.

Табела 3.4. Резултати квалитативне анализе узорака

албумин				казеин				желатин			
Phe Tyr Trp	Trp	His	Arg	Phe Tyr Trp	Trp	His	Arg	Phe Tyr Trp	Trp	His	Arg
+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -

Табела 3.5. Аминокиселински профил различитих биљних и животињских протеина

	Животињски протеини				Биљни протеини				
	КП млека	Млеко у праху	КП сурутке	Казеин	КП соје	Изоловани протеина соје	КП кромпира	КП грашка	КП пиринча
Суви остатак	92	92	94	92	90	94	91	94	93
Сирови протеини	49	34	76	89	64	85	74	83	68
Лизин	3.6	2.4	6.9	6.9	4.2	5.2	5.8	5.8	2.2
Метионин	0.8	0.8	1.7	1.7	0.9	1.1	1.7	0.8	1.8
Метионин+цистеин	1.2	1.1	3.4	3.4	1.9	2.1	2.9	1.6	3.2
Треонин	2.2	1.4	4.8	4.8	2.8	3.1	4.3	3.0	2.1
Триптофан	0.5	0.4	1.6	1.6	0.9	1.1	1.0	0.8	0.8
Изолеуцин	2.4	1.6	4.7	4.7	3.3	3.8	4.1	3.7	2.9
Леуцин	3.2	3.0	8.4	8.4	5.3	6.8	7.6	6.6	5.3
Валин	2.1	1.9	4.5	4.5	3.4	4.0	4.9	4.1	4.1
Хистидин	0.9	0.7	1.5	1.5	1.8	2.2	1.7	2.0	1.7
Аргинин	2.1	1.2	2.0	2.0	5.8	6.1	3.8	6.5	5.3
Фенилаланин	1.8	1.5	2.7	2.7	3.4	4.4	4.9	4.5	3.5
Тирозин	1.6	1.5	2.3	4.9	2.5	3.1	4.3	-	3.3
Фенилаланин + Тирозин	3.4	3.0	5.0	5.0	5.9	7.5	9.2	4.5	6.8
Леуцин + изолеуцин+ валин	7.6	6.5	18	19	12	15	17	14	12

скраћенице: КП – концентрат протеина

Запажање:

Набројати есенцијалне аминокиселине. Прокоментарисати податке из Табеле 3.5. о аминокиселинском профилу протеинских молекула из различитих извора. Који од наведених су комплетни протеини.

Датум и овера асистента (5):

__/__/____

Задаци

- На непознатом узорку (водени раствор неког угљеног хидрата) извести бојене реакције редоследом како је приказано на шеми (Слика 4.3) и закључити који угљени хидрат се налази у раствору.
- На основу резултата Фелингове реакције на растворима сахарозе и меда извести закључак о разликама у структури њихових молекула.

Теоријски део

Угљени хидрати, шећери, сахариди или гликани су класа природних органских супстанци чији молекули садрже атоме угљеника, водоника и кисеоника у односу $C_m(H_2O)_n$; због чега су добили назив угљени хидрати (хидратисани угљеникови атоми).

Према структурним карактеристикама и сложености грађе, угљени хидрати се деле на:

- **моносахариде** (просте шећере);
- олигосахариде (најзначајнији су **дисахариди**);
- **полисахариде** (сложене шећере).

Молекули угљених хидрата садрже знатно више кисеоникових атома у односу на број угљеникових атома, од свих осталих класа биомолекула.

Најзначајнији угљени хидрати су: глукоза, галактоза, фруктоза, рибоза (моносахариди); лактоза, сахароза, малтоза (дисахариди); скроб, целулоза, хитин, агар, хијалуронска киселина, хепарин (полисахариди). Олигосахариди и полисахариди настају међусобним повезивањем молекула моносахарида (или деривата моносахарида) **гликозидним везама**.

Организми користе угљене хидрате за различите **функције**: као извор енергије у ћелијама (глукоза), као складиште енергије (скроб), за изградњу чврстих структура (целулоза, хитин), као маркере идентитета на ћелијским зидовима, као компоненте нуклеотида који изграђују ДНК и РНК молекуле, као компоненте коензима (нпр. коензима А, NADH и FADH₂ коензима) и енергијом богатих АТФ молекула и друге.

Угљени хидрати (тј. молекули глукозе) примарно настају у зеленим биљкама из угљеник (IV)-оксида и воде у процесу који се назива **фотосинтеза**, а затим се повезују у полимерне ланце скроба. Биљне ћелије синтетишу и целулозу (полимер глукозе) и пектинске материје (полимери деривата глукозе).

У неким животињским ћелијама молекули глукозе се могу синтетисати из неугљенохидратних прекурсора у процесу **глюконеогенезе**, а складиште се као полимерни гликоген. Животињске ћелије синтетишу и полимере деривата моносахарида: хијалуронску киселину и друге гликосаминогликане, хитин итд.

Моносахариди су полихидроксилловани алдехиди (**алдозе**) и полихидроксилловани кетони (**кетозе**), а дужина угљеничног низа може бити од 3 до 9 атома угљеника. И алдозе и кетозе се према дужини угљеничног низа деле на: триозе, тетрозе, пентозе, хексозе, хептозе, октозе и нонозе. Моносахариди су чврсте супстанце беле боје које се добро растварају у води при чему настају безбојни раствори. Моносахариди садрже велики број хиралних центара, због чега је могућ значајан број стереоизомера (2^n , n-број хиралних C атома), а природни моносахариди припадају D-серији. **Глукоза** (алдохексоза) је најзначајнији извор енергије за већину организама, а такође је основни структурни елемент најраспрострањенијих хомодисахарида (малтозе и целобиозе) и хомополисахарида (амилозе, амилопектина, гликогена и целулозе).

хомо ди-/поли- сахариди ≡ понављајуће јединице су **исте**
хетеро ди-/поли- сахариди ≡ понављајуће јединице су **различите**

Галактоза (алдохексоза) улази у састав лактозе, хетеродисахарида из млека сисара. **Фруктоза** (кетохексоза) улази у састав дисахарида сахарозе (кухињски шећер) и у састав полисахарида фруктана (нпр. инулина). Рибоза (алдопентоза) улази у састав РНК молекула. Моносахариди у воденим растворима циклизују услед реакције алдехидне групе са хидроксилном групом удаљеном четири или пет угљеникових атома, услед чега се граде петочлани (фуранозни) или шесточлани (пиранозни) **полуацетални** прстенови, Слика 4.2.

Деривати моносахарида настају ензимски катализованим модификацијама моносахарида. Најзначајнији деривати су: шећерне киселине (нпр. глукуронска киселина и идуронска киселина), аминок шећери (нпр. глюкозамин, галактозамин, *N*-ацетил-глюкозамин, *N*-ацетил-галактозамин), фосфатни естри шећера (нпр. глюкоза-6-фосфат, фруктоза-1,6-бисфосфат), деокси шећери (нпр. деоксирибоза), шећерни алкохоли (нпр. рибитол, глицитол, манитол) и гликозиди (сви олигосахариди и полисахариди).

У енергетском метаболизму ћелија најзначајнији су фосфатни естри шећера (нпр. сви интермедијери гликолизе); за изградњу хетерополисахарида као што је хијалуронска киселина, потребне су шећерне киселине и аминок шећери. Деоксирибоза изграђује деоксинуклеотиде који изграђују ДНК ланце. Рибитол улази у састав структуре витамина Б₂.

Олигосахариди садрже од два до десет остатака моносахаридних јединица везаних **гликозидним везама** (кисеонични ацетални мостови). Најраспрострањенији су **дисахариди** који су изграђени од два иста (хомо) или два различита (хетеро) моносахаридна остатка. Нпр. малтоза и целобиоза су хомодисахариди од два остатка глюкозе, док су нпр. лактоза и сахароза хетеродисахариди и настају повезивањем галактозе и глюкозе односно глюкозе и фруктозе.

На основу оксидоредукционих својстава, сахариди се деле на: **редукујуће** и **нередукујуће**. Редукујући шећери могу да учествују у **оксидоредукционим реакцијама** и при томе се оксидују до одговарајуће киселине, док се други реактант у реакцији редукује. Редукујући шећери (моносахариди и неки дисахариди) у својој стурктури имају бар једну слободну полуацеталну групу, за разлику од нередукујућих који не садрже слободну полуацеталну функцију на аномерном центру, па стога не подлежу поменутим реакцијама. Пример нередукујућих дисахарида је сахароза.

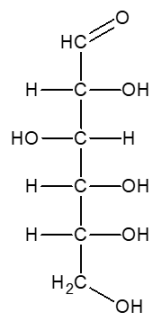
Полисахариди су полимери великог броја остатака моносахаридних јединица или њихових деривата. Могу бити линеарни или рачвасти. У природи су најраспрострањенија два хомополисахарида D-глюкозе: скроб и целулоза. Скроб се налази у врло великим количинама у биљкама где је главни складишни облик молекулског горива. Скроб је смеша два полисахарида: **амилозе** (линеарна фракције скроба) и **амилопектина** (разграната фракција скроба). Амилоза је линеарни полимер ланаца α -D-глюкопиранозе. Амилопектин је разгранати полимер α -D-глюкопиранозе, а рачвања се јављају на сваких 25-30 глюкозних јединица. Целулоза је линеарни полимер ланаца β -D-глюкопиранозе. Целулоза је највећим делом ванћелијски структурни састојак влакнастих и дрвенастих ткива биљака. Полисахариди су такође важни састојци ћелијских зидова бактерија и биљака и меких ћелијских превлака у животињским ткивима.

По хемијском саставу полисахариди се деле на једноставне и коњуговане. У састав једноставних полисахарида улазе само моносахариди и/или њихови једноставни деривати. У састав коњугованих полисахарида, поред моносахарида и њихових деривата улазе и извесне не-угљенохидратне компоненте, као што су на пример, пептиди, полипептиди (гликопептиди, гликопротеини) или липиди (гликолипиди).

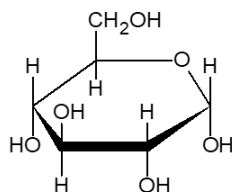
Према биолошкој функцији скроб и гликоген припадају скалдишним полисахаридима, док су целулоза и хитин структурни полисахариди. Хијалуронска киселина и други гликозаминогликани углавном имају заштитну функцију.

У биосфери, тј. целокупној живој материји, вероватно је присутно више угљених хидрата него све остале органске материје заједно, добрим делом због распрострањености два полимера D-глюкозе – целулозе и скроба.

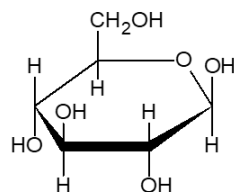




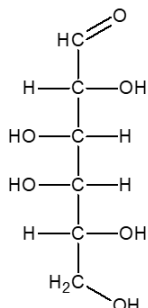
D-глюкоза



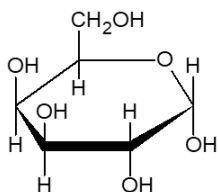
α-D-глюкопираноза



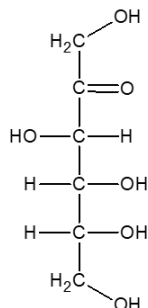
β-D-глюкопираноза



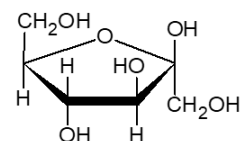
D-галактоза



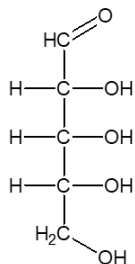
α-D-галактопираноза



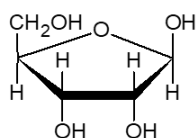
D-фруктоза



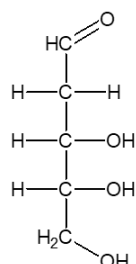
β-D-фруктофураноза



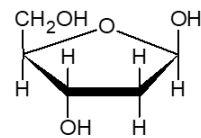
D-рибоза



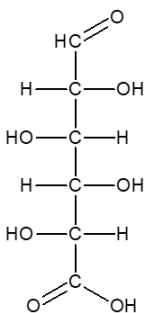
β-D-рибофураноза



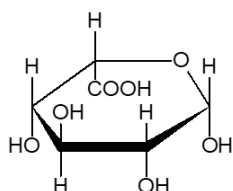
D-деоксирибоза



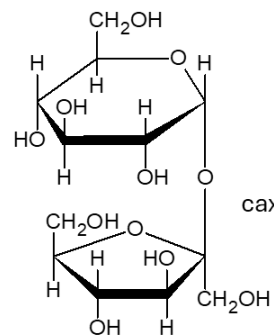
2'-β-D-деоксирибофураноза



L-идуронска киселина

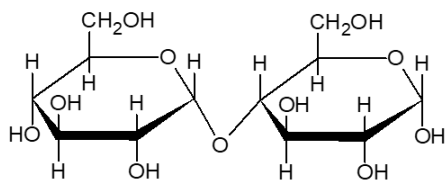


β-L-идуронска киселина



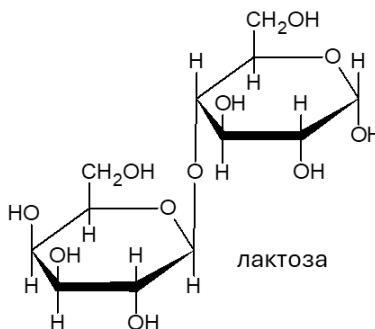
сахароза

β-D-фруктофуранозил-α-D-глюкопираноза



малтоза

α-D-глюкопиранозил-α-D-глюкопираноза



лактоза

β-D-галактопиранозил-α-D-глюкопираноза

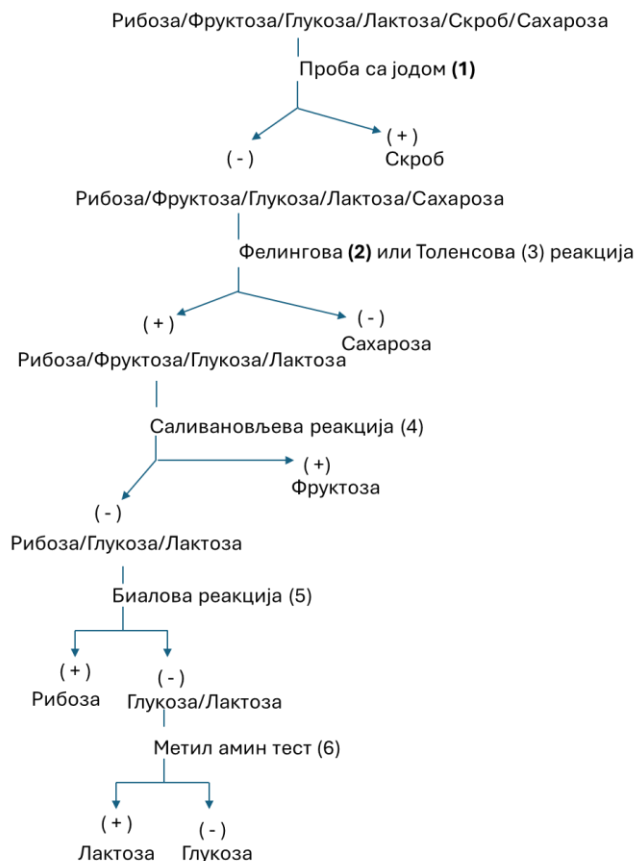
Слика 4.2. Структурне формуле молекула различитих угљених хидрата

Експериментални део

Вежба УХ1. Квалитативне реакције на угљене хидрате – идентификација раствора угљених хидрата

Методологија

Квалитативним реакцијама одређују се хемијска својства супстанци, тј. доказује се присуство карактеристичних функционалних група у молекулима. Одабрано је шест реакција којима се могу разликовати полисахариди од олигосахарида (1), редукујући од нередукујућих шећера (2, 3), кетозе од алдоза (4), пентозе од хексоза (5) и дисахариди од моносахарида (6), као што је приказано на Слици 4.3. Праћењем задатог редоследа бојених реакција може се одредити који раствор угљених хидрата представља непозната анализа.

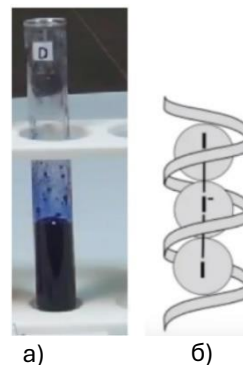


Слика 4.3. Шема редоследа квалитативних реакција за идентификацију врсте угљених хидрата у непознатом узорку

Проба са јодом (1) - тест на присуство скроба

Реакција скроба са јодом заснована је на образовању инклузионог комплекса који се формира када се у амилозу (линеарну фракцију скроба) увијену у хеликс (спиралу) инкорпорирају (углављују) молекули јода. Боја раствора постаје **тегет-црна** (Слика 4.4). Настали комплекс је нестабилан на повишеној температури, што се манифестује као ишчезавање боје при загревању епрувете у воденом купатилу, али се хлађењем боја враћа.

Слика 4.4. а) Карактеристична боја инклузионог комплекса и б) спирала коју формира линеарна фракција скроба.



Фелингова реакција (2) - тест на редукујуће шећере

Фелингов реагенс који се користи у овој **оксидоредукционој реакцији** чине два раствора која се одвојено припремају, а непосредно пре извођења огледа се мешају у запреминском односу (1:1) и загревају. Први раствор, Фелинг 1 (светло-плаве боје) је водени раствор бакар(II)-сулфата (CuSO_4), а други раствор, Фелинг 2 (безбојан) је алкални раствор калијум-натријум-тартарата. У овој оксидоредукционој реакцији, јони Cu^{2+} се редукују до Cu^+ јона који се таложе у облику нерастворног, **црвено обојеног бакар(I)-оксида**, Cu_2O . Јони бакра (Cu^{2+}) одузимају електроне молекулима моносахарида (шећера) који се оксидују до одговарајућих шећерних киселина.

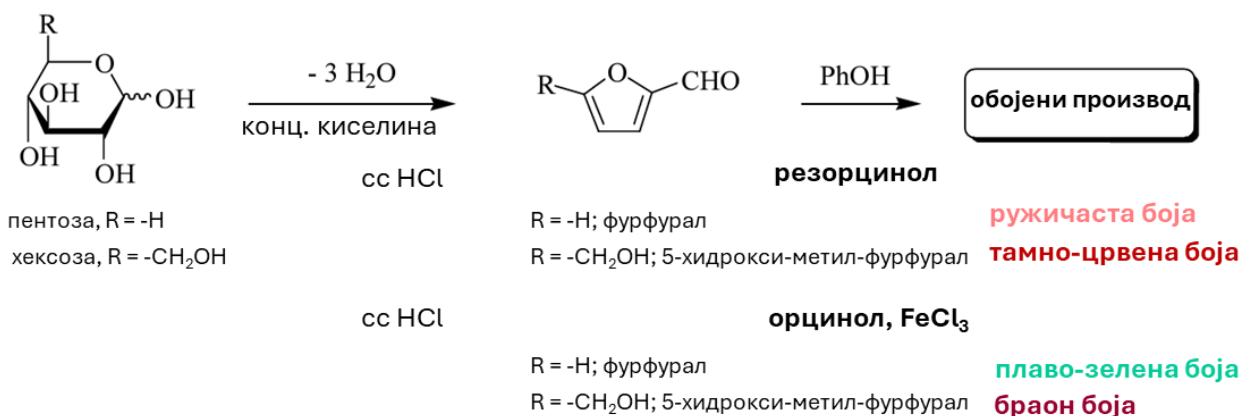
У овом огледу позитивну реакцију дају раствори моносахарида и неких дисахарида, али ће при испитивању раствора сахарозе и раствора трехалозе (нередукујући шећери), изостати издвајање црвеног талог, тј. реакција ће бити негативна. Ако у раствору има редукујућих шећера уочава се промена боје: из тамно-плавог раствора таложи се црвени талог.

Толенсова реакција (3) - тест на редукујуће шећере

Толенсова реакција, или реакција добијања Толеновог огледала, је такође оксидоредукциона реакција у којој је оксидационо средство амонијачни раствор сребро-нитрата. Јони Ag^+ се у току реакције редукују до елементарног сребра (Ag), а молекули редукујућих шећера (моносахарида или редукујућих дисахарида) се оксидују до молекула шећерних киселина. Ако се епрувета у којој се изводи оглед дуже загрева издвојено елементарно сребро се таложи на зидовима епрувете попут огледала, одатле и назив огледа.

Реакције дехидратације шећера концентрованим киселинама

Моносахарида су стабилни при загревању са разблаженим минералним киселинама. Концентроване киселине изазивају **дехидратацију** молекула моносахарида при чему петогљенични моносахарида (попут рибозе) постају молекули фурфурала, док шестогљенични моносахарида (попут глукозе, фруктозе, галактозе) постају 5-хидроксиметил-фурфурал. Они могу реаговати са различитим молекулима фенолне структуре, дајући интензивно обојене кондензационе производе (Слика 4.5).



Слика 4.5. Опште реакције дехидратације пентоза и хексоза и кондензација са фенолним једињењима. Саливановљева реакција у присуству ссHCl и резорцинола; и Биалова реакција у присуству ссHCl , орцинола и FeCl_3

Саливановљева реакција (4) - тест на кетозе

У Саливановљевој реакцији фенолно једињење је **резорцинол**, који у реакцији са насталим хидроксиметилфурфурлом (фурфуралом) гради кондензациони производ различитог интензитета црвене боје. Хидроксиметилфурфурал се продукује знатно брже из молекула кетоза, него из молекула алдоза. Због тога ће за исто време и под истим условима, раствор који садржи Саливановљев реагенс и раствор фруктозе (кетохексоза) постати тамно-црвено обојен, док ће раствор са глукозом (алдохексоза) бити тек ружичасто обојен. Стога, ова реакција служи за разликовање кетоза од алдоза.

Биалова реакција (5) - тест на пентозе

У Биаловој реакцији фенолно једињење је **орцинол**, који са фурфуралима (насталим из пентоза) у присуству гвожђе (III)-хлорида (FeCl_3) гради **зелени** кондензациони производ. У истој реакцији са 5-хидрокси-метил-фурфуралима (насталим из хексоза) настаје **мрки** кондензациони производ. Стога, ова реакција служи за разликовање пентоза од хексоза.

Специфичан тест за лактозу (6)

У алкалном раствору **метиламин** реагује са алдехидном групом глюкозног остатка у молекулу лактозе (и сличних дисахарида) формирајући Шифову базу која има жуто-браон боју. Уколико се садржај епрувете дуже загрева, боја може да се мења као последица даљих реакција или полимеризације у базној средини, водећи настанку комплексних производа. Ова реакција се не одвија у раствору моносахарида, иако је присутна слободна полуацетална група. У случају позитивне реакције, жута боја ће постепено прелазити у тамно црвену.



Слика 4.6. Лактоза са метиламином даје једињења типа Шифових база. Моносахариди не реагују.

Реагенси и прибор: Луголов раствор (4 g јода (I_2) и 6 g калијум-јодида (KI) растворити у дестилованој води у одмерној тиквици и допунити до 100 cm^3); Фелинг 1 (34,6 g бакар(II)-сулфата ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) растворити у 500 cm^3 дестиловане воде); Фелинг 2 (60 g натријум-хидроксида (NaOH) и 173 g калијум-натријум-тартарата растворити у 500 cm^3 дестиловане воде); 1% раствор сребро-нитрата (AgNO_3); амонијак (ccNH_3); Саливановљев реагенс (0,05 g резорцинола растворити у 100 cm^3 разблажене (1:2) хлороводоничне киселине (HCl); Биалов реагенс (1 g орцинола одмерити у ерленмајер, пажљиво додати 500 cm^3 30% раствора хлороводоничне киселине (HCl), мућкати до потпуног растварања орцинола, а затим додати 10% раствор гвожђе(III)-хлорида, (FeCl_3). Реагенс чувати у тамној, добро затвореној боци); 5% раствор метил-амонијум-хлорида; сталак са епруветама; водено купатило, пипете (1, 2 и 5 cm^3).

