

Dr Dejan Prvulović
Dr Đorđe Malenčić
Dr Jovana Šućur

PRAKTIKUM IZ BIOHEMIJE ŽIVOTINJA

EDICIJA POMOĆNI UDŽBENIK

Osnivač i izdavač edicije:

Poljoprivredni fakultet, Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Godina osnivanja:
1954

Glavni i odgovorni urednik edicije:

Dr Nedeljko Tica, redovni profesor
Dekan Poljoprivrednog fakulteta

Članovi Komisije za izdavačku delatnost:

Dr Ljiljana Nešić, vanredni profesor
Dr Branislav Vlahović, vanredni profesor
Dr Nada Plavša, vanredni profesor
Dr Milica Rajić, redovni profesor

katalogizacija

Autori:

Dr Dejan Prvulović, docent

Dr Đorđe Malenčić, redovni profesor

Dr Jovana Šućur, docent

Glavni i odgovorni urednik:

Dr Nedeljko Tica

Dekan Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti:

Dr Milan Popović, redovni profesor u penziji

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

Dr Danijela Kojić, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet

Izdavač:

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Zabranjeno preštampavanje i fotokopiranje. Sva prava zadržava izdavač.

Štampa: FB print, Novi Sad

Štampanje odobrio: Komisija za izdavačku delatnost, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Tiraž: 20

Mesto i godina štampanja: Novi Sad, 2017.

Ime i prezime

Broj indeksa

| Broj vežbe | Naziv vežbe | Overa |
|-------------------|---|--------------|
| 1. | Određivanje izoelektrične tačke aminokiseline alanina | |
| 2. | Određivanje izoelektrične tačke proteina želatina | |
| 3. | Bojene reakcije na proteine | |
| 4. | Denaturacija i koagulacija proteina | |
| 5. | Određivanje sadržaja proteina metodom Lowrya | |
| 6. | Određivanje kreatinina u serumu i urinu | |
| 7. | Uticao temperature i pH na aktivnost enzima amilaze | |
| 8. | Uticao koncentracije supstrata [S] i koncentracije enzima [E] na brzinu enzimske reakcije | |
| 9. | Aktiviranje lipaze solima žučnih kiselina | |
| 10. | Kvalitativne reakcije na ugljene hidrate | |
| 11. | Razdvajanje smeše lipida iz žumanceta metodom tankoslojne hromatografije | |
| 12. | Izolovanje lecitina iz žumanceta i kvalitativne reakcije na njega | |
| 13. | Izolovanje holesterola iz svinjskog mozga | |
| 14. | Ketonska tela | |
| 15. | Određivanje saponifikacionog i jodnog broja | |
| 16. | Izolovanje deoksiribonukleinskih kiselina iz svinjske jetre | |
| 17. | Izolovanje ribonukleinskih kiselina iz ćelija kvasca | |
| 18. | Određivanje sadržaja adrenalina | |
| 19. | Bojene reakcije na vitamine | |

PREDGOVOR

Pomoćni udžbenik "Praktikum iz biohemije životinja" je napisan u skladu sa akreditovanim Nastavnim planom i programom vežbi iz predmeta Biohemija i Biohemija životinja. Ovaj praktikum je prvenstveno namenjen studentima stočarstva i veterinarske medicine na osnovnim i integrisanim akademskim studijama. Praktikum omogućava studentima da steknu osnovna znanja o značaju biohemije, njenoj povezanosti sa drugim naučnim disciplinama i da se upoznaju sa osnovnim biohemijskim metodama. Poznavanje osnovnih biohemijskih metoda ima i značaja za pravilno tumačenje rezultata sa kojima će se budući stručnjaci sresti u praksi.

Autori žele da se zahvale svima koji su pomogli da tekst dobije svoj finalni oblik. Posebnu zahvalnost dugujemo recenzentima dr Milanu Popoviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u penziji i dr Danijeli Kojić, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta.

Novi Sad, 2017. godine

Autori

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| UVOD | 1 |
| 1. PROTEINI..... | 2 |
| 1.1. Određivanje izoelektrične tačke aminokiseline alanina | 3 |
| 1.2. Određivanje izoelektrične tačke proteina želatina..... | 5 |
| 1.3. Bojene reakcije na proteine | 7 |
| 1.4. Denaturacija i koagulacija proteina..... | 15 |
| 1.5. Određivanje sadržaja proteina metodom Lowrya..... | 20 |
| 1.6. Određivanje kreatinina u serumu i urinu | 22 |
| 2. ENZIMI..... | 24 |
| 2.1. Uticaj temperature i pH na aktivnost enzima amilaze | 26 |
| 2.2. Uticaj koncentracije supstrata [S] i koncentracije enzima [E] na brzinu enzimske reakcije..... | 32 |
| 2.3. Aktiviranje lipaze solima žučnih kiselina..... | 39 |
| 3. UGLJENI HIDRATI..... | 42 |
| 3.1. Kvalitativne reakcije na ugljene hidrate | 43 |
| 4. LIPIDI | 53 |
| 4.1. Razdvajanje smeše lipida iz žumanceta metodom tankoslojne hromatografije | 57 |
| 4.2. Izolovanje lecitina iz žumanceta i kvalitativne reakcije na njega..... | 62 |
| 4.3. Izolovanje holesterola iz svinjskog mozga..... | 64 |
| 4.4. Ketonska tela | 66 |
| 4.5. Određivanje saponifikacionog i jodnog broja | 68 |
| 5. NUKLEINSKE KISELINE..... | 71 |
| 5.1. Izolovanje deoksiribonukleinskih kiselina iz svinjske jetre | 72 |
| 5.2. Izolovanje ribonukleinskih kiselina iz ćelija kvasca | 74 |
| 6. HORMONI..... | 75 |
| 6.1. Određivanje sadržaja adrenalina..... | 76 |
| 7. VITAMINI | 78 |
| 7.1. Bojene reakcije na vitamine | 79 |
| LITERATURA..... | 82 |

UVOD

Poznavanje osnovnih biohemijskih procesa je osnovno polazište za pravilno razumevanje funkcije pojedinih tkiva, organa i organizma kao celine. Intenzivan razvoj biohemije je omogućio da se dobije velik broj informacija o hemijskim procesima koji se odvijaju u živim sistemima, prometu materije i energije i da se mnoga od tih saznanja iskoriste u praksi: poljoprivredi, zaštiti životne sredine, dijagnostici i medicini, farmaceutici itd.

Biohemija je spona koja povezuje biologiju i hemiju, proučava hemijske reakcije koje se odvijaju u živim organizmima a koje omogućavaju postojanje života. Skup tih hemijskih reakcija se naziva metabolizam. U metaboličkim reakcijama dolazi do modifikacije hemijskih jedinjenja uz istovremeni protok energije. Metabolizam se deli na anabolizam: sintezu složenijih organskih molekula iz jednostavnijih prekursora, i katabolizam: razgradnju kompleksnih organskih jedinjenja do molekula jednostavnije strukture. Ovaj složeni sistem omogućava da se ćelije, tkiva, organi, pa i sam organizam održava u životu, razvija i reprodukuje. Biohemija se bavi i proučavanjem struktura hemijskih jedinjenja koja učestvuju u metaboličkim reakcijama. Ta jedinjenja se nazivaju biomolekulima i dele se na primarne i sekundarne biomolekule. Primarni biomolekuli su zajednički za sve ćelije svih živih bića i u njih spadaju: proteini, ugljeni hidrati, lipidi i nukleinske kiseline, kao i mnogi od njihovih prekursora i derivata. Sekundarni biomolekuli su karakteristični samo za pojedine klase živih bića i obično su prisutna samo u pojedinim tkivima ili organima u njima. Biohemija je blisko povezana sa drugim naukama poput: organske hemije, molekularne biologije i fiziologije, a našla je i svoju široku primenu u veterinarskoj i humanoj medicini, poljoprivredi, prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Biohemija je nauka kod koje je eksperimentalni rad od najvećeg značaja. Laboratorijske i eksperimentalne analize doprinose otkrivanju novih i potvrđivanju važećih zakonitosti u biološkim sistemima.

1. PROTEINI

Proteini ili belančevine su jedinjenja široko rasprostranjena u prirodi, a čine osnovne ćelijske sastojke svih živih organizama. Ime im potiče od grčke reči *proteios*, što znači prvi ili najvažniji. Iako su sva jedinjenja koja ulaze u sastav ćelije važna za njenu pravilnu funkciju, proteini među njima zauzimaju posebno mesto jer su nezamenjivi u izgradnji ćelijskih struktura, katalizi i regulaciji metabolizma, procesima kontrakcije i transportu materija, a neki od njih ulaze u sastav odbrambenih sistema viših organizama.

Bez obzira na funkciju ili biološku aktivnost, svi proteini su makromolekuli izgrađeni od velikog broja aminokiselina, koje same po sebi nemaju veću biološku aktivnost. Struktura i osobine proteina zavise od vrste i broja, a još više od načina na koji su u molekulu proteina raspoređeni aminokiselinski ostaci. Specifičan redosled (sekvenca) aminokiselina, koje ulaze u sastav proteina, obezbeđuje svakom proteinu jedinstvene strukturne karakteristike, a samim tim i odgovarajuću biološku funkciju.

Proteini se mogu podeliti na proste i složene. Prosti proteini su oni koji hidrolizom daju samo aminokiseline. Na osnovu rastvorljivosti u vodi i rastvorima pojedinih elektrolita i nekih drugih osobina podeljeni su na albumine, globuline, gluteline, histone i dr.

Složeni proteini (proteidi) hidrolizom pored aminokiselina daju i neke neproteinske supstance koje se u pojedinim slučajevima nazivaju "prostetičnom grupom". Prema prirodi prostetične grupe složeni proteini se dele na nukleoproteine, glikoproteine, hromoproteine i dr.

1.1. Određivanje izoelektrične tačke aminokiseline alanina

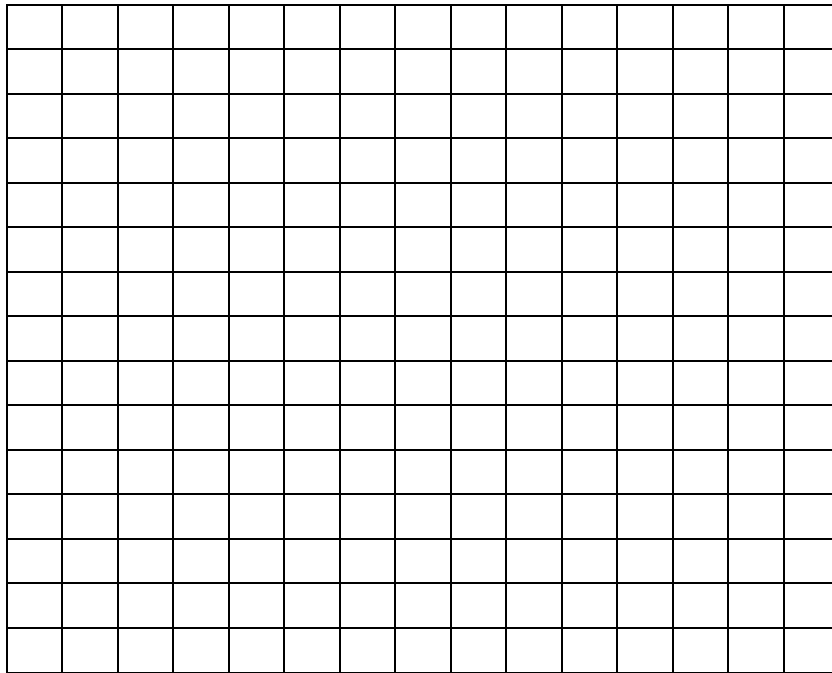
Proteinski molekuli sadrže veći broj aminokiselinskih ostataka čiji bočni nizovi u rastvorima podležu proteolitičkim reakcijama. Tako kisele funkcije asparaginske kiseline, glutaminske kiseline, tirozina ili cisteina podležu disocijaciji, dok se bazne funkcije lizina, agrinina i histidina mogu protonovati.

U zavisnosti od relativnog odnosa kiselih i baznih aminokiselinskih ostataka u molekulu proteina, ovaj će pri fiziološkim pH imati ukupan pozitivan ili negativan naboj. Promena pH vrednosti vodi ili deprotonovanju baznih funkcija ili suzbijanju disocijacije kiselih, te, kao i kod slobodnih aminokiselina, za svaki protein postoji karakteristično pH pri kome je suma pozitivnog naelektrisanja jednaka sumi negativnog naelektrisanja. Ovo pH se označava kao izoelektrično (pI).

Parcijalnom hidrolizom proteina se dobijaju proizvodi manjih molekulskih masa koji se nazivaju peptidi, a totalnom hidrolizom se dobijaju aminokiseline. Sve aminokiseline imaju bar dve funkcionalne grupe koje podležu proteolitičkim reakcijama u vodenim rastvorima. Pri pH vrednostima između 4 i 9 aminokiseline su u rastvoru prisutne i u dipolarnom obliku (Cviter jon – Zwitterion), kada je karboksilna grupa disosovana, a amino grupa te aminokiseline asosovana. Duž pomenutog opsega pH aminokiseline imaju izvestan naboj, a na jednoj određenoj pH vrednosti (takozvanoj izolektričnoj tački), ukupni naboj je ravan nuli. Izoelektrična tačka je ona pH vrednost na kojoj se aminokiseline nalaze u dipolarnoj strukturi tj. kada je zbir pozitivnog naelektrisanja jednak zbiru negativnog naelektrisanja u molekulu.

Postupak: U 50 cm³ rastvora alanina koncentracije 0,05 mol/dm³ dodati oko 1 cm³ rastvora HCl tako da pH rastvora bude približno 1,0. Nakon toga izvršiti retitraciju rastvora alanina sa rastvorom NaOH koncentracije 1 mol/dm³. Pomoću pH-metra očitati vrednosti pH serije rastvora alanina sa NaOH i na osnovu dobijenih rezultata nacrtati grafik (*Slika 1*). Na grafiku odrediti pI alanina i prikazati katjonski, anjonski i dipolarni oblik ove aminokiseline.

| | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|
| V NaOH (cm ³) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| pH | | | | | | | | |
| V NaOH (cm ³) | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| pH | | | | | | | | |



Slika 1. Titraciona kriva alanina

Overa:

1.2. Određivanje izoelektrične tačke proteina želatina

Proteini se zbog svoje specifične građe u vodenom rastvoru ponašaju amfoterno, odnosno u zavisnosti od pH sredine ponašaju se kao kiseline ili baze. Ova osobina je posledica prisustva kiselih i baznih grupa koje u vodenom rastvoru disosuju tako da se molekuli proteina nalaze u obliku dipolarnog molekula.

Pri određenoj pH disocijacija kiselih grupa jednaka je asocijaciji baznih grupa, broj negativnih i pozitivnih naelektrisanja na jednom molekulu proteina je isti, te je molekul nenaelektrisan. Takvo stanje molekula proteina u rastvoru naziva se izoelektrično stanje a pH vrednost rastvora u kome se protein nalazi u izoelektričnom stanju naziva se izoelektrična tačka proteina (pI).

Izoelektrična tačka većine proteina nalazi se u slabo kiselom području pH. Ovo je posledica toga što većina proteina u molekulima sadrže više karboksilnih grupa, odnosno monoaminodikarbonskih kiselina. Postoje, međutim, i proteini čija izoelektrična tačka leži u slabo alkalnoj sredini (npr. histoni). U strukturi ovih proteina preovlađuju diaminomonokarbonske kiseline.

Na izoelektričnoj tački, molekuli proteina nemaju električni naboj te između njih nema elektrostatičkih odbijanja, usled čega se proteini u takvom stanju najlakše istalože. Ovaj efekat taloženja proteina koristi se u eksperimentu određivanja izoelektrične tačke želatina.

Postupak: U šest epruveta napraviti seriju puferских rastvora prema podacima iz **Tabele 1**:

Tabela 1. Način pripreme serije pufernih rastvora za određivanje pI želatina

| Rastvori (cm ³): | Broj epruvete: | | | | | |
|---|----------------|------|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0.1 mol/dm ³ CH ₃ COONa | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 0.1 mol/dm ³ CH ₃ COOH | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | - |
| 1.0 mol/dm ³ CH ₃ COOH | - | - | - | - | - | 0.4 |
| destilovana voda | 1.88 | 1.75 | 1.5 | 1.0 | - | 1.6 |
| želatin | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| pH | 5.6 | 5.3 | 5.0 | 4.7 | 4.4 | 4.1 |
| Stepen замуćenja (+) | | | | | | |

Sve epruvete, nakon dodavanja 1 cm³ želatina, dobro protresti. Zatim pažljivo pipetirati (uz zid epruvete, bez mućkanja) oko 3 cm³ etanola do pojave trajnog замуćenja. Ostaviti da stoji 10 minuta.

Zadatak: Na osnovu stepena замуćenja epruveta, izraženog brojem + u tabeli, zaključiti na kojoj se pH vrednosti nalazi izoelektrična tačka želatina.

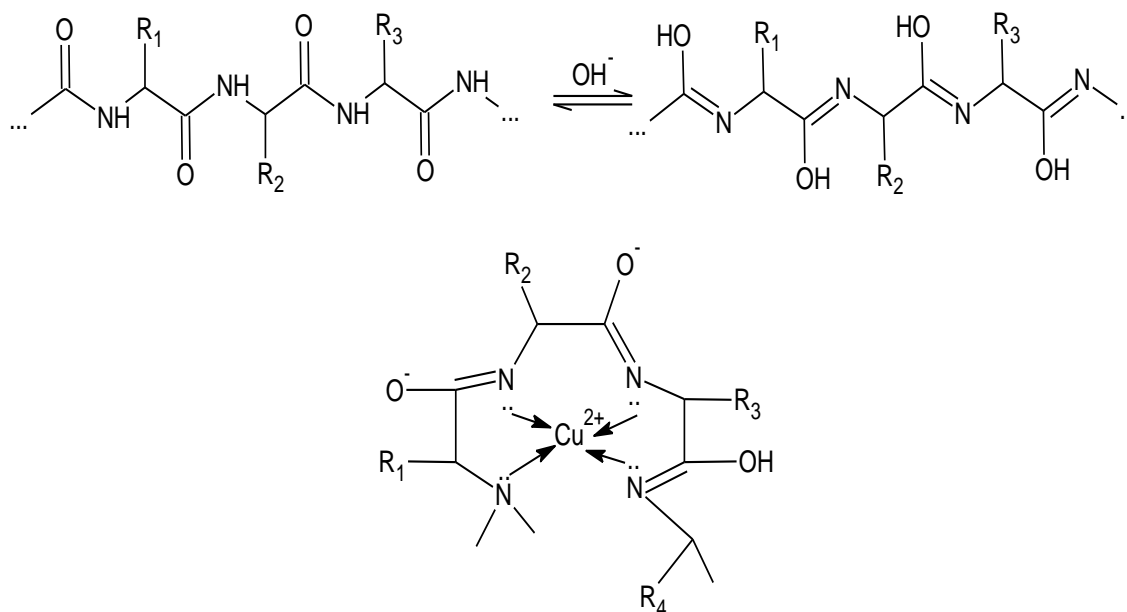
Zapažanje:

Overa:

1.3. Bojene reakcije na proteine

Biuretska reakcija

Mehanizam ove reakcije uključuje prethodnu enolizaciju peptidnih grupa u alkalnoj sredini, a enolizovani peptidni lanac u prisustvu Cu^{2+} jona daje kompleksno jedinjenje sledećeg tipa:

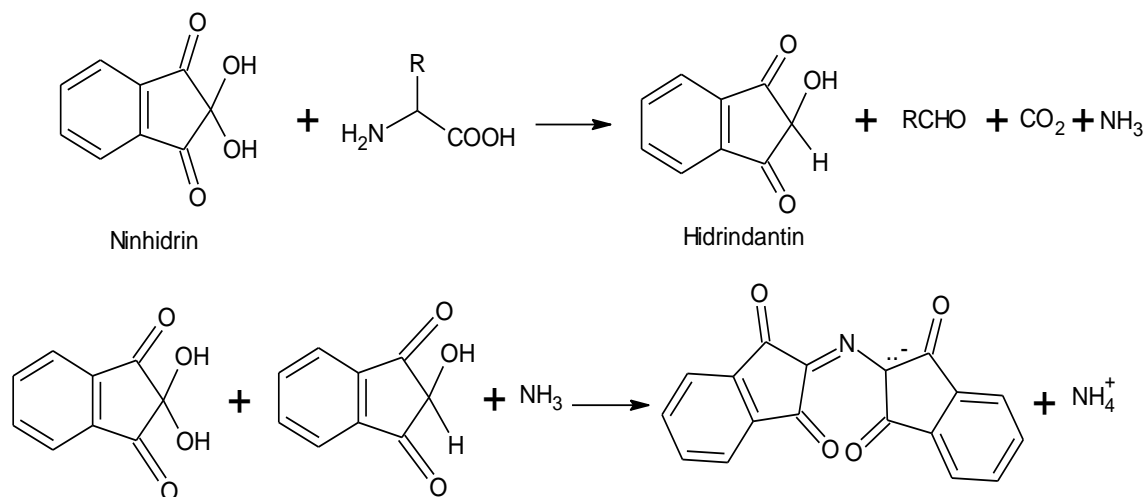


Da bi se kompleks nagradio peptid mora da ima najmanje četiri aminokiselinska ostatka. Kompleks koji nastaje ima plavo-ljubičastu boju, sa maksimumom apsorpcije u oblasti od 520 do 535 nm. Ova reakcija se često koristi za kolorimetrijsko određivanje sadržaja proteina.

Postupak: U epruvetu sipati 1 cm³ rastvora proteina pa dodati dvostruku zapreminu 30% rastvora NaOH. Sadržaj epruvete dobro promućkati pa dodati 2-3 kapi 1% rastvora CuSO_4 . Nakon ponovnog mućkanja javlja se plavo-ljubičasta boja.

Ninhidrinska reakcija

Jedna od najkarakterističnijih reakcija aminokiselina je reakcija sa ninhidrinom. Ninhidrin je oksidaciono sredstvo i vrši oksidativno deaminovanje α -aminogrupe, uz oslobađanje amonijaka, ugljendioksida, odgovarajućeg aldehida i redukovanog oblika ninhidrina. Amonijak reaguje sa sledećim molekulom ninhidrina i redukovanim ninhidrinom, hidrindantinom, dajući ljubičasto obojeni proizvod:

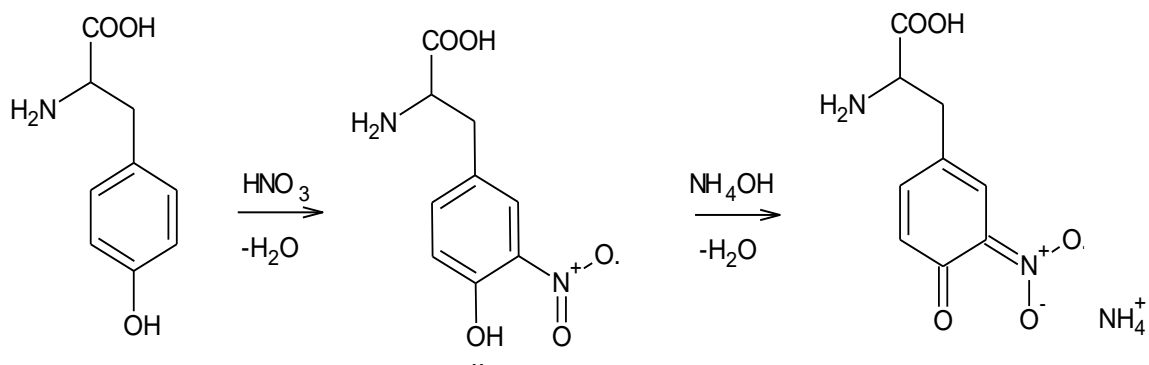


Apsorpcioni maksimum ljubičastog jedinjenja leži blizu 570 nm. Kako je intenzitet apsorpcije približno linearno zavisao od broja aminogrupa, na osnovu ove reakcije je razrađen kvantitativan analitički postupak za kolorimetrijsko određivanje aminokiselina i u vrlo razblaženim rastvorima. Reakcija se može smatrati opštom za primarne amine, ali istovremeno oslobađanje CO₂, koje se može pratiti manometrijski, služi za karakterizaciju i određivanje α -aminokiselina. U slučaju iminokiselina gradi se proizvod svetlo-žute boje, pa ova reakcija služi i za razlikovanje ovih supstanci u mnoštvu proteinogenih aminokiselina. Pozitivnu ninhidrinsku reakciju daju i polipeptidi, koji sadrže slobodnu α -aminogrupu.

Postupak: U 1 cm³ rastvora proteina dodati 2 kapi rastvora ninhidrina. Sadržaj epruvete promućkati i ostaviti nekoliko minuta u vodenom kupatilu na 70° C, pri čemu se razvija ljubičasto obojenje.

Ksantoproteinska reakcija

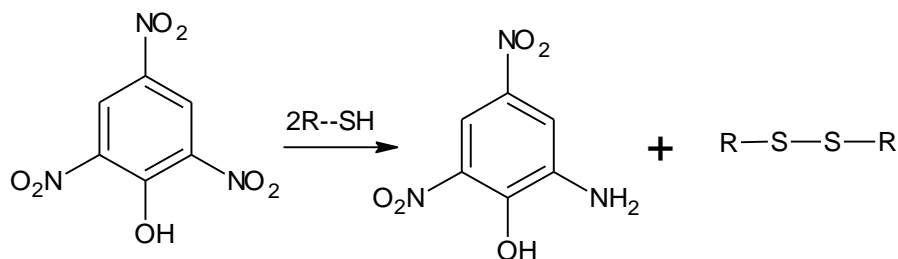
Pozitivnu ksantoproteinsku reakciju daju oni proteini koji u svom molekulu sadrže ostatke aromatičnih aminokiselina (fenilalanin, tirozin i triptofan). Želatin, koji ne sadrži ostatke aromatičnih aminokiselina, ne daje pozitivnu ksantoproteinsku reakciju. Žuta boja se javlja kao posledica nitrovanja aromatičnog prstena. Promena žute boje u narandžastu u alkalnoj sredini uslovljena je nastajanjem hromofomne grupe:



Postupak: U 1 cm³ rastvora proteina dodati 5-6 kapi cc HNO₃, pri čemu se javlja beli talog ili zamućenje. Pri zagrevanju talog se boji jarko žuto i skoro potpuno rastvara. Smešu ohladiti i pažljivo, bez mućkanja, dodati kap po kap cc NH₄OH ili NaOH do alkalne reakcije pri čemu se rastvor boji jarko narandžasto.

Reakcija sa pikrinskom kiselinom

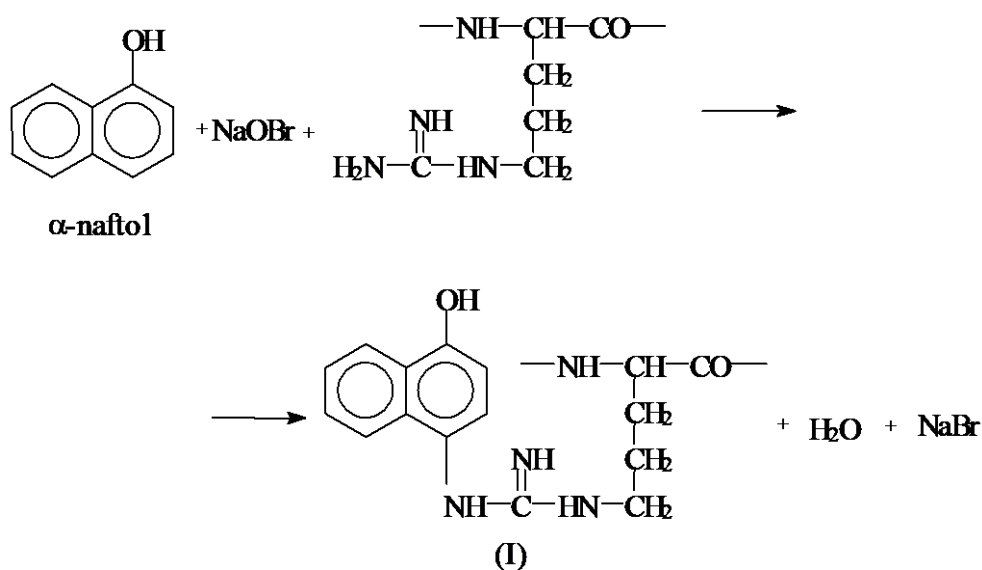
Sulfhidrilne grupe cisteinskih ostataka u proteinskom molekulu mogu da redukuju pikrinsku kiselinu do pikraminske:



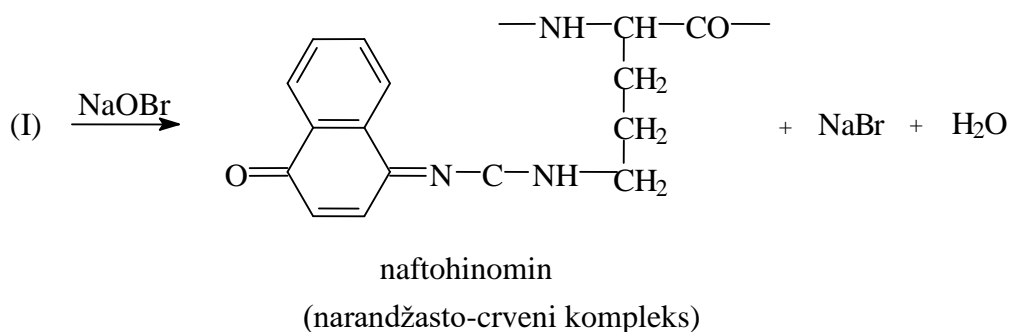
Postupak: U 1 cm³ rastvora proteina dodati na vrh špatule čvrstog Na₂CO₃ i 0,5 cm³ zasićenog rastvora pikrinske kiseline. Sadržaj epruvete promešati i zagrevati u toku nekoliko minuta. Žuta boja rastvora polako prelazi u crvenu.

Sachaguchieva reakcija

Guanidinska funkcija argininskih ostataka u proteinskom molekulu reaguje sa α -naftolom u prisustvu natrijumhipobromita dajući narandžastu boju. Iako mehanizam ove reakcije nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da u prisustvu oksidansa najpre dolazi do građenja kondenzacionog proizvoda α -naftola i guanidinskog ostatka arginina:



U sledećoj etapi, daljim delovanjem oksidansa obrazuje se jedinjenje tipa hinonimina (u ovom slučaju naftohinonimin):

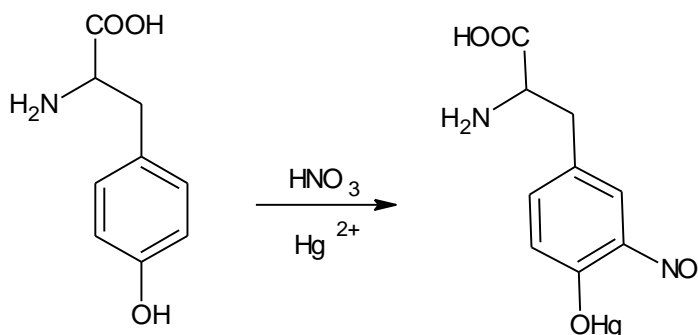


Međutim, nije isključeno nastajanje još složenijeg jedinjenja daljom reakcijom imino grupe guanidinskog ostatka sa α -naftolom u prisustvu oksidansa.

Postupak: U epruvetu sipati 2 cm³ rastvora proteina, 0,5 cm³ 10% rastvora NaOH i odmah zatim par kapi rastvora α -naftola. Sadržaj epruvete promućkati pa zatim dodati 0,5 cm³ rastvora natrijumhipobromita pa opet promućkati. Javlja se narandžasto-crvena boja koja ukazuje na prisustvo arginina u molekulu proteina.

Millonova reakcija

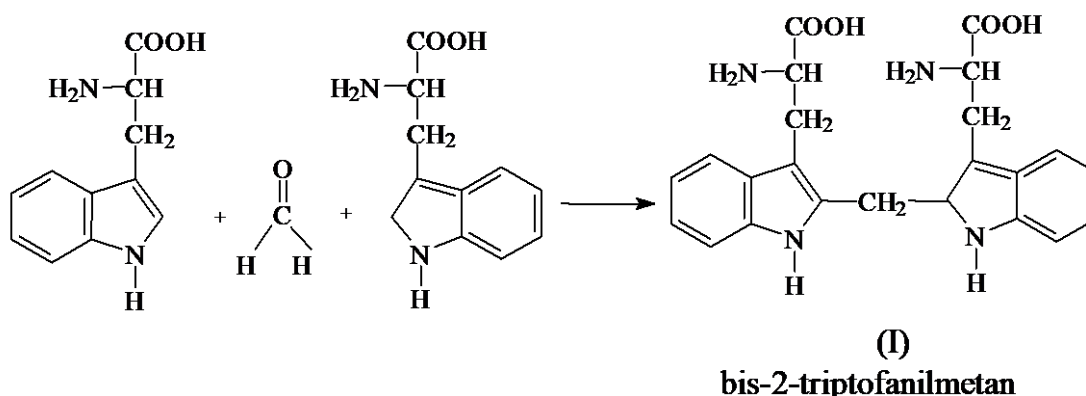
Millonovu reakciju daju svi proteini koji u svom sastavu imaju ostatke tirozina. Boja koja nastaje potiče od živine soli nastalog nitrozotirozinskog ostatka:



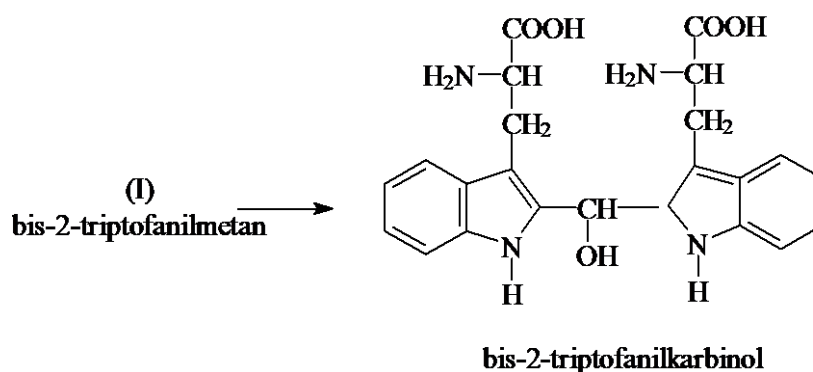
Postupak: U 0,5 cm³ rastvora proteina dodati 1 cm³ Millonovog reagensa. Javlja se talog koji se zagrevanjem epruvete na vodenom kupatilu boji smeđe-crveno.

Hopkins-Coleova reakcija (reakcija Adamkeviča)

U ovoj reakciji dolazi do kondenzacije dva molekula triptofana (ili dva triptofanska ostatka u polipeptidnom lancu), sa formaldehidom, koji je nastao iz glioksilne kiseline dejstvom cc H₂SO₄:



Proizvod kondenzacije se dalje oksiduje do *bis-2-triptofanilkarbinola*:



Postupak: Sipati u epruvetu nekoliko kapi ispitivanog proteina i dodati 2 cm³ glacijalne sirćetne kiseline (u glacijalnoj sirćetnoj kiselini je uvek prisutna i glioksilna kiselina). Smešu blago zagrevati, a zatim ohladiti pod mlazom vode. Niz zid nagnute

epruvete dodati oko 1 cm³ cc H₂SO₄, pazeći da se tečnosti ne mešaju. Sadržaj epruvete ne mućkati. Pri stajanju se na granici faza javlja crveno-ljubičasti prsten.

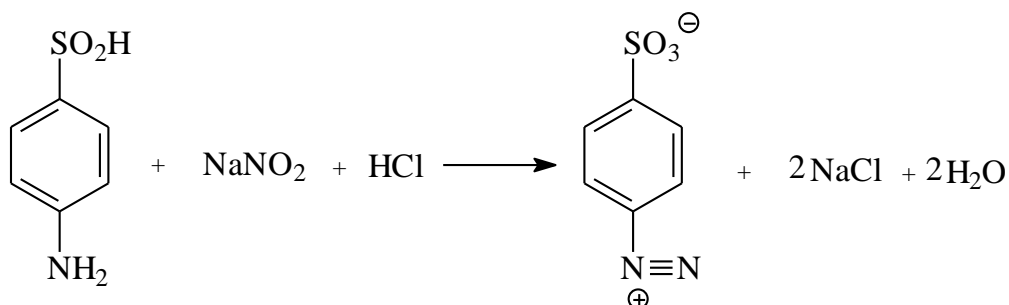
Vuazanova reakcija

Vuazanova reakcija je takođe karakteristična za triptofan, i po svom mehanizmu je analogna Hopkins-Coleovoj reakciji.

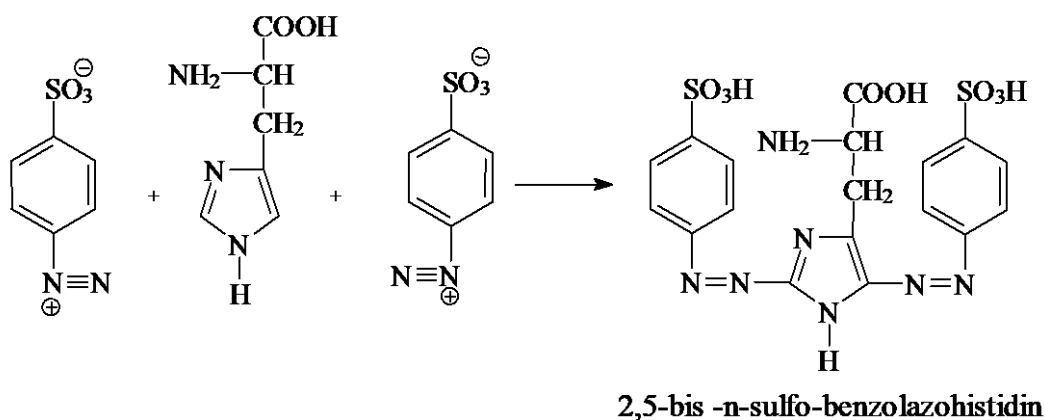
Postupak: U 0,5 cm³ rastvora proteina dodati 1 kap 2,5% rastvora formaldehida (sveže pripremljenog na dan ogleda). Sadržaj epruvete promućkati i dodati 1,5 cm³ cc HCl (gustine iznad 1,175) pa ponovo promućkati. Nakon deset minuta dodati 5 kapi rastvora NaNO₂. Razvija se plavo-ljubičasto obojenje.

Reakcija Paulija

Reakcija Paulija je karakteristična za histidinske ostatke u molekulu proteina. U prvoj fazi reakcije dejstvom NaNO₂ sulfanilna kiselina prelazi u diazobenzosulfonsku kiselinu:



U drugoj fazi, dva molekula diazobenzosulfonske kiseline reaguju sa histidinskim ostatkom iz molekula proteina, dajući obojeni kondenzacioni proizvod:



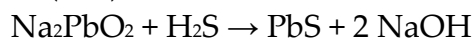
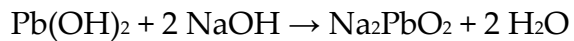
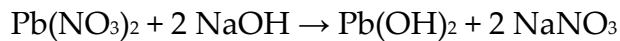
Postupak: U epruvetu sipati 0,5 cm³ 1% rastvora sulfanilne kiseline i 2 cm³ rastvora NaNO₂. Sadržaj epruvete snažno promućkati a zatim sipati 2 cm³ rastvora

ispitivanog proteina. Promešati pa dodati 10% rastvor Na_2CO_3 , dok se ne razvije tamno-crvena boja.

Reakcija za dokazivanje sumpornih komponenti proteina

Postupak: U epruvetu sipati $0,5 \text{ cm}^3$ rastvora proteina i 1 cm^3 30% rastvora NaOH i zagrevati do ključanja (oprezno jer tečnost lako kipi). Pri tome dolazi do delimične hidrolize peptidnih veza praćene deaminacijom. Izdvojeni amonijak se lako može registrovati po mirisu ili promenom boje navlažene indikatorske hartije postavljene na otvor epruvete. Istovremeno, iz aminokiselina koje sadrže sumpor, ovaj se oslobađa i izdvaja u vidu H_2S .

Topao rastvor podeliti u dve epruvete. U prvu dodati nekoliko kapi rastvora $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Javlja se smeđa ili crna boja, kao posledica reakcije nastalog natrijum plumbita sa izdvojenim H_2S :



U drugu epruvetu sa hidrolizatom dodati 2-3 kapi sveže pripremljenog rastvora natrijumnitroprusida. Javlja se crveno-ljubičasta boja.

| Reakcija | Albumin | Želatin | Zapažanje |
|----------------------------------|---------|---------|-----------|
| Biuretska reakcija | | | |
| Ninhidrińska reakcija | | | |
| Ksantoproteinska reakcija | | | |
| Reakcija sa pikrinskom kiselinom | | | |
| Sachaguchieva reakcija | | | |
| Millonova reakcija | | | |
| Hopkins-Coleova reakcija | | | |
| Vuazenova reakcija | | | |
| Reakcija Paulija | | | |
| Reakcija na sumporne komponente | | | |

Overa:

1.4. Denaturacija i koagulacija proteina

Najveći broj proteina zadržava svoju biološku aktivnost samo u uskim intervalima temperature i pH. U oblastima ekstremnih vrednosti pH i temperature dolazi do promena u molekulu proteina, koji se označava pojmom denaturacija. Jedan od osnovnih pokazatelja denaturacije proteina jeste gubitak rastvorljivosti, te se ova pojava naziva i koagulacija. U najvećem broju slučajeva do toplotne denaturacije proteina dolazi pri zagrevanju iznad 40-50° C. Neki proteini mogu da podlegnu denaturaciji i pri hlađenju ispod 10-15° C. Pošto je poznato da pri denaturaciji ne dolazi do narušavanja primarne strukture polipeptidnog lanca (ne dolazi do raskidanja polipeptidnih veza), zaključeno je da je ovo posledica razvijanja (odmotavanja) gusto uvijenog polipeptidnog lanca, usled čega se narušava karakteristična trodimenzionalna struktura proteina.

Funkcionalne grupe koje su bile zaklonjene u unutrašnjosti molekula javljaju se sada na površini polipeptidnog lanca i mogu se hemijskim putem identifikovati (kao na primer sulfhidrilne grupe).

Sem toplote i ekstremnih vrednosti pH, denaturaciju proteina mogu izazvati i UV-zračenje, mehanički faktori, visoke koncentracije uree i dr.

Denaturacija proteina zagrevanjem

| Epruveta | Zapažanje | |
|----------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| 1. | | |
| 2. | | |
| 3. | | |
| 4. | | |
| 5. | | |

Postupak: U pet epruveta sipati po 1 cm³ rastvora proteina. Prva epruveta služi kao kontrola. U drugu epruvetu dodati 1 kap 1% rastvora sirćetne kiseline, u treću 0,5 cm³ rastvora 10% sirćetne kiseline, u četvrtu sipati oko 0,5 cm³ 10% rastvora

sirćetne kiseline i nekoliko kapi zasićenog rastvora NaCl, a u petu epruvetu dodati oko 0,5 cm³ 10% rastvora NaOH. Svih pet epruveta zagrevati na ključalom vodenom kupatilu i zabeležiti zapažanja.

Povećanje broja SH-grupa posle denaturacije

Kod nativnog albumina SH-grupe cisteinskih ostataka su smeštene unutar gusto uvijenog molekula. Posle denaturacije sve SH-grupe se demaskiraju i mogu se dokazati reakcijom sa nitroprusidom u alkalnoj sredini.

Postupak: U dve epruvete sipati po 1 cm³ rastvora proteina i 3 kapi 5% rastvora NaOH. Sadržaj jedne epruvete zagrevati 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu, a zatim ohladiti. U obe epruvete dodati na vrh špatule smeše kristala amonijumsulfata i natrijumnitroprusida pa promućkati.

| Zapažanje | |
|-----------|---------|
| Albumin | Želatin |
| | |

Taloženje proteina koncentrovanim mineralnim kiselinama

Postupak: Pripremiti tri epruvete. U prvu epruvetu pažljivo sipati 1 cm³ koncentrovane azotne kiseline, u drugu 1 cm³ koncentrovane sumporne kiseline, a u treću 1 cm³ koncentrovane hlorovodonične kiseline. Zatim, pažljivo, niz zid svake epruvete, dodati 0,5 cm³ ispitivanog rastvora proteina, vodeći računa da ne dođe do mešanja.

| Kiselina | Zapažanje | |
|-----------------------------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| cc HNO ₃ | | |
| cc H ₂ SO ₄ | | |
| cc HCl | | |

Taloženje proteina organskim kiselinama

Sulfosalicilna i trihlorsirćetna kiselina su poznati specifični reagensi na proteine. Trihlorsirćetna kiselina taloži samo proteine, a ne taloži proizvode parcijalne degradacije proteina, niti aminokiseline. Stoga se ona često koristi za potpuno uklanjanje proteina iz bioloških tečnosti, poput krvnog seruma.

Postupak: U dve epruvete sipati po 1 cm³ rastvora proteina i u jednu dodati nekoliko kapi 5% rastvora trihlorsirćetne kiseline, a u drugu nekoliko kapi 20% rastvora sulfosalicilne kiseline.

| Kiselina | Zapažanje | |
|-----------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| Trihlorsirćetna | | |
| Sulfosalicilna | | |

Taloženje proteina solima teških metala

Joni teških metala (Hg, Ag, Cu, Pb i dr.) izazivaju taloženje proteina, obrazujući sa njima jedinjenja tipa soli, koja su teško rastvorna u vodi. Zbog toga se rastvori proteina (poput mleka), primenjuju kao protivotrov pri trovanju (npr. solima žive ili olova). Neki od ovih taloga (npr. sa solima bakra, olova ili cinka) rastvaraju se u višku taložnog sredstva zbog adsorpcije jona na površini proteinskih molekula. Kao rezultat ovog fenomena proteinske čestice dobijaju naboj i ponovo se rastvaraju. Rastvaranje taloga denaturisanih proteina u višku soli teških metala naziva se adsorpciona peptizacija.

Postupak: U dve epruvete sipati po 1 cm³ rastvora proteina i dodati, uz mućkanje, u jednu nekoliko kapi 5% rastvora CuSO₄, a u drugu nekoliko kapi 5% rastvora Pb(CH₃COO)₂. Nakon izdvajanja taloga dodati reagens u višku.

| Reagens | Zapažanje | |
|--------------------------------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| CuSO ₄ | | |
| Pb(CH ₃ COO) ₂ | | |

Taloženje proteina reagensima na alkaloide

Alkaloidi su jedinjenja koja u svom molekulu sadrže različite heterociklične prstenove sa azotom kao heteroatomom. Pošto u sastav proteina ulaze i aminokiseline sa heterocikličnim bočnim nizom (triptofan, histidin, prolin), to proteini daju neke reakcije karakteristične za alkaloide.

Postupak: U dve epruvete sipati po 1 cm³ rastvora ispitivanog proteina. Rastvore zakiseliti u epruvetama sa 1-2 kapi razblažene sirćetne kiseline. U prvu epruvetu sipati nekoliko kapi zasićenog rastvora pikrinske kiseline, a u drugu epruvetu dodati nekoliko kapi 5% rastvora HCl i par kapi 5% rastvora kalijum-heksacijanoferata II, do pojave taloga.

| Reagens | Zapažanje | |
|-----------------------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| Pikrinska kiselina | | |
| Kalijum-heksacijanoferat II | | |

Taloženje proteina fenolom i formaldehidom

Postupak: U dve epruvete sipati 1 cm³ rastvora proteina, pa u prvu dodati 1 cm³ vodom zasićenog fenola, a u drugu 1 cm³ rastvora formaldehida.

| Reagens | Zapažanje | |
|-------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| Fenol | | |
| Formaldehid | | |

Taloženje proteina alkoholom

Postupak: U epruvetu sipati 1 cm³ rastvora ispitivanog proteina i nekoliko kristala NaCl, a zatim dodati postepeno oko 3-4 cm³ etanola.

| Reagens | Zapažanje | |
|---------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| Etanol | | |

Taloženje proteina natrijumvolframatom

Natrijumvolframatom je jedan od efikasnijih reagenasa za taloženje proteina i često se primenjuje za deproteinizaciju bioloških tečnosti i ekstrakata. Sem proteina može da taloži i neke diaminokiseline.

Postupak: U epruvetu sipati 2 cm³ rastvora proteina, 0,5 cm³ 0,33 mol/dm³ sumporne kiseline i sadržaj epruvete promućkati a zatim dodati 0,5 cm³ rastvora 10% natrijumvolframata.

| Reagens | Zapažanje | |
|---------------------|-----------|---------|
| | Albumin | Želatin |
| Natrijumvolframatom | | |

| |
|---------------|
| Overa: |
|---------------|

1.5. Određivanje sadržaja proteina metodom Lowrya

Metoda se zasniva na merenju intenziteta boje rastvora proteina, koja se javlja kao posledica dve reakcije, i to biuretske i reakcije Folinovog reagensa (smeša fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline) sa tirozinskim i cisteinskim ostacima u molekulu proteina. Kao rezultat ovih reakcija javlja se plava boja, čiji intenzitet se meri spektrofotometrijski na 660 nm. Prednost ove metode leži u tome da se mogu određivati proteini i u vrlo razblaženim rastvorima.

Reagensi:

Rastvor kristalnog albumina goveđeg seruma ($c=0,1 \text{ mg/cm}^3$)

Rastvor A: Natrijumkarbonat (2%), K-Na-Tartarat (0,02%) u $0,1 \text{ mol/dm}^3$ rastvoru NaOH

Rastvor B: Bakar(II) sulfat (0,5%)

Rastvor C: 50 cm^3 rastvora A pomeša se sa 1 cm^3 rastvora B, na sam dan ogleda.