Узорак: анализа 1, анализа 2 (1% раствор угљених хидрата)

(1) Проба са јодом за разликовање полисахарида од олигосахарида

Поступак: сипати у епрувету 1 cm^3 раствора непознате анализе и додати 2-3 капи Луголовог раствора.

(2) Фелингова реакција за разликовање редукујућих од нередукујућих шећера

Поступак: додати у једну епрувету по 1 cm^3 раствора Фелинга 1 и Фелинга 2, промућкати и загрејати садржај епрувете у воденом купатилу. Приликом загревања реагенс не сме да промени боју, остаје теget обојен, у противном реагенс није исправан. Врућем раствору реагенса додати 2 cm^3 врућег раствора непознате анализе (претходно загрејаног у другој епрувети) и загревати још 5 минута.

(3) Толенсова реакција за разликовање редукујућих од нередукујућих шећера

Поступак: у епрувету додати 5 cm^3 раствора сребро-нитрата, а потом додавати у капима раствор амонијака све до појаве талога, а затим и даље док се талог потпуно не раствори. Потом додати 2 cm^3 раствора непознате анализе и загрејати.

(4) Саливановљева реакција за разликовање кетоза од алдоза

Поступак: сипати 1 cm³ раствора непознате анализе у епрувету, додати 2 cm³ Саливановљевог реагенса и уронити епрувету у кључало водено купатило.

(5) Биалова реакција за разликовање пентоза од хексоза

Поступак: сипати у епрувету 1 cm³ непознате анализе и додати 1 cm³ орцинолног реагенса. Смешу загревати на кључалом воденом купатилу у току 20 минута.

напомена за огледе (4) и (5)

избегавати продужено загревање епрувета са непознатом анализом јер оно може водити „лажно позитивном тесту” код алдоза. Ово важи и код Биалове реакције, јер продуженим загревањем и неке хексозе дају обојени комплекс попут пентоза.

(6) Метиламин тест за разликовање дисахарида од моносахарида

Поступак: у 2 cm³ непознате анализе додати 5 капи 20% раствора натријум-хидроксида (NaOH) и 5 капи 5% раствора метил-амонијум-хлорида (CH₃(NH₃)⁺Cl⁻). Загревати у врелом воденом купатилу.

Поступак: користећи упуства из Табеле 4.1. редом изводити бојене реакције на узорку (непозната анализа) и уписивати добијене резултате у Табелу 4.2. На основу резултата квалитативних реакција извести закључак који угљених хидрат је садржала анализа.

Табела 4.1. Редослед додавања реагенса у вежби УХ1

Проба са јодом	Фелингова реакција	Саливановљева реакција	Биалова реакција	Метиламин тест
1 cm ³ раствора анализе	1 cm ³ раствора Фелинга 1	1 cm ³ раствора анализе	1 cm ³ раствора анализе	2 cm ³ раствора анализе
2-3 капи Луголовог	1 cm ³ раствора Фелинга 2	2 cm ³ Саливановљевог реагенса	1 cm ³ орцинолног реагенса	5 капи 20% раствора натријум-хидроксида
промићкати садржај епрувете	загрејати	загрејати у кључалом воденом купатилу	загрејати у кључалом воденом купатилу у току 20 мин	5 капи 5% раствора метил-амонијум-хлорида
	2 cm ³ раствора анализе претходно загрејане у посебној епрувети			
	сјединити топли Фелингов реагес и топли раствор анализе			
	загревати још око 5 мин			

Табела 4.2. Приказ резултата квалитативне анализе непознатих узорака

Непозната анализа 1	Непозната анализа 2
Проба са јодом	
тегет-црни раствор (+): скроб	тегет-црни раствор (+): скроб
безбојан или жућкаст раствор (-): рибоза, фруктоза, глюкоза, лактоза, сахароза	безбојан или жућкаст раствор (-): рибоза, фруктоза, глюкоза, лактоза, сахароза
Фелингова или Толенсова реакција	
црвени талог (+): рибоза, фруктоза, глюкоза, лактоза	црвени талог (+): рибоза, фруктоза, глюкоза, лактоза
плави раствор (-): сахароза	плави раствор (-): сахароза
Саливановљева реакција	
тамно црвени раствор (+): фруктоза	тамно црвени раствор (+): фруктоза
ружичасти или светло црвени раствор (-): рибоза, глюкоза, лактоза	ружичасти или светло црвени раствор (-): рибоза, глюкоза, лактоза
Биалова реакција	
зелени раствор (+): рибоза	зелени раствор (+): рибоза
мрки раствор (-): глюкоза, лактоза	мрки раствор (-): глюкоза, лактоза
Метил-амин тест	
тамно црвени раствор (+): лактоза	тамно црвени раствор (+): лактоза
жућкасти раствор (-): глюкоза	жућкасти раствор (-): глюкоза

Закључак:

Вежба УХ2. Квалитативне реакције – разлике у хемијским својствима раствора кухињског шећера и меда.

Методологија

Сахароза је дисахарид изграђен од остатака глюкозе и фруктозе повезаних гликозидном везом, тако да у молекулу нема слободне полуацеталне групе (нередукујући шећер). Кисела хидролиза сахарозе до D-глюкозе и D-фруктозе често се назива инверзијом, при чему настаје еквимоларна смеша глюкозе и фруктозе (инвертни шећер). Мед је смеша глюкозе и фруктозе у еквивалентним количинама која настаје разлагањем сахарозе. Пчеле поседују ензим **инвертазу** која хидролизом сахарозе даје мед. Мед се назива и природни инвертни шећер. Овом вежбом може се доказати и нестабилност гликозидне везе у јако киселој средини на повишеној температури.

Термин инвертни шећер потиче од рада на полариметру и мерења оптичке активности раствора сахарозе и истог раствора након хидролизе сахарозе. Казаљка на инструменту полариметра се помера ка негативним вредностима (тј. долази до *инверзије* специфичног угла ротације), као последица разлагања сахарозе на еквимоларну смешу глюкозе и фруктозе.

Реагенси и прибор: Фелинг 1, Фелинг 2, стакл са епруветама, водено купатило

Узорци: 1% раствор меда, 1% раствор сахарозе, хидролизат сахарозе.

Поступак: припремити хидролизат сахарозе по следећем упутству: у 1 cm³ 1% раствора сахарозе додати 1 кап концентроване сумпорне киселине и раствор загрејати на кључалом воденом купатилу 3 минута. Охладити садржај епрувете и неутралисати га додавањем засићеног раствора натријум-карбоната, пратити издвајање мехурића.

У три различите епрувете сипати по 1 cm³ различитих узорака: 1% раствора меда, 1% раствора сахарозе и хидролизата сахарозе и епрувете загрејати на воденом купатилу.

Испитати реактивност узорака у реакцији са Фелинговим реагенсом на следећи начин: у три епрувете сипати по 1 cm³ раствора Фелинга 1 и Фелинга 2, промућкати и загрејати у воденом купатилу. Врућим растворима реагенаса додати по 1 cm³ врућих узорака: раствора меда (у прву епрувету), раствора сахарозе (у другу) и хидролизата сахарозе (и трећу) и загревати још 5 минута.

На основу резултата Фелингове реакције на растворима сахарозе и меда извести закључак о разликама у структури њихових молекула.

Запажање:

Датум и овера асистента (6):

__ / __ / ____

5

КВАНТИТАТИВНО ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПИДА, ПРОТЕИНА И УГЉЕНИХ ХИДРАТА

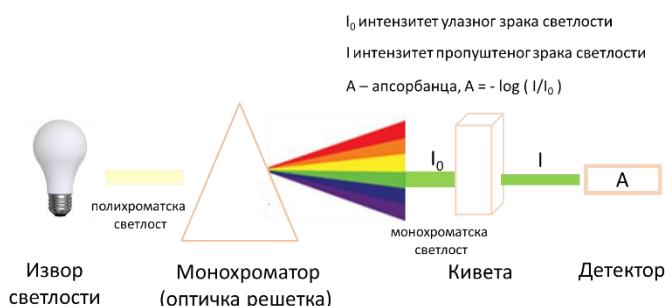
Задаци

- Применом различитих спектрофотометријских метода одреди садржај липида, протеина и угљених хидрата у узорку млека. Добијене резултате упоредити са подацима о нутритивним вредностима наведеним на амбалажи анализираниог млека.

Теоријски део

квантитативно $\equiv$ мерљиво

Због своје прецизности, поузданости и једноставности, спектрофотометријске методе су један од најважнијих алата за квантитативну анализу у многим научним и индустријским дисциплинама и то без претходне изолације мереног анализата (супстанце која се анализира, тј. чија се количина одређује). Неопходни услови за примену спектофотометрије јесу да: аналит апсорбује светлост при одређеној таласној дужини, или да постоји реагенс који селективно реагује са анализатом, а остали присутни молекули из сложеног матрикса не ометају мерење; да је узорак провидан, да концентрација анализата буде у одговарајућем опсегу, јер превелике концентрације могу проузроковати потпуну апсорпцију светлости чиме се губи линеарна веза између концентрације и апсорбанције, по Ламбер-Беровом закону ($A = \epsilon \cdot a \cdot c$, A - апсорбанција, ϵ - моларна апсорптивност, a - дужина оптичког пута, c - концентрација анализата). Инструмент који се користи у спектрофотометријским мерењима је спектрофотометар. Он мери количник интензитета улазног и излазног зрака монохроматске светлости (тј. негативан логаритам овог количника, тј. апсорбанцу). Монохроматска светлост се добија разлагањем беле светлости на оптичкој решетки.



Слика 5.1. а) Принцип рада спектрофотометра. б) Фотографија спектрофотометра

При раду на спектрофотометру основни кораци су:

- укључити апарат и пре мерења чекати бар 10 минута
- подесити таласну дужину мерења (λ)
- анулирати спектрофотометар на слепу пробу (раствор који не садржи аналит)
- измерити апсорбанцу анализе
- измерити апсорбанцу стандардног раствора - раствор познате концентрације на основу којег се прерачунава концентрација анализата.

Експериментални део

Вежба С1. Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних липида у млеку

Методологија

Липиди се из млека екстрахују (издвајају) смешом метанол – хлороформ (1:1). Екстраховани липиди се загревају са концентрованом сумпорном киселином (да би дошло до њихове хидролизе) након чега се додаје реагенс за липиде (садржи фосфорну киселину и ванилин), који у реакцији са липидима граде ружичасто-црвени комплекс. Интензитет боје насталог комплекса је пропорционалан концентрацији липида и мери се спектрофотометријски на таласној дужини између 510 nm и 550 nm.

Реагенси и прибор: хлороформ (CHCl_3), метанол (CH_3OH), концентрована сумпорна киселина (с H_2SO_4); реагенс за липиде (растворити 1,98 g ванилина у 782 cm^3 фосфорне киселине (85%) и допунити дестилованом водом до 1000 cm^3); 10 mg/cm^3 раствор холестерола у етанолу (растворити 1 g холестерола у апсолутном етанолу и допунити до 100 cm^3); шлифовани ерленмајер и одговарајући чеп; епрувете; аутоматске пипете; водено купатило, спектрофотометар; кивете за спектрофотометар; одмерна тиквица (100 cm^3 , 1000 cm^3), центрифуга, епрувете за центрифугу.

Узорак: млеко

Стандардни раствор: етанолни раствор холестерола, концентрације 10 mg/cm^3

Поступак: у ерленмајеру запремине 500 cm^3 припремити смешу метанола и хлороформа мешањем 25 cm^3 метанола и 50 cm^3 хлороформа. У исти ерленмајер додати 75 cm^3 млека и оставити на мућкалицу током 15 минута. Затим смешу поделити у шест епрувета за центрифугирање и центрифугирати у току 15 минута на 3500 обртаја у минути, на температури од 4°C. Након центрифугирања доњи, хлороформски слој (у ком се налазе липиди) одвојити у балон за упаравање и упарити хлороформ до сува на ротационом вакуум упаривачу (Слика 5.2). Након тога суви остатак растворити у 2 cm^3 етанола и користити за даљу анализу садржаја липида у млеку.



Слика 5.2. Фотографија вакуум упаривача

Обележити две епрувете (једну епрувету за анализу, једну за стандард) и у одговарајућу епрувету одмерити 0,05 cm^3 раствора анализе, односно 0,05 cm^3 раствора стандарда. Затим у обе додати по 2,0 cm^3 концентроване сумпорне киселине (с H_2SO_4).

Садржај епрувета промућкати, запушити епрувете ватом и оставити у кључалом воденом купатилу у току 10 минута. Док се епрувете хладе, обележити три нове суве епрувете (једну за анализу, једну за стандард и једну за слепу пробу), и додавати реагенсе према редоследу приказаном у Табели 5.1.

Табела 5.1. Раствори припремљени за одређивање садржаја укупних липида у вежби С1

	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5
	Анализа	Стандард	Слепа проба
Раствор из епрувете 1 (анализа)	0,1 cm^3		-
Раствор из епрувете 2 (стандард)		0,1 cm^3	
Концентрована cH_2SO_4	-	-	0,1 cm^3
Реагенс за липиде	2,5 cm^3	2,5 cm^3	2,5 cm^3
	Инкубација на собној температури у току 30 минута		
	Мерење апсорбације на 530 nm		

Интензитет обојења раствора анализе и раствора стандарда одредити мерењем на спектрофотометру, након подешавања нуле инструмента на таласној дужини од 530 nm. Прво мерити апсорбанцију мање обојеног раствора.

Пажљиво сипати раствор у кивету спектрофотометра како се не би створили мехурићи.

Израчунати садржај липида у млеку користећи следећу формулу:

$$mg \text{ липида } / 100 \text{ cm}^3 = \frac{A_{\text{анализе}}}{A_{\text{стандарда}}}$$

и упоредити га са садржајем липида у млеку наведеном на амбалажи.

Запажање:

$A_{\text{анализа}} =$

$A_{\text{стандард}} =$

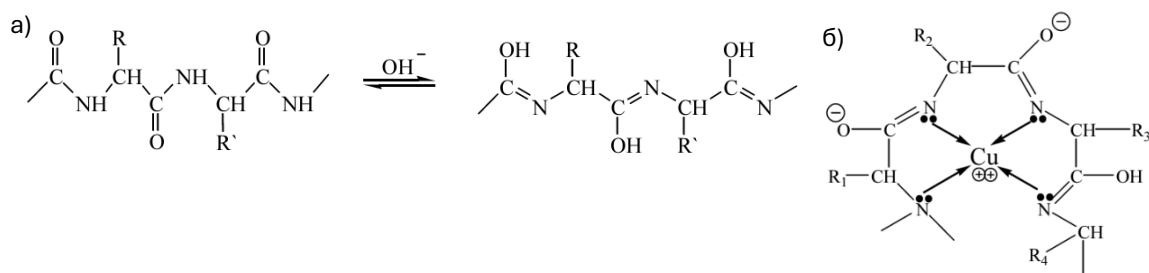
Резултат:

Вежба С2. Спектрофотометријско одређивање садржаја протеина методом по Лоурију

Методологија

Биуретска реакција је једна од најчешће коришћених доказних реакција за протеине. Заснива се на грађењу љубичастог комплекса између аминокислеинских остатака молекула протеина и јона бакра (Cu^{2+} јона) у базној средини.

Механизам ове реакције укључује претходну енолизацију пептидних група (Слика 5.3а) у алкалној средини. Енолизовани пептидни ланац у присуству јона бакра (Cu^{2+} јона) даје комплексно једињење (Слика 5.3б).



Слика 5.3. а) Кето-енол таутомерија пептидног ланца; б) грађење комплекса олигопептида са јонима Cu^{2+}

Метода по Лоурију (Lowry) за одређивање садржаја протеина подразумева се мерење интензитета **плаве боје** раствора протеина која је последица две реакције: биуретске (додатак раствора бакар(II)-сулфата у базној средини) и реакције тирозинских и цистеинских остатака у молекулима протеина са Фолиновим реагенсом (смеша фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине). Предност Лоријеве методе у односу на биуретску је то што се захваљујући комбинацији ових реакција могу одређивати протеини у врло разблаженим растворима. Апсорбанција се мери на 540 nm и пропорционална је концентрацији протеина у узорку.

Реагенси и прибор: раствор 1 (2% раствор натријум-карбоната (Na_2CO_3)), 0,02% раствор калијум-натријум-тартарата у 0,1 mol/dm³ раствору натријум-хидроксида; раствор 2 (0,5% раствор бакар(II)-сулфата), 0,35 mol/dm³ раствор Фолиновог реагенса; одмерна тиквица (10 cm³, 250 cm³), ерленмајер са брушеним чепом (25 cm³), мензура (100 cm³), аутоматске пипете (0,1 , 0,5 и 1 cm³), стакал са епруветама, спектрофотометар са киветама.

Узорак: млеко

Стандардни раствор протеина: 0,1 mg/ cm³ раствор албумина изолованог из говеђег крвног серума

Поступак: припремити стандардни раствор протеина растварањем 1 mg албумина у нормалном суду од 10 cm³. Припремити узорак разблаживањем 0,5 cm³ млека у нормалном суду од 250 cm³ и након допуњавања водом до црте, хомогенизовати благим мућкањем. Припремити реагенс за биуретску реакцију мешањем 50 cm³ раствора 1 и 1 cm³ раствора 2 у ерленмајеру од 100 cm³. Након тога, додавати растворе у осам претходно обележених епрувета, редоследом који је наведен у Табели 5.2.

Табела 5.2. Редослед додавања реагенаса у вежби С2.

Број епрувете	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	сп	калибрациона крива					анализа	
Дестилована вода (cm ³)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,5	0,5
Албумин (cm ³)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0	0
Узорак (разблажено млеко) (cm ³)	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Реагенс за биуретску реакцију (cm ³)	1	1	1	1	1	1	1	1
Инкубација на собној температури у току 10 мин								
Фолинов реагенс (cm ³)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Инкубација на собној температури у току 30 минута								
Измерити апсорбанцију на 540 nm								

скраћенице: сп – слепа проба

Епрувета 1 представља слепу пробу (не садржи ни узорак ни стандард) коју користимо за подешавање нуле инструмента, на 540 nm. Епрувете 2-6 садрже стандардне растворе албумина (тј. растворе познатих концентрација албумина) и служе за конструисање калибрационе криве. Калибрациона крива представља график зависности апсорбанције (мерена величина, на у оси) од концентрације протеина (на х оси).

Епрувете 7 и 8 садрже узорак разблаженог млека у коме се одређује садржај протеина (непозната концентрација), на основу измерене апсорбанције, након читавања одговарајуће вредности концентрације са калибрационе криве.

Резултате мерења уписати у Табелу 5.3., конструисати калибрациону криву и израчунати садржај протеина у млеку (водити рачуна о разблажењу). Добијени резултат упоредити са оним наведеним на амбалажи млека.

Радна концентрација представља стварну концентрацију анализата у реакционој смеши која се израчунава када узме у обзир разблажење основне концентрације додатком свих реагенаса потребних за реакцију.

Табела 5.3. Резултати мерења апсорбанције на 540 nm

Број епрувете	1	2	3	4	5	6	Узорак 1	Узорак 2
конц. албумина (μg/ cm ³)	0	20	40	60	80	100	-	-
конц. млечних протеина							?	?
A (на 540 nm)	0							

Калибрациона крива:

Запажање:

Вежба С3. Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних шећера у млеку

Методологија

Реакције коришћене за квалитативно одређивање угљених хидрата се уз коришћење одговарајућих стандардних раствора могу користити и за квантитативно одређивање садржаја угљених хидрата. За одређивање укупних шећера може да се користи реакција која се заснива на дехидратацији угљених хидрата сумпорном киселином и грађењу обојеног производа са орцинолом.

Реагенси и прибор: 1% раствор орцинола у $\text{cc H}_2\text{SO}_4$, концентрована сумпорна киселина ($\text{cc H}_2\text{SO}_4$), 5 mol/dm^3 раствор глукозе; спектрофотометар са киветама, нормални судови од 10 cm^3 и 250 cm^3 , ерленмајер са брушеним чепом (25 cm^3), мензура (100 cm^3), аутоматске пипете ($0,1 \text{ cm}^3$, $0,5 \text{ cm}^3$ и 1 cm^3), сталак са епруветама.

Узорак: млеко

Стандардни раствор угљених хидрата: раствор глукозе

Поступак: обележити осам епрувета и додавати растворе редоследом који је наведен у Табели 5.4.

Табела 5.4. Редослед додавања реагенаса у вежби С3.

Број епрувете	1	2	3	4	5	6	7	8
	сп	калибрациона крива					анализа	
дестилована вода (cm^3)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0	-	-
5 mol/dm^3 глукозе (cm^3)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-
разбл. узорак (cm^3)							0,5	0,5
$\text{cc H}_2\text{SO}_4$ (cm^3)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Инкубација на собној температури у току 30 минута уз мешање							
Орцинолни реагенс (cm^3)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	Кување на 95°C у току 5 мин, уз повремено мућкање							
	Хлађење у току 10 мин							

скраћенице: сп – слепа проба

Након хлађења раствора, измерити апсорбанције раствора на таласној дужини 475 nm и вредности измерених апсорбанција уписати у Табелу 5.5.

Табела 5.5. Резултати мерења апсорбанције на 475 nm

епрувета	1	2	3	4	5	6	Узорак 1	Узорак 2
концентрација глукозе ($\mu\text{g/cm}^3$)	0	20	40	60	80	100	-	-
концентрација шећера у млеку							?	?
A (на 475 nm)	0							

Аналогно, као код одређивања садржаја протеина у млеку, епрувета 1 представља слепу пробу, епрувете од 2 до 6 су разблажења стандардног раствора глукозе и служе за

конструисање калибрационе криве. На основу калибрационе криве и измерених вредности апсорбанција за узорак млека (епрувете 7 и 8) израчунати садржај шећера у млеку и упоредити га са вредностима на амбалажи.

Калибрациона крива:

Запажање:

Датум и овера асистента (7):

__/__/____

Задаци

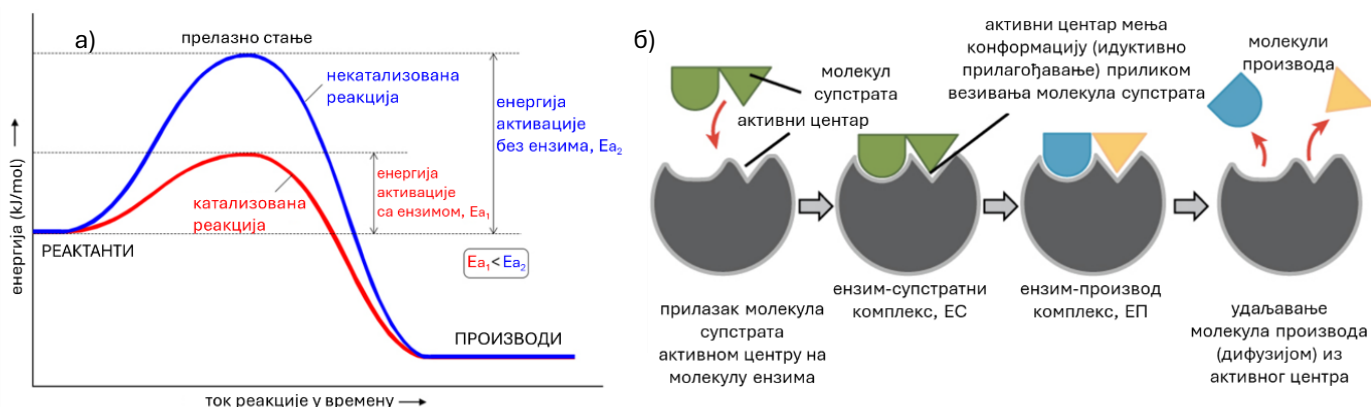
- Пратити утицај температуре, рН вредности и концентрације ензима на брзину ензимске реакције на примеру активности каталазе из кромпира.
- Испитати специфичност деловања ензима: амилазе, сахаразе и уреазе.

Теоријски део

Ензими су биолошки катализатори који су по структури најчешће **глобуларни протеини**, мада каталитичку функцију могу да врше и неки молекули рибонуклеинских киселина (тзв. рибозими).