Rastvor E: Folinov reagens ($0,35 \text{ mol/dm}^3$)

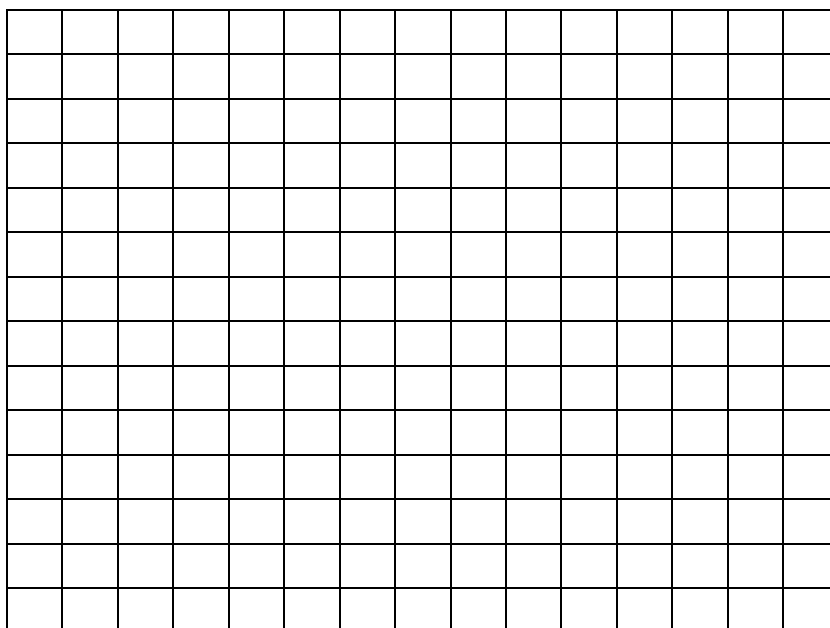
Izrada kalibracione krive:

Pripremiti rastvore prema *Tabeli 2*, očitati apsorbanciju (A) na 660 nm i konstruisati kalibracionu krivu (*Slika 2*):

Tabela 2. Način pripreme serije rastvora za izradu kalibracione krive

| Epruveta | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Destilovana voda (cm^3) | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,0 | 1,0 |
| Albumin (cm^3) | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,0 |
| Albumin ($\mu\text{g/cm}^3$) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 0 |
| A ($\lambda=660 \text{ nm}$) | | | | | | |

Postupak: Sipati 1 cm^3 mleka u odmerni sud od 250 cm^3 i dopuniti destilovanom vodom do crte. Nakon homogenizacije uzorka odpipetirati $0,5 \text{ cm}^3$ rastvora i dodati $0,5 \text{ cm}^3$ vode i 1 cm^3 rastvora C. U rastvore albumina goveđeg seruma takođe dodati 1 cm^3 rastvora C, promešati i sve inkubirati na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim brzo dodati $0,1 \text{ cm}^3$ pripremljenog rastvora Folinovog reagensa i odmah promešati. Dobijenu smešu inkubirati na sobnoj temperaturi 30 do 90 minuta, pa zatim očitati apsorbanciju na 660 nm. Kao slepu probu u drugoj kivetu, umesto rastvora albumina dodati $0,5 \text{ cm}^3$ destilovane vode (epruveta 6). Iz očitane apsorbancije odrediti sadržaj proteina u ispitivanom uzorku pomoću kalibracione krive.



Slika 2. Kalibraciona kriva albumina

Rezultat

Overa:

1.6. Određivanje kreatinina u serumu i urinu

Pored toga što su aminokiseline gradivne komponente proteina, pojedine aminokiseline su i prekursori mnogobrojnih specijalizovanih biomolekula, poput pojedinih alkaloida, hormona, koenzima, vitamina, porfirina, antibiotika, pigmenata i dr. koji imaju specifične biološke funkcije. Jedan od primera ovih jedinjenja je i kreatin koji u formi fosfokreatina predstavlja važan metabolit za bioenergetiku mišića i nerava.

Sinteza kreatina se obavlja u bubrezima, jetri i pankreasu a zatim se prenosi u krv do ostalih organa kao što su mišići i mozak gde se fosforilacijom pretvara u fosfokreatin, visokoenergetsko jedinjenje. Uzajamno pretvaranje fosfokreatina u kreatin i obrnuto je posebna odlika metabolizma mišićne kontrakcije. Jedan deo slobodnog kreatina se u mišićima pretvara u svoj anhidrid kreatinin. Od 1 do 2% mišićnog kreatina se dnevno pretvara u kreatinin. Količina endogenog kreatina koja se proizvodi je srazmerna mišićnoj masi. Na osnovu oslobađanja kreatinina može se pratiti stopa filtriranja glomerula. Mala količina kreatinina se reasorbuje u tubulama a mala količina koja se javlja u urinu potiče od sekrecije u tubulama. Slabljenjem renalne funkcije oslobađa se sve manja količina kreatinina.

Klirens je kvantitativna mera za ekskreciju neke supstance bubrezima. To je ona količina krvi ili plazme očišćene od onolike količine supstance koliko se urinom izluči za 1 minut (ml/min). Klirens kreatinina može biti mera glomerularne filtracije. Referentne vrednosti klirensa kreatinina su specifične za svaku životinjsku vrstu, a kod čoveka su 95-105 ml/min.

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

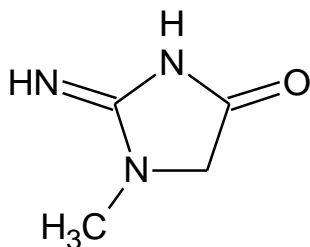
C - klirens

U – koncentracija kreatinina u urinu

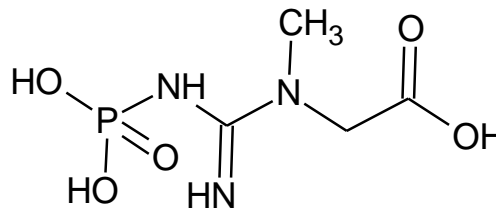
V – zapremina urina

P – koncentracija kreatinina u serumu

Kreatinin se najčešće određuje Jaffee-ovom reakcijom koja se bazira na karakteristici da se kreatinin sa alkalnim pikratom vezuje u jedinjenje narandžasto-crvene boje, čiji se intenzitet određuje kolorimetrijski.



Slika 3. Struktura kreatinina



Slika 4. Struktura fosfokreatina

Postupak: Na 0,5 cm³ ispitivanog uzorka se doda 4,5 cm³ 5% rastora trihlorsirćetne kiseline u epruveti za centrifugiranje. Sadržaj epruvete se promućka i ostavi da stoji 5 minuta, a zatim centrifugira. U epruvetu obeleženu sa 2 se prenese 4,0 cm³ supernatanta i neutrališe sa 0,5 cm³ 2 mol/dm³ rastvora NaOH. Istovremeno se pripremi i slepa proba (epruveta 1) sa 4,5 cm³ vode umesto uzorka i standard (epruveta 3) sa 4,5 cm³ standardnog rastvora kreatinina. Zatim se u sve tri epruvete doda po 0,5 cm³ Jaffee-ovog reagensa (alkalni rastvor pikrata), smeša se ostavi da stoji 10 minuta, a zatim se kolorimetrijski određuje uz zeleni filter ili spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 550 nm. Alkalni rastvor pikrata se priprema svež: 5,0 cm³ pikrinske kiseline i 1.0 cm³ 10% NaOH. Iz apsorbance standardnog rastvora i probe se izračunava koncentracija kreatinina u uzorku.

Tabela 3. Način pripreme standardnog rastvora i probe

| | Kontrola 1 | Proba 2 | Standard 3 |
|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Neutralisani filtrat | - | 4,5 cm ³ | - |
| Voda | 4,5 cm ³ | - | - |
| Standardni rastvor | - | - | 4,5 cm ³ |
| Jaffee-ov reagens | 0,5 cm ³ | 0,5 cm ³ | 0,5 cm ³ |

Izračunavanje:

Overa:

2. ENZIMI

U živim organizmima, kako jednoćelijskim, tako i u visoko organizovanim, odvija se velik broj biohemijskih procesa, pri čemu se vrši razgradnja i sinteza različitih jedinjenja uz oslobađanje ili vezivanje energije. Sve te hemijske reakcije odigravaju se najčešće u neutralnoj pH sredini i na relativno niskim temperaturama (kod toplokrvnih organizama najčešće na 37° C, a kod hladnokrvnih često i na mnogo nižoj). Jasno je da se pod ovim uslovima mnoge hemijske reakcije izuzetno sporo odigravaju bez učešća katalizatora. Biološki katalizatori su specifični globularni proteini koji se nazivaju enzimi ili fermenti i koji omogućavaju tok mnogih metaboličkih reakcija.

Procesi vrenja (fermentacije) su bili poznati još u najstarije vreme (alkoholno vrenje), ali je njihovo sistemsko proučavanje započelo tek radovima Pasteura krajem XIX veka. Danas su mnogi enzimi izolovani u čistom i kristalnom stanju, a velikom broju je i struktura potpuno određena.

Enzimi najčešće dobijaju nazive prema vrsti i tipu reakcije koju katalizuju, prema supstratu na koji deluju ili prema proizvodu koji nastaje. Na osnovu ovih načela nomenklature usvojena je sledeća klasifikacija enzima:

1. Oksido-reduktaze,
2. Transferaze,
3. Hidrolaze,
4. Liaze,
5. Izomeraze i
6. Ligaze.

Nazivi svih enzima se završavaju nastavkom -aza. Međutim, još su ponegde u upotrebi i trivijalni nazivi pojedinih enzima poput: tripsin, pepsin, ptijalin i sl.

Po svom hemijskom sastavu enzimi su proteinska jedinjenja. Pored proteinske komponente u enzimskim reakcijama učestvuju i druge komponente neproteinskog karaktera. Ova jedinjenja se nazivaju koenzimima. Ukoliko su ona stabilnije vezana za protein nazivaju se prostetičnim grupama. Uz pomenute komponente proteinske i neproteinske prirode u mnogim enzimskim reakcijama učestvuju i različiti joni metala.

Enzimi se od nebioloških katalizatora razlikuju u nekoliko značajnih aspekata:

- Veće reakcione brzine: brzine enzimski katalizovanih reakcija su 10^8 pa čak do 10^{20} puta veće od brzina nekatalizovanih, i za nekoliko redova veličine veće od onih koje su katalizovane nebiološkim katalizatorima.

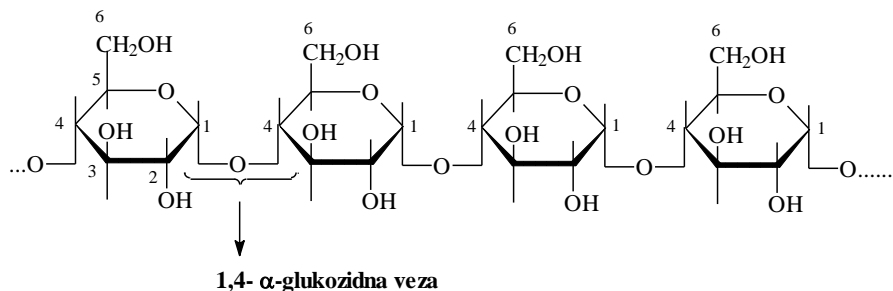
- Blaži reakcioni uslovi: enzimski katalizovane reakcije se odigravaju pri blažim uslovima (temperatura ispod 50° C, atmosferski pritisak, pH najčešće neutralno), dok efikasna hemijska kataliza često zahteva visoke temperature, pritisak i ekstremne pH vrednosti.
- Veća specifičnost: enzimi se odlikuju visokom specifičnošću prema supstratu i u enzimskim reakcijama se retko javljaju sporedni proizvodi. Na primer, u enzimskoj sintezi proteina, koja se odvija u ribozomima, grade se polipeptidi koji sadrže i preko 1000 aminokiselinskih ostataka. Sa druge strane, u hemijskoj sintezi polipeptida, zbog sporednih reakcija, moguće je, u odgovarajućim prinosima, dobiti polipeptide koji sadrže do 100 aminokiselinskih ostataka.
- Mogućnost regulacije: katalitička aktivnost mnogih enzima varira u zavisnosti od koncentracije ne samo supstrata već i drugih supstanci. Mehanizmi ovih regulatornih procesa uključuju alosternu kontrolu, kovalentnu modulaciju enzima i promene u intenzitetu sinteze datog enzima.

2.1. Uticaj temperature i pH na aktivnost enzima amilaze

Najveća i najznačajnija grupa proteina u smislu biološke aktivnosti jesu enzimi. Enzimi deluju kao katalizatori biohemijskih reakcija. Hiljade reakcija u organizmu, koje zajedničkim imenom nazivamo *metabolizam*, omogućene su prisustvom i aktivnošću enzima. Kako su enzimi proteinskog karaktera, oni su veoma osetljivi na promene temperature i pH sredine.

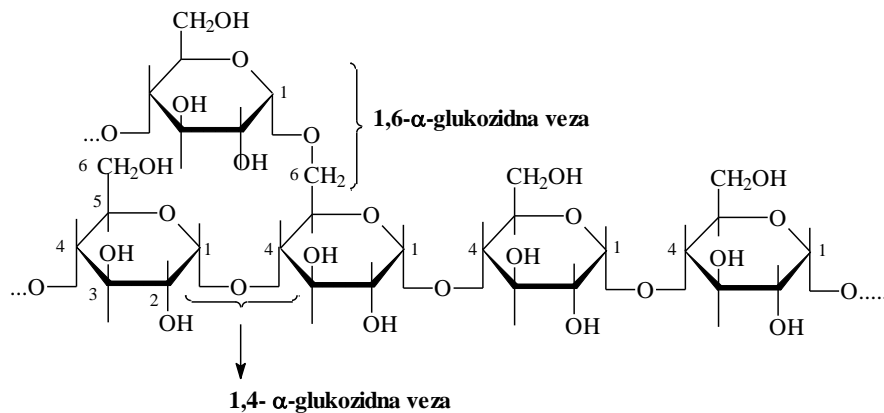
Amilaze su biljni i životinjski enzimi koji hidrolizuju polisaharid skrob, izgrađen iz dve vrste strukturnih jedinica – amiloze i amilopektina. Animalne amilaze se nalaze u pljuvački i pankreasu, dok su amilaze biljnog porekla prisutne u semenu. Po specifičnosti delovanja razlikujemo dva enzima iz grupe amilaza:

α -amilaza (EC 3.2.1.1; ovo je kodni broj enzima α -amilaze, gde prvi broj govori da ovaj enzim spada u enzimsku grupu hidrolaza, drugi broj označava vrstu katalizovane reakcije (hidroliza glukoziidne veze), a treći broj detaljnije označava vrstu katalizovane reakcije. Četvrti broj definiše supstrat i naziva se još individualnim brojem enzima). α -amilaza deluje na 1,4- α -glukoziidne veze u sredini molekula skroba, cepajući amilozu celom dužinom. Proizvodi reakcije su dekstrini i malo maltoze. Na *Slici 5* prikazana je struktura amiloze:

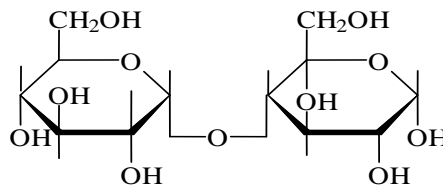


Slika 5. Segment strukture amiloze

β -amilaza (EC 3.2.1.2), postepeno odcepljuje molekule maltoze sa krajeva razgranatog lanca amilopektina (*Slika 6*) hidrolizujući ga potpuno u maltozu sve dok ne dođe do 1,6- α -glukoziidne veze (tačka račvanja molekula). Obe amilaze deluju specifično samo na 1,4- α -glukoziidnu vezu dok 1,6- α -glukoziidnu vezu hidrolizuje enzim 1,6- α -glukoziidaza. Ovaj enzim hidrolizuje skrob u potpunosti na maltozu i glukozu.



Slika 6. Segment strukture amilopektina



Slika 7. Struktura maltoze

a) Uticaj temperature na aktivnost amilaze:

Temperatura jednako utiče na brzinu enzimskih reakcija kao i kod nekatalizovanih reakcija. Zagrevanje za 10° C povećava brzinu reakcije dva do četiri puta. No ovaj kinetički efekat temperature je u suprotnosti sa osetljivošću enzima prema povišenoj temperaturi. Naime, neki enzimi su već pri 40-50° C ireverzibilno oštećeni, a samo su retki aktivni još i iznad 60° C. Oštećenje, koje se naziva denaturacija, se u većini slučajeva sastoji u gubitku native (prirodne) konformacije bitne za enzimsku aktivnost.

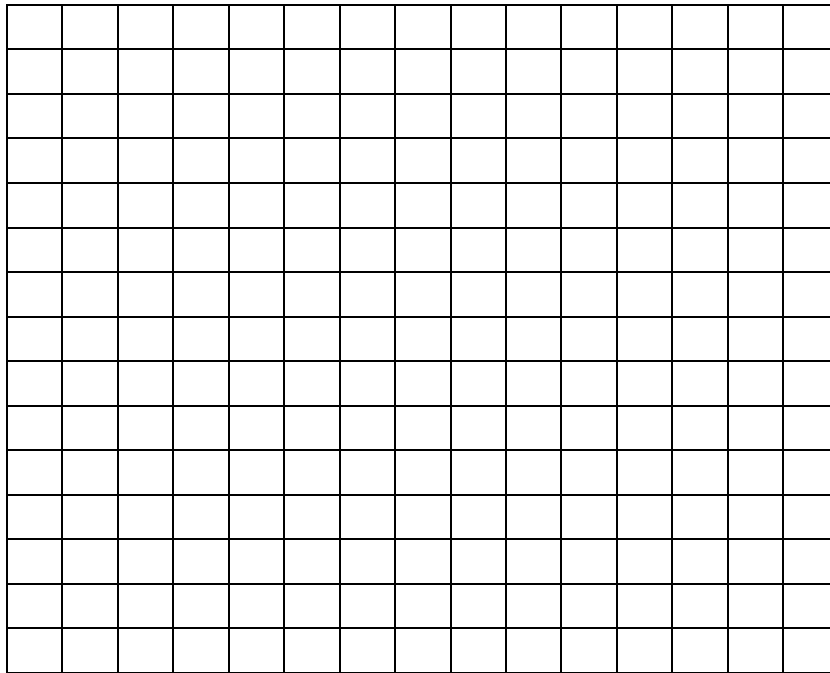
Za svaki enzim postoji određena temperatura na kojoj ispoljava svoju najveću aktivnost i ona se označava kao optimalna ($t_{opt.}$).

Postupak: a) U dve epruvete sipati po 1 cm³ preparata amilaze, pa jednu epruvetu zagrevati 2 min na ključalom vodenom kupatilu i ohladiti je vodom ispod slavine. U obe epruvete dodati 1 cm³ rastvora skroba i staviti ih u termostat na 37° C. Nakon 15 min epruvete ohladiti vodom i svakoj dodati 2 kapi rastvora joda u KI (Lugolov rastvor). Na osnovu dobijenih boja zaključiti kako utiče visoka temperatura na aktivnost enzima.

b) U dve epruvete sipati po 1 cm³ rastvora preparata amilaze, a u druge dve sipati po 1 cm³ skroba. Sve četiri epruvete postaviti u kadu sa ledom. Nakon 5 min skrob iz epruveta preručiti u epruvete sa amilazom, dobro ih protresti i držati na ledu još 10 min. Nakon toga jednoj epruveti dodati 2 kapi Lugolovog rastvora pri čemu se pojavljuje plava boja, što znači da hidroliza skroba nije izvršena, odnosno da je aktivnost enzima na 0° C neznatna. Drugu epruvetu staviti zatim u termostat na 37° C i nakon 20 min ohladiti ispod slavine i dodati 2 kapi Lugolovog rastvora.

Zadatak: Posmatrati reakcije hidrolize skroba sa amilazama iz pljuvačke na osnovu boja dobijenih u reakciji sa Lugolovim rastvorom, na temperaturama 0°, 37° i 100° C. Dobijene rezultate uneti u tabelu, a na osnovu aktivnosti enzima (izražene brojem +) nacrtati grafik (*Slika 8*).

| T ⁰ na kojoj se izvodi ogled | Boja sa Lugolovim rastvorom | Aktivnost enzima (+) |
|---|-----------------------------|----------------------|
| a ₁) skrob + amilaza na 37° C | | |
| a ₂) skrob + amilaza na 100°, pa na 37° C | | |
| b ₁) skrob + amilaza na 0° C | | |
| b ₂) skrob + amilaza na 0°, inkubirano na 37° C | | |



Slika 8. Grafik uticaja temperature na aktivnost amilaze

b) Uticaj pH na aktivnost amilaze:

Većina enzima ima karakteristično pH na kome je njegova aktivnost maksimalna. Najpovoljnija koncentracija H^+ jona naziva se optimalno pH ($pH_{opt.}$). Iznad i ispod ovog pH aktivnost enzima, po pravilu, opada, znači kriva zavisnosti delovanja pH na aktivnost enzima ima oblik zvona. Međutim, profil pH aktivnosti enzima nije uvek zvonastog oblika, već može biti samo delimično zvonast, pa čak i pravolinijski u izvesnim intervalima.

Odnosi između pH i aktivnosti različitih enzima zavise od više faktora:

- pK jonskih grupa u aktivnom delu enzimskog molekula koje učestvuju u vezivanju za supstrat,
- pK funkcionalnih jonizujućih grupa molekula supstrata koje učestvuju u vezivanju za enzim,
- pK funkcionalnih grupa molekula enzima odgovornih za katalitičko delovanje,
- pK drugih grupa u molekulu enzima čiji stepen jonizacije može usloviti specifičnu, katalitički aktivnu konformaciju molekula.

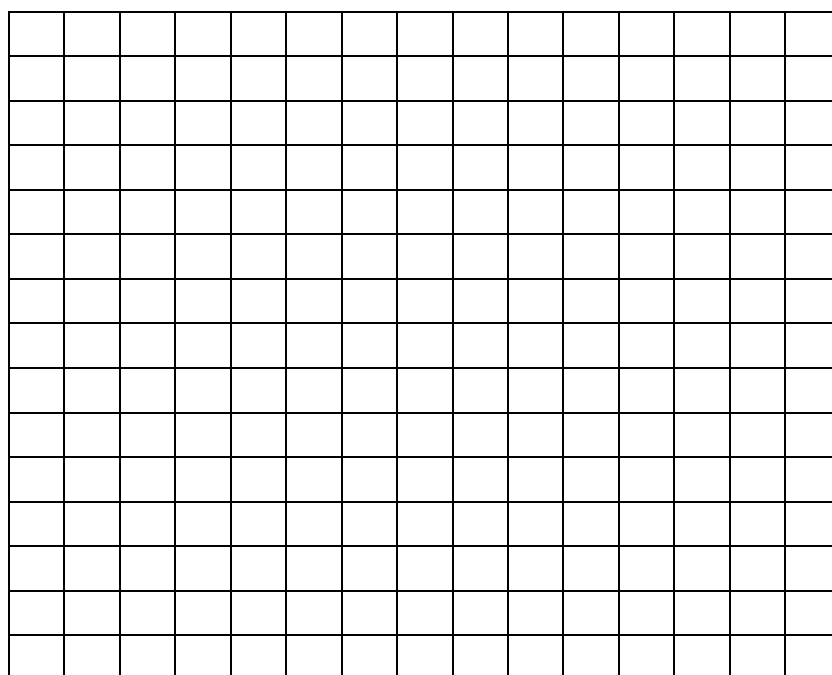
Postupak: U sedam epruveta pomoću rastvora Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 napraviti rastvore sa različitim pH vrednostima prema podacima iz *Tabele 4*.

U navedene rastvore dodati brzo po 1 cm^3 rastvora skroba, a zatim po 1 cm^3 rastvora preparata amilaze. Smešu u svakoj epruveti dobro protresti a zatim staviti stalak sa epruvetama u termostat na 37°C . Nakon 15 min ohladiti epruvete ispod slavine i u svaku dodati po 2 kapi Lugolovog rastvora i dobro promućkati. Kao rezultat, usled različitog stepena hidrolize skroba, dobijaju se različito obojeni kompleksi.

Tabela 4. Način pripreme serije pufernih rastvora za ispitivanje uticaja pH

| | | | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Broj epruvete: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Na_2HPO_4 | - | 0,25 | 1,0 | 2,5 | 3,5 | 4,5 | 5,0 |
| KH_2PO_4 | 5,0 | 4,75 | 4,0 | 2,5 | 1,5 | 0,5 | - |
| pH | 4,49 | 5,59 | 6,24 | 6,81 | 7,17 | 7,73 | 9,18 |
| Aktivnost enzima: | | | | | | | |

Zadatak: Posmatrati reakcije hidrolize skroba sa amilazama u pufernim rastvorima različitih pH. Na osnovu boja dobijenih u reakciji sa Lugolovim reagensom odrediti aktivnost enzima (izraženo brojem +) i nacrtati grafik (*Slika 9*).



Slika 9. Grafik uticaja pH na aktivnost amilaze

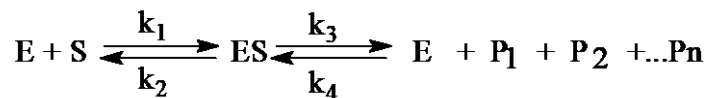
Overa:

2.2. Uticaj koncentracije supstrata [S] i koncentracije enzima [E] na brzinu enzimske reakcije

Oblast enzimologije koja proučava brzine enzimskih reakcija naziva se *kinetika enzimskih reakcija*. Ona proučava zavisnost brzine reakcija katalizovanih enzimima od hemijske prirode reaktanata (supstrata, enzima) i uslova pod kojim oni reaguju (koncentracija, temperatura, pH, prisustvo aktivatora ili inhibitora itd.). Predstavlja matematički izraz enzimskih reakcija i daje kvantitativne odnose između brzine reakcija i koncentracije enzima i supstrata. Uslov da se odredi aktivnost nekog enzima je da se izmeri brzina reakcije koju on katalizuje. Ovo se može ostvariti merenjem nastalog proizvoda ili nestalog supstrata u funkciji vremena. Izuzetak su enzimi iz grupe dehidrogenaza kod kojih se umesto navedenih parametara meri koncentracija NADH.

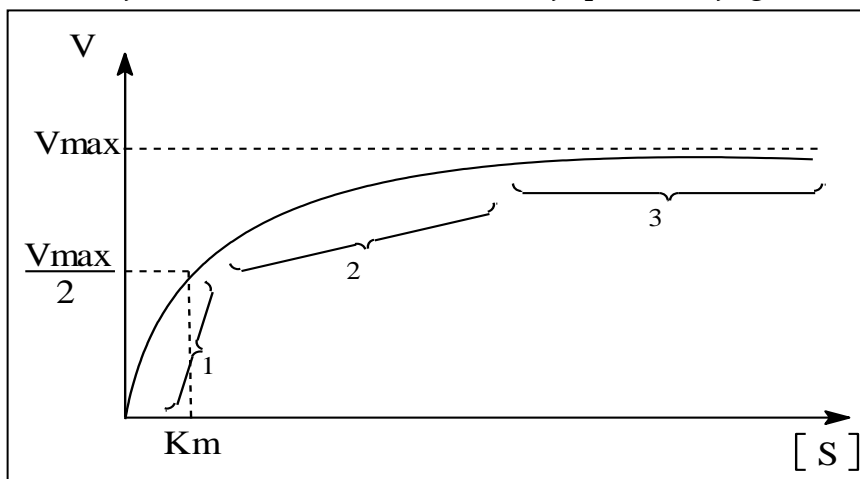
a) Uticaj koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije:

Opšti principi kinetike hemijskih reakcija mogu se primeniti i na reakcije katalizovane enzimima. Međutim, enzimske reakcije pokazuju izvesne specifičnosti koje nisu primećene kod neenzimskih reakcija, a to je fenomen zasićenja enzima supstratom. Kada enzim (E) deluje na supstrat (S), proizvodi reakcije (P₁, P₂, ...) se ne stvaraju direktno iz supstrata već se enzim prethodno vezuje za supstrat u nestabilan kompleks enzim-supstrat (ES). U najjednostavnijem slučaju, kompleks ES se zatim raspada na proizvode reakcije i obnovljeni enzim, sposoban da stupi u reakciju sa sledećim molekulom supstrata:



gde su k₁, k₂, k₃ i k₄ konstante brzine;

Uticaj koncentracije S na brzinu enzimske reakcije prikazan je grafički na *Slici 10*:



Slika 10. Promena brzine enzimske reakcije (V) u zavisnosti od koncentracije supstrata $[S]$

Pri niskoj koncentraciji supstrata $[S]$, brzina V je proporcionalna $[S]$ i reakcija je prvog reda (1) u odnosu na supstrat, tj. prava linija čiji nagib zavisi od K (konstanta promene koncentracije supstrata u jedinici vremena) (*Slika 10*). Ovaj slučaj se može matematički predstaviti izrazom:

$$V = \frac{-d[S]}{dt} = K[S]$$

gde je K konstanta promene koncentracije S u jedinici vremena;

Sa povećanjem $[S]$, V usporava rast, nije više proporcionalna $[S]$ i u ovoj zoni je reakcija mešovitog reda (2). Daljim povećanjem $[S]$, V postaje konstantna i nezavisna od $[S]$ (3). U ovom opsegu koncentracije supstrata reakcija je nultog reda u odnosu na supstrat, a enzim je zasićen supstratom. Svi enzimi pokazuju efekat zasićenja ali se znatno razlikuju u visini $[S]$ potrebne da dovede do zasićenja.

Ovaj efekat zasićenja podstakao je naučnike *Michaelisa* i *Mentena* da početkom 20. veka zasnuju *Teoriju dejstva i kinetike enzima*. Oni su izveli jednačinu koja povezuje kinetičke parametre enzimskih reakcija pod pretpostavkom da se ES-kompleks ireverzibilno raspada na slobodan enzim i proizvode reakcije:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Ovo je *Michaelis-Menten*-ova jednačina kojom su utvrđeni kvantitativni odnosi između brzine enzimske reakcije V i koncentracije supstrata $[S]$, kada su V_{\max} i K_m poznati. Iz ove jednačine možemo da izrazimo K_m :

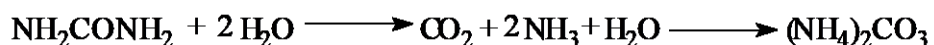
$$K_m = [S] V_{\max}/2$$

Koncentracija supstrata pri kojoj je postignuta polovina maksimalne brzine reakcije jednaka je *Michaelis-Menten*-ovoj konstanti (K_m). K_m ne zavisi od koncentracije enzima, a zavisi od strukture supstrata, pH i temperature. Kod enzima koji imaju više supstrata, oni za svaki supstrat imaju karakterističnu K_m . Visoke vrednosti K_m ukazuju da je potrebna visoka koncentracija supstrata za postizanje poluzasićenja. To znači da enzim nema veliki afinitet prema supstratu i da će se pre vezati za neki drugi supstrat, za koji ima manju K_m vrednost. Uobičajene vrednosti za K_m kreću se između 10^{-2} - 10^{-5} mol/dm³.

Svaki enzim u odnosu na neki supstrat ima definisanu aktivnost. Jedinica enzimske aktivnosti označava količinu jednog enzima koji će katalizovati transformaciju specifične količine supstrata u proizvod, pod definisanim uslovima. Kako je u SI sistemu mera jedinica za vreme sekund, a za količinu materije mol, to je za jedinicu enzimske aktivnosti uvedena jedinica *katal* (kat). Katal je definisan onom količinom enzima koja pretvara 1 mol supstrata u sekundi pod specifičnim uslovima. U praksi se često pored katala upotrebljavaju manje jedinice – mikrokatal (μ kat; 10^{-6} kat) i nanokatal (nkat; 10^{-9} kat). U upotrebi se sreće i starija jedinica, tzv. internacionalna jedinica (IU) koja označava količinu enzima koja transformiše 1 μ mol supstrata u minuti pod specifičnim uslovima (npr. pH, temperatura, zasićenost itd.)

Za ispitivanje uticaja koncentracije supstrata i koncentracije enzima na brzinu enzimske reakcije, u ovoj vežbi će nam poslužiti enzim ureaza i njegov supstrat urea (karbamid).

Ureaza (EC 3.5.1.5) je enzim koji pripada grupi hidrolaza i katalizuje reakciju hidrolize uree na CO_2 i NH_3 :



urea

amonijum-karbonat

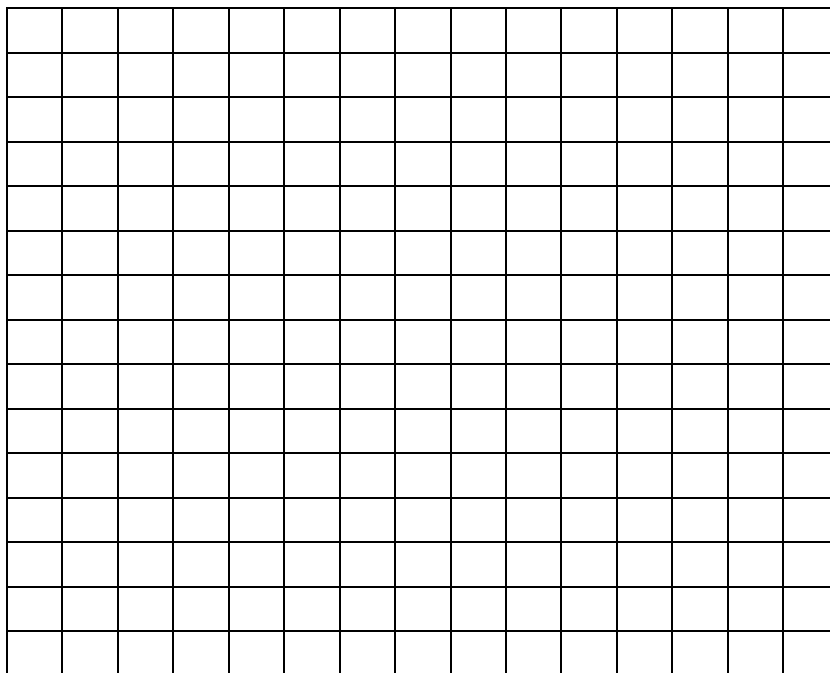
Ureaza se nalazi u organizmima sisara, a u većim količinama i u nekim ratarskim kulturama (npr. soja).

Postupak: U šest epruveta odmeriti pipetom po 2 cm³ destilovane vode. U prvu epruvetu dodati 2 cm³ rastvora karbamida. Rastvor dobro izmešati. Iz ovako pripremljenog rastvora odpipetirati 2 cm³ i preneti u drugu epruvetu, i tako dalje, u sve naredne epruvete. Iz šeste epruvete odbaciti 2 cm³ nakon mešanja. Na ovaj način dobijaju se različite koncentracije (dvostruka razblaženja) karbamida u pojedinim epruvetama. Zatim u svaku epruvetu dodati po 1 cm³ rastvora ureaze, promućkati, i sve epruvete staviti u termostat na 37° C. Nakon 15 min stalak sa epruvetama izvaditi i ohladiti vodom iz slavine. U svaku epruvetu dodati po 2 kapi indikatora. Usled prisustva amonijum karbonata indikator menja boju u plavo. Nastali amonijum karbonat titrisati sa rastvorom 0.03 mol/dm³ HCl do bledo-ružičaste boje. Broj utrošenih cm³ je merilo za aktivnost ureaze.

Zadatak: Na osnovu dobijenih vrednosti utroška titracionog sredstva (*Tabela 5*), nacrtati odgovarajući grafik (*Slika 11*). Na apscisu nanositi koncentracije supstrata (karbamida) a na ordinatu broj cm³ 0.03 mol dm⁻³ HCl koja je utrošena pri titraciji.

Tabela 5. Vrednosti utroška titracionog sredstva

| | | | | | | |
|--|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Broj epruvete: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| [karbamid] | 0.25 | 0.125 | 0.063 | 0.031 | 0.015 | 0.007 |
| cm ³ 0.03 mol dm ⁻³ HCl | | | | | | |

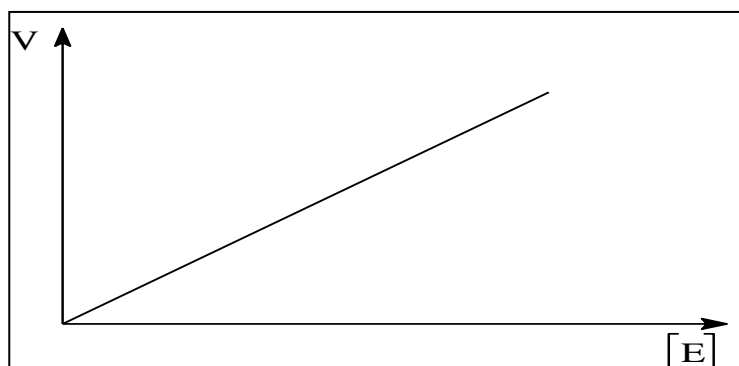


Slika 11. Grafik uticaja koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije

b) Uticaj koncentracije enzima na brzinu enzimske reakcije:

Za efikasno delovanje nekog enzima dovoljne su njegove minimalne količine u odnosu na supstrat. Ako se pri konstantnoj koncentraciji supstrata, temperaturi, pH i drugim uslovima menja koncentracija enzima [E], onda se menja i brzina enzimske reakcije. Utvrđeno je da se sa povećanjem koncentracije enzima (pri konstantnim nabrojanim uslovima) brzina reakcije povećava linearno.

Uticaj koncentracije E na brzinu enzimske reakcije prikazan je grafički na *Slici 12.*



Slika 12. Promena brzine enzimske reakcije (V) u zavisnosti od koncentracije enzima [E]

Postupak: U šest epruveta napraviti različite koncentracije ureaze na sledeći način (**Tabela 6**):

Tabela 6. Način pripreme serije rastvora različitih koncentracije ureaze

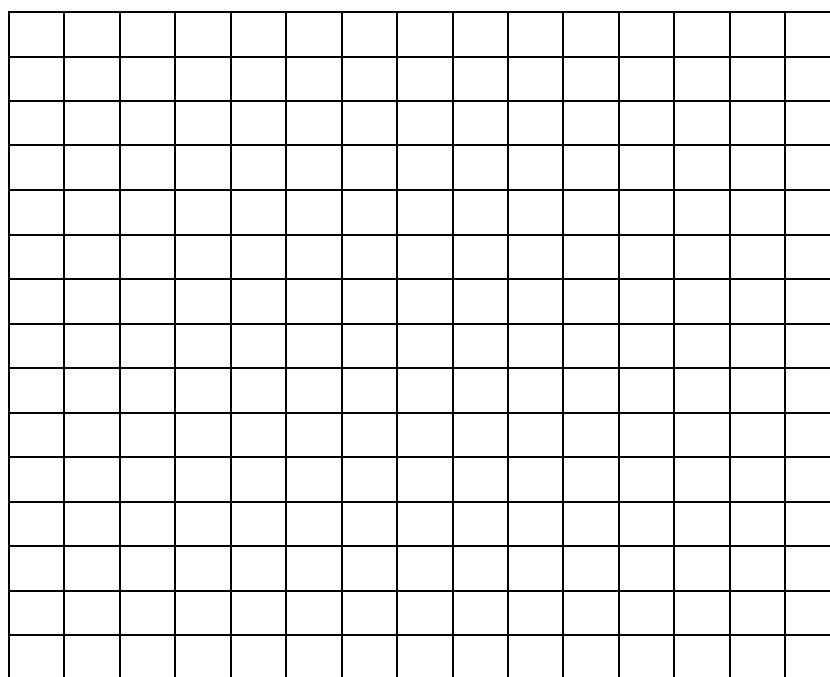
| | | | | | | |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| cm ³ destilovane vode: | 1.9 | 1.8 | 1.7 | 1.6 | 1.5 | 1.4 |
| cm ³ rastvora ureaze: | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |

U svaku epruvetu dodati po 2 cm³ rastvora karbamida, dobro protresti i staviti ih u termostat na 37° C. Nakon 15 min epruvete izvaditi, ohladiti vodom ispod slavine i dodati po dve kapi indikatora. Nastali amonijum karbonat titrisati sa 0.03 mol/dm³ HCl do blede-ružičaste boje. Utrošeni broj cm³ kiseline predstavlja merilo aktivnosti ureaze u zavisnosti od njene koncentracije.

Zadatak: Dobijene vrednosti za utrošak titracionog sredstva uneti u **Tabelu 7**, i na osnovu ovih podataka nacrtati odgovarajući grafik (**Slika 13**). Na apscisu naneti cm³ rastvora ureaze a na ordinatu broj cm³ HCl koja je utrošena za titraciju.

Tabela 7. Vrednosti utroška titracionog sredstva

| | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Broj epruvete: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| cm ³ rastvora ureaze | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 |
| cm ³ 0.03 mol/dm ³ HCl | | | | | | |



Slika 13. Grafik uticaja koncentracije enzima na brzinu enzimske reakcije

| |
|---------------|
| Overa: |
|---------------|

2.3. Aktiviranje lipaze solima žučnih kiselina

Lipaze su enzimi koji katalizuju hidrolizu neutralnih masti i pripadaju hidrolazama, podgrupi esteraza. Široko su rasprostranjeni u prirodi, a posebno im je velika koncentracija u pankreasu, jetri i zidovima tankih creva. Lipaza pankreasa katalizuje odcepljenje masnih kiselina samo u položaju α i α' , a ona iz zidova tankih creva deluje i na β -estarsku vezu. Međutim, ipak se oko 75% masti unešene hranom resorbuje u obliku β -monoacilglicerola. U mukozi creva se ponovo gradi neutralna mast, koja se dalje prenosi limfom. Delovanje lipaza pospešeno je prisustvom soli žučnih kiselina, koje se stvaraju u jetri i izlučuju u tanko crevo. One su površinski aktivne materije (smanjuju površinski napon) i stoga deluju kao emulgatori masti. Smatra se, osim toga, da poseduju sposobnost aktivacije samih lipaza.

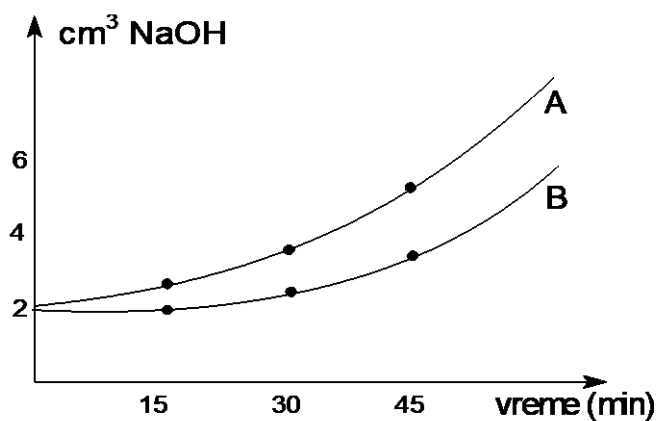
Kod mobilizacije rezervi iz masnog tkiva dolazi do hidrolize masti unutar ćelije pod dejstvom specifičnih ćelijskih lipaza. Ove enzime aktivira $3',5'$ -cAMP ("ciklični AMP"). Građenje $3',5'$ -cAMP katalizuje enzim adenilatciklaza. Hormoni koji stimuliraju adenilatciklazu, kao što su adrenalin i glukagon, deluju lipolitički. U ovom slučaju oslobođene masne kiseline vežu se u krvi na proteine seruma i tako prenose do jetre, gde se degradiraju.

Priprema preparata lipaze: U avanu sa tučkom homogenizovati 10 g sveže svinjske jetre, prethodno dobro očišćene od masnog tkiva, uz dodatak minimalne količine kvarcnog peska. Dodati homogenatu 20 cm³ smeše glicerol-voda (1:3), dobro promešati i procediti kroz dvostruki sloj gaze. Filtrat, koji predstavlja preparat lipaze, neutralisati sa par kapi zasićenog rastvora natrijumkarbonata, uz fenolftalein kao indikator. Podeliti filtrat na dva dela: jednu polovinu staviti u termostat na 37° C, a drugu polovinu prokuvati (100° C) (preparat inaktivirane lipaze).

Soli žučnih kiselina su površinski aktivne materije (smanjuju površinski napon) i stoga deluju kao emulgatori masti. Smatra se da poseduju i sposobnost aktivacije samih lipaza. Lipaze deluju samo na emulgovane masti na graničnoj površini lipid-voda. Hidroliza masti u hrani provodi se prvenstveno u tankom crevu delovanjem lipaze pankreasa, koja se takođe aktivira solima žučnih kiselina. Lipaza pankreasa hidrolizuje samo estarske veze na C-1 i C-3 atomu triacilglicerola. Znatan deo masti iz hrane (50-60%) resorbuje se kao 2-monoacilglicerol, dok se ostatak 2-monoacilglicerola dalje hidrolizuje 2-monoacilglicerol lipazom.

Važan faktor za delovanje lipaza je pH sredine. One deluju u slabo alkalnoj i alkalnoj sredini, tako da lipaze u želudcu, gde je kisela sredina, jedino mogu da razlože fino emulgovane čestice masti, što je slučaj kod mleka gde se mast nalazi u obliku nestabilne emulzije. Do potpune hidrolize dolazi u tankom crevu gde je sredina slabo alkalna. Kod korišćenja (razgradnje) rezervi iz masnog tkiva dolazi do hidrolize unutar ćelije delovanjem specifičnih ćelijskih lipaza.

Kriva hidrolize masti pomoću lipaze pokazuje da brzina reakcije raste sa vremenom i da je značajno veća u prisustvu žuči (tj. soli žučnih kiselina), koje ne samo što lipazu prevode iz neaktivnog u aktivno stanje, nego takođe prevode kompaktnu masu ulja i masti u fino emulgovano stanje, gde enzim pokazuje maksimalnu aktivnost (*Slika 14*).



A-aktivnost lipaze predhodno aktivirane sa žučnim kiselina

B-aktivnost lipaze bez dodatka žučnih kiselina

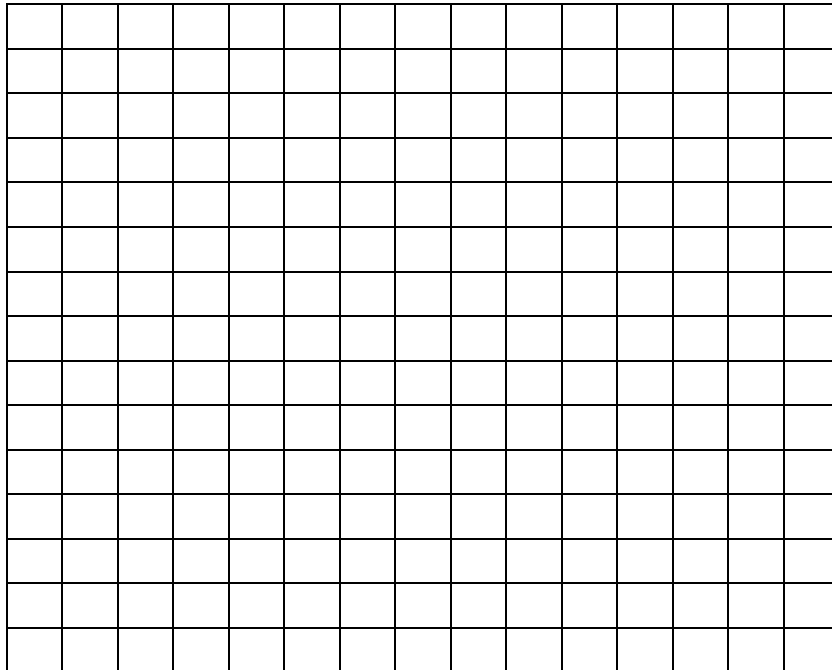
Slika 14. Kriva hidrolize masti u prisustvu lipaze i soli žučnih kiselina

Za eksperimentalno praćenje aktivnosti enzima lipaze pogodan supstrat je mleko koje sadrži oko 2,8% masti.

Postupak: U dva erlenmajera (zapremine 100 cm³) koji su obeleženi brojevima 1 i 2, odmeriti menzutom 50 cm³ supstrata, tj. mleka. Zatim dodati u svaku posudu po 2 cm³ ekstrakta lipaze (izvor: svinjski pankreas). Pored toga u erlenmajer br. 1 dodati 5-6 kapi žuči radi aktiviranja lipaze. Sadržaj zatim brzo promešati i odmah potom posebnim pipetama uzeti po 10 cm³ tečnosti i preneti u dva manja erlenmajera (zapremine 25 cm³, označene brojevima 1a i 2a) radi titrisanja. Posle toga erlenmajere 1 i 2 staviti u termostat zagrejan na 37° C. U erlenmajere 1a i 2a dodati po 10 cm³ destilovane vode i 2-3 kapi indikatora, a zatim pažljivo titrisati sa rastvorom 0.1 mol dm⁻³ NaOH do pojave svetlo-ružičaste boje. Zabeležiti utrošak baze. Nakon toga erlenmajere 1a i 2a dobro oprati. Posle isteka 15 min od vremena stavljanja erlenmajera br. 1 i 2 u termostat, uzeti iz njih po 10 cm³ tečnosti, preneti u erlenmajere 1a i 2a i titrisati na prethodan način, a rezultat zabeležiti. Istu operaciju izvesti još 2-3 puta posle svakih sledećih 15 minuta hidrolize. Titraciju vršiti uvek pod istim uslovima.

Zadatak: Nacrtati krivu razlaganja triacilglicerola u mleku u funkciji vremena, nanoseći na apscisu vreme u minutama, a na ordinatu broj cm³ rastvora 0.1

mol dm⁻³ NaOH utrošenog za titraciju svakog uzorka iz probe u erlenmajeru br. 1 (sa dodatkom žuči) i iz erlenmajera br. 2 (bez dodatka žuči) (*Slika 15*).