Катализатори су супстанце које убрзавају реакције, а из реакције излазе непромењени.

Своју функцију да убрзавају биохемијске реакције ензими остварују снижавањем енергије активације реакције (Слика 6.1. а), везујући реактант (супстрат) у комплекс (ензим-супстратни комплекс, ЕС) и олакшавајући раскидање постојећих веза у молекулу супстрата и настанак новог/нових производа. Молекули ензима из реакција излазе непромењени (Слика 6.1. б).

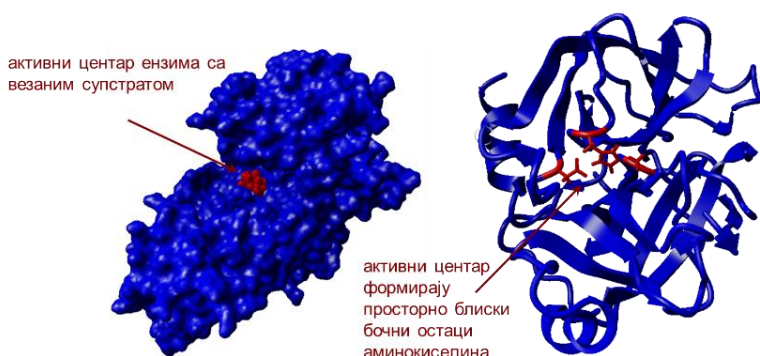


Слика 6.1. а) Дијаграм разлика у енергији активације катализоване и некатализоване реакције.
б) Фазе одвијања биохемијске реакције у активном центру ензима.

Место на ензиму за које се везује супстрат и у којем се дешава катализа је **активни центар** ензима. Њега формирају бочни остаци аминокиселина који су просторно блиско распоређени (Слика 6.2).

Сваки ензим се може идентификовати тј. именовати на три начина:

1. кодним (класификационим) бројем у форми четири броја: ЕС број 1.1.1.1 (ЕС – *Enzyme commission*), где је први – тип реакције коју катализује ензим (група), други – подгрупа, трећи – под-подгрупа, а четврти број произвољно додељени серијски број у под подгрупи,
2. системским називом (формира се према строго дефинисаним правилима и детаљно описује реакцију коју ензим катализује),
3. препорученим/тривијалним називом.



Слика 6.2. Активни центар ензима

У пракси се најчешће користе препоручени називи – који представљају скраћену верзију системског назива и садрже неку информацију о функцији ензима: нпр. назив супстрата који се разлаже, уз суфикс **-аза** (уреаза, сахараза, амилаза) или описује каталитичко дејство ензима уз суфикс **-аза** (нпр. алкохол-дехидрогеназа). У употреби су и тривијални називи који не садрже ближе информације о функцији ензима: нпр. каталаза, химотрипсин, пепсин итд. који врше убрзавање хидролизе пероксида – први, тј. катализу хидролизе полипептида – друга два ензима. Према кодном броју сваки ензим припада једној од седам категорија, као што је приказано у табели (Табела 6.1).

Табела 6.1. Подела ензима према типу реакције коју катализују

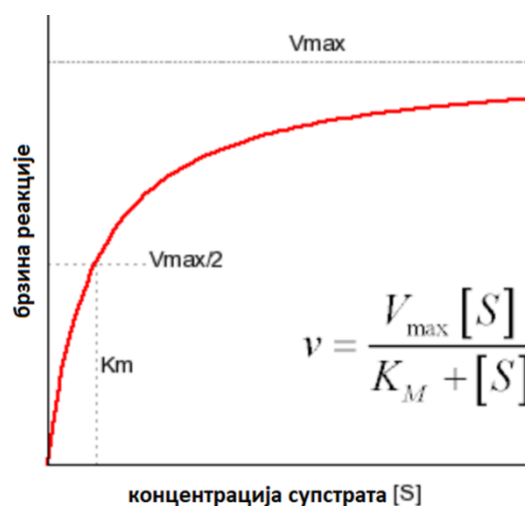
Број групе	Назив групе ензима	Улога	Реакција
1	оксидоредуктазе	катализују реакције оксидације или редукције	$A_{\text{ред}} + B_{\text{окс}} \rightleftharpoons A_{\text{окс}} + B_{\text{ред}}$
2	трансферазе	катализују пренос група	$A-B + V \rightleftharpoons A + V-B$
3	хидролазе	катализују хидролизу	$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + A-OH$
4	лијазе (синтазе)	катализују реакције адиције или елиминације	$A=B + V-\Gamma \rightleftharpoons VA-B\Gamma$
5	изомеразе	катализују интерконверзију изомера	$A \rightleftharpoons \text{изомер } A$
6	лигазе (синтетазе)	катализују грађење везе уз утрошак енергије (ATP)	$A + B + ATP \rightleftharpoons AB + ADP + P$
7	транслоказе	катализују транспорт кроз мембрану	$A_{\text{страна1}} \rightleftharpoons A_{\text{страна2}}$

Према месту налажења ензими могу бити: интрацелуларни, екстрацелуларни или мембрански. Према броју полипептидних ланаца у структури деле се на: мономерне, олигомерне и мултиензимске комплексе; а по сложености на: једноставне (протеинске) ензиме и сложене ензиме који захтевају присуство јона метала или органског молекула (коензима).

Највећи број биохемијских реакција су повратне реакције и ензими катализују и директну и супротну реакцију, тако да ће положај равнотеже (однос концентрације производа и реактаната) бити непромењен.

Повећање брзине биохемијских реакција (кинетику реакција) услед повећања концентрације супстрата није линеарно (што је случај код некатализованих реакција), тј. при вишим концентрацијама супстрата, брзина реакције се асимптотски приближава некој максималној вредности v_{max} (Слика 6.3). Плато се постиже када су сва активна места ензима заузета молекулима супстрата, тј. брзина ензимом катализоване реакције зависи и од концентрације ензима.

Математичка функција која описује кинетику већине ензимских реакција је **хипербола**, а поставили су је Леонор Михаелис и Мауд Леонора Ментен. **Константа K_m** која се јавља у једначини (Слика 6.3) представља ону концентрацију супстрата при којој се постиже половина максималне брзине (v_{max}) реакције. Ова вредност указује на **афинитет** ензима према одређеном супстрату, тј. лакоћу везивања супстрата за ензим. Што је вредност K_m нижа, афинитет је већи.



Слика 6.3. Утицај концентрације супстрата на брзину биохемијске реакције. Функција хиперболичне зависности v од $[S]$.

Све ензимски катализоване реакције имају неколико заједничких **одлика**:

1. ензимима катализоване реакције се одвијају при **благим реакционим условима** (температура тела око 36,5°C, физиолошка pH итд). За сваки ензим постоји одређена **оптимална температура** и оптимална **pH вредност** при којој ензим испољава највећу активност, а свака промена доводи до смањења његове активности. Са друге стране, неоргански катализатори, углавном захтевају екстремне вредности температуре (загревање на 100°C, јако ниске или јако високе pH вредности, висок притисак итд.), на којима би дошло до денатурације ензима;
2. брзине ензимских реакција су веома велике, у интервалу од 10^6 до 10^{12} пута веће од брзина неорганским катализаторима катализованих реакција;
3. ензимске реакције одликује **висока специфичност**, која може да буде **реакциона** (катализују један тип реакције, нпр. хидролизу пептидне везе), **групна** (прихватају само супstrate одређене структуре) или **апсолутна** (ензим катализује реакцију са само једним супстратом). Специфичност је условљена тродимензионалном структуром активног центра. Наиме, распоред аминокиселинских остатака у активном центру је такав да не постоји могућност везивања неодговарајућег супстрата. Модел **кључ-брава** описује механизам ензимске катализе по принципу један кључ откључава једну браву, тј. сваки ензим има супстрат који мора бити потпуно структурно комплементаран активном центру како би била могућа реакција. Овај стари модел је данас замењен **моделом индукованог прилагођавања**, по коме структура активног центра није ригидна и долази до конформационих промена на ензиму ради прилагођавања активног центра за катализу, након везивања супстрата;
4. **могућност регулације активности ензима** је још једна значајна одлика ензимских реакција и од изузетног је значаја за правилно функционисање организма као целине. Биохемијске реакције у ћелијама морају бити правилно координисане и усаглашене, што се постиже регулацијом активности кључних, тзв. регулаторних ензима. Регулација ензимске активности може бити брза и спора. Брза регулација базирана је на модификовању активности ензима (инхибиција или активација) директним утицајем на његову структуру: алостерном модификацијом, ковалентном модификацијом или протолитичком модификацијом (активирањем зимогених облика ензима). Спора регулација представља контролу синтезе ензима (генска регулација) или разградње ензима. Нарушавањем концентрације ензима утиче се на брзину реакције.

Инхибитори ензима су супстанце које се везују за ензим и смањују његову активност. Могу бити реверзибилни и иреверзибилни инхибитори. Реверзибилни инхибитори могу бити компетитивни (везују се за слободан ензим), акомпетитивни (се везују ЕС комплекс) и мешовити (везују се и за слободан ензим и за ЕС комплекс). Реверзибилни инхибитори се само привремено везују за ензим. А након што се уклоне са ензима, ензимска активност се обнавља. Иреверзибилни инхибитори трајно онеспособљавају ензиме.

Проучавањем ензимских инхибитора научници су добили корисне информације о природи функционалних група активног центра, механизму ензимског деловања, као и о улози одређених функционалних група у постизању и одржавању специфичне конформације ензимског молекула.

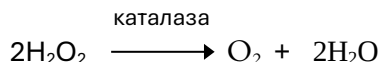
Многобројни лекови делују као инхибитори ензима, нпр. аспирин инхибира ензим циклооксигеназу. Мада и неки отрови делију као иреверзибилни инхибитори ензима нпр. бојни отрови на бази органофосфатних једињења делују као иреверзибилни инхибитори ензима ацетилхолинестеразе.

Експериментални део

Вежба Е1. Утицај температуре, рН и концентрације ензима на брзину ензимске реакције

Методологија

Ензим каталаза (ЕС број: 1.11.1.6; водоник-пероксид оксидоредуктаза) катализује реакцију разградње водоник-пероксида (H_2O_2) на воду и кисеоник (Слика 6.4), чиме смањује токсичност овог молекула. Велике концентрације H_2O_2 доводе до оксидативног оштећења биомолекула.



Слика 6.4. Једначина реакције хидролизе водоник-пероксида до кисеоника и воде, катализована каталазом

Као извор каталазе у овом огледу служи кромпир. Каталаза има заштитно дејство јер штити ћелије од оксидативног стреса који настаје нагомилавањем токсичних кисеоничних врста, као што је и водоник-пероксид. При условима у којима је ензим активан, долази до хидролизе H_2O_2 , односно ослобађања кисеоника као производа реакције. Пошто је кисеоник гасовит, макроскопски показатељ ензимске реакције је издвајање мехурића у епруветама у којима је ензим активан.

Реагенси и прибор: 12% водоник-пероксид (H_2O_2), 10% раствор сирћетне киселине (CH_3COOH), дестилована вода, водено купатило, сталак са епруветама, пипете, лењир, нож, даска за сечење.

Узорак: кромпир

Поступак: исецкати кромпир на четири коцкице величине 0,5 cm x 1 cm x 2 cm. Једну коцкицу додатно исецкати на мање делове, а једну кувати у кључалој води током 5 минута.

Нумерисати четири епрувете и у сваку од њих сипати реагенси редоследом који је приказан у Табели 6.2.

Табела 6.2. Редослед додавања реагенаса у вежи Е1.

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4
1 cm ³ водоник пероксида	1 cm ³ водоник пероксида	1 cm ³ водоник пероксида	1 cm ³ водоник пероксида
1 cm ³ H ₂ O	1 cm ³ H ₂ O	1 cm ³ H ₂ O	1 cm ³ CH ₃ COOH
1 коцкица кропира	1 коцкица прокуваног кропира	ситно исецкана коцкица кропира	1 коцкица кропира
Инкубација на собној температури у току 20 минута			

Посматрати брзину појаве мехурића (издвајање кисеоника) у епруветама и на основу тога извести закључак о утицају температуре, рН и концентрације ензима на брзину ензимске реакције. Узети у обзир да је каталаза протеински молекул.

Запажање:

Испитивање специфичност деловања ензима

Методологија

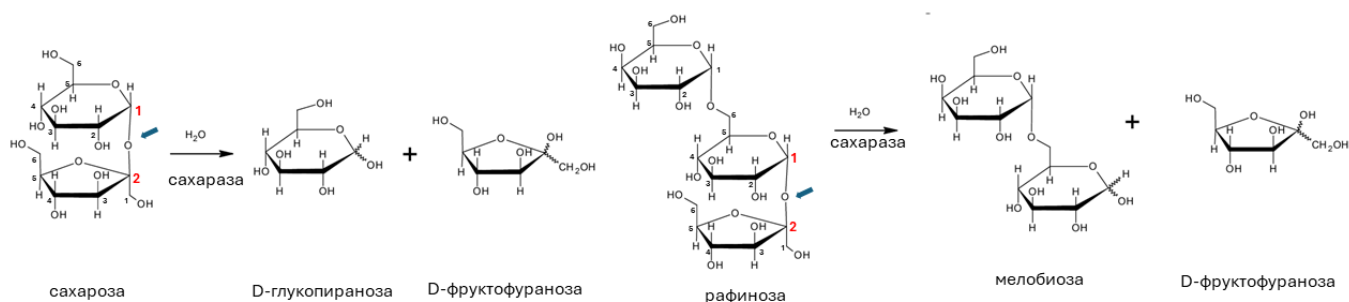
Ензим α -амилазу (ЕС број 3.2.1.1; 1,4- α -D-глюкан-4-глюканохидролаза) продукују ћелије пљувачних жлезда и ћелије панкреаса. Основна улога овог ензима у организму јесте катализовање хидролизе складишних полисахарида (скроба и гликогена) до декстрина (олигосахаридних ланаца), малтозе и глюкозе, олакшавајући варење и ресорпцију угљених хидрата у дигестивном тракту. Амилаза катализује реакцију хидролизе ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-О-гликозидне везе у молекулу амилозе, амилопектина и гликогена.

Једна од најчешће коришћених доказних реакција на присуство скроба је реакција амилозе са молекулима јода (Луголов раствор) у којој настаје тегет-црно обојени комплекс. Уколико дође до реакције хидролизе скроба, реакција са Луголовим раствором ће бити негативна (изостаће настанак тегет-црног комплекса). Са друге стране, ако се анализирају производи хидролизе скроба, ако је дошло до хидролизе, доказна реакција за присуство редукујућих шећера ће бити позитивна.

Ензим сахараза, сукраза или инвертаза (ЕС број 3.2.1.48; β -D-фруктофуранозид фруктохидролаза) се биосинтетише у ентероцитима (ћелијама цревне мукозе). Улога овог ензима јесте катализа хидролизе $\beta(2 \rightarrow 1)$ -О-гликозидних веза између фруктозног и глюкозног остатка у молекулу сахарозе, при чему настаје еквимоларна смеша глюкозе и фруктозе. Ови молекули се затим ресорбују кроз ентероците у крвоток, којим доспевају до свих ћелија којима служе као извор енергије.

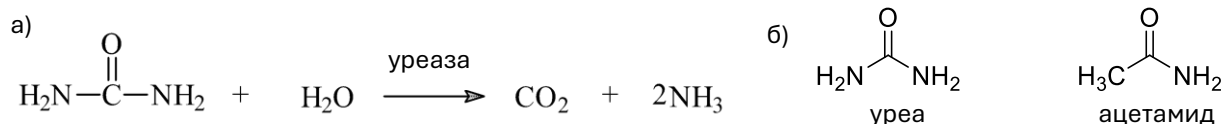
Утврђено је да сахараза може да делује и на оне олигосахариде у чијим молекулима је присутна $\beta(2 \rightarrow 1)$ -О-гликозидна веза између фруктозног и глюкозног остатка, као што је нпр. трисахарид рафиноза (Слика 6.5).

Као доказна реакција да је дошло до хидролизе $\beta(2 \rightarrow 1)$ -О-гликозидних веза, може да се користи било која оксидоредукциона реакција, али и Саливановљева реакција на кетозе. Афинитет сахаразе је већи ка сахарози него ка рафинози.



Слика 6.5. Једначине реакција хидролизе сахарозе и рафинозе катализоване ензимом сахаразом. K_m за сахараза-сахароза ензим-супстрат пар је 20-50 mmol/dm³, а за сахараза-рафиноза пар износи 50-100 mmol/dm³

Уреаза (ЕС број 3.5.1.5; уреа амидохидролаза) је један од првих ензима који је изолован из соје. Није присутна у хуманим ћелијама, али се у дигестивном тракту људи могу наћи бактерије које продукују овај ензим. Ензим уреаза катализује хидролитичко разлагање уреје на угљендиоксид и амонијак (Слика 6.6). Као доказна реакција активности уреазе може се користити кисело базни индикатор фенолфталеин који је безбојан у киселој, а ружичаст у базној средини. Појава ружичасте боје у епрувети указује на ослобађање молекула амонијака и повећање рН вредности раствора.



Слика 6.6. а) Једначина реакције хидролизе молекула уреје катализоване уреазом. б) Поређење структура молекула уреје и ацетамида.

Вежба Е2. Специфичност деловања α -амилазе (ЕС број 3.2.1.1; 1,4- α -D-глюкан-4-глюканохидролаза) и сахаразе (ЕС број 3.2.1.48; β -D-фруктофуранозид фруктохидролаза)

Реагенси и прибор: препарат амилазе, препарат сахаразе, Луголов раствор, реагенси Фелинг 1 (34,6 g бакар(II)-сулфата ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) у 500 cm^3 дестиловане воде) и Фелинг 2 (60 g натријум-хидроксида (NaOH) и 173 g калијум-натријум-тартарата у 500 cm^3 дестиловане воде), 2% раствор сахарозе, 1% раствор скроба у 0,3% раствору натријум-хлорида.

Водено купатило, термометар, стак са епруветама, трбушасте пипете (2 x 2 cm^3), градуисане пипете (2 x 1 cm^3), мензуре (2 x 10 cm^3), ерленмајер (50 cm^3), левак, хартија за цеђење.

Припрема препарата амилазе: растворити 15 mg амилазе у 100 cm^3

Припрема препарата сахаразе: размутити 1 g осушеног пекарског квасца у 10 cm^3 дестиловане воде, па процедити. Бистар филтрат користити као препарат сахаразе.

Фелингова реакција: додати у једну епрувету по 1 cm^3 раствора Фелинга 1 и Фелинга 2, промућкати и загрејати садржај епрувете у воденом купатилу. Врућем раствору реагенса додати 2 cm^3 врућег раствора анализе (претходно загрејаног у другој епрувети) и загревати још 5 минута. Ако у раствору има редукујућих шећера, из тамно-плавог раствора почеће таложење црвеног талоба, бакар(I)-оксида, Cu_2O .

Поступак: нумерисати четири епрувете и додати растворе и реагенсе редоследом приказаним у Табели 6.3.

Табела 6.3. Редослед додавања реагенаса у вежби Е2.

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5	Епрувета 6
2 cm^3 1% раствора скроба	2 cm^3 1% раствора скроба	2 cm^3 1% раствора скроба	2 cm^3 1% раствора скроба	2 cm^3 2% раствора сахарозе	2 cm^3 2% раствора сахарозе
0,5 cm^3 амилазе	0,5 cm^3 сахаразе	0,5 cm^3 амилазе	0,5 cm^3 сахаразе	0,5 cm^3 амилазе	0,5 cm^3 сахаразе
Инкубација на 37°C у току 10 минута					
1-2 капи Луголовог раствора	1-2 капи Луголовог раствора	Фелингова реакција	Фелингова реакција	Фелингова реакција	Фелингова реакција
плави раствор (+)	плави раствор (+)	црвени талог (+)	црвени талог (+)	црвени талог (+)	црвени талог (+)
безбојан раствор (-)	безбојан раствор (-)	плави раствор (-)	плави раствор (-)	плави раствор (-)	плави раствор (-)

На основу изведених квалитативних реакција: проба са јодом и Фелингова реакција, извести закључак о специфичности испитиваних ензима.

Запажање:

Вежба Е3. Испитивање групне и апсолутне специфичност сахаразе (ЕС број 3.2.1.48; β -D-фруктофуранозид фруктохидролаза) и уреазе (ЕС број 3.5.1.5; уреа амидохидролаза)

Реагенси и прибор: препарат сахаразе, 1% раствор сахарозе, 1% раствор рафинозе, Саливановљев реагенс (0,05 g резорцинола растворити у 100 cm^3 разблажене (1:2) хлороводоничне киселине (HCl); препарат уреазе, 5% раствор урее, 5% раствор ацетамида, 1% раствор фенолфталеина у етанолу. Водено купатило, термометар, стакл са епруветама, пипете (1 x 1 cm^3 ; 2 x 2 cm^3), мензура (10 cm^3 , 50 cm^3), пипете (1 x 1 cm^3 ; 2 x 5 cm^3), ерленмајер (100 cm^3), чаша (250 cm^3), левак, хартија за цеђење.

Припрема препарата уреазе: у чаши суспендовати 3 g сојиног брашна у 125 cm^3 дестиловане воде и оставити на собној температури у току 30 минута уз повремено мешање. Процедити суспензију кроз квалитативну хартију за цеђење. Филтрат представља препарат уреазе.

Поступак: Обележити четири епрувете и додати реагенсе редоследом приказаним у Табели 6.4.

Табела 6.4. Редослед додавања реагенаса у вежби Е3.

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4
2 cm^3 1% раствора сахарозе	2 cm^3 1% раствора рафинозе	2 cm^3 раствора урее	2 cm^3 раствора ацетамида
1 cm^3 препарата сахаразе	1 cm^3 препарата сахаразе	1 cm^3 препарата уреазе	1 cm^3 препарата уреазе
Инкубација на 37°C у току 10 минута		2 капи фенолфталеина	2 капи фенолфталеина
1 cm^3 Саливановљевог реагенса	1 cm^3 Саливановљевог реагенса		
Загревање на 100°C у току 20 минута			
светло црвена (-) тамно црвена (+)	светло црвена (-) тамно црвена (+)	ружичасто обојење (+) раствор беле боје (-)	ружичасто обојење (+) раствор беле боје (-)

Посматрати брзину појаве боје у епруветама 1 и 2 и на основу тога извести закључак о афинитету сахаразе према коришћеним супстратима.

На основу промене боје индикатора фенолфталеина у епруветама 3 и 4 закључити какву специфичност има уреазе.

Запажање:

Датум и овера асистента (8):

__ / __ / ____

Задаци

- На основу изгледа склопљених тродимензионалних модела молекула ДНК и тРНК извести закључке о њиховим биолошким функцијама.
- Применом квалитативних реакција на компоненте нуклеинских киселина: азотне базе, деоксирибозу, фосфорну киселину; испитати да ли талог добијен у вежби Л7. представља талог ДНК молекула.

Теоријски део

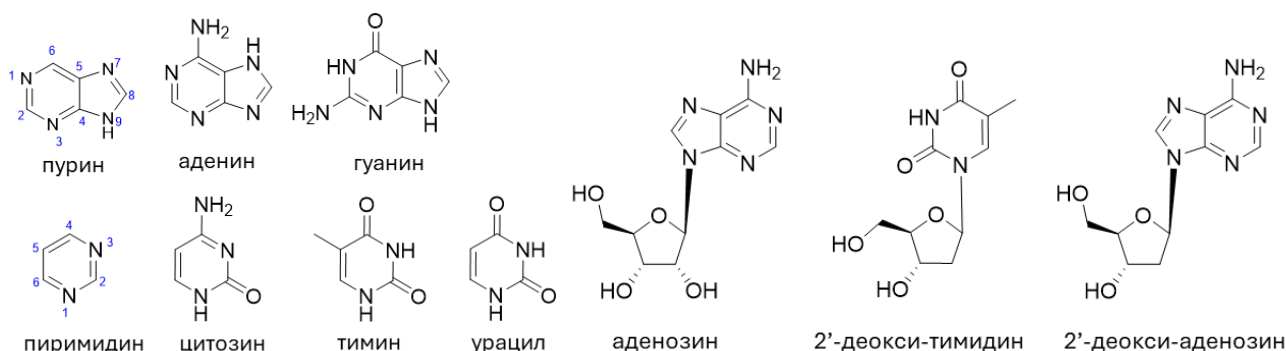
Нуклеинске киселине су линеарни полимери остатака нуклеотида или деоксинуклеотида међусобно повезаних **фосфодиестарским везама**.