Slika 15. Kriva hidrolize masti

Overa:

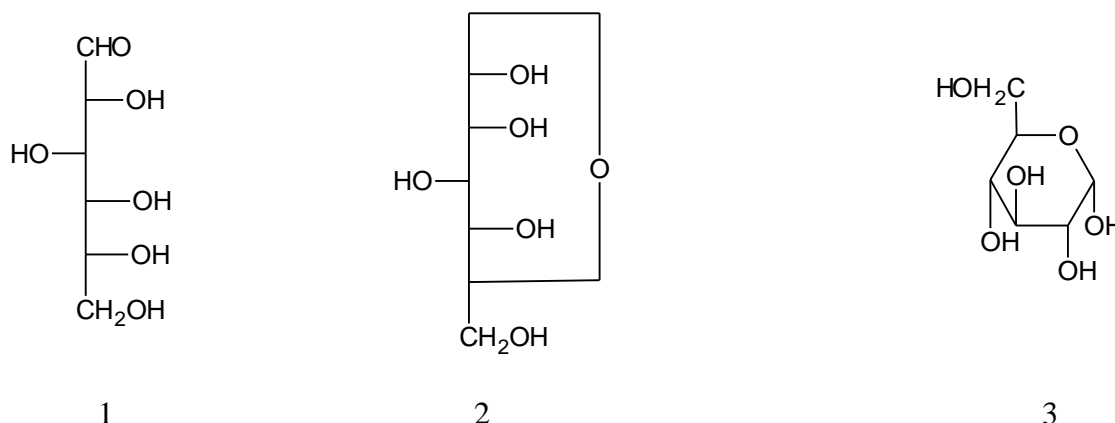
3. UGLJENI HIDRATI

Ugljeni hidrati ili saharidi predstavljaju grupu široko rasprostranjenih biomolekula. Prema stepenu složenosti strukture se dele na:

- Monosaharide, ili jednostavne šećere, koji su polihidroksilni aldehidi ili ketoni. Najrasprostranjeniji monosaharid je šestougljenični šećer D-glukoza. Glukoza je najznačajnije "molekulsko gorivo" za većinu organizama, a takođe i osnovni gradivni blok ili prekursor najrasprostranjenijih oligosaharida i polisaharida.
- Oligosaharide koji sadrže od dve do deset monosaharidnih jedinica vezanih glikozidnim vezama. Najrasprostranjeniji prirodni oligosaharidi su disaharidi koji su izgrađeni od dve monosaharidne jedinice.
- Polisaharide koji sadrže veoma duge nizove monosaharidnih jedinica; mogu biti linearni i račvasti. Većina polisaharida sadrži u periodičnom redosledu monomerne jedinice samo jedne vrste ili dve naizmenečne vrste monosaharida; stoga oni nisu informacioni molekuli (za razliku od proteina i polinukleotida).

U biosferi, tj. celokupnoj živoj materiji, verovatno je prisutno više ugljenih hidrata nego svih ostalih organskih materija zajedno, dobrim delom zbog rasprostranjenosti dva polimera D-glukoze: celuloze i skroba. Celuloza je najvećim delom vanćelijski strukturni sastojak vlaknastih i drvenastih tkiva biljaka. Skrob se nalazi u velikim količinama u biljkama, gde je glavni skladišni oblik molekuskog goriva. Polisaharidi su takođe važni sastojci ćelijskih zidova bakterija i biljaka i mekih ćelijskih prevlaka u životinjskim tkivima.

Pojedini oblici struktura kod prostih šećera mogu se videti na primeru D-glukoze kao reprezentativnog šećera (*Slika 16*):

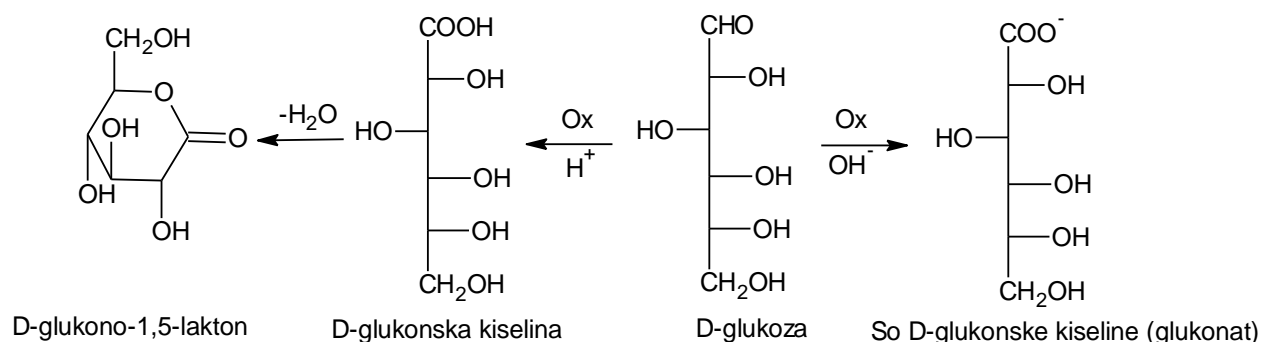


Slika 16. Strukture D-glukoze: 1-struktura po Fischer-u, 2-poluacetalna struktura po Fischer-u i Tollens-u, 3- struktura po Haworth-u

3.1. Kvalitativne reakcije na ugljene hidrate

Oksidacija redukujućih šećera jonima prelaznih metala

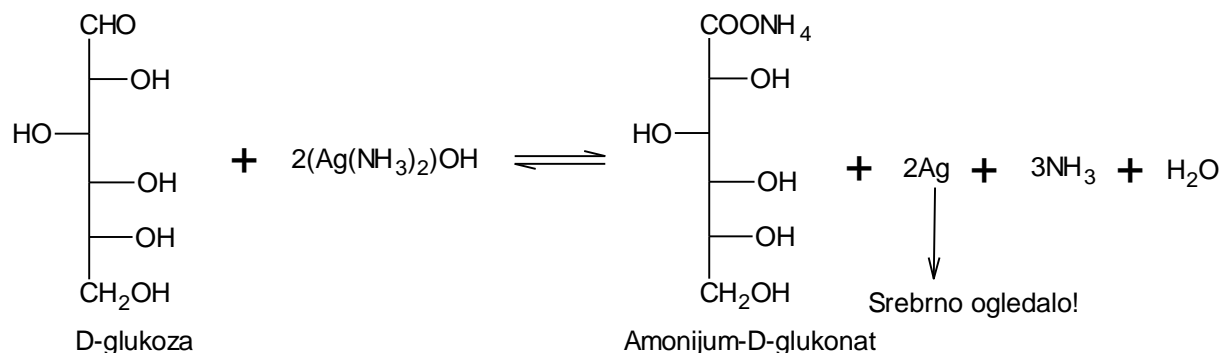
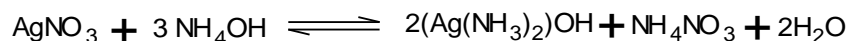
Slaba oksidaciona sredstva kao što su joni izvesnih prelaznih metala (Ag^+ , Cu^{2+} i Bi^{3+}) oksiduju aldehydni ugljenikov atom aldoza, pri čemu nastaju odgovarajuće karbonske kiseline (aldonske kiseline). Reakcije se najčešće izvode u alkalnoj sredini, pri čemu D-glukoza, npr., daje so glukonske kiseline. Ako se reakcija izvodi u kiseljoj sredini, intermedijerno nagrađena D-glukonska kiselina se spontano dehidratirše dajući odgovarajućij lakton.



Iste reakcije daju i ketoze (jer se u alkalnoj sredini ketoze izomerizuju u aldoze) kao i redukujućij disaharidi (maltoza, celobioza, laktoza). Ove reakcije ne daju neredukujućij disaharidi (saharoza, trehaloza).

Tollensova reakcija

Rastvori redukujućij šećera redukuju amonijaćni rastvor srebronitrata do elementarnog srebra, koje se taloži na zidovima staklenog suda u obliku ogledala:

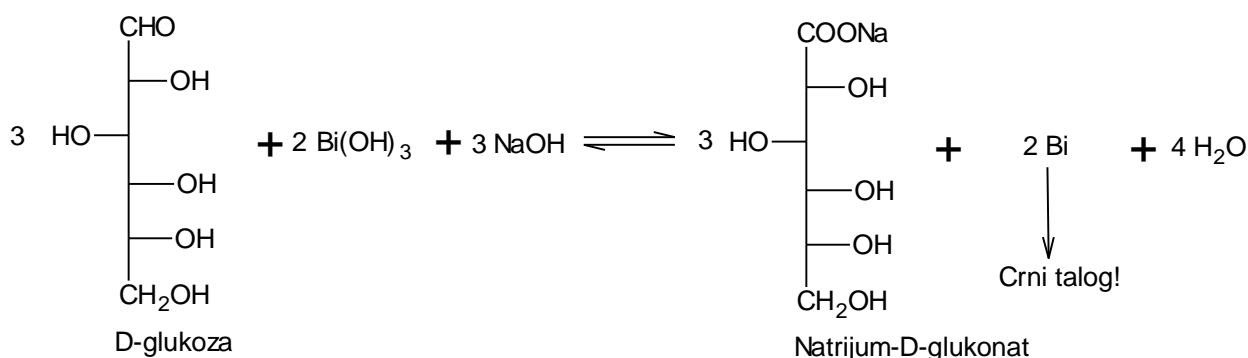
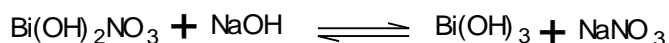


Postupak: Rastvoru srebronitrata dodavati rastvor NaOH, kap po kap, do pojave taloga, a zatim rastvor amonijaka dok se talog ne rastvori, vodećij računa da se rastvor amonijaka ne doda u višku. U amonijaćni rastvor srebronitrata dodati 1 cm³ rastvora ispitivanog šećera i smešu zagrevati na vodenom kupatilu. Ubrzo se javlja

talog elementarnog srebra a dužim zagrevanjem zidovi epruvete će biti prekriveni srebrnim ogledalom.

Nylanderova reakcija

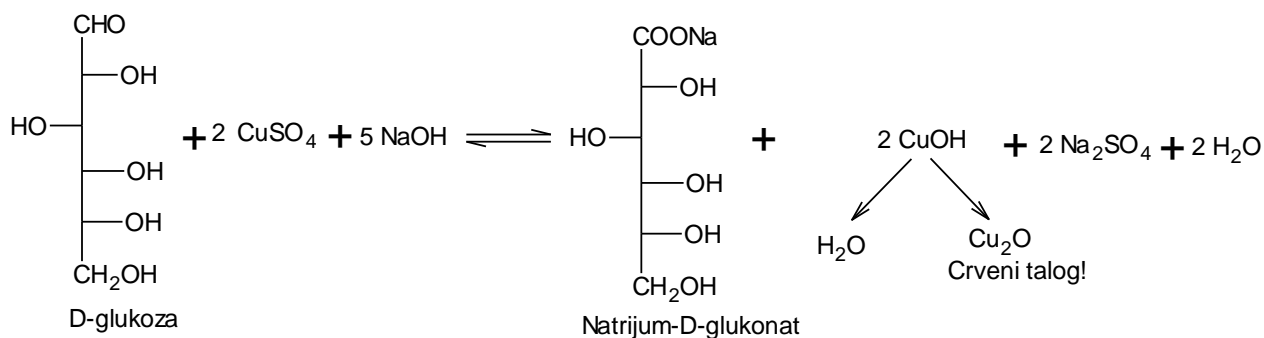
Za određivanje redukujućih šećera često se primenjuju i soli bizmuta, posebno kod određivanja šećera u mokraći, jer za razliku od soli bakra, ne oksiduju mokraćnu kiselinu.



Postupak: Sipati u epruvetu 1 cm³ rastvora ispitivanog šećera, dodati 0,5 cm³ Nylanderovog reagensa i pažljivo zagrevati na vodenom kupatilu oko 2 minuta. Javlja se najpre mrka, a zatim crna boja koja potiče od sitnog taloga elementarnog bizmuta.

Trommerova reakcija

Monosaharidi u alkalnoj sredini redukuju Cu²⁺ u Cu⁺, a sami se oksiduju do odgovarajućih aldonskih kiselina, odnosno do njihovih soli.



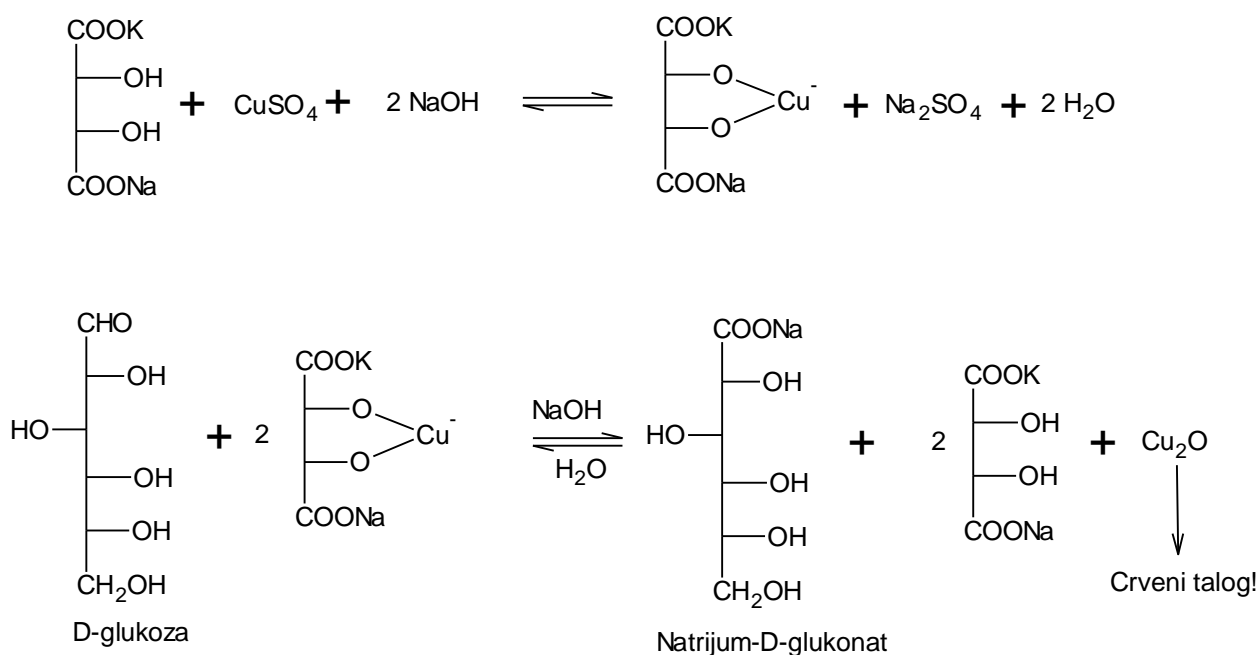
Postupak: Sipati u epruvetu 1 cm³ ispitivanog rastvora šećera i 1 cm³ 10% rastvora NaOH. Dodati smeši, uz mućkanje, kap po kap 5% rastvor CuSO₄ sve dok se ne pojavi neprolazno замуćenje koje potiče od Cu(OH)₂. Pažljivo zagrevati epruvetu

(poželjno na plameniku); najpre se javlja žuta boja (od CuOH), koja prelazi u crvenu (Cu₂O), što ukazuje na pozitivnu Trommerovu reakciju.

Napomena: Kada je CuSO₄ u višku, pozitivna reakcija je teško uočljiva, jer nastali Cu(OH)₂ pri zagrevanju gubi vodu i prelazi u crni CuO.

Fehlingova reakcija

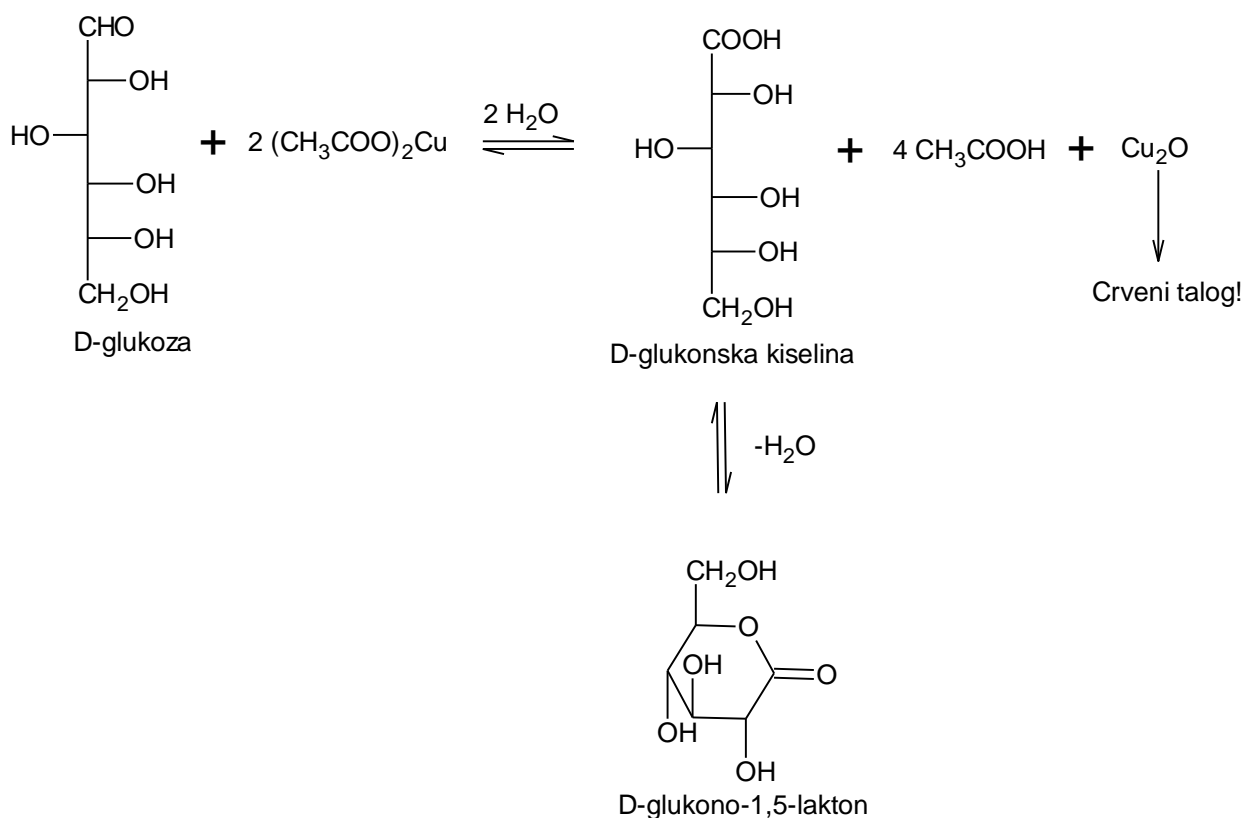
Ova reakcija se veoma često koristi za dokazivanje redukujućih šećera. Reagens sa kojim se reakcija izvodi sastoji se iz dva rastvora: tzv. Fehling I, koji predstavlja vodeni rastvor bakar(II)sulfata, i tzv. Fehling II, koji predstavlja alkalni rastvor kalijumnatrijuntartarata. Mehanizam ove reakcije je isti kao i u Trommerovoj reakciji. Međutim, prednost Fehlingove reakcije je u tome što višak reagensa ne ometa uočavanje pozitivne reakcije, jer se Cu²⁺, ne izdvaja u obliku oksida. Mešanjem Fehling I i Fehling II rastvora nastaje bakar(II)kalijumnatrijuntartarat, koji reaguje sa šećerom dajući crveni talog Cu₂O.



Postupak: Pomešati u epruveti jednake delove rastvora Fehling I i II i zagrijati. Prilikom zagrevanja reagens ne sme da promeni boju (u protivnom reagens nije ispravan). Vrućem rastvoru dodati vrući rastvor šećera i zagrevati 5 minuta na vodenom kupatilu. U slučaju redukujućih šećera javlja se crveni talog Cu₂O.

Barfedova reakcije

Barfedova reakcija se razlikuje od prethodnih reakcija na redukujuće šećere po tome što oksidacija ne protiče u alkalnoj već u kiseloj sredini. Pri ovim reakcionim uslovima redukujući disaharidi se praktično ne oksiduju, pa ih je na taj način moguće razlikovati od monosaharida.



Postupak: U 3 cm³ Barfedovog reagensa sipati 0,5 cm³ rastvora ispitivanog šećera. Zagrevati smešu u toku 10 minuta na vodenom kupatilu. Monosaharidi redukuju reagens do Cu₂O, dok disaharidi ne daju pozitivnu reakciju.

Napomena: treba izbegavati dugotrajno klučanje, jer disaharidi u kiseloj sredini mogu da se hidrolizuju do monosaharida, koji daju pozitivnu Barfedovu reakciju.

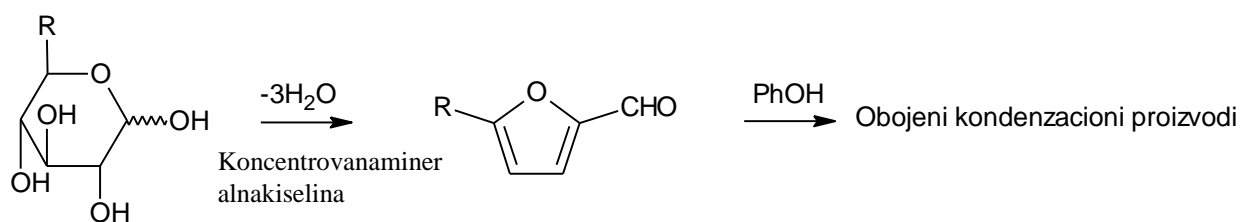
| Reakcija | D-glukoza | D-fruktoza | Saharoza | Maltoza |
|----------------------|-----------|------------|----------|---------|
| Tollensova reakcija | | | | |
| Nylanderova reakcija | | | | |
| Trommerova reakcija | | | | |
| Fehlingova reakcija | | | | |
| Barfedova reakcija | | | | |

Objasni različito ponazanje saharoze u odnosu na ostale ispitivane šećere.

Dehidratacija monosaharida dejstvom koncentrovanih mineralnih kiselina i bojene reakcije sa fenolima

Monosaharidi su stabilni pri zagrevanju sa razblaženim mineralnim kiselinama. Nasuprot tome, koncentrovane kiseline izazivaju dehidrataciju, pri čemu

pentoze daju furfural, dok heksoze daju 5-hidroksimetilfurfural. Pomenuti proizvodi mogu reagovati sa raznim fenolima, dajući intenzivno obojene kondenzacione proizvode nepoznatog sastava.



R=H: Pentoza

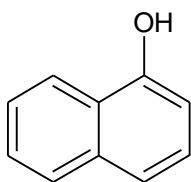
R=CH₂OH: Heksoza

R=H: Furfural

R=CH₂OH: 5-Hidroksimetilfurfural

Molischova reakcija

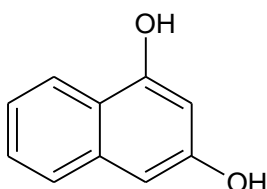
Molischova reakcija sa alkoholnim rastvorom α -naftola služi kao test za sva jedinjenja koja u toku reakcije dehidratacijom prelaze u furfural ili neki supstituisani furfural. Dehidratacija se odigrava dejstvom koncentrovane sumporne kiseline. Furfural, koji nastaje pri dehidrataciji, reaguje sa α -naftolom, dajući različito obojene kondenzacione proizvode.



Slika 17. Struktura α -naftola

Postupak: U 1cm³ rastvora ispitivanog šećera dodati 2 kapi Molischovog reagensa i intenzivno promešati. U nagnutu epruvetu (vrlo oprezno!) dodati 2 cm³ koncentrovane sumporne kiseline. Na granici dve tečnosti pojaviće se plavo-ljubičasta obojena zona.

Naftorezorciona Tollensova proba

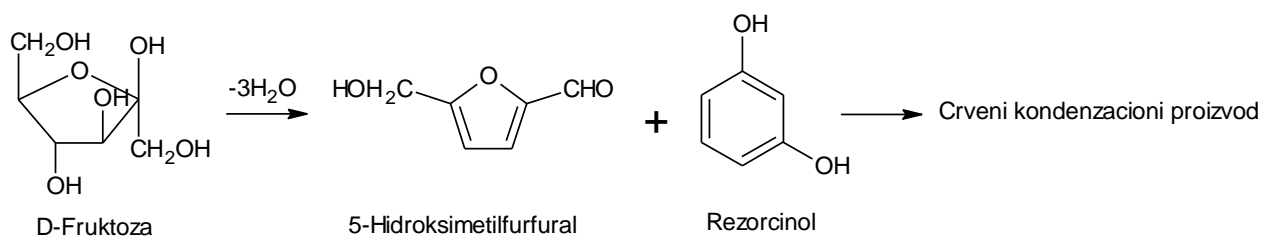


Slika 18. Struktura naftorezorcinola

Postupak: U 3 cm³ ispitivanog rastvora šećera dodati 0,5 cm³ 1% alkoholnog rastvora naftorezorcina i 0,5 cm³ koncentrovane HCl. Smešu pažljivo zagrevati do ključanja i ostaviti da ključa 1 minut. Zatim, ohladiti sadržaj epruvete, dodati 1 cm³ etra ili benzena i promućkati. Etarski (benzenski) sloj se boji različito: glukoza, manosa i galaktoza daju plavo-zelenu boju, ramnoza-ljubičastu, arabinoza i ksiloza-tamno plavu, uronske kiseline, za čije se dokazivanje ova reakcija često primenjuje, boje etarski (benzenski) sloj intenzivno ljubičasto.

Salivanova reakcija na ketoze

Zagrevanjem heksoza sa razblaženim kiselinama nastaje hidroksimetilfurfural koji lako reaguje sa rezorcinolom (Salivanov reagens) dajući crveni kondenzacioni proizvod.

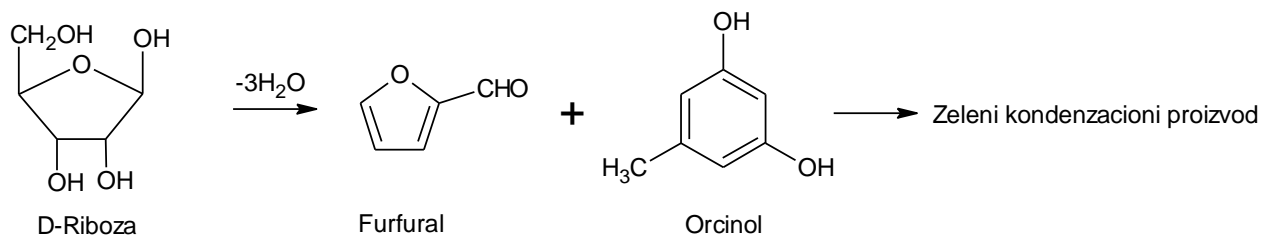


Hidroksimetilfurfural se obrazuje znatno brže iz ketoza nego iz aldoza. Za isto vreme i pod istim uslovima, rastvor koji sadrži fruktozu obojiće se tamno-crveno, dok će rastvor sa glukozom biti tek ružičasto obojen. Stoga ova reakcija služi za razlikovanje ketoza od aldoza.

Postupak: Sipati 0,5 cm³ rastvora ispitivanog šećera i dodati 2 cm³ reagensa. Epruvetu uroniti u ključalo vodeno kupatilo i zabeležiti vreme pojave boje.

Bialova reakcija na pentoze

Pentoze u kiseljoj sredini daju furfural, koji se kondenzuje sa orcinolom u prisustvu FeCl₃ dajući zeleni kondenzacioni proizvod.

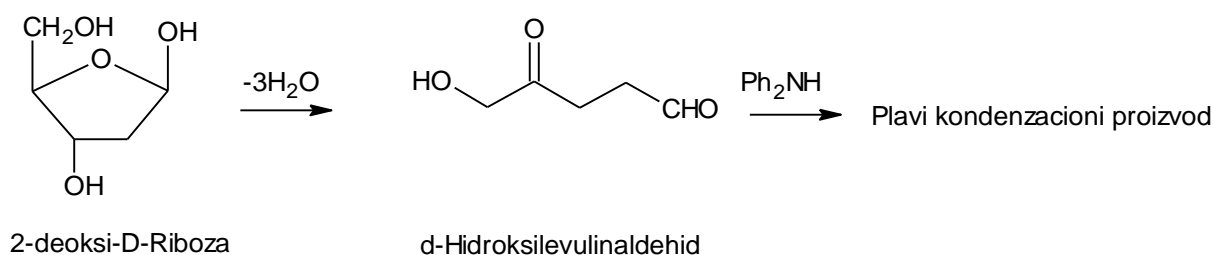


Postupak: U 1 cm³ ispitivanog rastvora dodati istu zapreminu orcinolnog reagensa. Smešu zagrevati na ključalom vodenom kupatilu u toku 20 minuta. U

prisustvu pentoza javlja se zelena boja. Zelenu boju daju i uronske kiseline, ali pri dužem zagrevanju. Aldoheksoze pri zagrevanju sa HCl daju hidrosimetilfurfural, a zatim levulinsku kiselinu. Ove supstance sa orcinolom daju mrke kondenzacione proizvode.

Reakcija sa difenilaminom

Deoksiriboza dehidracijom sa mineralnim kiselinama, preko furfurala, prelazi u δ -hidroksilevulinaldehid i srodna jedinjenja, koja se kondenzuju sa aromatičnim aminima, dajući proizvode intenzivno plave boje.

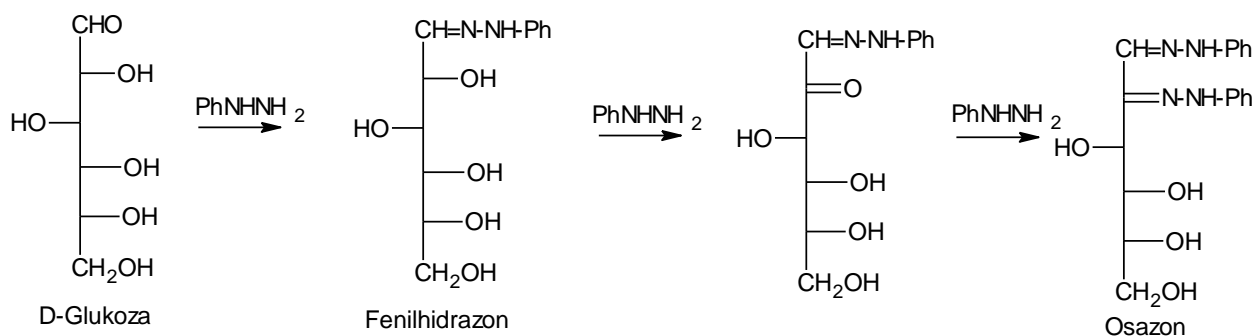


Postupak: Sipati 1 cm³ rastvora ispitivanog šećera u epruvetu i dodati 2 cm³ reagensa. Zagrevati reakcionu smešu 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Razvija se plava boja koja je postojana nekoliko sati.

| Reakcija | D-glukoza | D-fruktoza | Saharoza | Maltoza |
|---------------------------|-----------|------------|----------|---------|
| Molischova reakcija | | | | |
| Salivanova reakcija | | | | |
| Bialova reakcija | | | | |
| Reakcija sa difenilaminom | | | | |

Reakcija sa fenilhidrazinom

Monosaharidi u slabo kiselom rastvoru reaguju sa viškom fenilhidrazina gradeći fenilosazone, koji su nerastvorni u vodi i lako kristališu. Ovo je opšta reakcija za jedinjenja koja sadrže grupu $-\text{CHOHCHO}$, koja dejstvom tri mola fenilhidrazina grade 1,2-bis-hidrazone, trivijalno nazvane osazoni. U prvoj fazi reakcije dolazi do kondenzacije karbonilne grupe sa jednim molom fenilhidrazina. Drugi mol fenilhidrazina oksiduje hidroksilnu grupu na C_2 (kod aldoza), odnosno C_1 (kod ketoza) pri čemu se sam redukuje do anilina, dok se treći mol kondenzuje sa ovako nagrađenom karbonilnom grupom.



Postupak: Sipati u epruvetu 1 cm^3 rastvora šećera i dodati 3 cm^3 regensa (menzurom, nikako pipetom). Zagrevati epruvetu na ključalom vodenom kupatilu u toku pola sata, a zatim ostaviti da se hladi. Obratiti pažnju na oblik kristala koji se javlja kod različitih šećera i zapažanja zabeležiti.

| Rastvor šećera | Rezultat reakcije | Zapažanje |
|-------------------|-------------------|-----------|
| D-glukoza | | |
| D-fruktoza | | |
| Saharoza | | |
| Maltoza | | |

Reakcija skroba sa jodom

Reakcija skroba sa jodom je zasnovana na obrazovanju nepostojanog inkluzionog jedinjenja joda sa amilozom (linearna frakcija skroba).

Postupak: U 5 cm³ rastvora skroba dodati 2-3 kapi Lugolovog rastvora. Rastvor se boji intenzivno plavo. Sadržaj epruvete podeliti na tri dela. U prvu od njih dodati 2 cm³ 10% rastvora NaOH, a u drugu 2-3 cm³ etanola. Treću epruvetu zagrevati, a zatim ohladiti pod mlazom vode.

Opisati i objasniti promene u boji rastvora pri izvedenim ogledima.

Overa:

4. LIPIDI

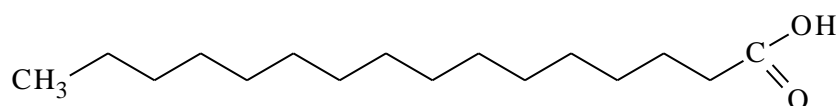
Lipidi su organska jedinjenja koja ulaze u sastav ćelija svih živih organizama. Lako se rastvaraju u nepolarnim organskim rastvaračima (etar, benzol, hloroform, toluol i dr.), dok se u polarnim rastvaračima ne rastvaraju (voda). Po hemijskom sastavu lipidi su prosti ili složeni estri viših masnih kiselina. Prosti lipidi se prema alkoholnoj komponenti dele na: gliceride (alkoholna komponenta je glicerol), voskove (estri viših monohidroksilnih alkohola) i steride (steroli). Složeni lipidi se razlikuju od prostih po tome što pored viših masnih kiselina i glicerola sadrže i druge komponente: fosfornu kiselinu, azotne baze, šećere, inozit i dr. Lipidi imaju višestruke funkcije u živim organizmima. Pojedini predstavnici ove grupe biomolekula učestvuju u izgradnji ćelijskih membrana, drugi predstavljaju rezervne oblike "metaboličkog goriva". S druge strane, neki od njih imaju zaštitnu ulogu ili, pak, ispoljavaju hormonsko ili vitaminsko dejstvo.

Lipidi koji se mogu saponifikovati

Zajednička osobina ovih lipida je da pri zagrevanju sa alkalijama daju soli masnih kiselina - sapune. Osnovni strukturni elementi ovih lipida su masne kiseline (MK). One se dele na zasićene i nezasićene masne kiseline.

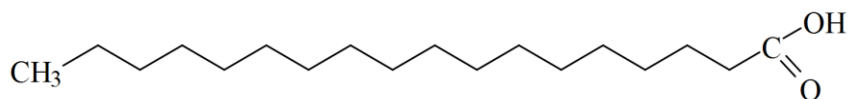
Od *zasićenih* masnih kiselina, u živim organizmima najviše su zastupljene:

1. Palmitinska kiselina (16:0); $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$, prisutna u rezervnim mastima:



Slika 19. Struktura palmitinske kiseline

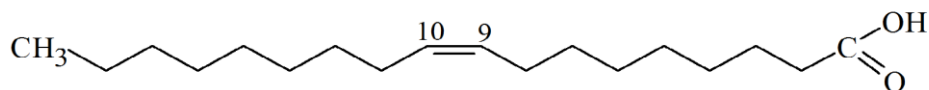
2. Stearinska kiselina (18:0); $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$, ulazi u sastav svih životinjskih masti, dok se u uljima retko sreće:



Slika 20. Struktura stearinske kiseline

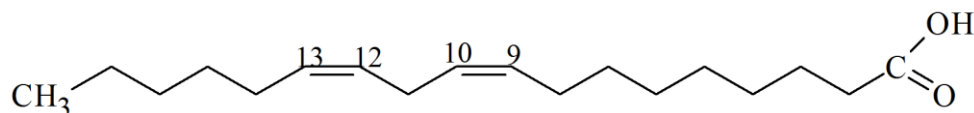
Od nezasićenih masnih kiselina najčešće se sreću:

1. Oleinska kiselina (18:1^{A9}) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, sa jednom dvostrukom vezom, zastupljena pretežno u uljima:



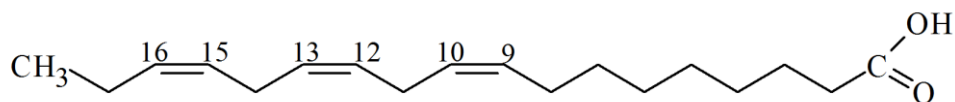
Slika 21. Struktura oleinske kiseline

2. Linolna kiselina (18:2^{A9,12}); $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, sa dve dvostruke veze, nalazi se u većoj količini u lanenom, suncokretovom i makovom ulju:



Slika 22. Struktura linolne kiseline

3. Linoleinska kiselina; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, sa tri dvostruke veze, nalazi se u lanenom, konopljinom i orahovom ulju:

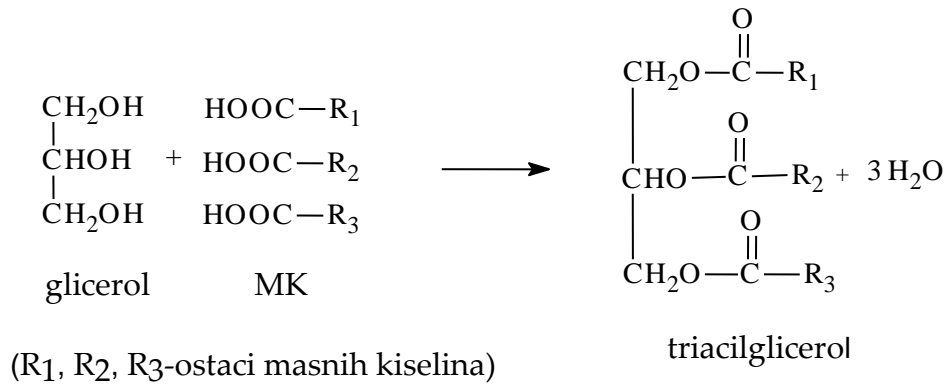


Slika 23. Struktura linoleinske kiseline

Lipidi koji se mogu saponifikovati mogu se svrstati u nekoliko grupa jedinjenja:

1. *Neutralne masti (acilgliceroli)*

Neutralne masti su estri masnih kiselina i trohidroksilnog alkohola glicerola. One su glavni oblik skladišnih lipida u biljnim i životinjskim ćelijama.



Acilgliceroli na sobnoj temperaturi ili pak na telesnoj temperaturi mogu biti u čvrstom ili tečnom stanju, što zavisi od prirode masnih kiselina iz kojih su nastali. Dužina (broj ugljenikovih atoma u lancu) i stepen nezasićenosti (broj dvostukih veza u molekulu) masnih kiselina određuje fizičke i hemijske osobine acilglicerola.

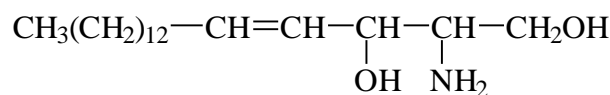
2. Fosfogliceridi

Fosfogliceridi su najvećim delom locirani u ćelijskim membranama. Kod ovih jedinjenja jedna od primarnih alkoholnih grupa glicerola je esterifikovana fosfornom kiselinom.

Najrasprostranjeniji fosfogliceridi u višim biljkama i životinjama su kefalini i lecitini.

3. Sfingolipidi

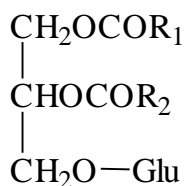
Sfingolipidi se nalaze u ćelijskim membranama životinja, a u velikim količinama su prisutni u moždanom i nervnom tkivu. Pri hidrolizi daju jedan molekul masne kiseline i jedan molekul nezasićenog aminoalkohola sfingozina ili njegovog analoga dihidrosfingozina. Ova klasa lipida ne sadrži glicerol.



Slika 24. Struktura sfingozina

4. Glikolipidi

Kao polarne glave ovi lipidi imaju hidrofilne ugljene hidrate, najčešće D-glukozu ili D-galaktozu, koji su glikozidno vezani za alkoholnu komponentu (glicerol).



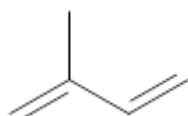
Slika 25. Opšta formula glikolipida; Glu – glukoza, R₁, R₂ – ostaci masnih kiselina

5. Voskovi

Voskovi predstavljaju estre viših masnih kiselina sa monohidroksilnim alkoholima dugog niza, a po strukturi i osobinama su bliski mastima. Najvažnija biološka uloga im je to što čine sastavnu komponentu prevlaka na koži.

Lipidi koji se ne mogu saponifikovati

U ovu grupu lipida se ubrajaju steroidi i terpenoidi. Ova jedinjenja imaju zajedničku strukturnu jedinicu - izopren, čijom polimerizacijom nastaju.

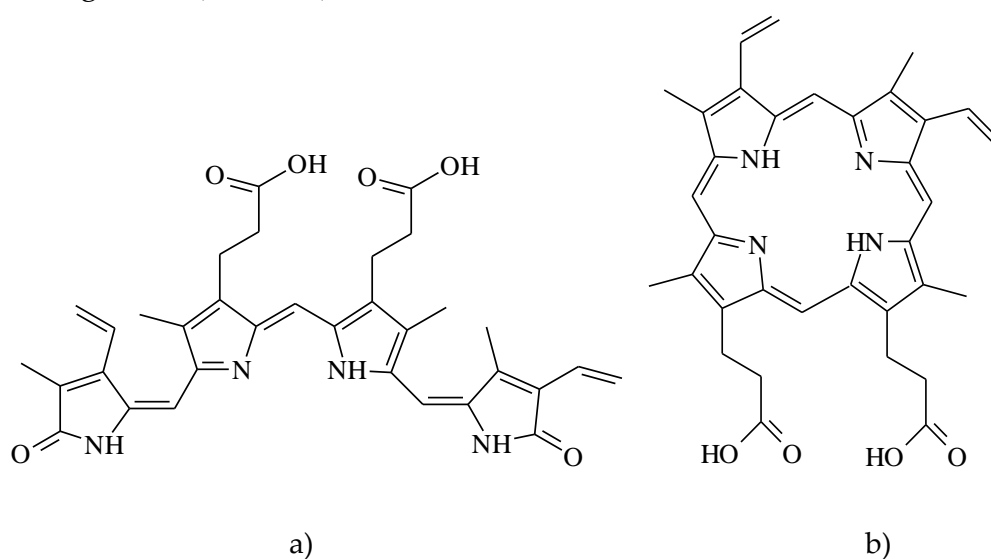


Slika 26. Struktura izoprena

4.1. Razdvajanje smeše lipida iz žumanceta metodom tankoslojne hromatografije

Kod većine ptica i gmizavaca *jaje* je zigot, rezultat oplodjenja jajne ćelije. Ono hrani i štiti embrion. Sastoji se iz neravne i hrapave ljuske, izgrađene iz CaCO_3 , unutrašnje i spoljašnje membrane izgrađene iz proteina keratina, vazdušne kapsule, belanceta, izgrađenog iz oko 40 vrsta proteina - glavnih sastojaka jajeta zajedno sa vodom, kalaize (končići od belanceta), i žumanceta sa njegovom membranom. Žumance sadrži manje vode i više proteina nego belance. Takođe sadrži još nešto lipida, sve liposolubilne vitamine (A, D, E i K), vitamine B₁ i B₂, zatim gvožđe, fosfor, kalcijum a izvor je i lecitina, efikasnog emulgatora. Takođe sadrži i masne kiseline - zasićene (palmitinska 23%, stearinska 4%, miristinska 1%) i nezasićene (oleinska 47%, linoleinska 16%, palmitoleinska 5%, linolenska 2%).

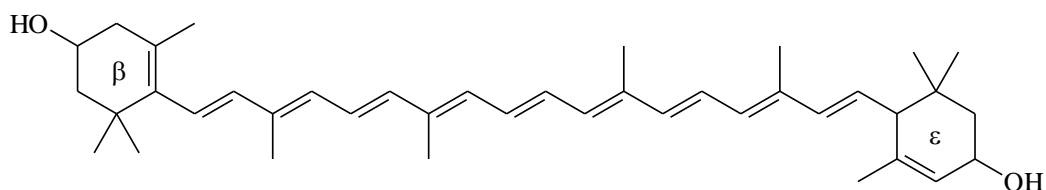
Boja ljuske jajeta potiče od pigmenata u spoljašnjem delu ljuske i može da varira kod različitih vrsta od bele do tamno braon. Osnovna boja jaja kičmenjaka je bela i potiče od CaCO_3 ali neke ptice polažu obojena jaja što je posledica prisustva pigmenata biliverdina i njegovog helata sa cinkom koji daju osnovnu zelenu ili plavu boju, i protoporfirina koji daje osnovnu crvenu ili braon boju jajeta ili je prisutan u vidu mrlja na ljusci. Imaju zaštitnu ulogu, štiteći jaja od predatora. Oba pigmenata su po hemijskoj strukturi tetrapiroli koji nastaju kao sporedni proizvodi razgradnje hemoglobina (*Slika 27*).



Slika 27. Strukture biliverdina (a) i protoporfirina (b)

Boja žumanceta zavisi od načina ishrane živine. Ukoliko živina konzumira hranu bogatu žuto-narandžastim biljnim pigmentima - ksantofilima - oni se skladište u žumancetu. Ksantofili (lutein, zeaksantin i α - i β - kriptoksantin) predstavljaju žute pigmente koji po hemijskoj strukturi pripadaju klasi karotenoida, derivata izoprenoida izgrađenih iz 8 izoprenskih jedinica. Njihova molekulska formula je $\text{C}_{40}\text{H}_{54}(\text{OH})_2$. Pronađeni su u lišću većine biljaka i sintetišu se u plastidima. Učestvuju

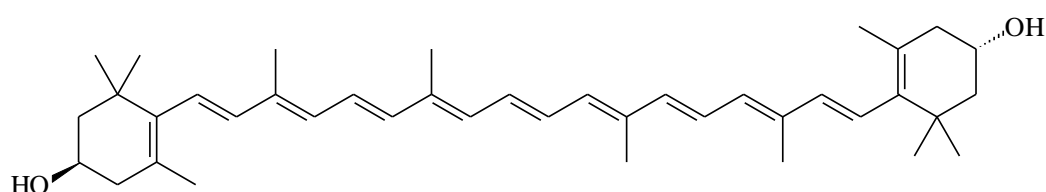
u procesu fotosinteze. U biljkama se ksantofili nalaze zajedno sa drugim pigmentima - karotenima, antocijaninima i retko, fikobilinima. Životinje ne mogu da sintetišu ksantofile već ih unose hranom biljnog porekla. Ksantofili predstavljaju oksidovane derivate karotena (sadrže -OH grupu) te su stoga polarniji od karotena.



Slika 28. Struktura luteina

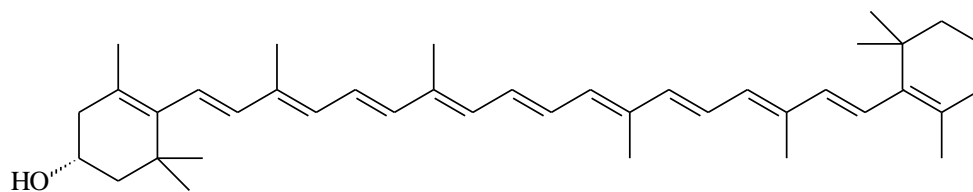
Lutein je jedan od 600 poznatih ksantofila koji se mogu pronaći u prirodi. U organizmima ima ulogu antioksidansa. Lipofilne je prirode. Prisustvo hromofora, u vidu dugog polienskog lanca (*Slika 28*) ukazuje na sposobnost molekula da apsorbuje svetlost. Polienski lanac je osetljiv na oksidativnu degradaciju pod uticajem svetlosti i visoke temperature. Lutein apsorbuje plavu svetlost i kao takav ima komplementarnu žutu boju u niskim koncentracijama, a narandžasto-crvenu u visokim koncentracijama. Hrana bogata ovim pigmentom daje se živini kako bi se postigla karakteristična žuta boja kože i žumanca jajeta. Takođe se nalazi u makuli, malom delu mrežnjače odgovorne za centralni vid. Smatra se da štiti od oksidativnog stresa i svetlosti visoke energije.

Zeaksantin je 3,3'-derivat β-karotena, nastaje hidroksilacijom β-jononskih prstenova β-karotena. Zeaksantin je osnovni pigment zrna žutog kukuruza a nalazi se i u žumancetu i šafranu. Lutein i zeaksantin su strukturalni izomeri, jedina razlika je u položaju dvostruke veze u prstenovima na kraju molekula (*Slika 29*).



Slika 29. Struktura zeaksantina

Kriptoksantin je prirodni karotenoidni pigment koji se može izolovati iz različitih namirnica kao što su narandže, papaja, žumance, maslac i goveđi krvni serum. Strukturno, jako je sličan β-karotenu sa dodatkom hidroksilne (-OH) grupe (*Slika 30*). U ljudskom organizmu se pretvara u vitamin A (retinol). Kriptoksantin je jedan od karotenoidnih antioksidanata i može pomoći u sprečavanju slobodno-radikalnih oštećenja ćelije i DNK.