Нуклеотиди/деоксинуклеотиди су биомолекули изграђени повезивањем азотне базе N-гликозидном везом са молекулом рибозе/деоксирибозе за коју је везан остатак фосфорне киселине (фосфоестарском везом). Може се рећи да су нуклеотиди/деоксинуклеотиди фосфатни естри **нуклеозида/деоксинуклеозида**, мањих молекула изграђених од азотне базе и петнозе (рибозе/деоксирибозе).

Поред тога што су мономерне јединице нуклеинских киселина, нуклеотиди имају и друге **улоге** у организму:

- у облику нуклеозид-трифосфата, нпр. АТФ молекули, **учествују у депоновању и трансферу енергије**;
- компоненте су коензима (нпр. NADH, FADH₂) који учествују у реакцијама оксидо-редукција или нпр. коензима А који учествује у трансферу ацил- група;
- представљају сигналне молекуле (сАМР, сГМР), а однос концентрација АТФ/АДР молекула служи за регулацију метаболизма.

Азотне базе које улазе у састав ДНК молекула (Слика 7.1) су деривати пурина: 6-амино-пурин (аденин) и 2-амино-6-оксо-пурин (гуанин) и деривати пиримидина: 4-амино-2-оксо-пиримидин (цитозин) и 2,4-диоксо-5-метил-пиримидин (тимин). У састав РНК молекула улазе: аденин, гуанин, цитозин и урацил (2,4-диоксо-пиримидин) уместо тимина.



Слика 7.1. Структурне формуле молекула азотних база које улазе у састав ДНК/РНК, и неких нуклеозида/деоксинуклеозида.

Нуклеозиди/деоксинуклеозиди добијају назив према називу базе и то тако што пуринске базе добијају наставка -ОЗИН док пиримидинске базе добијају наставка -ИДИН, уз извесне модификације назива (Табела 7.1). За три базе аденин, гуанин и цитозин постоје и нуклеозидна и деоксинуклеозидна форма јер се могу везивати и за рибозу и за деоксирибозу, док се урацил претежно везује за рибозу, а тимин за деоксирибозу.

Табела 7.1. Принцип давања назива нуклеозидима и нуклеотидима

база	рибонуклеозид	деоксирибонуклеозид	рибонуклеотид	деоксирибонуклеотид
аденин	+ озин; аденозин	деоксиаденозин	аденозин-5'-фосфат	деоксиаденозин-5'-фосфат
гуанин	+ озин; гуанозин	деоксигуанозин	гуанозин-5'-фосфат	деоксигуанозин-5'-фосфат
цитозин	+ идин; цитидин	деоксицитидин	цитидин-5'-фосфат	деоксицитидин-5'-фосфат
урацил	+ идин; уридин		уридин-5'-фосфат	
тимин	+ идин;	деокситимидин		деокситимидин-5'-фосфат

ДНК молекули су **хетерополимери** јер у изградњи молекула ДНК учествују четири различита деоксирибонуклеотида: **деоксиаденозин-5'-фосфат** (деоксиаденилна киселина, dAMP), **деоксигуанозин-5'-фосфат** (деоксигуанилна киселина, dGMP), **деоксицитидин 5'-фосфат** (деоксицитидилна киселина, dCMP) и **деокситимидин-5'-фосфат** (деокситимидилна киселина, dTMP).

Сваки ДНК молекул је сачињен од **два** полинуклеотидна ланца који су антипаралелне оријентације и који су комплементарни, а увијају се у десну страну око заједничке осе формирајући хеликс (спиралу) пречника 2 nm (20 Å). Комплементарни парови база су: аденин – тимин и гуанин – цитозин (Слика 7.3).

Биолошки је најзаступљенија Б форма ДНК, чије су структурне карактеристике први пут објаснили Џејмс Вотсон и Франсис Крик, заједно са Розалинд Френклин (Табела 7.2; Слика 7.2).

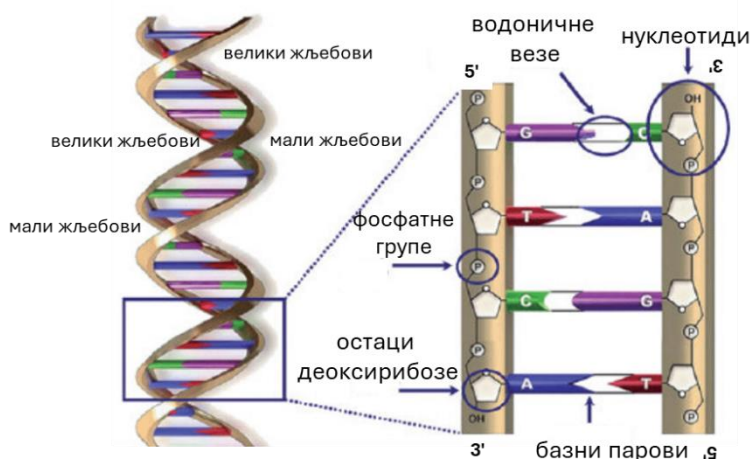
У В-ДНК молекулама равни у којима леже базни парови су међусобно паралелне (ароматични прстенови су скоро паралелни са прстенастим системима изнад и испод) и скоро нормални на осу хеликса. **Базе** су **хидрофобне** и интерагују једна са другом **ван дер Waals-овим интеракцијама** и **дипол-дипол интеракцијама**. Дакле, базе заузимају централни део молекула, док се шећерно-фосфатне кичме протежу бочно са обе стране и увијају око централног дела, формирајући велике и мале жљебове. Ширина ДНК спирале је иста у свим деловима јер се увек спарују једна пуринска и једна пиримидинска база (Слика 7.3).

Табела 7.2. Карактеристике В завојнице ДНК молекула

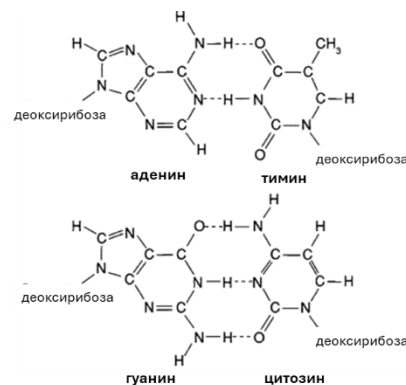
Смер увијања хеликса	десни хеликс (десногири)
Пречник хеликса	20 Å (2 nm)
Број базних парова по навоју	10
спон дуж хеликса по навоју	34,0 Å (3,4 nm)
Успон дуж хеликса по базном пару	3,4 Å (0,34 nm)
Велики жљеб	дубок
Мали жљеб	дубок
Конформација шећерне компоненте	C _{2'} -ендо
Угао гликозил- групе	Анти

Два ланца су међусобно везана **водоничним везама** између наспрамних база. А и Т су међусобно везани са **две водоничне**, а G и C са **три водоничне везе** (Слика 7.3).

Редослед база у једном ланцу аутоматски одређује редослед база у другом. Два ланца



Слика 7.2. Тродимензионални модел В-конформације ДНК молекула

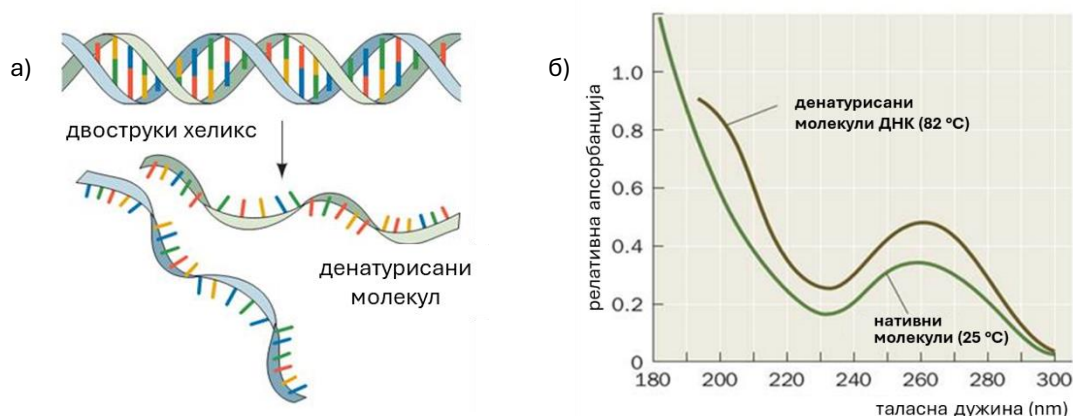


Слика 7.3. Повезивање комплементарних база

међусобно нису идентична, већ комплементарна. Иако је В-двоструки хеликс ДНК најзаступљенија структура ДНК молекулâ, двострука узвојница се може наћи и у нешто измењеним конформацијама, од којих су најчешће А-ДНК и Z-ДНК.

Под појмом денатурације ДНК се подразумева нарушавање њене секундарне структуре. **Два полинуклеотидна ланца се раздвајају један од другог, прелазећи у клупчаст облик.** Када се раствор ДНК постепено загрева, већ на температури од 40°C долази до нарушавања њене секундарне структуре, док денатурација почиње на 75°C. Процес денатурације је праћен променом физичких особина ДНК; нпр. вискозност ДНК се драстично смањује, мења се интензитет апсорпције у UV области итд.

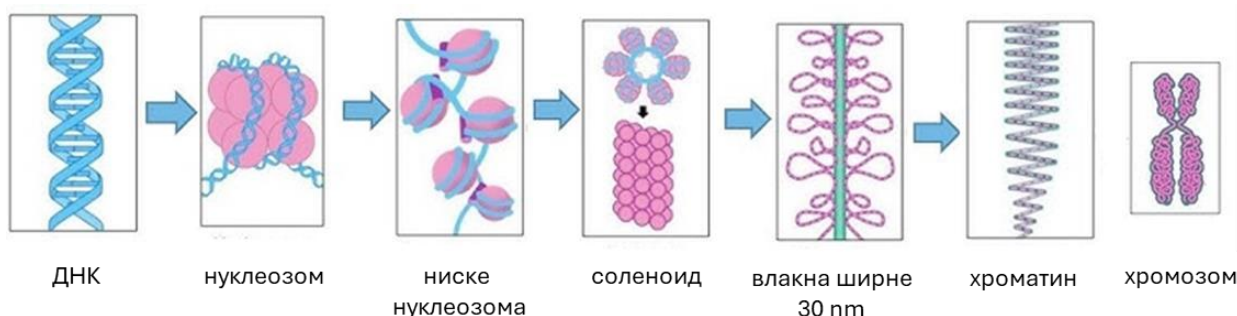
Апсорбанција ДНК скоро искључиво потиче од апсорбанције **ароматичних азотних база**, па се након денатурације, апсорбанција раствора повећава и до 40% (што се означава као хиперхромни ефекат, Слика 7.4).



Слика 7.4. а) Денатурација молекула ДНК и (десно) хиперхромни ефекат

Код *еукариотских* ћелија ДНК молекули се налазе у једру везани за протеине *хистоне*, градећи комплексне нуклеопротеине, који се називају *хроматин*.

Основна јединица паковања ДНК молекула је **нуклеозом**. Нуклеозом настаје када се сегмент ДНК ланца (дугачак око 150 базних парова) намотава на протеинско језгро које чини 8 субјединица различитих молекула хистона (октамер хистона). Сегмент ДНК обавија октамер скоро 2 пуна круга. Ово се понавља и добија се ниска нуклеозома која се савија у соленоид, који формира влакно које се савија у веће лукове који су усидрени на скелет протеина (нехистонских). Најкондензованија форма хроматина је *хромозом* (Слика 7.5). У нашим соматским ћелијама се налази сет од 23 пара хромозома (укупно 46, 2n), а у полним ћелијама сет од 23 хромозома (1n).



Слика 7.5. Хијерархија паковања ДНК у хромозоме

Генетске информације се налазе у редоследу нуклеотида у ДНК. **Генетички код** је однос који постоји између редоследа база у ДНК (тј. иРНК) и редоследа аминокиселина у протеинима.

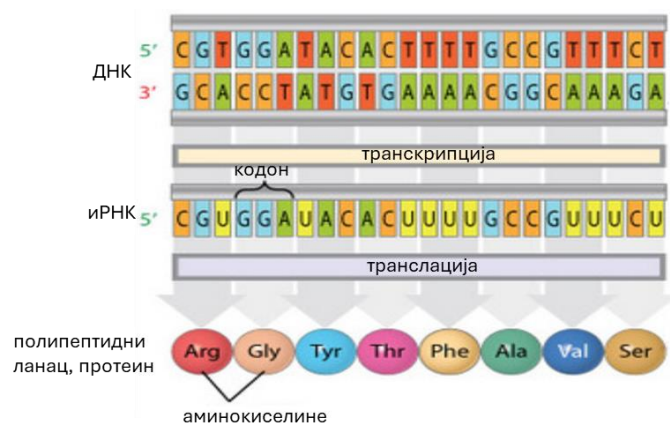
У *еукариотским* ћелијама постоји неколико типова РНК молекула који имају кључне улоге у експресији гена, синтези протеина и различитим регулаторним процесима. За процес биосинтезе протеина тј. транслације, најзначајније су: иРНК (информациона), рРНК (рибозомална) и тРНК (транспортна).

Гласничка или информациона РНК (иРНК) настаје процесом транскрипције гена (тј. копирањем једног од ланаца ДНК) која се одвија у једру ћелија. Молекули информационе РНК се састоје од једног полирибонуклеотидног ланца. У редоследу својих база иРНК носи информације за синтезу **једног** полипептидног ланца. Синтетисана иРНК напушта једро и прелази у цитосол где се везује између две субјединице рибозома и ту служи као матрица коју читају молекули тРНК.

Групе од три узастопна нуклеотида престављају шифре (кодоне) за одговарајуће аминокиселине. Од четири рубонуклеотида (AMP, GMP, CMP и UMP) могуће је направити 64 различита триплета база (тј. кодона). Утврђено је да од 64 кодона, 61 кодира неку од 20 аминокиселина, а преостала 3 кодона су стоп сигнали, који означавају крај синтезе протеина. На Слици 7.6 су приказани кодони и одговарајуће аминокиселине. Види се да за једну аминокиселину постоји више кодона.

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC		UCC		UAC		UGC	
UUA	Leu	UCA		UAA	STOP	UGA	STOP
UUG		UCG		UAG		UGG	Trp
CUU		CCU	Pro	CAU	His	CGU	
CUC		CCC		CAC		CGC	Arg
CUA		CCA		CAA	Gln	CGA	
CUG		CCG		CAG		CGG	
AUU		ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC		AAC		AGC	
AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG		AAG		AGG	
GUU		GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	
GUC		GCC		GAC		GGC	Gly
GUA	Val	GCA		GAA	Glu	GGA	
GUG		GCG		GAG		GGG	

Слика 7.6. Кодони за одговарајуће аминокиселине



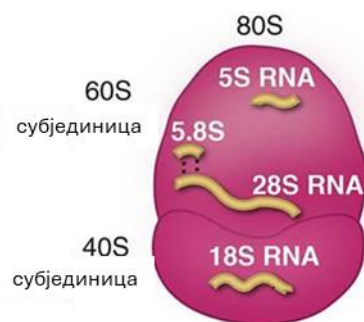
Слика 7.7. Шематски приказ повезаности нуклеинских киселина и протеина

Рибозомална РНК (рРНК) је структурна и каталитичка компонента рибозома, што значи да молекули рРНК заједно са специфичним протеинима изграђују велику и малу субјединицу рибозома (Слика 7.8), али и да имају улогу катализатора у формирању пептидних веза између аминокиселина.

Рибозомална РНК чини око 65% укупне масе рибозома. Рибозоми су супрамолекулске структуре на којима се одвија синтеза протеина, тј. **транслација**. Рибозоми се налазе слободни у цитосолу, или везани за мембране ендоплазматичног ретикулума (ћелијске органеле).

Транспортна РНК (тРНК) служи као преносилац аминокиселина до рибозома у процесу синтезе протеина (Слика 7.10). Такође служи и као молекул адаптер који се својом антикодонском петљом привремено везује за триплет база (кодон) на молекулу иРНК, док је она везана за рибозом и тиме омогућавају уграђивање **одговарајуће аминокиселине** на **одговарајуће место** у растућем полипептидном ланцу. За сваку од 20 аминокиселина које се уграђују у протеине, постоји бар једна специфична тРНК. За преношење неких аминокиселина постоји и већи број одговарајућих тРНК (оне се називају **изоакцепторске тРНК**).

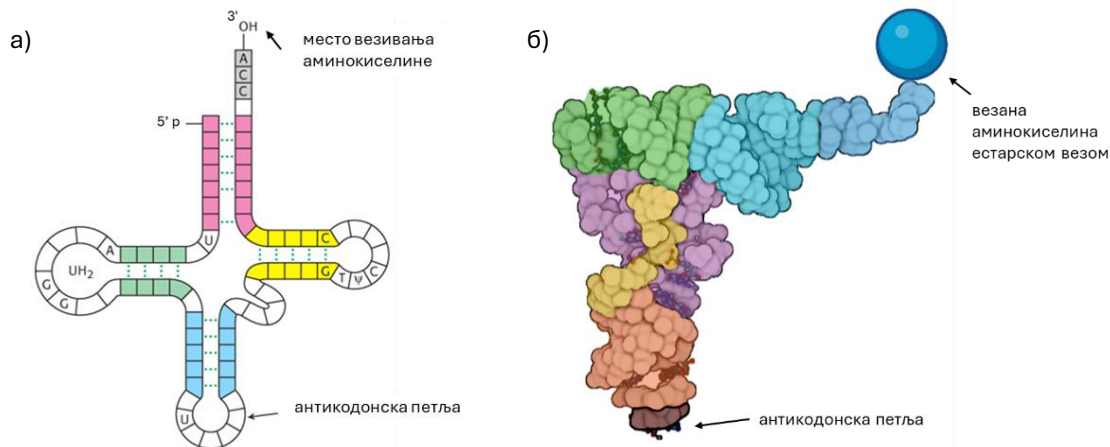
Молекули транспортне РНК (тРНК) су једноланчани молекули, који садрже од 75 до 90 нуклеотида у низу, а савијени су у облик детелине са три листа (Слика 7.9а). Најзначајнији делови молекула су антикодонска петља и триплет база ССА, на 3' крају молекула. За слободну 3'-ОН групу рибозе терминалног аденилата везује се **аминокиселина својом карбоксилном**



Слика 7.8. Рибозом еукариота, место синтезе протеина у ћелијама

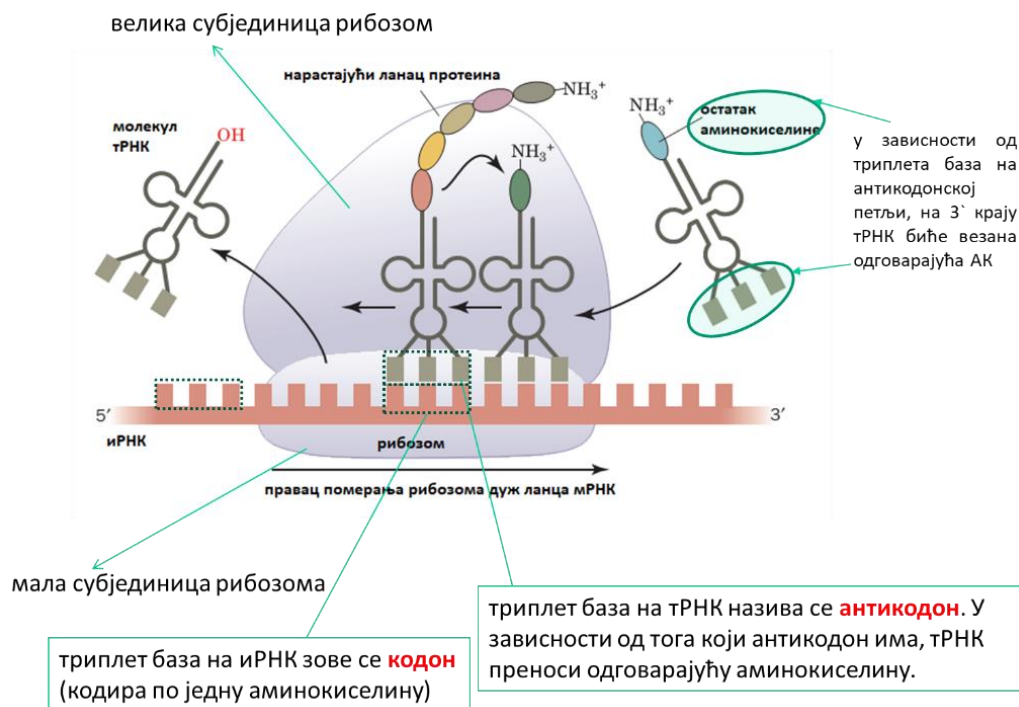
групом и настаје **аминоацил-дериват тРНК**. Ова реакција је ензимски катализована ензимима из класе синтетаза, а молекули ензима врше проверу да ли је антикодонска петља одговарајућа за аминокиселину која се везује за 3' крај естарском везом.

Тродимензионална структура тРНК је компактна и заузима облик слова Г или латичног слова L (Слика 7.9б), са крацима просечне дужине око 6 nm (60 Å). Иако око 43 од 76 базних парова формира дволанчане сегменте, чак 71 база даје свој допринос густом паковању (ван дер Валсовим интеракцијама).



Слика 7.9. а) Дводимензионална структура тРНК (изглед детелине) и б) тродимензионална структура тРНК са везом одговарајућом аминокиселином (изглед слова Г или латичног слова L)

Структуру тРНК карактерише присуство модификованих база и необично повезивање базних парова. Овакве терцијерне интеракције доприносе компактнијем паковању тРНК молекула.



Слика 7.10. Шематски приказ синтезе протеина на рибозому.

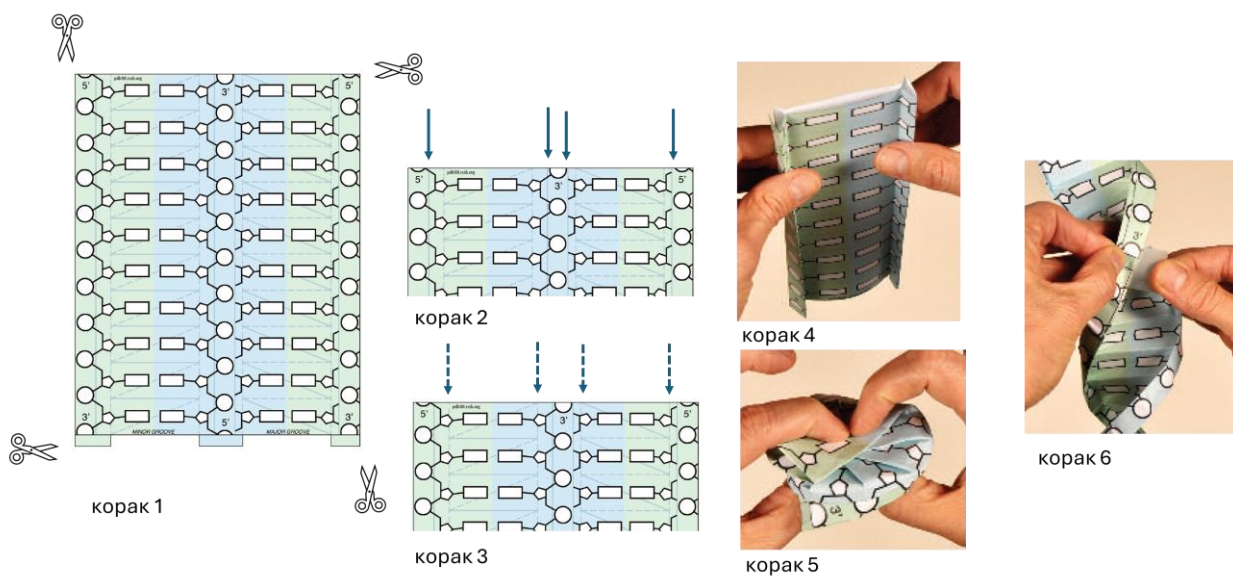
Остале рибонуклеинске киселине попут: малих нуклеарних РНК (снРНК и сноРНК), микро РНК, интерферирајућа РНК, дуге некодирајуће РНК, Рiwi-интерагујућа РНК и циркуларне РНК и друге, имају утицаја на обраду иРНК, усмеравање хемијских модификација рРНК и тРНК молекула, деградације или инхибиције иРНК итд., чиме се може постићи утишавање појединих гена, регулација ремоделовања хроматина и интеракција са различитим протеинима, што

доприноси složenoј регулацији и експресији гена у еукариотским ћелијама, и подстиче процесе који омогућавају ћелијску функцију и развој.