Slika 30. Struktura kriptoksantina

Hromatografija

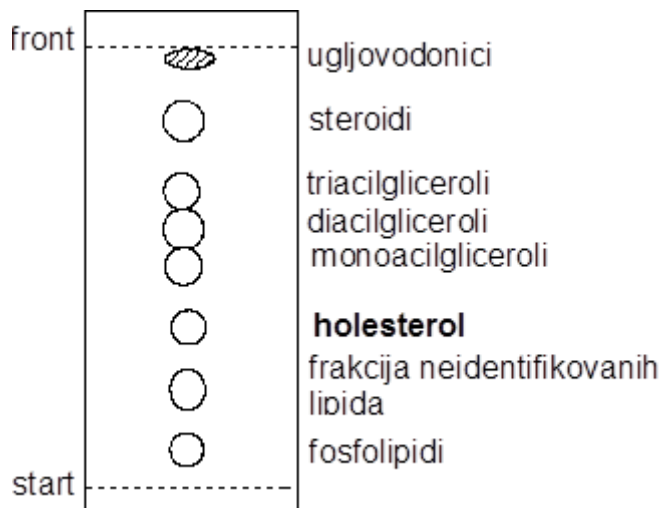
Hromatografija predstavlja grupu metoda za razdvajanje komponenti iz smeše, pri čemu se razdvajanje odvija na bazi različitih fizičkih i hemijskih procesa. Komponente uzorka se pri tome raspodeljuju između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze.

Hromatografija u tankom sloju spada u grupu hromatografskih metoda gde se adsorbens (stacionarna faza) nanosi u vidu tankog sloja na staklenu ili aluminijumsku ploču. U zavisnosti od vrste uzorka i komponenti koje se žele razdvojiti postoje različite vrste adsorbensa. Na pripremljenu ploču se tankom staklenom cevčicom, kapilalom, nanosi rastvor smeše koju treba razdvojiti na sastavne komponente. Ploča se uspravno postavlja u hromatografsku kadu u kojoj se nalazi rastvarač (ili smeša rastvarača) za razvijanje hromatograma. Rastvarač se, pod dejstvom kapilarnih sila, penje uz sloj adsorbensa. Svojim kretanjem on nosi sastojke smeše različitim brzinama, u zavisnosti od njihove mobilnosti i afiniteta prema adsorbensu.

R_f vrednost predstavlja odnos pređenog puta svake određene komponente smeše i upotrebljenog rastvarača i konstantna je vrednost za konstantne uslove.

$$R_f = \frac{a}{b} \leq 1$$

a a – pređeni put ispitivane komponente smeše (cm)
 b b – pređeni put rastvarača (cm)



Slika 31. Hromatogram žumanceta jajeta

Postupak: Pripremljeno žumance razmazati u što tanjem sloju na staklenu ploču i osušiti u struji toplog vazduha. Skinuti osušeno žumance špatulom i preneti ga u pripremljeni suvi erlenmajer. Dodati 10 cm³ anhidrovanog acetona i erlenmajer intenzivno mućkati u toku 5 minuta. Ovaj ekstrakt lipida i pigmenata procediti preko naborane filter hartije u petrijevu posudu, a talog ponovo ekstrahovati sa 10 cm³ acetona. Ponovo procediti i spojene acetonske ekstrakte upariti na manju zapreminu da bi se dobio koncentovaniji rastvor i metodom tankoslojne hromatografije odrediti sastav smeše.

Kao razvijajući (mobilnu fazu) upotrebiti smešu: heksan-dietiletar-glacijalna sirćetna kiselina (73:25:2). Hromatografija se izvodi u kadi sa brušenim poklopcem, koja je iznutra obložena filter papirom.

Kada se front razvijajuća popne na $\frac{3}{4}$ ploče, izvaditi ploču iz hromatografske kade, označiti liniju fronta i osušiti u struji toplog vazduha. Osušeni sloj isprskati u kapeli sa rastvorom fosfomolibdenske kiseline i ploču zagrevati u sušnici na 80-100° C do pojave plavih mrlja.

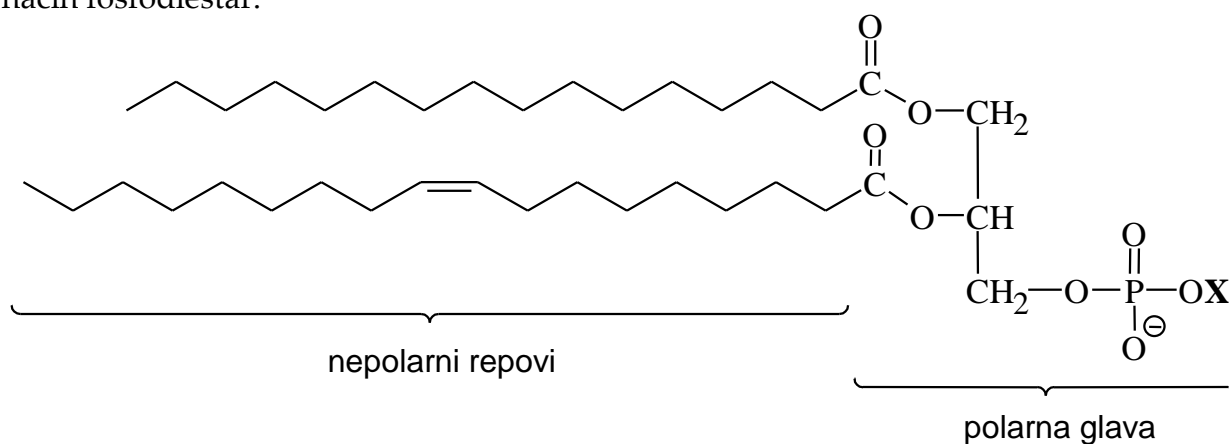
Skicirati izgled hromatografske kade i ploče i odrediti R_f vrednost za holesterol.

| |
|--|
| |
|--|

| |
|---------------|
| Overa: |
|---------------|

4.2. Izolovanje lecitina iz žumanceta i kvalitativne reakcije na njega

Fosfogliceridi su lipidi koji se uglavnom nalaze u ćelijskim membranama, a manji deo ima ulogu skladišnih lipida. Alkoholna komponenta ovih jedinjenja je glicerolfosforna kiselina (umesto glicerola), jer je jedna od primarnih hidroksilnih grupa glicerola esterifikovana sa fosfornom kiselinom. Pored dva ostatka viših masnih kiselina estarski vezanih za hidroksilne grupe glicerola u položajima C₁ i C₂, većina fosfoglicerida sadrži još jednu alkoholnu komponentu (X) čija je OH grupa esterifikovana sa jednom od preostalih OH grupa fosforne kiseline gradeći na taj način fosfodiestar.

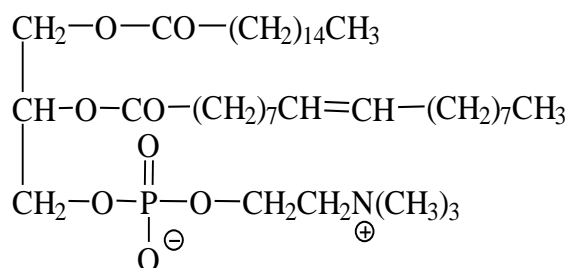


Slika 32. Struktura fosfodiestra

Različite vrste fosfolipida određene su u najvećoj meri prirodom supstituenta X tj. alkoholne komponente sekundarno esterifikovane sa fosfornom kiselinom. Alkoholna komponenta može biti:

| Alkoholna komponenta: | Naziv fosfoglicerida: |
|--|--------------------------------|
| etanolamin H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -OH | fosfatidiletanolamin (kefalin) |
| holin (CH ₃) ₃ N-CH ₂ -CH ₂ -OH | fosfatidilholin (lecitin) |
| serin NH ₂ -CH(COOH)-CH ₂ -OH | fosfatidilserin |

Najrasprostranjeniji fosfolipidi životinja su iz grupe lecitina i kefalina. Oni su metabolički vezani jedan za drugog takođe i sa fosfatidilserinom koji se smatra njihovim metaboličkim prekursorom. Oni su glavni lipidni sastojci većine membrana animalnih ćelija.



Slika 33. Struktura lecitina

Postupak: Dobijeni acetonski ekstrakt žumanceta (videti postupak iz prethodne vežbe) odbaciti, a ostatak žumanceta ekstrahovati sa 10 cm³ hloroforma u toku 10 minuta, pri čemu se u najvećoj meri ekstrahuju fosfolipidi. Preko naborane filter hartije sadržaj erlenmajera procediti u petrijevu posudu i upariti do suva u struji toplog vazduha. Ekstrakt hloroforma sadrži najviše lecitina, te se stoga može smatrati sirovim preparatom lecitina.

Svi lecitini (a poznato ih je više od 80) daju karakteristične kvalitativne reakcije, zasnovane na njihovoj nerastvorljivosti u acetonu, sposobnosti da sa vodom grade emulzije i osobini da se kadmijumhloridom grade komplekse.

Jednu trećinu preparata sirovog lecitina preneti u epruvetu i rastvoriti ga sa 6 cm³ toplog etanola. Ukoliko rastvor nije bistar, procediti ga preko filter hartije i podeliti u tri epruvete:

- U prvu epruvetu dodati 1-2 cm³ acetona i snažno promućkati,
- U drugu epruvetu dodati nekoliko kapi destilovane vode i promućkati,
- U treću epruvetu dodati 1-2 cm³ rastvora CdCl₂.

Registrovati promene i zabeležiti zapažanja.

Overa:

4.3. Izolovanje holesterola iz svinjskog mozga

Holesterol je steroidni sekundarni alkohol, koji se nalazi u tkivima i biološkim tečnostima čoveka i životinja, u slobodnom ili esterifikovanom obliku (estar palmitinske, stearinske ili oleinske kiseline). Nervna tkiva su naročito bogata holesterolom (20-30 g/kg tkiva). Najveća koncentracija holesterola (40-55 g/kg) je u beloju moždanoj masi i kičmenoj moždini, tako da se ovaj materijal i upotrebljava za preparativno dobijanje holesterola.

Holesterol se iz biološkog materijala ekstrahuje sa hloroformom, toplim etanolom, etrom, acetonom i drugim organskim (nepolarnim) rastvaračima. Iz osušenog svinjskog mozga holesterol se najlakše izoluje acetonom, pri čemu se fosfolipidi ne ekstrahuju.

Kvalitativno se holesterol dokazuje bojenim reakcijama (Huppert-Salkowsky reakcijom i Burchard-Liebermannovom reakcijom), pri čemu obojeni produkti holesterola nastaju njegovom dehidratacijom mineralnim kiselinama.

Postupak: Odmeriti 1 g svežeg svinjskog mozga u porcelanski avan, dodati na vrh špatule kvarcnog peska i smešu homogenizovati u toku 5 minuta. U homogenizovanu smešu dodati oko 3 g gipsa, brzo izmešati i naneti špatulom u tankom sloju na pripremljenu staklenu ploču. Ploču staviti u sušnicu zagrejanu na 75-80° C i ostaviti da se osuši. Osušenu smešu skinuti špatulom sa ploče i preneti u suv erlenmajer. Suvi materijal preliti sa 10 cm³ acetona i smešu mučkati u toku 10 minuta. Suspenziju procediti preko filter hartije i talog ponovo vratiti u erlenmajer i još dva puta ekstrahovati acetonom na opisan način. Spojene acetonske ekstrakte preneti u izmerenu petrijevu posudu i upariti aceton u struji toplog vazduha. Izračunati prinos dobijenog holesterola.

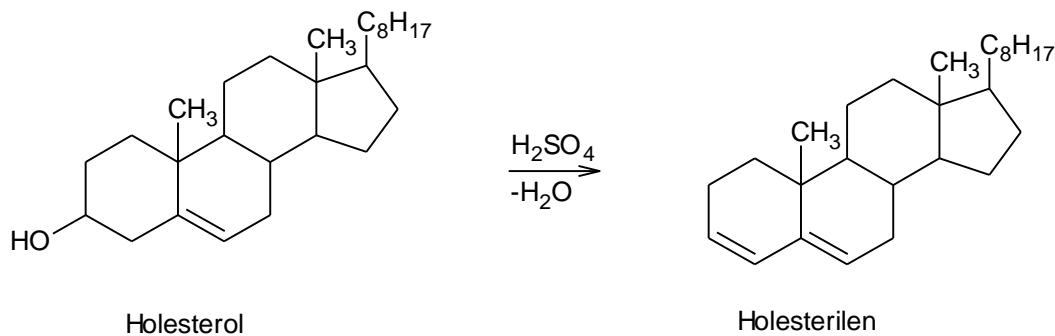
Rezultat

Masa holesterola:

Prinos:

Sa dobijenim preparatom izvesti sledeće bojene reakcije:

Salkowskyjeva reakcija se bazira na dehidrataciji holesterola sa koncentrovanom sumpornom kiselinom, pri čemu nastaje crveno obojeni dehidratacioni proizvod.



Postupak: U suhu epruvetu staviti malo kristala holesterola (dobijenih u prethodnom postupku), dodati 1 cm³ hloroforma, 1 cm³ koncentrovane sumporne kiseline i sadržaj epruvete energično mućkati u toku nekoliko minuta. Hloroformski sloj obojiće se crveno, a donji sloj sumporne kiseline žuto. Stajanjem žuti ekstrakt sumporne kiseline pokazivaće žuto-zelenu fluorescenciju.

Burchard-Liebermannova reakcija se bazira na dehidraciji holesterola nakon čega dolazi do reakcije dva dehidratirana molekula pri čemu nastaje bisholestadien. Praktični značaj ove reakcije je u tome što ona čini osnovu za kolorimetrijska određivanja koncentracije holesterola u biološkom materijalu.

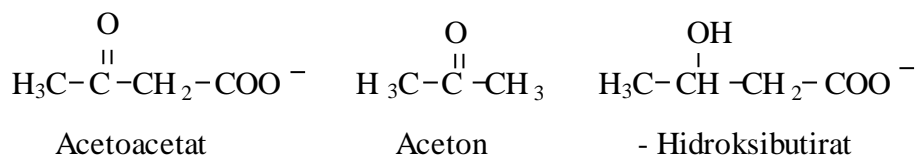
Postupak: U suhu epruvetu staviti malo dobijenih preparata holesterola i rastvoriti u 2 cm³ hloroforma. U rastvor dodati 2 kapi anhidrida sirćetne kiseline i 2-3 kapi koncentrovane sumporne kiseline, pri čemu će se rastvor obojiti prvo ružičasto, zatim ljubičasto i na kraju plavo-zeleno.

Zapažanje

Overa:

4.4. Ketonska tela

Pod izvesnim metaboličkim uslovima, koji su udruženi sa velikom brzinom oksidacije masnih kiselina, jetra proizvodi značajne količine acetoacetata i β -hidroksibutirata koji difuzijom prelaze u krv. Acetoacetat se spontano dekarboksiluje, dajući aceton. Ove tri supstance su poznate kao ketonska tela (*Slika 34*).



Slika 34. Strukture ketonskih tela

Normalno, ketonska tela su prisutna u krvi (kod čoveka oko 1 mg/100 ml), ali ne i u urinu. Povišenje nivoa ketonskih tela u krvi se javlja pri smanjenom unošenju ugljenih hidrata ili pri nemogućnosti njihovog iskorištavanja u organizmu (nedostatak insulina – Diabetes melitus). Ako se stvoreni acetoacetat ne iskoristi od strane ekstrahepatičnih tkiva (pre svega skeletnih mišića i srca) nastaće ketoza. Ketozu karakterišu: ketonemija (povećana koncentracija ketonskih tela u krvi), ketonurija (prisustvo ketonskih tela u urinu) i miris acetona u izdahnutom vazduhu.

Za dokazivanje ketonskih tela u urinu koristi se Legalova reakcija. U ovoj reakciji divalentno gvožđe, Fe^{2+} , iz natrijumnitroprusida, u prisustvu ketonskih tela se oksiduje i prelazi u Fe^{3+} oblik. Ova promena se registruje pojavom crvene boje.

Postupak: Na 5 cm³ urina dodati 0,5 cm³ natrijumnitroprusida, promućkati i niz zid epruvete pažljivo dodati 0,5 cm³ 10% rastvora NaOH (bez mućkanja!). Na dodirnoj površini se javlja crveni prsten u prisustvu ketonskih tela.

Napomena: S obzirom da istu reakciju daje i kreatinin, sadržaj epruvete se promućka a zatim podeli u dve epruvete. Jedna epruveta ostaje kao kontrola, a u drugu se doda par kapi glacijalne sirćetne kiseline. Ako se boja pojača prisutna su ketonska tela, a ako se izgubi nastala je samo zbog prisustva kreatinina.

Zaključak

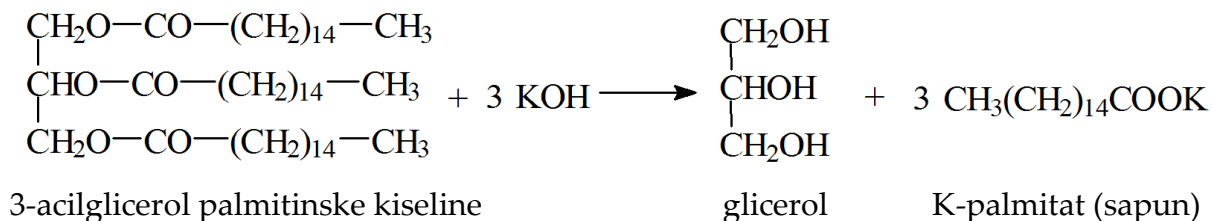
Overa:

4.5. Određivanje saponifikacionog i jodnog broja

a) Određivanje saponifikacionog broja (SB)

Saponifikacioni broj (SB) se može definisati kao broj mg KOH potrebnih za saponifikaciju 1 g masti ili ulja, tj. za neutralizaciju kako slobodnih, tako i estarski vezanih masnih kiselina u 1 g ulja ili masti. Veličina saponifikacionog broja zavisi od molekulske mase masnih kiselina prisutnih u uzorku.

Mehanizam alkalne hidrolize, tj. saponifikacije masti prikazan je reakcijom:



Postupak: odpipetirati 2 cm³ ulja u erlenmajer od 250 cm³, dodati 25 cm³ alkoholnog rastvora KOH i zagrevati reakcionu smešu dok se ne izbistri (oko 20 minuta na 70° C). Bistra reakciona smeša pokazuje da je saponifikacija završena. Reakcionu smešu ohladiti, a višak alkalija titrisati sa 0,5 mol/dm³ rastvorom HCl, uz fenolftalein kao indikator (2 kapi), do obezbojenja. Istovremeno uraditi, po istom postupku, i slepu probu, bez uzimanja ulja – umesto toga odpipetirati 2 cm³ destilovane vode.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{SB} = \frac{(a - b) \times 28,05}{g}$$

a – broj cm³ HCl utrošenih za slepu probu,

b – broj cm³ HCl utrošenih za radnu probu,

g – masa uzorka,

28,05 – faktor preračunavanja (titar 0,5 mol/dm³ KOH)

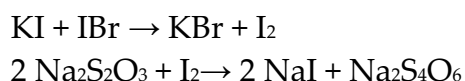
$m = \rho \times V$, gde je $\rho = 0,92 \text{ g/ml}$

$g = 0,92 \text{ g/ml} \times 2 \text{ ml} = 1,84 \text{ g}$

Rezultat:

b) Određivanje jodnog broja (JB)

Jodni broj (JB) je broj grama joda koji se adira na 100 g masti ili ulja. Brzina adicije joda zavisi od strukture nezasićenih masnih kiselina. Adicija joda će biti brža ukoliko je dvostruka veza udaljenija od karboksilne grupe. Jod se izrazito sporo adira na masne kiseline koje sadrže konjugovane dvostruke veze. Vrednost jodnog broja ukazuje na stepen nezasićenosti masti ili ulja, a određuje se Hanušovom metodom. Po ovoj metodi jod za adiciju se dodaje u obliku jodmonobromida (IBr) u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Višak IBr se određuje pomoću KI, pri čemu se oslobađa jod koji se titriše standardnim rastvorom natrijumsulfata, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$:



Postupak: Odmeriti 0,2 cm³ ulja u erlenmajer i dodati 7,5 cm³ hloroforma da se ulje rastvori. Smeši dodati 12,5 cm³ Hanušovog reagensa i ostaviti na tamnom mestu 15 minuta. U isto vreme postaviti i slepu probu bez dodatka ulja. Posle toga u oba erlenmajera dodati 7,5 cm³ KI i 100 cm³ destilovane vode. Oslobođeni jod titrisati sa natrijumsulfatom. Kada rastvor postane svetlo mrk dodati nekoliko kapi rastvora skroba i nastaviti titraciju dok ne iščezne plava boja inluzionog jedinjenja joda i skroba.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{JB} = \frac{(a - b) \times 1,27}{g}$$

a – broj cm³ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošenih za titraciju slepe probe,

b – broj cm³ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošenih titraciju radne probe,

g – masa uzorka,

1,27 – faktor preračunavanja (titar 0,5 mol/dm³ KOH)

$$m = \rho \times V, \quad \text{gde je } \rho = 0,92 \text{ g/ml}$$

$$g = 0,92 \text{ g/ml} \times 0,2 \text{ ml} = 0,184 \text{ g}$$

Rezultat:

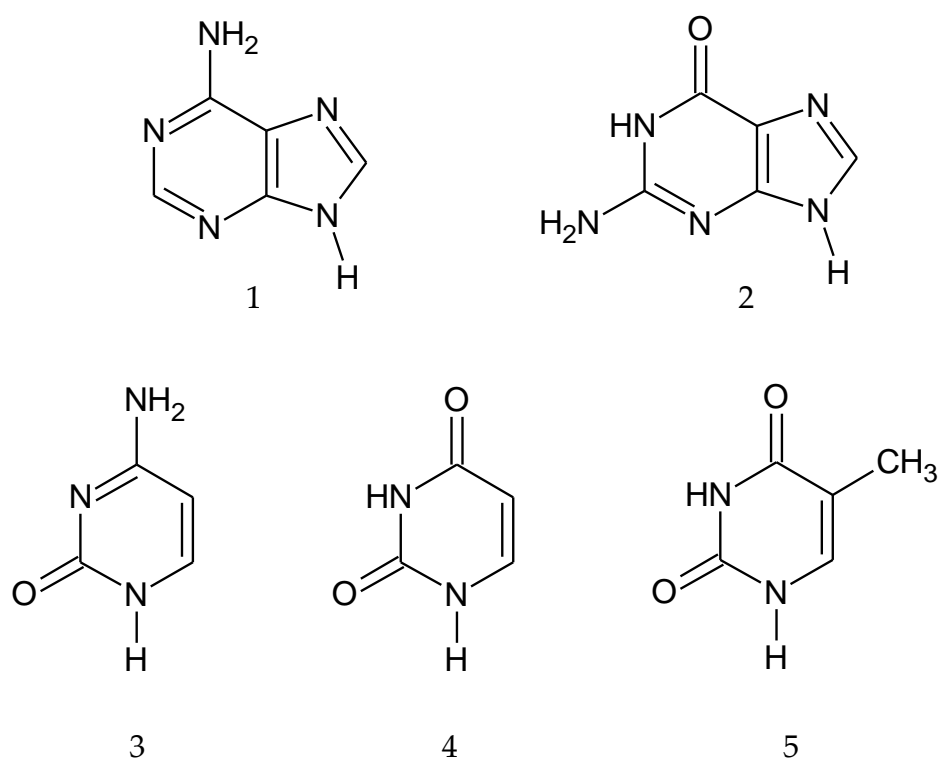
Overa:

5. NUKLEINSKE KISELINE

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA ili DNK) i ribonukleinska kiselina (RNA ili RNK) su osnovni ćelijski biomolekuli, koji su od presudno značaja u čuvanju i transferu genetskih informacija. Po hemijskom sastavu nukleinske kiseline su linearni polimeri monomera, nukleotida, međusobno povezanih 3'-5' fosfodiastarskim vezama.

Nukleotidi su fosfatni estri pentoza koje su C-N glikozidnom vezom povezane sa azotnim bazama. Kod ribonukleotida šećerna komponenta je D-riboza, a kod deoksiribonukleotida 2'-deoksi-D-riboza. Hidrolizom nukleotida se dobijaju nukleozidi, sastavljeni od azotnih baza i odgovarajućeg monosaharida: D-riboze i 2'-deoksi-D-riboze.

Azotne baze u strukturi nukleotida su planarni, aromatični, heterociklični molekuli, derivati purina i pirimidina (*Slika 35*).



Slika 35. Strukture nukleinskih kiselina. Derivati purina: 1- adenin, 2- guanin. Derivati pirimidina: 3- citozin, 4- uracil, 5- timin

5.1. Izolovanje deoksiribonukleinskih kiselina iz svinjske jetre

Deoksiribonukleinske kiseline (DNA) su polinukleotidi u kojima su osnovne jedinice četiri različita tipa deoksiribonukleotida (dAMP, dGMP, dTMP i dCMP) međusobno vezanim različitim redosledom 3'-5' fosfodiesterarskim vezama. Molekuli DNA se obično sastoje od dva polideoksiribonukleotidna lanca međusobno povezana vodoničnim vezama između komplementarnih parova baza i uvijenih u obliku dvostruke spirale. DNA se nalaze u svim ćelijama organizma (izuzev u eritrocitima) kao proteinski kompleksi tj. deoksiribonukleoproteini. Kao najčešći izvori za izolovanje DNA koriste se slezina, timus, tiroidna žlezda i jetra.

Watson-Crickov model molekula DNA (B-oblik) je desno orijentisana dvostruka spirala koja u jednom namotaju sadrži 10 parova baza. Smanjenjem relativne vlažnosti B-oblik može da pređe u A-oblik, takođe desno orijentisan, koji sadrži 11 parova baza u jednom namotaju. Dva lanca su antiparalelna i prostiru se u 5'-3', odnosno 3'-5' pravcu. Kada se rastvor DNA zagreva, na određenoj temperaturi nativna struktura molekula se narušava tj. dolazi do odvijanja dva komplementarna lanca koji potom zauzimaju neuređene konformacije. Ova pojava je poznata kao denaturacija molekula DNA i može se pratiti promenama različitih fizičko-hemijskih osobina.

Molekuli DNA vrlo lako denaturišu, tako da eksperimentalni uslovi prilikom njihovog izolovanja iz tkiva moraju biti strogo kontrolisani. Takođe ćelije nekih tkiva sadrže mnogo deoksiribonukleaza, tako da se prilikom izolovanja DNA razlaže na manje fragmente.

Deoksiribonukleoproteidi su rastvorni u vodi i rastvorima visoke koncentracije neutralnih soli (2 mol/dm³), ali su nerastvorni u rastvorima niske koncentracije soli (0,04-0,25 mol/dm³). Zbog toga se tkiva homogenizuju u rastvoru NaCl c=0,14 mol/dm³ puferizovanog rastvorom natrijumcitrata na pH 7. Pri tim eksperimentalnim uslovima većina drugih biomolekula prelazi u rastvor, dok u talogu ostaju nerastvorni deoksiribonukleoproteidi, koji se kasnije rastvaraju u rastvoru NaCl koncentracije 2 mol/dm³. Natrijumcitat inhibira aktivnost deoksiribonukleaze pošto vezuje Ca²⁺ i Mg²⁺ jone, koji su kofaktori ovog enzima.

Postupak: Homogenizovati 50 g sveže jetre u toku 1 minuta sa 200 cm³ puferisanog rastvora NaCl. Suspenziju potom centrifugirati 15 minuta pri 3500 o/min i dobijeni talog homogenizovati sa još 200 cm³ rastvora NaCl. Supernatant odbaciti, a talog suspendovati u rastvoru NaCl (c=2 mol/dm³) tako da konačna zapremina iznosi 1 dm³.

Ostaviti suspenziju preko noći na hladnom, a zatim centrifugirati pri 3500 o/min 15 minuta. Odvojiti supernatant i polako, uz mešanje, sipati u dvostruku zapreminu ohlađenog etanola. Rastvor mešati štapićem, pri čemu se na štapić namotavaju niti DNA. Fibrile pažljivo odvojiti, isprati ih hladnim etanolom, rastvoriti u puferisanom rastvoru NaCl i rastvor čuvati duboko zamrznut.

Za izolovane DNA dokazna reakcija se zasniva na osobini deoksiriboze, konstitutivne jedinice DNA, da dehidratacijom sa mineralnim kiselinama, preko furfurala, prelazi u δ -hidroksilevulinaldehid i srodna jedinjenja, koja se kondenzuju sa aromatičnim aminima, dajući proizvode intenzivno plave boje.

U epruvetu dodati malo izolovane DNA i 2 cm³ difenilaminskog reagensa. Reakcionu smešu zagrevati 10 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Javlja se plava boja rastvora koja je postojana nekoliko sati.

Zapažanja

Overa:

5.2. Izolovanje ribonukleinskih kiselina iz ćelija kvasca

Ribonukleinske kiseline (RNA), za razliku od deoksiribonukleinskih kiselina, sastoje se od samo jednog polinukleotidnog lanca. U ćelijama postoje tri glavne vrste RNA: informaciona RNA (i-RNA), ribozomalna RNA (r-RNA) i transportna RNA (t-RNA). Svaka od njih se nalazi u više različitih molekulskih oblika.

Ćelije kvasca su veoma bogate ovim ribonukleinskim kiselinama, tako da često služe kao izvori istih. Ukupne ribonukleinske kiseline iz ćelija kvasca se dobijaju ekstrakcijom iz vodene suspenzije celih ćelija pomoću fenola. Koncentrovani rastvor fenola raskida vodonične veze u makromolekulima izazivajući denaturaciju proteina. Dobijena zamućena suspenzija se centrifugira na sobnoj temperaturi da bi se odvojile dve faze: gornja vodena i donja fenolna faza. Gornja bistra vodena faza sadrži rastvorne RNA, polisaharide, nukleotide, aminokiseline i tragove denaturisanih proteina. Donja fenolna faza sadrži koagulisane denaturisane proteine i DNA koje su asosovane sa tim proteinima. Pipetom se odvoji vodena faza koja sadrži RNA, koja se potom iz rastvora istaloži etanolom (u rastvoru ostaju mali biomolekuli).

Postupak: U erlenmajeru od 250 cm³ suspendovati 2 g osušenog kvasca u 20 cm³ destilovane vode prethodno zagrejane na 37° C. Suspenziju ostaviti 15 minuta na vodenom kupatilu (37° C), a zatim lagano dodati 20 cm³ fenola zasićenog sa vodom. Suspenziju mućkati 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirati 15 minuta na 3000 o/min. Odvojenu vodenu fazu koja sadrži RNA pažljivo odpipetirati Pasterovom pipetom u čašu, koja se nalazi u ledenom kupatilu. Vodenom rastvoru dodati rastvor natrijumacetata do 2% krajnje koncentracije, a RNA istaložiti dodavanjem dve i po zapremine ohlađenog etanola. Rastvor ostaviti 1 sat na ledu ili na -20° C. Dobijeni talog odvojiti centrifugiranjem u toku 5 minuta pri 3000 o/min. Talog oprati rastvorom etanol-voda (3:1), prethodno ohlađenim na 4° C, ponovo centrifugirati i dobijeni talog (RNA) oprati etrom i osušiti na vazduhu.

Izračunati prinos dobijene RNA

Overa asistenta:

6. HORMONI

Hormoni su biološki aktivna organska jedinjenja, koja su proizvodi specijalizovanih žlezda ili žlezda sa unutrašnjim lučenjem (endokrine žlezde). Regulacija lučenja hormona je kontrolisana od strane centralnog nervnog sistema. Hormoni putem krvi, odnosno telesnih tečnosti ili humora, prenose poruke ciljnim organima ili tkivima na koje deluju preko specifičnih receptora. Hemijska struktura hormona je vrlo raznolika i mogu se podeliti na sledeće grupe:

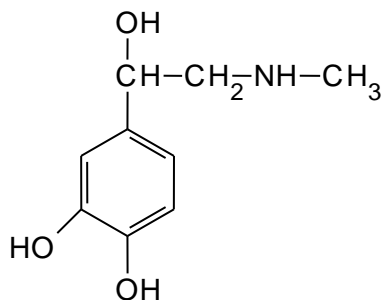
- Steroidni hormoni: kortikoidni, androgeni, estrogeni;
- Aminokiselinski hormoni: tiroksin, trijodtironin, adrenalin, noradrenalin;
- Peptidni hormoni: kortikotropin, vazopresin, melanotropin, kalcitonin, insulin, glukagon;
- Proteinski hormoni: somotropin, tiotropin, lutopin.

Hormoni se obično nalaze u krvi u veoma malim koncentracijama (10^{-6} do 10^{-12} mol/l). Prva faza hormonske aktivnosti je njihovo vezivanje za hormonske receptore koji su lokalizovani na površini ćelije ili u citosolu ciljane ćelije. Oni mogu podleći različitim promenama i proizvoditi intraćelijske glasnike, koji zatim prenose signale od receptora na enzime ili molekularne sisteme u ćeliji. Intraćelijski glasnici regulišu specifične enzimske reakcije, inaktiviraju gene ili vrše njihovu ekspresiju.

Hormoni imaju veći broj funkcija: pomažu održavanje homeostaze – bilansa biološke aktivnosti u organizmu, posreduju u odgovoru na spoljne stimulanse, imaju ulogu u rastu i razviću i nizu drugih biohemijsko-fizioloških procesa.

6.1. Određivanje sadržaja adrenalina

Adrenalin se sintetizuje u srži nadbubrežne žlezde i deluje kao regulator metabolizma. On se oslobađa iz depoa u srži nadbubrežne žlezde kao odgovor na stres, napor, hladnoću i nizak nivo glukoze u krvi, povećavajući razgradnju triacilglicerola i glikogena. Adrenalin se ponaša i kao stimulator metabolizma proteina kao i nekih jedinjenja kalcijuma i fosfora. Po hemijskoj prirodi adrenalin je 1-(3,4-dihidroksifenil)-2-(metilamino)-etanol:



Slika 36. Struktura adrenalina

Sadržaj adrenalina se određuje spektrofotometrijski zahvaljujući njegovoj sposobnosti da sa raznim reagensima gradi obojena jedinjenja. Jedna od najčešćih metoda bazira se na reakciji adrenalina sa Follinovima reagensom, pri čemu nastali obojeni kompleks ima maksimum absorpcije na 512 nm.

Postupak: Za analizu odmeriti 1 g mišićnog tkiva, homogenizovati ga sa kvarcnim peskom u avanu sa tučkom i dodati 10 cm³ trihlorsirćetne kiseline. Homogenat prebaciti u kivetu i centrifugirati 10 minuta na 3500 o/min. U dve epruvete odpipetirati po 0,5 cm³ supernatanta, a u treću dodati 0,5 cm³ standardnog rastvora adrenalina. Epruvete ohladiti u toku 5 minuta na 15° C, a potom dodati reagense prema *Tabeli 8*:

Tabela 8. Zapremine reagenasa

| Epruveta | NaHCO ₃ | NaOH |
|----------|---------------------|----------------------|
| 1. | 0,5 cm ³ | - |
| 2. | 0,5 cm ³ | 0,75 cm ³ |
| 3. | 0,5 cm ³ | - |

Epruvete ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi, zatim u sve tri epruvete odpipetirati po 0,25 cm³ Follinovog reagensa, a u epruvete 1 i 3 po 0,75 cm³ NaOH. Promućkati i nakon dva minuta izmeriti apsorbanciju na 512 nm.

Sadržaj adrenalina se izračunava prema sledećem obrascu:

$$C_p = \frac{E_{st} \times C_{st}}{E_p} \times 200$$

C_p – koncentracija adrenalina u uzorku (mg/100 g)
 E_{st} – ekstinkcija standarda (epruveta 3)
 E_p – razlika ekstinkcija epruveta 1 i 2
 C_{st} – koncentracija standardnog rastvora adrenalina

Napomena: Askorbinsku kiselinu, cistein i deo glutationa razara NaHCO_3 , a smeša NaHCO_3 i NaOH u drugoj epruveti razara adrenalin, askorbinsku kiselinu i cistein.

Rezultat

$E_1 =$

$E_2 =$

$E_{st} =$

$C_p =$

Overa:

7. VITAMINI

Vitamini su organska jedinjenja različite strukture, neophodna za život i razviće čoveka i životinja. Sintetizuju ih biljke i mikroorganizmi, a ponekad nastaju i u životinjskim ćelijama. U organizam čoveka i životinja vitamini dospevaju mahom putem hrane. Nedostatak ili nedovoljna količina vitamina u ishrani čoveka i životinja dovodi do određenih poremećaja metabolizma, karakterističnih za svaki vitamin, koje karakteriše zajednički naziv avitaminoza.

Neki vitamini su sastavni delovi enzimskih sistema; tako npr. nikotinamid ulazi u sastav koenzima I (NAD) i koenzima II (NADP), riboflavin u sastav FAD-a, pantotenska kiselina u sastav koenzima A, itd. Nekada su nazivi vitamina bili obeleženi velikim slovima abecede, što se do danas zadržalo, dok je danas nomenklatura vitamina izvedena iz njihove hemijske strukture.

Prema svojoj rastvorljivosti vitamini se dele na dve grupe:

- vitamini rastvorljivi u vodi (hidrosolubilni vitamini)
- vitamini rastvorljivi u organskim rastvaračima (etru, benzolu, hloroformu itd.). U tkivima, ova grupa vitamina se rastvara u lipidima, te se često označava kao grupa liposolubilnih vitamina.

Neki vitamini se u organizmu deponuju u jetri i bubrezima ili se izlučuju putem mleka te je stoga ova hrana životinjskog porekla bogat izvor vitamina za čoveka.

Sadržaj vitamina u biljnim i životinjskim tkivima izražava se obično u mg ili u internacionalnim jedinicama (IU).

7.1. Bojene reakcije na vitamine

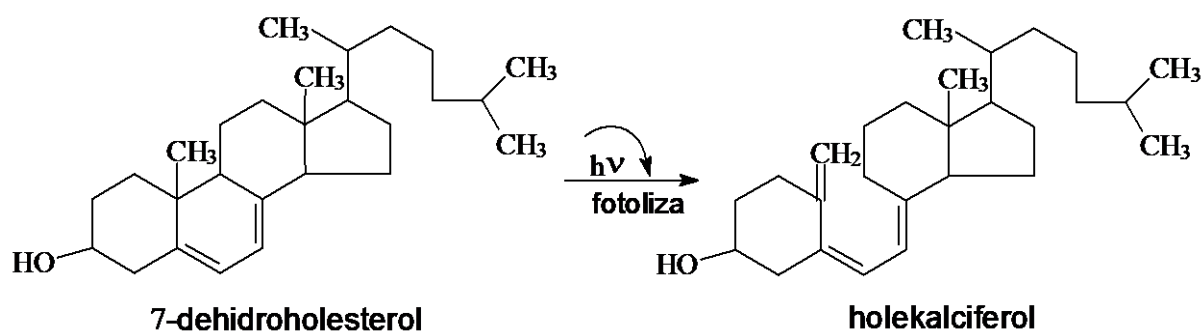
Vitamini predstavljaju grupu organskih jedinjenja raznovrsne strukture i hemijskih osobina i neophodni su za normalan tok metabolizma ćelija, tkiva i organa. Većina vitamina ima ulogu koenzima u enzimskim reakcijama.

Danas je poznato preko 30 jedinjenja vitaminskog karaktera, za čiju većinu je utvrđena struktura i hemijska svojstva. Neki vitamini se mogu naći i u obliku provitamina, koji ne ispoljavaju vitaminsku aktivnost, već se specifičnim hemijskim reakcijama u organizmu životinja i čoveka prevode u biološki aktivna jedinjenja.

Vitamini grupe D

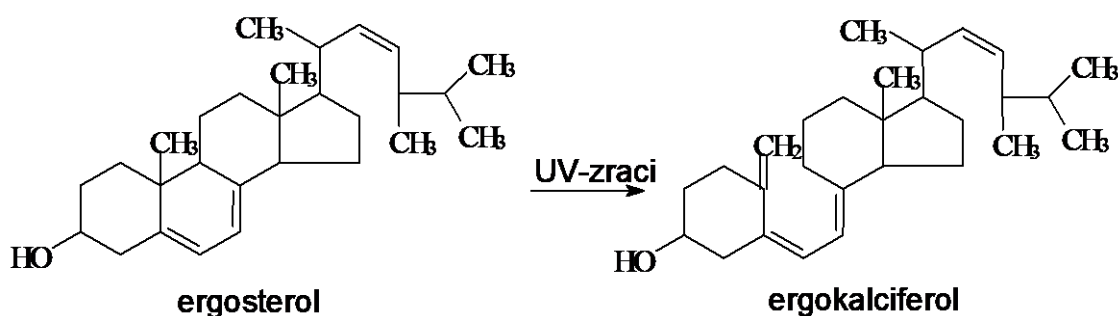
Nedostatak ove grupe vitamina u organizmu dovodi do pojave poremećaja metabolizma kao što je rahitis. Vitamini grupe D regulišu resorpciju Ca^{2+} jona iz digestivnog trakta, a preko Ca^{2+} i metabolizam PO_4^{3-} jona. Predstavnici vitaminske grupe D jesu vitamini D_1 , D_2 , D_3 , D_5 , D_6 . Oni su međusobno vrlo bliski u pogledu vitaminske funkcije, a manje ili više se razlikuju u pogledu strukture i načina nastajanja.

Vitamini D grupe se ubrajaju u grupu liposolubilnih vitamina (derivata izoprena). Ovi vitamini se stvaraju od provitamina 7-dehidroholesterolu u životinjama, odnosno iz ergosterola u biljkama. Ova dva provitamina se razlikuju samo po bočnom lancu. Nastaju procesom fotoizomerizacije pod uticajem UV zraka. UV zračenje spontano raskida prsten B 7-dehidroholesterolu ili ergosterola. U životinjama ovo zračenje prevodi 7-dehidroholesterol u holekalciferol (vitamin D_3) (Slika 37), dok se kod biljaka ergosterol prevodi u ergokalciferol (vitamin D_2) (Slika 38). Oba ova vitamina imaju jednaku biološku vrednost. Ljudi imaju dva izvora vitamina D - unošenje putem hrane ili fotolizom 7-dehidroholesterolu u koži.



Slika 37. Nastajanje holekalciferola

Glavni poremećaji metabolizma usled deficita vitamina D su hipokalcemija i hipofosfatemija, iz razloga što vitamini D stimulišu apsorpciju Ca^{2+} jona iz digestivnog trakta, a preko metabolizma Ca^{2+} reguliše i metabolizam PO_4^{3-} . U hrani ima malo vitamina D (više ga ima u ribljem ulju i žumancetu), a najviše se vitamin D nalazi u sloju epidermisa gde se iz 7-dehidroholesterolu fotolitičkom reakcijom prevodi u vitamin D_3 . Starenjem se smanjuje količina 7-dehidroholesterolu u epidermisu, što se verovatno odražava negativnim bilansom kalcijuma koji se zapaža u starosti. Deficit vitamina D kod dece izaziva rahitis, a kod odraslih osteomalaciju.



Slika 38. Nastajanje ergokalciferola

Dokazne reakcije na vitamin D:

Reakcija sa anilinom

Vitamin D daje sa anilinom u kiseljoj sredini emulziju crvene boje.

Postupak: U epruvetu sipati 1 cm^3 ribljeg ulja, 1 cm^3 anilina i 0.5 cm^3 cc HCl. Zagrevati do ključanja u toku 30 sekundi. Žuta emulzija obojiće se u crveno.

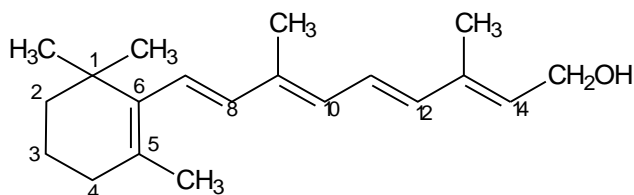
Reakcija sa SbCl_3

Zasićeni rastvor antimon (III) hlorida daje sa hloroformskim rastvorom vitamina D žutu boju.

Postupak: U epruvetu sipati 2 cm^3 hloroformskog rastvora vitamina D i tome dodati 0.2 cm^3 zasićenog rastvora SbCl_3 . Rastvor se boji žuto.

Vitamini grupe A

U ovu grupu vitamina ubrajaju se jedinjenja hidrofobnog karaktera koja nemaju funkciju koenzima a predstavljaju mesta primarne fotohemijske reakcije u funkcionisanju čula vida. Nazivaju se još i retenoidima. Najpoznatiji su retinol (vitamin A₁) (*Slika 39*) i njegov aldehyd retinal.



Slika 39. Struktura retinola

Vitamin A₁ se sintetizuje iz β-karotena koji se naziva provitaminom vitamina A. Sinteza je katalizovana enzimom β-karoten-15,15`-dioksigenzom. Biohemijaska funkcija vitamina A se sastoji u tome sto su retinol i retinal reaktanti u hemijskim izmenama koje nastaju u toku vizuelnog procesa u očima i njihovog vezivanja za proteine tipa opsin u receptorskim ćelijama. Takođe učestvuju u procesima rasta skeleta, a posebno su značajni za funkciju epitela, kože i sluzokože, sekreciju sluzi, sintezu mukopolisaharida itd.

Test na retinol (vitamin A₁):

U prisustvu cc H₂SO₄ dolazi do dehidracije vitamina A pri čemu nastaje obojeni proizvod.

Postupak: U epruvetu kapalicom dodati 10 kapi ribljeg ulja, zatim 5 kapi hloroforma i 1-2 kapi cc H₂SO₄. Uočava se plavo obojenje koje stajanjem prelazi u smeđe-crveno.

Overa:

LITERATURA

1. Burtis C.A., Bowers L.D., Chatteraj S.C., Ullman M.D. 1997. Hromatografija. U: Osnovi kliničke hemije (urednik: Norbert W. Tietz). Velarta, Beograd, Srbija, s: 110-128.
2. Voet D., Voet J.G. 1995. Biochemistry. John Willey & Sons, Inc., Somerset, NJ, SAD.
3. Grant G.H., Silverman L.M., Christenson R.H. 1997. Aminokiseline i proteini. U: Osnovi kliničke hemije (urednik: Norbert W. Tietz). Velarta, Beograd, Srbija, s: 301-359.
4. Erlykina E.I., Zagoskin P.P., Kalashnikov S.P., Khvatova E.M., Fokin V.M., Semenova T.S., Jacobson L.I., Shlapakova T.I. 2008. Laboratory manual on biochemistry. Publishing House of Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nižnji Novgorod, Rusija.
5. Kaminskas A., Mažeikienė A. 2012. Biochemistry laboratory manual, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Litvanija.
6. Lelevich S.V., Popechits T.V. 2010. Clinical biochemistry. Grodno State Medicinal University, Grodno, Belorusija.
7. Malenčić Đ., Popović M. 2011. Praktikum iz biohemije biljaka. Poljoprivredni fakulte, Novi Sad, Srbija.
8. Moss D.W., Henderson A.R., Kachmar J.F. 1997. Enzimi. U: Osnovi kliničke hemije (urednik: Norbert W. Tietz). Velarta, Beograd, Srbija, s: 360-443.
9. Popović M.T. 2008. Biohemija životinja. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija.
10. Prvulović D., Jovanović-Galović A., Stanić B., Popović M., Grubor-Lajšić G. 2007. Effect of a clinoptilolite supplement in pig diets on performance and serum parameters. Czech Journal of Animal Science, 52(6): 159-164.
11. Prvulović D., Kojić D., Grubor-Lajšić G., Košarčić S. 2008. The effects of dietary inclusion of hydrated aluminosilicate on performance and biochemical parameters of broiler chickens. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 32: 183-189.
12. Prvulović D., Kojić D., Popović M., Grubor-Lajšić G. 2015. Inhibitory effects of aluminosilicates on lead acetate toxicity in selected organs of broilers. Thai Journal of Veterinary Medicine, 45(2): 255-261.
13. Prvulović D., Košarčić S., Popović M., Dimitrijević D., Grubor-Lajšić G. 2012. The influence of hydrated aluminosilicate on biochemical and haematological parameters, growth performance and carcass traits of pigs. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11(1): 134-140.

14. Prvulović D., Popović M., Kojić D., Grubor-Lajšić G. 2014. Effects of dietary lead acetate and aluminosilicates on the antioxidative defense system of broilers' muscle tissues. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(3): 223-226.
15. Prvulović D., Popović M., Kojić D., Grubor-Lajšić G. 2014. Effects of aluminosilicates on lipid peroxidation and antioxidants in aflatoxin B1-induced tissue injury in chickens. *Studia Universitas Babes-Bolyai, Chemia*, 59(2): 51-62.
16. Repnik K., Potočnik U. 2013/2014. Laboratorijske vaje iz Biokemije in Molekularne biologije. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija.
17. Ruškovska T. 2012. Osnovi na biohemija. Univerzitet "Goce Delčev", Štip, Makedonija.
18. Stein E.A. 1997. Lipidi, lipoproteini i apolipoproteini. U: Osnovi kliničke hemije (urednik: Norbert W. Tietz). Velarta, Beograd, Srbija, s: 471-523.
- Strelec I., Kovač T. 2013. Praktikum iz biokemije. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, osijek, Hrvatska.
19. Hawcroft D. 1987. Diagnostic Enzymology. John Wiley & Sons, London, Velika Britanija.
20. Hegyi G., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., Venekei I. 2013. Introduction to practical biochemistry. Eötvös Loránd University, Mađarska.
21. Campbell M. K. 1991. Biochemistry. Sanders College Publishing, Orlando, Florida, SAD.
22. Caraway W.T., Watts N.B. 1997. Ugljeni hidrati. U: Osnovi kliničke hemije (urednik: Norbert W. Tietz). Velarta, Beograd, Srbija, s: 444-470.
23. Waterborg J.H. 2009. The Lowry method for protein quantitation. U: The Protein Protocols Handbook, 2nd edition (urednik: John M. Walker). Humana Press, otowa, NJ, SAD, s: 7-10.
24. Wenk M.R., Fernandis A.Z. 2007. A manual for biochemistry protocols. World Scientific Publishing Co., Singapur.