Експериментални део

Вежба НК1. Састављање папирног модела молекула ДНК

Одштампати модел из Прилога и у празна поља уписати комплементарне парове база. Након што исечете модел пратити наведена упутства на који начин савијати папир да би се добио тродимензионални модел. Ради јасноће поступка савијања, пратити и Сliku 7.11.



Слика 7.11. Упутство за савијање папирног модела ДНК молекула

Поступак :

1. Исећи модел приказан на Слици 7.11. (корак 1) дуж све четири ивице.
 2. Потом **уздужно** савијати модел по **пуним** сивим линијама (укупно 4 линије), тако да сива пуна линија буде видљива дуж набора, корак 2.
 3. Затим **уздужно** савијати модел по **испрекиданим** сивим линијама (укупно 4 испрекидане линије), на супротну страну од претходног корака, тако да испрекидана линија остане сакривена у прегибу (корак 3).
 4. Модел сада подесити да изгледа као на Слици 7.11. корак 4.
 5. Даље **хоризонтално** испресавијати модел (попут савијања лепезе), пратећи хоризонталне (пуне) и дијагоналне (испрекидане линије). Пуне линије треба да буду видљиве на прегибу, док испрекидане линије треба да буду унутра. Ако га правилно испресавијате, ваш модел ће изгледати као на Слици 7.11, корак 5.
 6. Отворите модел и подесите оквире са стране.
- Завршени модел представља десно увијену двоструку спиралу, Слика 7.11, корак 6.
- На основу направљеног модела описати основне елементе структуре ДНК (шта чини кичму молекула, а шта се налази у унутрашности спирале), као и геометрију изградње (под којим углом су фосфатна кичма и азотне базе).

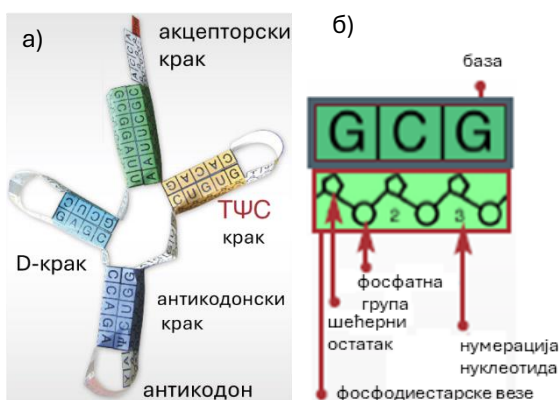
Одговори:

Вежба НК2. Прављење папирног модела молекула транспортне РНК

Транспортна РНК је неопходна за синтезу протеина, јер молекули тРНК допремају аминокиселине до рибозома у којима се врши синтеза протеина. На Слици 7.12. приказан је тродимензионални модел који је потребно саставити, као и појашњење ознака на моделу.

Поступак:

1. Исећи нуклеотидне секвенце папирног модела.
2. Пратећи нумерацију нуклеотида, **залепити** секвенце у дугачак низ. Приликом лепљења сиво поље је спојница и не треба да се види у секвенци.
3. Направити резове између сваке дупле линије (укупно 16 резова).
4. Савити модел дуж хоризонталних испрекиданих линија и дуж малих вертикалних испрекиданих линија.
5. Упарити комплементарне нуклеотидне секвенце према следећем редоследу:
 - 10-13 са 25-22
 - 27-31 са 43-39
 - 49-53 са 65-61
 - 1-7 са 72-66
6. Модел добија облик детелине – **секундарна структура тРНК**. Свака обојена област представља регионе структуре двоструког хеликса.
7. **Формирати терцијерну структуру** формирањем комплементарног базног пара две базе – G19 и C56 (обојене жутом), а сиву картицу залепити испод. Ово формира почетак терцијерне структуре тРНК, облик слова Г или инвертовани L -облик.



Слика 7.12. а) Састављен тродимензионални модел. б) Ознаке на папирном моделу.

Одговорити на следећа питања: а) модел састављене тРНК одговара тРНК за преношење које аминокиселине? б) Написати триплет база који представља одговарајући антикодон. в) Написати триплет база тј. кодон који на мРНК молекулу одговара овом антикодону. г) Којом

аминокиселином, код еукариота, обично започиње синтеза протеина на рибозому? д) Шта се дешава када се приликом синтезе протеина наиђе на стоп кодон? ђ) Наведите стоп кодоне.

Одговори:

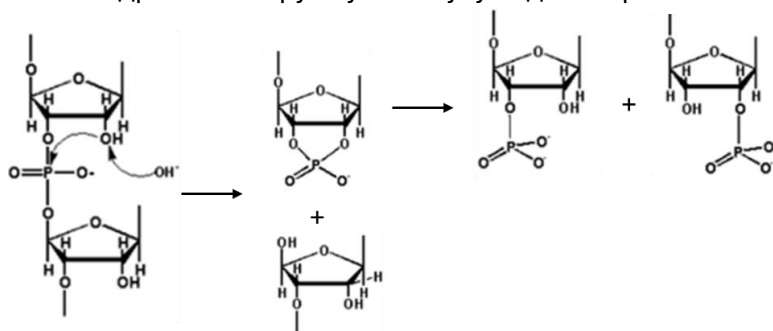
Вежба НКЗ. Хидролиза нуклеинских киселина и квалитативне реакције на компоненте нуклеинских киселина

Методологија

Деградација ДНА и РНА полимера

Фосфодиестарске везе у молекулима ДНК су хемијски стабилније у поређењу са истим везама у молекулима РНК, што је у складу са биолошким функцијама ових молекула: ДНК молекули складиште генетске информације на дуже стазе, док РНК молекули имају динамичку улогу у различитим процесима у ћелији (синтеза протеина, регулација експресије гена и других процеса) и животни век им је краћи. Ензими који специфично катализију хидролизу фосфодиестарских веза у нуклеинским киселинама су нуклеазе, а разликују се различити типови (ендонуклеазе и екзонуклеазе, ДНазе, РНазе, и друге). У одсуству ових катализатора, полимери су **прилично стабилни** тј. брзина хидролизе је врло мала, иако је равнотежа померена у правцу хидролизе.

РНК молекули су осетљиви на алкалну хидролизу због присуства слободне 2' хидроксилне групе у молекулу рибозе, због чега може доћи до интрамолекулске транс-естерификације унутар полинуклеотидног ланца и раскидања ланца (Слика 7.13); што код ДНК ланца није случај, због одсуства 2'-хидроксилне групе у молекулу 2'-деоксирибозе.



Слика 7.13. Нестабилност рибонуклеинских ланаца у базној средини због присуства слободне 2'-хидроксилне групе у рибозном остатку

Хидролиза нуклеинских киселина се може постићи загревањем раствора нуклеинских киселина са јаким киселинама. Нуклеинске киселине се разлажу на њихове основне градивне елементе: пуринске и пиримидинске базе, рибозу или деоксирибозу и фосфорну киселину,

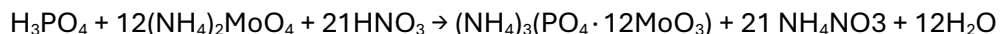
које могу да се докажу одговарајућим квалитативним реакцијама. За киселу хидролизу нуклеинских киселина се често користи перхлорна киселина (HClO_4).

Поступак хидролизе нуклеинских киселина: измерити масу осушеног изолата ДНК (добијеног у вежби Л7) и пренети га у кивету за центрифугирање. Додати толико раствора перхлорне киселине да се добије 10% раствор изолата. Кивету за центрифугирање затим затворити чепом кроз који је провучена стаклена цевчица и загревати на кључалом воденом купатилу, око 60 минута. Након тога садржај из кивете охладити и дупло га разблажити тј. додати једнаку запремину дестиловане воде. Овај хидролизат неутралисати додатком 1 mol/dm^3 раствора калијум-хидроксида, проверавањем рН помоћу универзалне индикаторске хартије. У кивети се таложи калијум-перхлорат. Након центрифугирања кивете на 3000 обртаја у минути, у току 10 минута могуће је одвојити овај талог, а бистри супернатант употребити за хемијску анализу састава.

Пуринске базе могу да се докажу у реакцији са амонијачним раствором сребро-нитрата (AgNO_3) при чему настају соли, које се издвајају у облику **бледо-смеђег талога**.

Пентозе могу да се докажу применом Биалове или Дишесове реакција, као што је описано у поглављу Угљени хидрати. Биалова реакција се заснива на способности пентоза да у киселој средини дају фурфурал, који се кондензује са орцинолом у присуству FeCl_3 дајући зелени кондензациони производ. Док применом Биалове реакције може да се потврди да ли је присутна пентоза, применом Дишесове реакције може да се утврди да ли је реч о рибози (узорак РНК) или деоксирибози (узорак ДНК). Наиме, у Дишесовој реакцији, загревањем у присуству глацијалне сирћетне и сумпорне киселине **деоксирибозе** граде **плаво** обојени производ са дифениламином. При истим условима молекули **рибозе** и дифениламина граде **зелено** обојени производ.

Присуство остатка **фосфорне киселине** у нуклеинским киселинама, као и у другим сложеним биомолекулима (фосфопротеидима, нуклеопротеидима) доказује се реакцијом са амонијум-молибдатом. У овој реакцији настаје жути комплекс фосфо-молибдата, који се додатком јаког редукционог средства (аскорбинске киселине) редукује до плаво обојених оксида молибдена.



Слика 7.14. Једначина реакције фосфата са амонијум-молибдатним реагенсом

Тест на пуринске базе

Поступак: у епрувету додати $0,5 \text{ cm}^3$ хидролизата ДНК и проверити рН вредност универзалном индикаторском хартијом. Затим додати $0,5 \text{ cm}^3$ (10-15 капи) концентрованог амонијака (ccNH_3) до алкалне реакције (поново проверити рН). Потом додати 10 капи амонијачног раствора сребро-нитрата (AgNO_3). Почеће да се издваја пахуљаста талог беле боје.

Биалова реакција на пентозе – разлика између пентоза и хексоза

Поступак: у $0,5 \text{ cm}^3$ испитиваног хидролизата додати исту запремину орцинолног реагенса. Садржај епрувете кувати на кључалом воденом купатилу у току 20 минута. У случају позитивне реакције јавља се зелени производ.

Дишесова реакција – разлика између пентоза и деоксипентоза

Поступак: у епрувету додати $0,5 \text{ cm}^3$ капи хидролизата ДНК и $0,5 \text{ cm}^3$ раствора дифениламина. Раствор промућкати и стави на загревање у кључало водено купатило у току 15-20 минута. Ако су присутни молекули деоксирибозе јављаће се плаво обојени производ.

Тест на фосфорну киселину

Поступак: у епрувету додати $0,5 \text{ cm}^3$ хидролизата. Додати $0,5 \text{ cm}^3$ раствора амонијум-молибдата ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), промућкати садржај епрувете и додати $0,5 \text{ cm}^3$ раствора аскорбинске киселине. У случају позитивне реакције, најпре се јавља жута боја амонијум-фосфо-молибдата ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ MoO}_3$), а потом услед оксидоредукционе реакције у присуству аскорбинске киселине настаје плаво обојени комплекс.

Реагенси и прибор: 2 mol/dm³ перхлорна киселина; 1 mol/dm³ раствор калијум-хидроксида (KOH); амонијачни раствор сребронитрата (у 2% раствор сребро-нитрата (AgNO₃) постепено додавати концентровани раствор амонијака (NH₃) док се, на почетку створени, талог потпуно не раствори); концентровани амонијак (NH₃); 1% раствор аскорбинске киселине у 1 mol/dm³ раствору хлороводоничне киселине (HCl); раствор амонијум-молибдата у раствору азотне киселине (7,5 g амонијум-молибдата растворити у 100 cm³ дестиловане воде и додати 100 cm³ 32% раствора азотне киселине (HNO₃)), орцинолни реагенс (одмерити 1 g орцинола и пажљиво додати 500 cm³ 30% раствора хлороводоничне киселине (HCl), мућкати док се потпуно не раствори, а затим додати 10% раствор гвожђе(III)-хлорида (FeCl₃), реагенс чувати у тамној, добро затвореној боци); 1% раствор дифениламина (1 g дифениламина растворити у 100 cm³ глацијалне сирћетне киселине и додати 2,8 cm³ концентроване сумпорне киселине (H₂SO₄)); пипете (1 cm³), кивета за центрифугирање, пробушен чеп са стакленом цевчицом, центрифуга, сталак са епруветама, водено купатило, стаклени штапић, мензуре (10 cm³ и 100 cm³), универзална индикаторска хартија, пипете.

Узорак: ДНК изолована из воћа у вежби *Утицај детерџента на биолошке мембране* (Л7).

Поступак: обележити четири епрувете, а затим додати растворе према упутству из Табеле 7.3.

Табела 7.3. Редослед додавања реагенаса у вежби НКЗ

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4
Тест на пуринске базе	Биалова реакција на пентозе	Дишесова реакција на деоксишећере	Тест на фосфорну киселину
0,5 cm ³ хидролизата	0,5 cm ³ хидролизата	0,5 cm ³ хидролизата	0,5 cm ³ хидролизата
Око 0,5 cm ³ концентрованог амонијака (до базне средине)	0,5 cm ³ орцинолног реагенса	0,5 cm ³ дифениламин	0,5 cm ³ раствора амонијум-молибдата
0,5 cm ³ амонијачног раствора AgNO ₃	Кување 15 до 20 минута	Кување 15 до 20 минута	0,5 cm ³ раствора аскорбинске киселине
Бео талог да / не	Зелени раствор да / не	Плави раствор / Зелени раствор / Безбојни раствор	Плави раствор да / не

Запажање:

Датум и овера асистента (9):

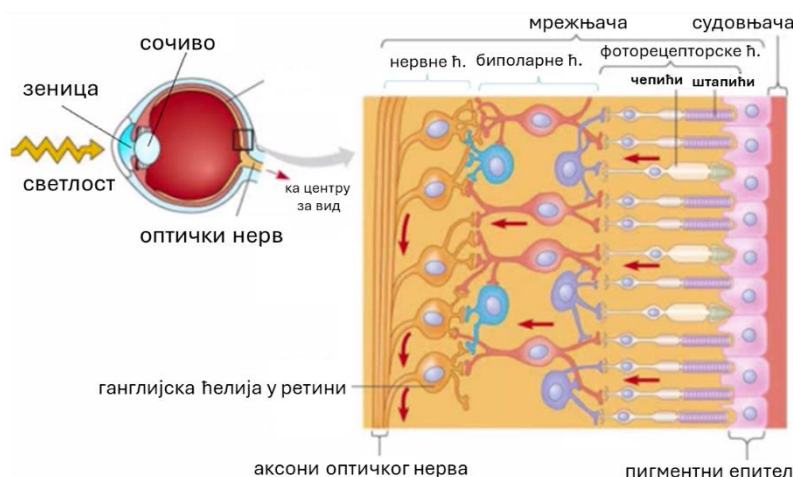
__ / __ / ____

Задаци

- На основу склопљеног тродимензионалног модела структуре родопсина прокоментарисати колико α -хеликс региона садржи протеински део родопсина (опсин) и којом везом се везује молекул ретинала за опсин. Навести који се све протеински молекули активирају након фотоизомеризације витамина А и промене конформације родопсина.
- Анализирати састав вештачких суза и комерцијалних препарата за очување вида на присуство хијалуронске киселине, као и витамина А, Е и С (аскорбинска киселина).

Теоријски део

Светлост улази у око кроз зеницу и помоћу сочива се фокусира на мрежњачу (ретину). Фоторецепторске ћелије ретине (штапићи и чепасти) одговарају на светлосни надражај и генеришу електричне импулсе који се прослеђују преко биполарних ћелија на нервне ћелије (које улазе у састав оптичког нерва) до центра за вид у мозгу.

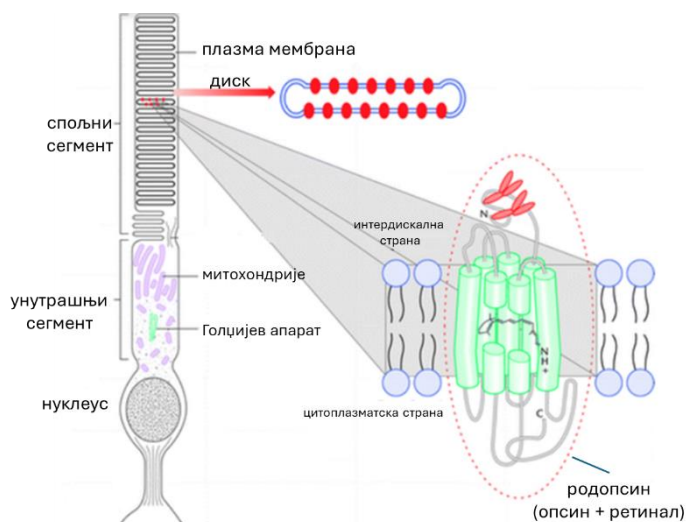


Слика 8.1. Орган око. Распоред различитих типова ћелија унутар мрежњаче (ретине)

Ретина садржи милионе фоторецепторских ћелија које се деле у две групе: чепасти (којих има око 7 милиона и који су одговорни за боју и оштрину вида) и штапиће (којих има око 120 милиона и који су осетљиви на видљиву светлост). Ретина садржи и биполарне ћелије које представљају спону фоторецепторских и нервних ћелија; а у састав ретине улазе и пигментне епителне ћелије (Слика 8.1).

Фоторецепторске ћелије имају изражен такозвани спољни сегмент ћелије који је испуњен мембраноликим дисковима у које су уроњени протеински молекули попут родопсина (Слика 8.2), трансдуцина, фосфодиестеразе, гуанилил-циклазе и других. Родопсин је сложени протеин код којег је за протеински део тзв. опсин, ковалентном везом везана простетичка група, 11-*cis*-ретинал (тј. витамин А). Молекул витамина А се својом алдехидном групом везује за аминокиселину по реду у секвенци опсина). Настаје ковалентна веза типа Шифове базе. Опсински део садржи седам α -хеликса којима је уроњен у мембрану дискова. У молекулу витамина А (везаног за опсин) се одвија фотохемијска

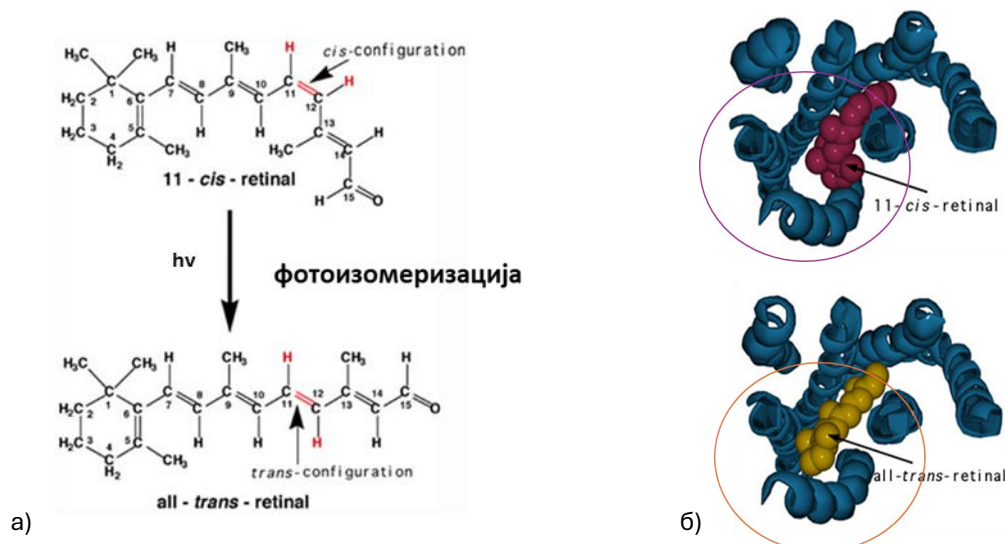
76



Слика 8.2. На фоторецепторској ћелији истакнути спољашњи регион. Молекули родопсина уметнути у липидне двослоје

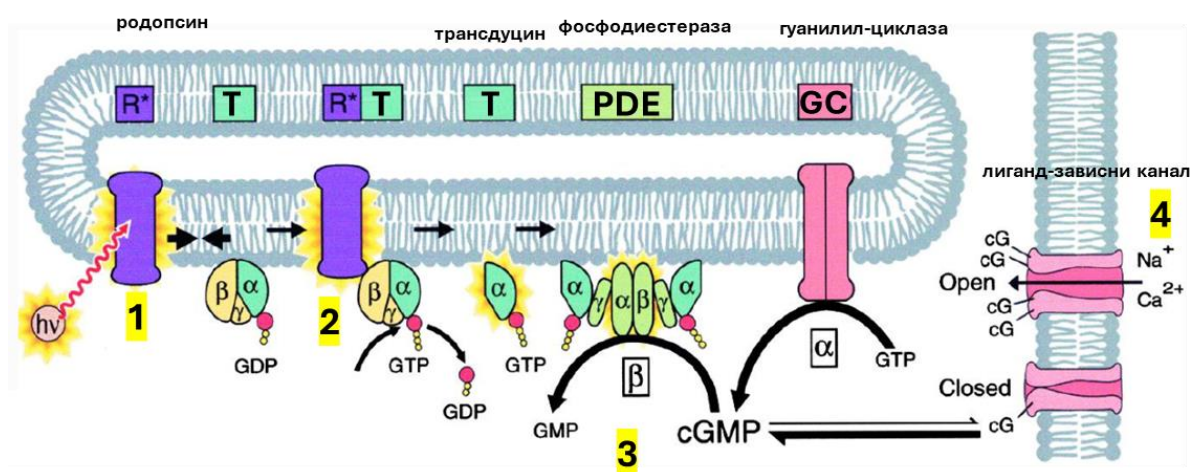
реакција привременог раскидања двоструке C=C везе између 11. и 12. угљениковог атома и изомеризација двоструке везе из *cis* конфигурације у стабилнију *trans*-конфигурацију, као последица интеракције витамина А са светлости. Дакле, долази до фотоизомеризације витамина А.

Молекул ретинала овом фотоизомеризацијом мења и своју геометрију, из савијеног облика прелази у издужени облик, што изазива битне промене у конформацији молекула опсина.



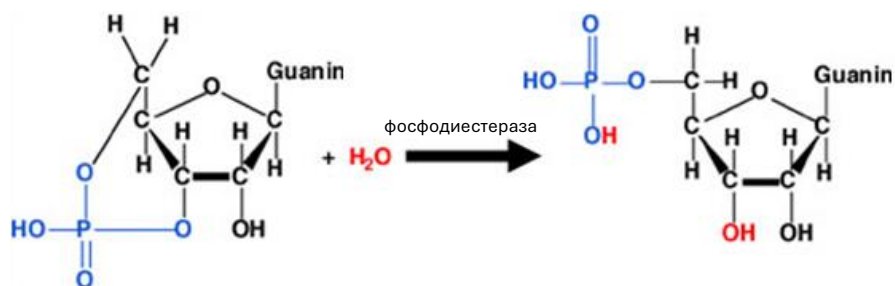
Слика 8.3. а) Једначина реакције фотоизомеризације 11-*cis* ретинала у 11-*trans* ретинал. б) Промена облика простетичне групе и последична промена конформације опсинског дела.

Дакле, фотоизомеризација ретинала праћена је низом молекулских промена на нивоу опсина које се завршавају дисоцијацијом (раздвајањем) родопсина на опсин и *trans*-ретинал (Слика 8.6). Као **крајња** последица фотоизомеризације ретинала доћи ће до **стварања нервнoг импулса**. Оваквом исходу **претходи** активација протеинске каскаде (Слика 8.4) коју чине: **родопсин**, протеин **трансдуцин** (из фамилије G-протеина) и ензим **фосфодиестераза** уроњени у липидни двослој **дискова** спољашњег сегмента фоторецепторских ћелија, као и лиганд зависни протеински канал из ћелијске мембране фоторецепторских ћелија, задужен за размену јона натријума и калцијума. Молекул cGMP је регулатор поменутих канала и док је везан за канале, обезбеђује њихову отворену конформацију. Снижавање цитосолне концентрације cGMP молекула води затварању ових канала и последично до појаве хиперполаризације мембране фоторецепторских ћелија.



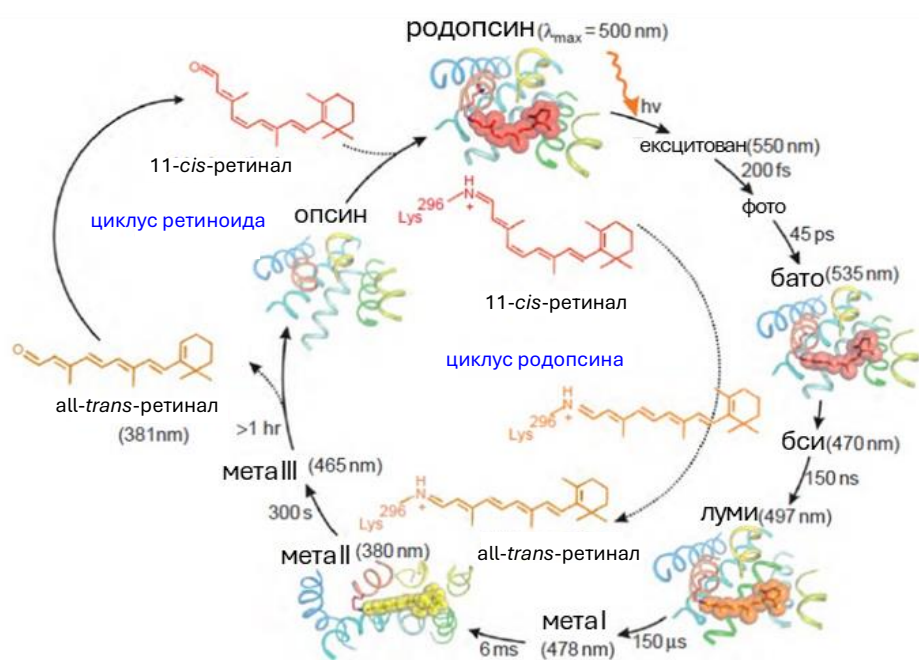
Слика 8.4. Фототрансдукција. Биохемијске основе процеса вида – протеинску каскаду чине: родопсин, трансдуцин, фосфодиестераза – протеини уроњени у дискове спољашњег сегмента фоторецепторских ћелија. На ћелијској мембрани су лиганд зависни јонски канали (отворени су када је за њих везани молекули цикличног GMP (cGMP); **скраћенице**: cG – циклични GMP, R* – активирани родопсин; R*T – привремени комплекс активираниог родопсина и трансдуцина, PDE – фосфодиестераза, GC – гуанилил циклаза.

Снижавање концентрације cGMP молекула је резултат ензимом катализоване реакције хидролизе једне фосфоестарске везе (Слика 8.5) унутар овог молекула. Ензим је фосфодиестераза.



Слика 8.5. Једначина хидролизе фосфоестарске везе у молекулу cGMP-а. Катализована је ензимом фосфодиестеразом

Речено је да је фотоизомеризација ретинала, из 11-*cis* у *all-trans* изомер праћена низом конформационих трансформација опсинског дела родопсина. Након активације трансдуцина, *all-trans* изомер ретинала се дисоцира са опсинског дела и пролази кроз низ трансформација да би се поново вратио у почетну форму 11-*cis* ретинал која ће се асоцирати са опсином у молекул родопсина. Ово се назива циклус родопсина.



Слика 8.6. Циклус родопсина и циклус ретинаоида

Молекул родопсина који садржи *trans*-ретинал се назива још и **батородопсин** и веома је нестабилан, јер се *trans*-облик ретинала не уклапа добро у структуру протеина (Слика 8.6). У току неколико наносекунди облик протеина батородопсина почиње да се мења - опсински део се увија око молекула *trans*-ретинал и молекул родопсина пролази кроз енергетски веома неповољне структуре: лумиродопсин, метародопсин I, метародопсин II и метародопсин III. Потом се молекули *trans*-ретинала удаљавају од опсина. Метародопсин II активира сигналну каскаду која доводи до формирања нервнoг импулса.

Као што опсински део молекула пролази кроз различите фазе у поступку враћања у почетни облик, тако се и ослобођени *all-trans*-ретинал преко низа биохемијских трансформација: редукције, изомеризације и оксидације враћа у почетни хемијски облик: 11-*cis*-ретинал. Ове реакције се одвијају делом у фоторецепторским ћелијама (редукција), а делом у ћелијама пигментног епитела (изомеризација и оксидација). Наиме, прво се *all-trans*-ретинал редукује у *all-trans*-ретинол у фоторецепторским ћелијама, а затим се транспортује до ћелија пигментног епитела где се изомеризује назад у 11-*cis*-ретинол помоћу специфичног ензима (RPE65), а потом и оксидује у 11-*cis*-ретинал и транспортује назад у фоторецепторске ћелије, где се регенеришу молекули родопсина. Овај низ ензимски катализованих реакција се назива ретинаидни циклус.

Експериментални део

Вежба В1. Квалитативна анализа комерцијалних препарата за очување вида

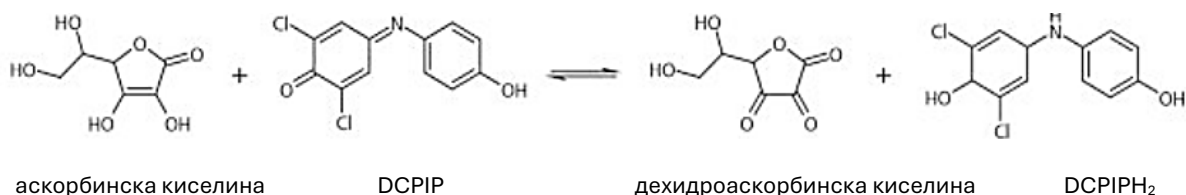
Методологија

Реакција доказивања натријум-хијалуронидата који се додаје у капи за очи ради повећања вискозности и спречавања сушења ока, заснива се на реакцији са натријум хијалуронидата са карбазолом, у којој настаје плаво обојени производ.

Реакција **доказивања витамина А** се заснива на дехидратацији **витамина А** у присуству H_2SO_4 при чему настаје плаво обојени производ, чија се боја стајањем мења у смеђе-црвену.

Реакција **доказивања витамина Е** (токоферола) се заснива на реакцији оксидоредукције, при чему се у присуству јаког оксиданса токоферол оксидује у хинон. Реакција оксидације праћена је појавом црвене боје.

Једна од најчешће коришћених метода за одређивање садржаја **витамина С** (аскорбинске киселине) заснива се на редокс реакцији између аскорбинске киселине и 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP). У овој реакцији (Слика 8.7), аскорбинска киселина редукује DCPIP, што резултује његовом променом боје – од обојене (плаво у неутралној, розе у киселој средини) до безбојног производа. Недостатак методе је што ова реакција није у потпуности селективна, већ и друга једињења ступају у реакцију поред молекула витамина С. Овај проблем се превазилази припремом екстракта у *meta*-фосфорној киселини која успорава реакцију између реагенса и поменутих једињења.



Слика 8.7. Једначина реакција витамина С и 2,6-дихлорфенолиндофенола

Доказна реакција на натријум-хијалуронат_поступак: у епрувету додати 0,5 cm^3 узорка (капи за очи или екстракта припремљеног у *meta*-фосфорној киселини) и 2 cm^3 25 mmol/dm^3 натријум-тетрабората у сумпорној киселини и оставити током 10 минута у воденом купатилу (100°C). Након хлађења пажљиво је додати 0,5 cm^3 0,1% раствора карбазола у апсолутном етанолу и поново загревати 100°C током 10 минута. Посматрати промену боје.

Доказна реакција на витамин А_поступак: у епрувету додати 0,5 cm^3 узорка (капи за очи или хлороформског екстракта капсуле препарата) и 2 капи концентроване сумпорне киселине (с H_2SO_4). Посматрати промену боје.

Доказна реакција на витамин Е_поступак: у епрувету додати 0,5 cm^3 узорка (капи за очи или хлороформског екстракта капсуле препарата) и 1 cm^3 концентроване азотне киселине. Снажно промућкати садржај епрувете и посматрати промену боје.

Доказна реакција на витамин С_поступак: у епрувету додати 0,5 cm^3 узорка (капи за очи или екстракта припремљеног у *meta*-фосфорној киселини) и 2,5 cm^3 раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и посматрати промену боје.

Прибор и реагенси: хлороформ, концентрована сумпорна киселина (с H_2SO_4), азотна киселина (с HNO_3), 1% раствор карбазола (у етанолу или води), 0,25 g/dm^3 раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 1% раствор сирћетне киселине, сталак са епруветама, шпатула, пипете, хартија за цеђење, водено купатило.

Узорци: шест комерцијално доступних препарата, од тога три препарата капи за очи различитих произвођача (нпр. Xero-Vision Plus, Proculin tears, Xero-Vision Liposcur) и три препарата који се продају као додаци исхрани за очување процеса вида (нпр. Doppel Herz Vitamini, Dietpharm Makulin® Plus, Visionace® Plus).

Припрема узорка: капи за очи користити директно, а препарате у таблетама (или садржај из капсула) хомогенизовати у авану. Потом:

- а) витамин С екстраховати коришћењем 2 cm³ meta-фосфорне киселине,
- б) водонерастворне витамине Е и А екстраховати коришћењем хлороформа – три пута по 10 cm³ хлороформа. Хлороформске екстракте сјединити у истом балону и упарити хлороформ на ротационом вакуум упаривачу. Суви остатак растворити у 2 cm³ етанола и користити за извођење квалитативних реакција.

Поступак: на припремљеним узорцима извести бојене реакције према упутству из Табеле 8.1.

Табела 8.1. Редослед додавања реагенса у квалитативним реакцијама за доказивања натријум-хијалуронидата и витамина (А, Е, С) у различитим комерцијалним препаратима у вежби В1

Натријум-хијалуронат	Витамин А	Витамин Е	Витамин С
1 cm ³ екстракта	0,5 cm ³ екстракта	0,5 cm ³ екстракта	0,5 cm ³ екстракта
2 cm ³ натријум-тетрабората	2 капи cc H ₂ SO ₄	1 cm ³ cc HNO ₃	2,5 cm ³ раствора 2,6-дихлорфенол-индофенола
Загревање 100°C у току 10 минута			
1 cm ³ раствора карбазола			
Загревање 100°C 10 минута			
Плави раствор	Плави раствор Смеђе црвени раствор	Црвени раствор да / не	Обезбојавање ружичастог раствора да / не

Добијене резултате уписати у Табелу 8.2.

Табела 8.2. Резултати квалитативне анализе узорка

Натријум-хијалуронат	Витамин А	Витамин Е	Витамин С	Натријум-хијалуронат	Витамин А	Витамин Е	Витамин С	Натријум-хијалуронат	Витамин А	Витамин Е	Витамин С
капи бр.1				капи бр. 2				капи бр. 3			
+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
препарат бр.1				препарат бр. 2				препарат бр. 3			
+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -

Запажања:

Датум и овера асистента (10):

__ / __ / ____

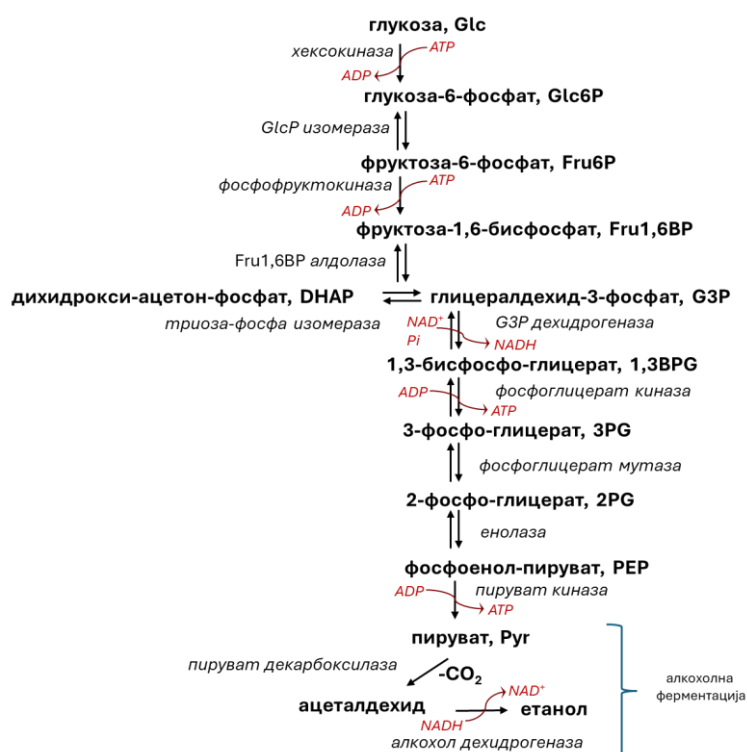
Задаци 1

- Пратити процес гликолизе у квасцима доказивањем акумулираних интермедијера након инхибиције појединих ензима и након везивања интермедијера у производ који се даље не може метаболирати.
- Квалитативним реакцијама доказати присуство интермедијера: пирувата, ацеталдехида, етанола и угљен-диоксида (CO_2).
- Посматрати разлику у количини издвојеног CO_2 након пола сата ферментације квасаца у присуству различитих супстрата.

Теоријски део 1

Пекарски квасац, *Saccharomyces cerevisiae*, је једноћелијски **еукариотски** микроорганизам и факултативни анаероб. То значи да ћелије квасаца могу да троше глюкозу при аеробним условима (ћелијско дисање) уз продукцију воде и угљеник (IV)-оксида (CO_2), или могу да врше ферментацију у одсуству кисеоника (анаеробни услови) уз производњу етанола и CO_2 .

Разградња једног молекула **глюкозе** до два молекула **пирувата** која се одвија кроз десет узастопних реакција представља један метаболички пут и назива се **гликолиза**. Гликолиза је универзална за еукариотске ћелије, а може да се одвија и у присуству и у одсуству кисеоника. Даље разлагање молекула пирувата зависи од концентрације кисеоника у ћелијама. Ако нема довољно кисеоника у околини ћелије квасаца настали пируват разлажу до ацеталдехида уз ослобађање молекула CO_2 . Ацеталдехид даље преводи (редукују) у етанол. Ове две узастопне реакције чине **алкохолну ферментацију**. Све реакције гликолизе и алкохолне ферментације су катализоване деловањем одговарајућих **ензима** и одвијају се у цитосолу ћелија.



Слика 9.1. Шематски приказ гликолизе и алкохолне ферментације

Експериментални део 1

Ферментација квасаца

Методологија

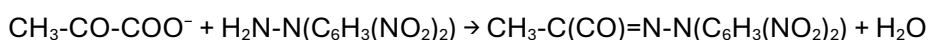
Селективном инхибицијом активности неких ензима у метаболичким путевима могуће је акумулирати поједине интермедијере. Инхибирани ензими не врше катализу разградње својих супстрата, па се они могу доказати квалитативним реакцијама. Ови интермедијери се при физиолошким условима врло брзо троше у наредним узастопним реакцијама, те их није

могуће доказати. Инхибиција ензима се може постићи променом оптималних физиолошких услова или додатком инхибитора.

На пример, подешавањем **базних услова** коришћењем раствора динатријум-хидроген-фосфата (Na_2HPO_4) може се постићи селективна инхибиција ензима **пируват декарбоксилазе**. Додатком **флуоридних јона** (раствор натријум-флуорида, NaF) постиже се инхибиција активност ензима **енолазе**.

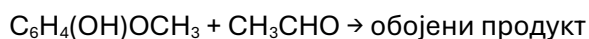
Други начин за заустављање неког метаболичког пута јесте дериватизација интермедијера, који се даље не може метаболисати, јер у тако измењеном облику не одговара активном центру свог ензима. На пример, додатком **натријум-бисулфита** који реагује са молекулима **ацеталдехида** може се спречити даља редукција ацеталдехида у етанол, катализована ензимом **алкохол дехидрогеназом**.

На ове начине нагомилани интермедијери, пируват и ацеталдехид, могу потом бити доказани неком од квалитативних реакција. За **пируват** је то реакција са 2,4-динитрофенил-хидразином, која је специфична за карбонилна једињења (алдехиде и кетоне). Пируват садржи кето групу па реагује са хидразином дајући хидразон (Слика 9.2), производ који се издваја у облику талог, жуте или жуто-наранџасте боје.



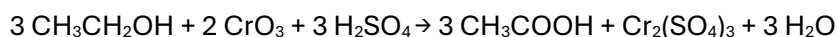
Слика 9.2. Једначина реакције доказивања пирувата

За детекцију **ацеталдехида** користи се гвајакол (2-метоксифенол) при чему долази до оксидоредукционе реакције где ацеталдехид делује као оксидационо средство. Оксидација гвајакола резултира променом боје, у црвену или наранџасту (Слика 9.3). Ова реакција је погодна за брзу квалитативну детекцију ацеталдехида. Промена боје је уочљива чак и при нижим концентрацијама, међутим могу реаговати и други алдехиди, што значи да није апсолутно специфична реакција.



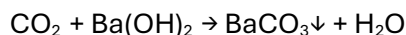
Слика 9.3. Једначина реакције доказивања ацеталдехида

Једна од често коришћених квалитативних реакција за **доказивање етанола** у лабораторијским условима је оксидоредукциона реакција са калијум-дихроматом у киселој средини, у којој настаје зелено-обојени производ. Промена наранџасте боје Cr^{6+} јона реагенса у тамно зелену боју производа (Cr^{3+} јони) је доказ присуства етанола ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) или других примарних алкохола који се оксидују до алдехида, а потом до одговарајуће киселине, Слика 9.4.



Слика 9.4. Једначина реакције доказивања етанола

За доказивање **угљеник(IV)-оксида** (CO_2) може се користити свеже припремљен раствор баријум-хидроксида ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ тзв. баритна вода. Увођењем CO_2 у баритну воду долази до замућења раствора услед настанка нерастворног баријум-карбоната (BaCO_3). Бело замућење или бели талог је доказ присуства угљен-диоксида, Слика 9.5.



Слика 9.5. Једначина реакције доказивања угљеник (IV)-оксида

Као што је наведено, при анаеробним условима квасци преводе глукозу у етанол и угљен-диоксид (CO_2). Количина продуктованог угљен-диоксида зависиће од количине квасаца, али и од типа супстрата који квасци користе као извор енергије (храна). Ако се користи иста количина истих сојева квасаца, може се пратити за коју врсту хране су квасци највише пријемчиви, тј. шта могу лакше да метаболишу. Уколико се на флашу у којој се одвија ферментација стави балон издвојени угљен-диоксид ће надувати балон. Угљен-диоксид испуњава запремину балону сразмерно полазној количини глукозе. У флашама у које су додати сахароза, густин и брашно, глукоза је доступна тек након хидролизе гликозидних веза,

која је ензимски катализована одговарајућим ензимима (сахараза, α -амилаза), па је количина производа мања у односу на флашу у коју је додат грожђани шећер (тј. 98% глюкоза).

Вежба М1. Идентификација интермедијера гликолизе и алкохолне ферментације у квасцима

Реагенси и прибор: 0,5 mol/dm³ раствор динатријум-хидроген-фосфата (Na₂HPO₄), pH 10; чврсти натријум-бисулфит (NaHSO₃); 100 mmol/dm³ водени раствор натријум-флуорида; 10% раствор трихлорсирћетне киселине (CCl₃COOH); раствор 2,4-динитрофенилхидразина (растворити 19,8 mg динитрофенилхидразина у 10 cm³ концентроване хлороводоничне киселине (HCl) и разблажити до 100 cm³); 1,0 g/dm³ раствор гвајакола у 70% етанолу, 2% раствор натријум-хидроксида; 1% раствор калијум-дихромата (K₂Cr₂O₇), концентрована сумпорна киселина (сс H₂SO₄), засићени раствор баријум-хидроксида (Ba(OH)₂), баритна вода, дестилована вода темперирана на 40-45°C; пластичне флаше, балони, пластичне кашичице, техничка вага, сталак са епруветама, инкубатор.

Узорци: декстроза у праху (грожђани шећер), суви пекарски квасац у кесицама (7-10 g / кесици).

Доказивање пирувата

Поступак: у епрувете сипати 2 cm³ раствора пробе (из флашица 1Б, 2, 3, 4), затим додати 1 cm³ раствора 2,4-динитрофенилхидразина и промућкати. Одвадити 2-3 капи у нову епрувету, додати 1 cm³ раствора натријум-хидроксида (NaOH) и разблажити водом до 5 cm³.

Доказивање ацеталдехида

Поступак: сипати у епрувету 2 cm³ пробе, додати 2 cm³ раствора динатријум-хидроген-фосфата и 3 капи гвајакола и промућкати. У присуству ацеталдехида јавља се браон боја.

Доказивање етанола

Поступак: сипати у епрувету 1 cm³ пробе, додати 1 cm³ раствора калијум-дихромата (K₂Cr₂O₇) и 1 cm³ концентроване сумпорне киселине (сс H₂SO₄). Смешу загрејати на кључалом воденом купатилу и пратити промену боје.

Доказивање присуства угљеник(IV)-оксида

Поступак: помоћу цевчице уводити угљен-диоксид (CO₂) у баритну воду и пратити промене.

Поступак: у 5 пластичних флаша одмерити састојке према упутству из Табеле 9.1.

Табела 9.1. Редослед додавања реагенаса у вежби М1

1А	1Б	2	3	4
3 g декстрозе	3 g декстрозе	3 g декстрозе	3 g декстрозе	3 g декстрозе
100 cm ³ воде (40-45°C)	100 cm ³ воде (40-45°C)	100 cm ³ (40-45°C) раствора Na ₂ HPO ₄	100 cm ³ воде (40-45°C)	100 cm ³ млаке воде (40-45°C)
1 cm ³ млаке воде	1 cm ³ млаке воде	1 cm ³ млаке воде	1 cm ³ раствора NaF	0,3 g Na-бисулфита
1 кесица сувог квасца (7 - 10 g)	1 кесица сувог квасца (7 - 10 g)	1 кесица сувог квасца (7 - 10 g)	1 кесица сувог квасца (7 - 10 g)	1 кесица сувог квасца (7 - 10 g)
ставити чеп са цевчицом и уводити у баритну воду	ставити балоне и благо промућкати садржај флашица			
инкубирати на 37°C у току 30 минута, обложи флашице крпом или алуминијумском фолијом				
	додати 2 cm ³ раствора трихлорсирћетне киселине			
користити за доказивање CO ₂	сачекати издвајање талога или по потреби центрифугирати на 2500 о/мин у току 10 минута			
	супернатант сипати у по 3 епрувете			

Све флаше благо промућкати. На флашу 1А ставити чеп са цевчицом и цревом чији је крај уроњен у епрувету са баритом водом (2 cm³). На флаше 1Б-4 ставити балоне. Флаше темперирати на 37°C у току 30 минута. По истеку инкубације, у ове флашице додати по 2 cm³ раствора трихлорсирћетне киселине и сачекати издвајање талога. Декантовати садржај сваке флаше у по три епрувете и извести бојене реакције на пируват, ацеталдехид и етанол према упутству из Табеле 9.2.

Табела 9.2. Редослед додавања реагенса код квалитативне анализе на: пируват, ацеталдехид и етанол

Реакција на пируват	Реакција на ацеталдехид	Реакција на етанол
2 cm ³ пробе	2 cm ³ пробе	1 cm ³ пробе
1 cm ³ раствора 2,4-динитрофенилхидразина	2 cm ³ раствора динатријум-хидроген-фосфата	1 cm ³ раствора калијум-дихормата (K ₂ Cr ₂ O ₇)
промућкати и 2 капи ставити у нову епрувету	3 капи гвајакола	1 cm ³ концентроване сумпорне киселине (сс H ₂ SO ₄).
1 cm ³ раствора натријум-хидроксида (NaOH)		загрејати на кључалом воденом
4 cm ³ воде		

Запажања о промени боји реагенса у доказним реакцијама уписати у Табелу 9.3:

Табела 9.3. Резултати квалитативних реакција на пируват, ацеталдехид и етанол

Реакција на:	Флаша 1Б	Флаша 2	Флаша 3	Флаша 4
пируват	наранџасти талог (+) нема (-)	наранџасти талог (+) нема (-)	наранџасти талог (+) нема (-)	наранџасти талог (+) нема (-)
ацеталдехид	црвено-браон (+) нема (-)	црвено-браон (+) нема (-)	црвено-браон (+) нема (-)	црвено-браон (+) нема (-)
етанол	зелена (+) наранџаста (-)	зелена (+) наранџаста (-)	зелена (+) наранџаста (-)	зелена (+) наранџаста (-)

На основу добијених резултата извести закључке. Такође, навести да ли је доказана продукција угљеник (IV)-оксида у флаши 1А.

Запажања:

Вежба М2. Утицај супстрата на интензитет ферментације квасаца

Реагенси и прибор: дестилована вода темперирана на 40–45°C, пластичне флаше, балони, пластичне кашичице, техничка вага, сталак са епруветама, конач, лењир.

Узорци: декстроза (грожђани шећер), мед, фруктоза, густин, брашно, сахароза, фруктозни сируп, суви пекарски квасац у кесицама

Поступак: у 8 пластичних флаша одмерити супстрате и реагенсе према упутству из табеле.

Табела 9.4. Редослед додавања реагенса у вежби М2

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
-	3 g грожђаног шећера	3 g фруктозе у праху	3 g меда	3 g фруктозног сирупа	3 g сахарозе	3 g густина	3 g брашна
100 cm ³ млаке воде (око 40 – 45°C)							
по 1 кесица сувог квасца (7 – 10 g)							

На сваку флашу поставити балон, садржај флаше благо промућкати и упакovati у алуминијумску фолију или суву крпу. Потом их темперирати на 37°C у току 30 минута. По истеку периода инкубације запазити да су се балони надували и да су балони различите величине на скоро свакој флаши. Обим балона (у најширем делу) обавити концем и дужину конца измерити лењиром. Уписати резултате у Табелу 9.5. тако да се види на којој се флашици највише напунио балон, а на којој најмање. Такође, наведите назив ензима који су потребни да би се ослободили молекули глукозе (раскинула гликозидна веза) из молекула супстрата. На основу добијених резултата изведите одговарајуће закључке.

Табела 9.5. Резултати мерења обима балона [cm] у вежби М2

Ред. бр. флаше	Обим балона [cm], после 15 мин и 30 мин		Назив ензима потребног да се ослободе молекули глукозе из супстрата
1. -			
2. декстроза			
3. фруктоза			
4. мед			
5. фруктозни сируп			
6. сахароза			
7. густин			
8. брашно			

Запажања:

Задатак. Интермедијери гликолизе и алкохолне ферментације

Попунити табелу (Табела 9.6) у којој су дате структурне формуле интермедијера гликолизе и алкохолне ферментације навођењем:

- назива интермедијера
- броја угљеникових атома у њиховим структурним формулама
- називе функционалних група у сваком интермедијеру
- којој класи органских молекула припадају на основу присутних функционалних група
- назива реакција између свака два суседна интермедијера
- назива ензима који катализује сваку реакцију.

Датум и овера асистента (12):

___/___/___

Табела 9.6. Интермедијери гликолизе и алкохолне ферментације

[illegible]

Задаци 2

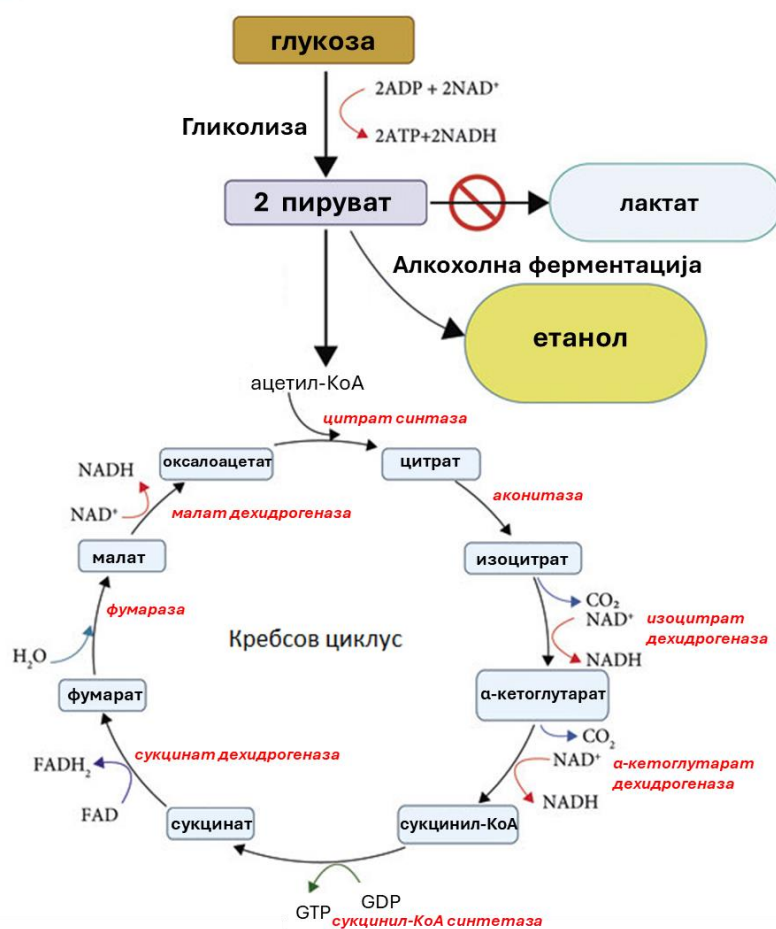
- Применом редокс индикатора детектовати настанак редукованих коензима у Кребсовом циклусу. Пратити промену интензитета плаве боје метиленског плавог при различитим условима експеримента - уз додатак супстрата, уз додатак инхибитора ензима и при физиолошким условима. На основу промене боје метиленско плавог закључити при којим условима настаје више молекула редукованих коензима.

Теоријски део 2

При **аеробним** условима оксидација глюкозе након гликолизе се наставља преко интермедијера **Кребсовог циклуса**, цикличног метаболичког пута који се назива још и циклус лимунске киселине или циклус трикарбонске киселине (Слика 9.6). Улазни интермедијер у Кребсов циклус је **ацетил-** група везана за коензим А, која настаје из пирувата у реакцији декарбоксијације. Кребсов циклус чини низ од осам међупродуката:

цитрат, изоцитрат, α -кетоглутарат, сукцинил-КоА, сукцинат, фумарат, малат и оксалоацетат; који се непрекидно претварају из једног облика у други, редоследом како је приказано на шеми, деловањем специфичних ензима.

Ове реакције се одвијају у матриксу митохондрија и покрећу се у присуству великих количина **ацетил-КоА** који може да потиче из различитих метаболичких путева разградње угљених хидрата, масти или протеина. Ацетил група се са коензима А преноси на оксалоацетат и настаје цитрат (со лимунске киселине), а током низа оксидоредукционих реакција које следе ацетил група се оксидује до 2 молекула угљеник(IV)-оксида, а настају редуковани коензими (3 молекула NADH, 1 молекул FADH_2) и GTP. Интермедијери Кребсовог циклуса су увек присутни у матриксу митохондрија у физиолошким количинама, али њихови нивои варирају у зависности од енергетског стања ћелије.



Слика 9.6. Шематски приказ судбине пирувата код ћелија квасаца. При анаеробним условима фаворизује се ферментација, а при аеробним условима Кребсов циклус.

Даља судбина редукованих коензима NADH и FADH_2 (тј. њихова реоксидација у NAD^+ и FAD облике)

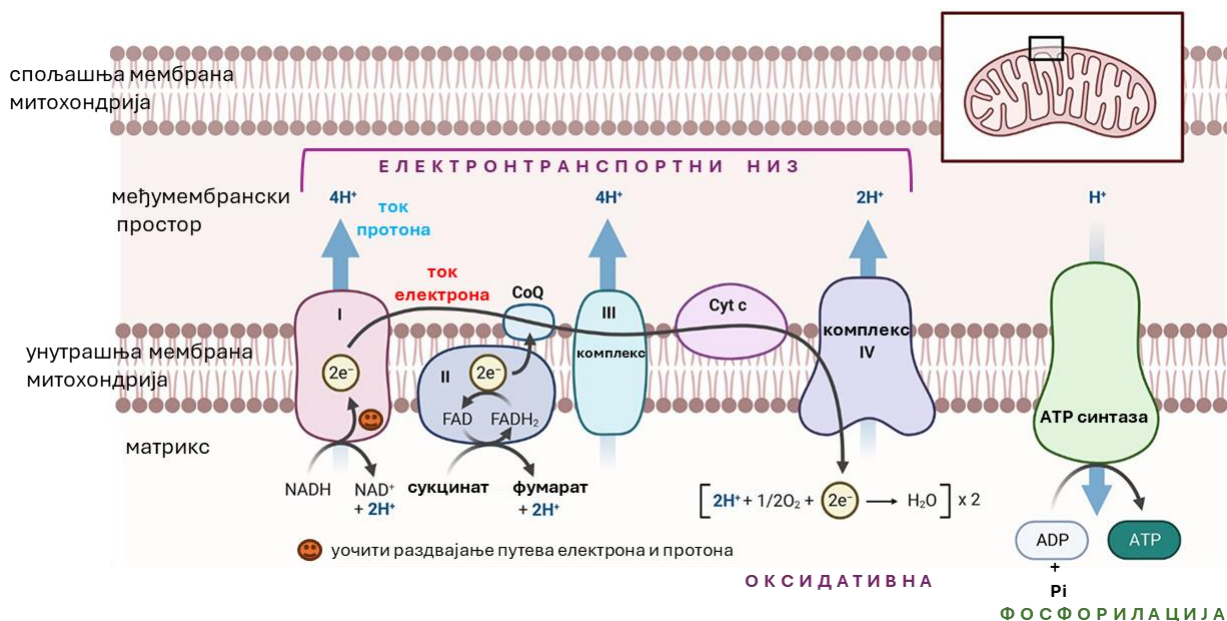
Да би се редуковани коензими реоксидовали ради даље употребе у катаболичким реакцијама, одвија се процес **ћелијског дисања** (Слика 9.7). Овај сложени процес чине **електрон-транспортни низ** и **оксидативна фосфорилација**, а може се разложити на неколико кључних фаза:

1. реоксидацију коензима, тј. коензими отпуштају **електроне** (e^-) и **протоне** (H^+);
2. пренос ослобођених електрона кроз протеинске пумпе (комплексе протеина урођене у унутрашњу мембрану митохондрија) до крајњег акцептора електрона, молекулског кисеоника (O_2). Разликују се **четири протеинска комплекса** и они **чине** тзв. **електрон-транспортни низ** (ЕТН);
3. стварање градијента протона: пумпањем протона (H^+) из матрикса у међумембрански простор настаје разлика у концентрацији H^+ јона између ова два региона у митохондријама, раздвојена унутрашњом мембраном. Пумпе (молекули протеина из ЕТН) које својим радом генеришу градијент, добијају енергију за свој рад из протока електрона са редукованих коензима до кисеоника. Како електрони пролазе кроз ЕТН, електрони губе енергију на сваком кораку. На крају ЕТН, електрони морају бити уклоњени како би се омогућио проток нових електрона. Томе служи кисеоник, тако што прихвата електроне који су прошли кроз ЕТН;
4. синтезу АТФ молекула - коришћењем протонског градијента покреће се ензим **АТФ синтаза** која катализује енергетски веома неповољну реакцију адиције молекула неорганског фосфата на молекуле АДФ, при чему настају енергијом богати АТФ молекули.

Дакле, редуковани коензими су носиоци потенцијалне енергије (атома водоника који потичу из молекула хране) која се користи за континуирану производњу АТФ молекула.

Без кисеоника као крајњег прихватиоца електрона, проток електрона кроз ЕТН би се зауставио, што би прекинуло производњу АТФ-а. Зато је кисеоник кључан за аеробно дисање — његова способност да прихвата електроне обезбеђује непрекидни рад ЕТН и производњу АТФ-а, који је главни извор енергије за ћелију.

Када кисеоник прихвати електроне, он се комбинује са протонима (H^+) да би формирао воду (H_2O). Ова реакција се може приказати као: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$.



Улога АТФ молекула у организму

АТФ (аденозин-трифосфат) игра централну улогу у управљању енергијом у ћелијама и организму, служећи као примарна енергетска валута. Његове функције обухватају многе биолошке процесе неопходне за преживљавање, раст и одржавање организма. Неке од кључних улога АТФ молекула у организму су:

1. **пренос енергије за ћелијске процесе:** за реакције биосинтезе макромолекула; за активни транспорт кроз ћелијску мембрану; за контракцију мишића (промену конформације миозинских влакана ради интеракције са актином); за ћелијску деобу итд;
2. **пренос сигнала:** ATP је укључен у трансдукцију сигнала – путем фосфорилације протеина мења се конформацију, а тиме и функција протеина, што је кључно за пренос сигнала; прекурсор је за настанак cAMP, секундарног гласника у ћелији;
3. учествује у **регулацији метаболичких путева:** представља супстрат и модулатор активности регулаторних ензима и тиме утиче на врзину метаболичких реакција у складу са енергетским потребама ћелије. Уколико ћелије имају довољно енергије фаворизују се реакције биосинтезе и зауставља се складиштење енергије, а уколико има дефицит енергије фаворизују се катаболичке реакције;
4. **одржавање хомеостазе ћелије:** покретањем јонских пумпи у ћелијским мембранама одржавају се електрохемијски градијенти јона што је од нарочитог значаја за правилно функционисање нервних и мишићних ћелија;
5. **одржавање телесне температуре:** хидролиза ATP молекула користи се за одржавање телесне температуре;
6. **изградња нуклеинских киселина:** ATP молекули су градивне јединице РНК молекула, а у облику деоксирибонуклеотида (dATP) учествују у грађењу ДНК молекула;
7. **детоксикација и уклањање ћелијског отпада:** у јетри, покреће реакције детоксикације олакшавајући реакције коњугације (нпр. са глутатионом); ATP је потребан за разградњу протеина путем протеазома, помажући уклањање оштећених или неправилно савијених протеина из ћелије;
8. **краткотрајно складиште енергије:** ATP се складишти у малим количинама у мишићним ћелијама и користи се током краткотрајних интензивних активности;
9. **ослобађање и рециклирање неуротрансмitera** у синапсама: може и сам деловати као неуротрансмитер;
10. **регулација апоптозе:** облика програмиране ћелијске смрти, што је од значаја за рад имуног система и елиминисање оштећених ћелија.

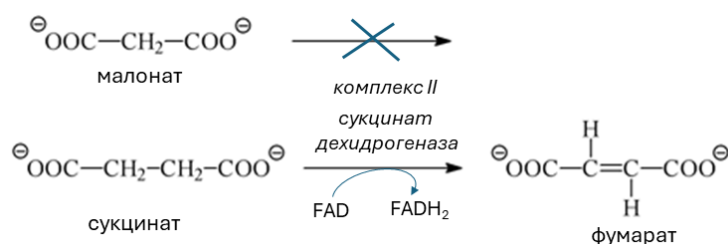
Сумарно, ATP је незаменљив за готово све биолошке функције, од обезбеђивања енергије за ћелијски рад, сигнализацију и регулацију метаболизма до подршке кретању, хомеостазе и комуникацији између ћелија. Он је кључан за одржавање живота и на ћелијском нивоу и на нивоу организма.

Експериментални део 2

Вежба М3. Идентификација редукованих коензима

Методологија

Користити млевено месо тј. ћелије мишићног ткива као извор ензима Кребсовог циклуса. Једна од реакција Кребсовог циклуса је и оксидација (дехидрогенација) сукцината до фумарата коју катализује ензим сукцинат дехидрогеназа. Атоми водоника се са сукцината преносе на коензим FAD (флавин-аденин-динуклеотид) који прелази у редуковану форму FADH_2 , како је приказано у једначини реакције (Слика 9.8).



Слика 9.8. Једначина реакције оксидације сукцината у фумарат уз редукцију коензима FAD до FADH_2

CN(C)c1ccc2c(c1)nc3ccccc3s2 + 3H⁺ + 2e⁻ ⇌ C[NH+](C)c1ccc2c(c1)n([H])c3ccccc3s2
 оксидована форма (плаве боје) редукована форма (безбојна)

Узорак: млевено месо (упоређи да ли има разлике ако се користи јунеће и пилеће месо)

Поступак: у четири обележене епрувете додати реагенсе према упутству из табеле (Табела 9.7).

Табела 9.7. Редослед додавања реагенаса у вежби М3.

1.	2.	3.	4.
-	1 g млевеног мяса	1 g млевеног мяса	1 g млевеног мяса
3 cm ³ воде	3 cm ³ воде	3 cm ³ воде	4 cm ³ воде
1 cm ³ раствора сукцината	-	1 cm ³ раствора сукцината	-
-	1 cm ³ раствора малоната	-	-
1 кап индикатора	1 кап индикатора	1 кап индикатора	1 кап индикатора

Потом, **само једном снажно промућати** садржај сваке епрувете и ставити их у сталак. Забележити промене боје у епруветама. Који је редослед обезбојавања раствора у пробама. Образложите добијене резултате.

Запажања:

Задатак. Интермедијери Кребсовог циклуса

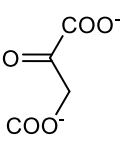
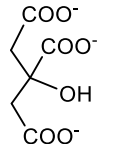
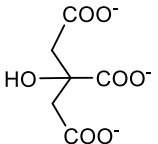
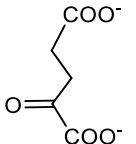
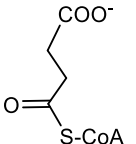
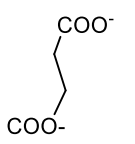
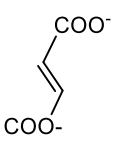
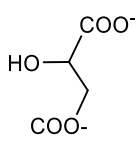
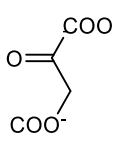
У првом реду табеле (Табела 9.8) приказане су структурне формуле интермедијера цикличног метаболичког пута који се зове Кребсов циклус или циклус лимунске киселине или циклус трикарбонске киселине, а који представља последњу фазу оксидације органских молекула у ћелијама. Попунити табелу навођењем:

- а) тривијалног назива интермедијера
- б) броја угљеникових атома у њиховим структурним формулама
- в) назива функционалних група у сваком интермедијеру
- г) којој класи органских молекула припадају (на основу присутних функционалних група)
- д) назива реакција између свака два суседна интермедијера
- ђ) назива ензима који катализује сваку реакцију.

Датум и овера асистента (11):

__ / __ / ____

Табела 9.8. Интермедијери Кребсовог циклуса

								
Број угљеникових атома								
назив интермедијера (навести и назив киселине и назив одговарајуће соли)								
назив функционалних група присутних у молекулу								
којој класи органских једињења припада молекул на основу присутних функционалних група								
тип реакција превођења једног интермедијера у други (који ензим катализује реакцију)								

Задаци 3

- Испитати значај дигестивних ензима, као и специфичних услова (одговарајућа pH, присуство жучних киселина) у варењу хране. На основу претходног знања предложити бојене реакције којима се могу утврдити производи разлагања: протеина, триацилглицерола и скроба.

Теоријски део 3

Храна тј. макромолекули из хране се варе (разлажу), а затим ресорбују у крвоток или елиминишу из организма, правилним функционисање гастроинтестиналног тракта (ГИТ).

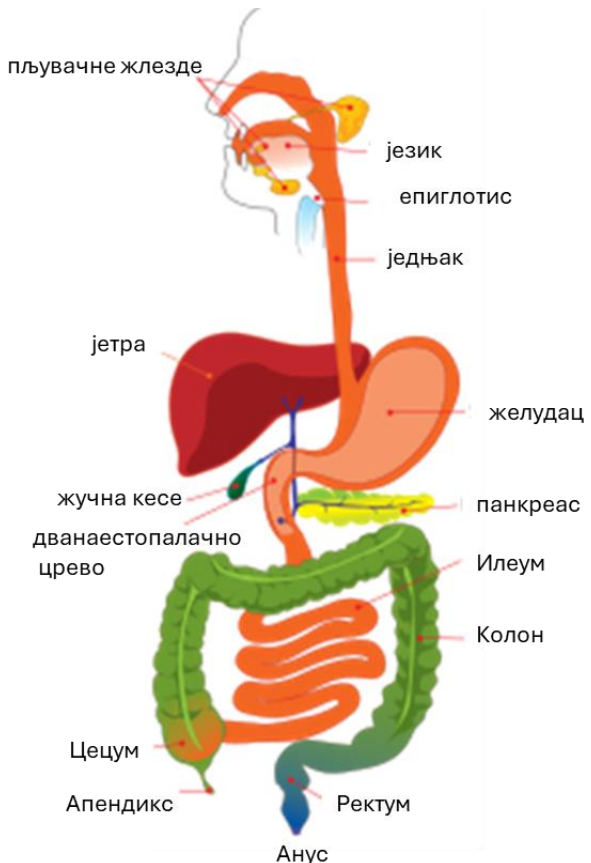
Гастроинтестинални тракт је континуално црево које се протеже од усне дупље до ануса, а различити региони врше различите функције у варењу, као што су: разлагање полимера на саставне мономерне јединице, ресорпцију (усвајање) нутриената кроз епителијалне ћелије танког црева у крвоток, елиминацију несварених остатака хране.

Различити региони ГИТ-а (Слика 9.10) су: усна дупља, ждрело, једњак, желудац, танко црево (дванаестопалачно црево, јејунум, илеум), дебело црево (цецум, колон, ректум, анални канал) и анус.

Помоћни органи ГИТ-а су: јетра, жучна кеса, панкреас, пљувачне жлезде, јер продукују и луче различите дигестивне ензиме или супстанце потребне за оптималан рад ензима (подешавање pH, емулговање итд).

Кључни ензими дигестивног тракта (дигестивни ензими) за хидролизу:

- **пептидних веза у протеинима** су различите протеазе: пепсин (продукује се у ћелијама желуца, делује у желуцу); трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, еластаза (продукују се у ћелијама панкреаса а излучују се у и делују у танком цреву); аминопептидазе и дипептидазе (продукују се у ћелијама које облажу танко црево, и делују у лумену црева);
- **естарских веза у триацилглицеролима** и другим липидима су: липаза из пљувачке (продукују је ћелије пљувачних жлезда, делује у усној дупљи); желудачна липаза (продукују је ћелије зида желуца; делује у лумену желуца), панкреасна липаза (продукују је ћелије панкреаса, делује у лумену црева) холестерол-естераза, фосфолипаза A2, лизофосфолипаза (продукују их ћелије зида црева, делују у лумену црева). Помоћни молекули за емулговање масти су жучне киселине. Продукују их ћелије јетре, складиште се у жучној кеси, а делују у лумену танког црева. Олакшавају рад панкреасних липаза;
- **гликозидних веза скроба, лактозе и других шећера** су: α -амилаза из пљувачке (продукују је ћелије пљувачних жлезда, делује у усној дупљи); α -амилаза из панкреаса (продукују је ћелије панкреаса, делује у лумену танког црева); малтаза, сахараза, лактаза, изомалтаза, трехалаза (продукују их ћелије зида танког црева, делују на површини ендотелијалних ћелија црева или у лумену црева).



Слика 9.10. Различити региони гастроинтестиналног тракта (ГИТ)

Експериментални део 3

Методологија

Дигестија протеина је процес разградње протеина на краће пептиде или саставне јединице, аминокиселине, које тело може апсорбовати и користити. Пептидазе су ензими који катализују хидролизу амидних веза у полипепидним ланцима. Углавном су то ензими са групном специфичности, а **селективно раскидају пептидне везе** између одговарајућих аминокиселина (нпр. *пепсин* раскида оне пептидне везе код којих је ароматична аминокиселина реаговала својом карбоксилном групом; *трипсин* оне пептидне везе у којима карбоксилна група потиче од базних аминокиселина – лизина и аргинина; док *химотрипсин* раскида пептидне везе које такође формирају ароматичне аминокиселине (карбоксилном групом), али и оне поред којих се налазе леуцин, метионин и хистидин). Наведене пептидазе се разликују и по вредности **оптималне рН**: за пепсин је оптимална јако ниска рН, док остали делију при благо базним условима. Ниска рН у желуцу је значајна и за „стерилизацију“ хране. Оно што је такође карактеристика пептидаза јесте да се оне синтетишу у ћелијама у **зимогеној форми (неактивна форма)**, а до њихове активације долази у лумену желуца или у лумену црева. За пепсин, који се лучи као пепсиноген, мале концентрације хлороводоничне киселине су потребне за **активацију** и превођење у пепсин.

Блажи облици дисфункције дигестивног тракта (лоше варење, диспепсија, надутост, гасови, инсуфицијенција панкреаса) могу се ублажити употребом препарата попут **дигестала**. Овај препарат садржи различите ензиме потребне за процес варења хране као што су амилаза, липаза и пептидазе.

За праћење активности пептидаза може се користити Биуретска реакција. У овој доказној реакцији базни услови омогућавају пептидазију полипептида, који потом граде комплексе са Cu^{2+} јонима, љубичасте боје. Љубичаста боја раствора је пропорционална концентрацији полипептида, али и дужини полипептидног ланца протеина. Уколико је дошло до хидролизе пептидних веза, мења се интензитет љубичасте боје, што може да служи за праћење активности пептидаза, нпр. пепсина и утицаја хлороводоничне киселине на активност овог ензима.

Дигестија липида представља хидролизу естарских веза у молекулима триацилглицерола, до моноацилглицерола и слободних масних киселина који могу да се ресорбују у танком цреву. Липиде уносимо кроз различите намирнице, између осталог и млека. Садржај липида у млеку варира. Праћење ефикасности липаза у разлагању липида из млека може се постићи коришћењем кисело-базног индикатора, бром-крезол-зеленог (Слика 9.11). Уколико липазе убрзају реакцију хидролизе естарских веза у триацилглицеролима из млека, ослободиће се масне киселине које ће утицати на промену рН раствора. Типична рН вредност млека је у интервалу 6,5-6,8 рН јединица. Она зависи од врсте (козије < кравље < овчије), од састава (садржај протеина и минерала) као и периода стајања млека, да ли је пастеризовано итд. Разлике у количини ослобођених масних киселина утицаће и на промену рН раствора тј. на промену боју индикатора.



Слика 9.11. Распон боја индикатора у зависности од рН вредности раствора.
Протонована и депротонована форма индикатора.

Дигестија угљених хидрата

Молекули скроба се у усној дупљи хидролизују (разлажу) најпре на производе попут амилодекстрина, еритродекстрина и ахродекстрина, а потом до малтозе као крајњег производа, с тим што може настати и извесна количина глукозе. Хидролиза скроба је катализована присуством ензима α -амилазе из пљувачке. Разлагање скроба може се постићи и дејством хлороводоничне киселине као неорганског катализатора, уз загревање. Ефикасност деловања амилазе може се испитати двома реакцијама: Луговолом пробом и Тромеровом реакцијом. Првом реакцијом се испитује колико је скроба остало у огледу након хидролизе, а другом колико је настало редукујућих шећера (малтозе и глукозе).

Вежба М4. Значај протеаза у варењу (дигестији) протеина

Реагенси и прибор: 10% раствор натријум-хидроксида (NaOH), 5% раствор бакар(II)-сулфата (CuSO_4), сталак са епруветама, газа

Узорак: беланце (раствор беланцета), дигестал, пепсин

Припрема раствора беланцета: беланце јајета, одвојено од жуманцета, помешти са десетоструком количином дестиловане воде и процедити преко двоструке овлажене газе. Филтрат представља раствор јајчаног албумина, док у талогу остаје јајчани глобулин. Садржај албумина у беланцету износи око 5-6%, па је припремљени раствор приближно 0,5%.

Таблете дигестала хомогенизовати у авану са тучком и екстраховати са 20 cm^3 дестиловане воде. Смешу центрифугирати на 3000 о/мин у току 5 минута. Користити супернатант у огледу.

Биуретска реакција_поступак: у епрувету сипати 1 cm^3 пробе и дупло већу запремину 10% раствора натријум-хидроксида (NaOH). Благо промућкати и додати пар капи 5% раствора бакар(II)-сулфата (CuSO_4).

Поспутац: у шест нумерисаних епрувета додати реагенсе како је наведено у Табели 9.9.

Табела 9.9. Редослед додавања реагенаса у вежби М4.

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5	Епрувета 6
1 cm^3 беланце	1 cm^3 беланце	1 cm^3 беланце	1 cm^3 беланце	1 cm^3 беланце	1 cm^3 беланце
2 cm^3 дест. вода	2 cm^3 дест. вода	2 cm^3 пепсин	2 cm^3 пепсин	2 cm^3 дигестала	2 cm^3 дигестала
-	2 капи сс HCl	-	2 капи сс HCl	-	2 капи сс HCl
60 мин инкубација на 37°C	60 мин инкубација на 37°C	60 мин инкубација на 37°C	60 мин инкубација на 37°C	60 мин инкубација на 37°C	60 мин инкубација на 37°C
Биуретска реакција	Биуретска реакција	Биуретска реакција	Биуретска реакција	Биуретска реакција	Биуретска реакција

На основу обојености добијених раствора извести закључке.

Запажања:

Вежба М5. Значај жучних киселине у варењу (дигестији) липида

Реагенси и прибор: рН индикатор (бром-крезол-зелено), соли жучних киселина (говеђа жуч), липаза ($c=0,15 \text{ mg/cm}^3$), амилаза ($c=0,15 \text{ mg/cm}^3$), сталак са епруветама

Узорак: млеко

Поступак: у пет епрувета додати по 1 cm^3 узорка млека и сипати реагенси како је приказано у Табели 9.10.

Табела 9.10. Редослед додавања реагенаса у вежби М5.

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3	Епрувета 4	Епрувета 5
1 cm^3 млека	1 cm^3 млека	1 cm^3 млека	1 cm^3 млека	1 cm^3 млека
2 капи индикатора	2 капи индикатора	2 капи индикатора	2 капи индикатора	2 капи индикатора
1 cm^3 воде	1 cm^3 липазе	1 cm^3 липазе	1 cm^3 амилазе	1 cm^3 амилазе
2 капи соли жучних киселина		2 капи соли жучних киселина		2 капи соли жучних киселина
инкубација на 37°C у току 15 минута				

На основу промене боје индикатора извести закључак о утицају соли жучних киселина на варење липида.

Запажање:

Вежба М6. Значај ензима α -амилазе у варењу (дигестији) скроба

Реагенски и прибор: ензим амилаза ($c=0,15 \text{ mg/cm}^3$), 1% раствор скроба у 0,3% раствору натријум-хлорида (NaCl), 10% раствор хлороводоничне киселине (HCl), 10% раствор натријум-хидроксида (NaOH), 1% раствор бакар(II)-сулфата, Луголов раствор, водено купатило, термометар, сталак са епруветама.

Проба јода: у једну половину пробе додати 1-2 капи Луголовог раствора.

Тромерова реакција: у другу половину пробе додати 1 cm^3 10% раствора натријум-хидроксида (NaOH) и $0,5 \text{ cm}^3$ 1% раствора бакар(II)-сулфата (CuSO_4) и загрејати садржај епрувете у воденом купатилу.

Поступак: нумерисати три епрувете и додати у сваку по 5 cm^3 1% раствора скроба и реагенсе како је наведено у Табели 9.11.

Табела 9.11. Редослед додавања реагенаса у вежи М6:

Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3
5 cm^3 1% раствор скроба	5 cm^3 1% раствор скроба	5 cm^3 1% раствор скроба
-	HCl	ензим
Инкубација на 37°C у току 15 минута		

Садржај сваке епрувете испитати квалитативним реакцијама на присуство скроба (проба са јодом) и на присуство глукозе или малтозе (Тромерова реакција). Због тога садржај сваке епрувете поделити на два дела и додати одговарајуће реагенсе како је наведено у Табели 9.12.

Табела 9.12. Редослед додавања реагенаса при квалитативној анализи

Проба јода	Тромерова реакција
1 cm^3 проба	1 cm^3 проба
1-2 капи Луголовог раствора	1 cm^3 10% раствора натријум-хидроксида (NaOH)
	$0,5 \text{ cm}^3$ 1% раствора бакар(II)-сулфата (CuSO_4)
	загрејати садржај епрувете у воденом купатилу

Резултате бојених реакција прикажи у табели 9.13.

Табела 9.13. Резултати квалитативне анализе

	Епрувета 1	Епрувета 2	Епрувета 3
Луголова реакција	тегет – плави раствор (+) безбојни раствор (-)	тегет – плави раствор (+) безбојни раствор (-)	тегет – плави раствор (+) безбојни раствор (-)
Тромерова реакција	плави раствор (-) црвени талог (+)	плави раствор (-) црвени талог (+)	плави раствор (-) црвени талог (+)

Извести закључак о ефикасности разградње скроба.

Запажања:

Датум и овера асистента (13):

___ / ___ / _____

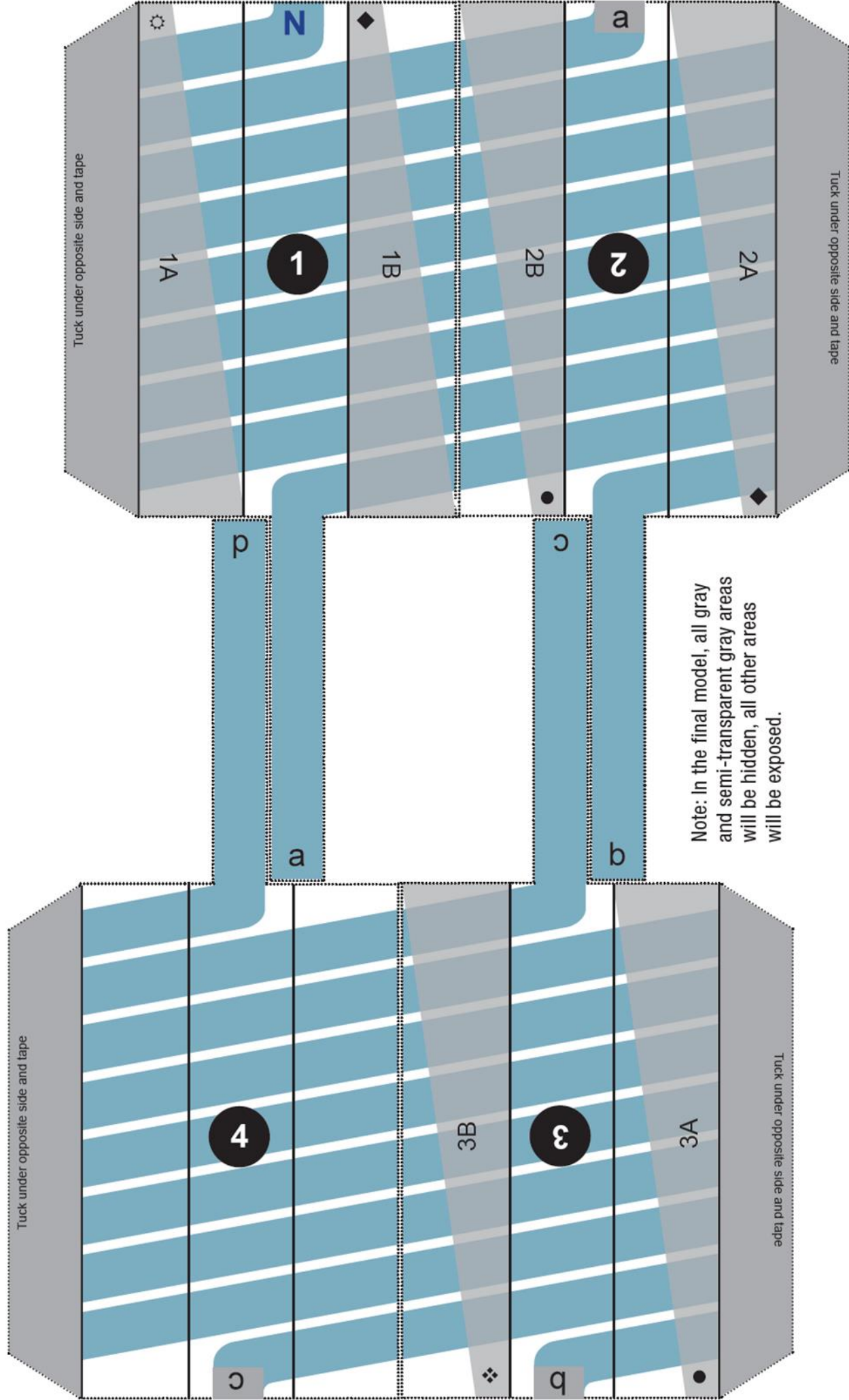
Литература

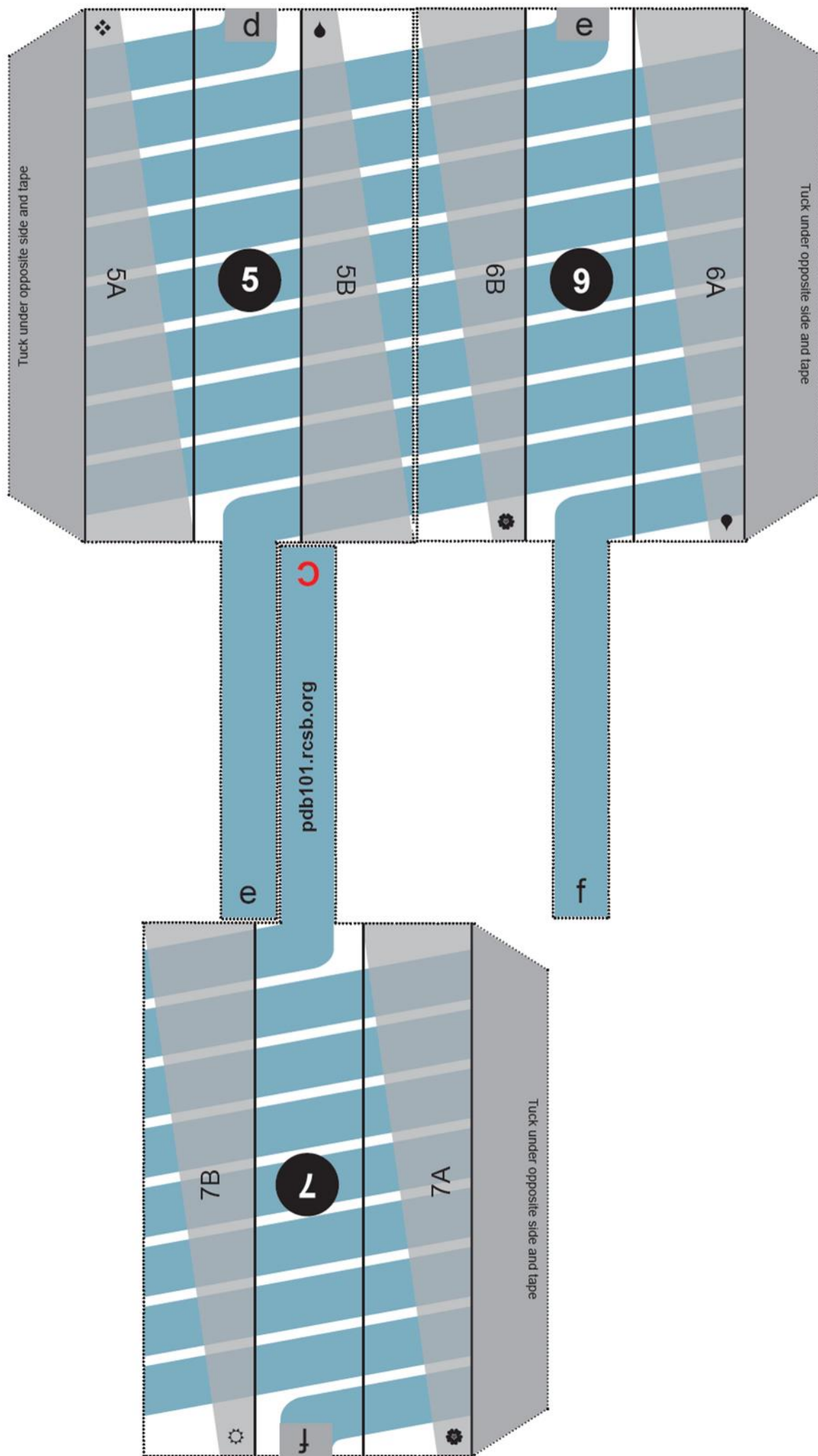
1. Brestenský, M., Nitrayová, S., Patráš, P., & Nitray, J. (2019). Dietary requirements for proteins and amino acids in human nutrition. *Current Nutrition & Food Science*, 15(7), 638-645.
2. Voet, D., & Voet, J. G. (2010). *Biochemistry*. John Wiley & Sons.
3. Vucic, V., Tepsic, J., Arsic, A., Popovic, T., Debeljak-Martacic, J., & Glibetic, M. (2012). Fatty acid content of vegetable oils and assessment of their consumption in Serbia. *Acta Alimentaria*, 41(3), 343-350.
4. Kushak, R. I., Drapeau, C., Van Cott, E. M., & Winter, H. H. (2000). Favorable effects of blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 2(3), 59-65.
5. Lindner, P., & Shomer, I. (1984). Interference of azide in assays of carbohydrates. *Food chemistry*, 14(2), 141-153.
6. Malherbe, J. & Meyep C. (1997). A mini qualitative Carbohydrate Analysis Session, *Journal of Chemical Education*, 74(11) 1304-1305
7. Мимица-Дукић, Н. (2014). Интермедијерни метаболизам, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Нови Сад
8. Михаиловић, М., Јовановић, И. (2008). Биохемија, Научна КМД, Београд
9. Петровић, Ј. и др. (2000) Практикум из биохемије и препаративне биохемије, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, Нови Сад
10. Петровић, А. (2023). На морском плавом жалу – чаробни свет протеина. *Хемијски преглед* 64(5-6) 82-95
11. Porsgaard, T., & Høy, C. E. (2000). Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *The Journal of nutrition*, 130(6), 1619-1624.
12. Catala A. (2012): Lipid peroxidation, Ријека, Хрватска.
13. Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N. (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate polymers*, 54(1), 59-61.
14. Quinn, P. J., Chapman, D., & Keith, A. D. (1980). The Dynamics of Membrane Structure. *Critical Reviews in Biochemistry*, 8(1), 1-117.
15. <https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/dna>
16. <https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/trna>
17. <https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/g-protein-coupled-receptor-gpcr>

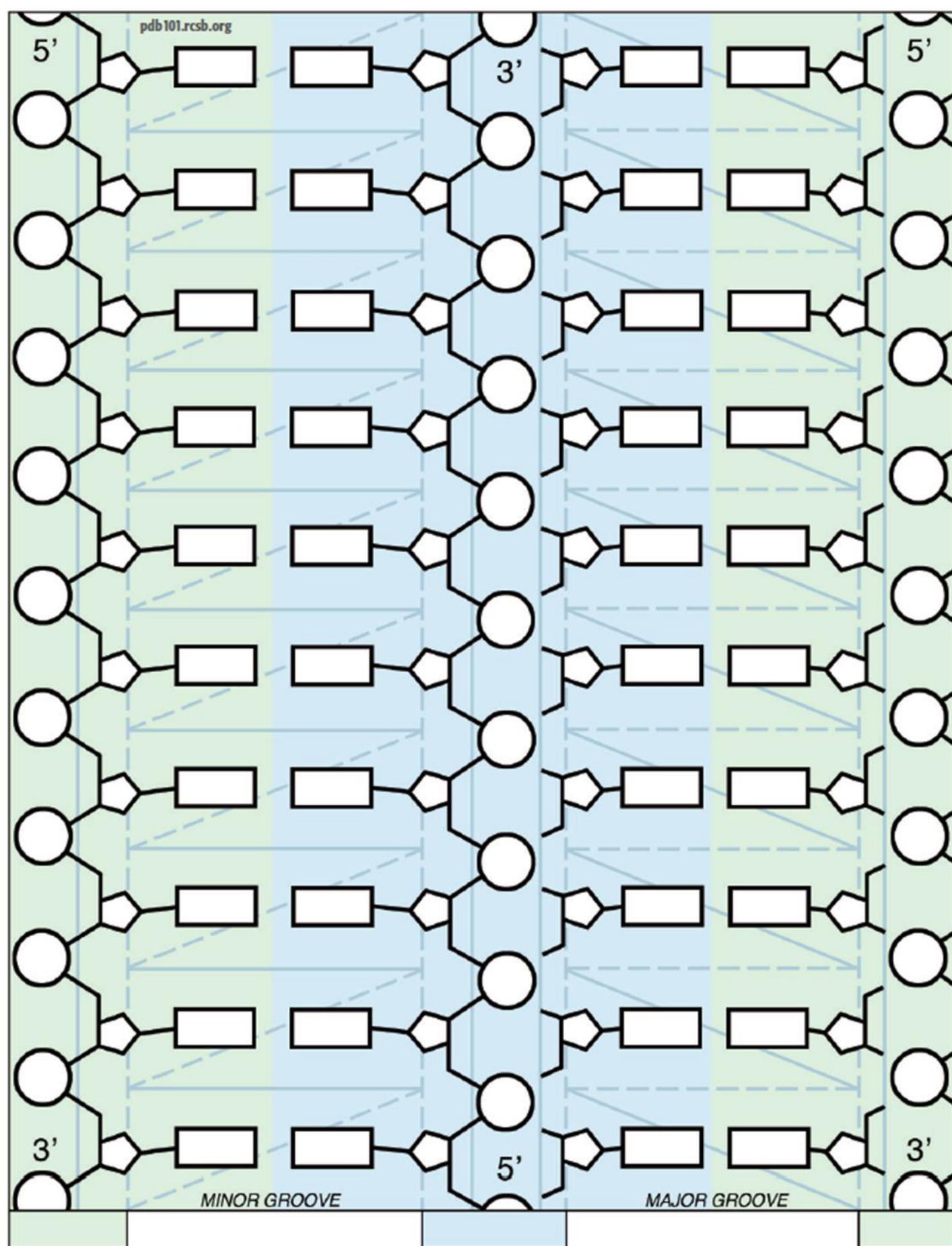
Прилог

У прилогу су папирни модели за састављање тромензионалних структура молекула: G-протеин зависног рецептора, ДНК и тРНК.

Упутства за састављање се налазе у Поглављу 3 и Поглављу 7.







PDB-101 is the educational portal of RCSB Protein Data Bank (rcsb.org)

