

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIY VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM VAZIRLIGI**

ANDIJON DAVLAT UNIVERSITETI

Kimyo kafedrası

5140500-Kimyo ta‘lim yo‘nalishi uchun

**Bioorganik kimyo fanidan „ Oqsillarning tabiiy manbalari (sut, qon
zardobi) dan ajratib olish” mavzusidagi**

USLUBIY TAVSIYANOMASI

Tuzuvchilar:

O‘qituvchi G.S.Rozimamatova

Kafedra mudiri:

k.f.n., dotsent Yu.Isaev

Andijon-2016

OQSILLARGA SIFAT REAKSIYALAR.

Darsning maqsadi: talabalarni oqsillarning sifat reaksiyalari va ayrim fizik-kimyoviy xossalari bilan tanishtirish, hamda oqsillarni biologik materiallardan ajratib olish va ularning xossalari oʻrganish yuzasidan olgan nazariy bilimlarini mustahkamlash.

Darsning rejasi: 1. Mashgʻulotga nazariy tayyorgarlik.
2. Tajribalarni bajarish.
3. Mavzu boʻyicha savol vatopshiriqlarni bajarish.
4. Bajarilgan tajribalar yuzasidan yakuniy hisobot tayyorlash.

Dars uchun kerakli jixozlar: Probirkalar, suv hammomi, shisha tayoqcha, oqsil eritmasi, oʻyuvchi natriyning 30 % li eritmasi, mis sulfatning 1 % li eritmasi, ningidrin eritmasi, sulfanil kislotasining 5 % li xlorid kislotadagi 1 5 li eritmasi, natriy nitritning 0,5 % li eritmasi, natriy karbonatning 10 % li eritmasi

Nazariy qism.

Oqsillarni sifat jihatdan aniqlash ikki xil turdagi reaksiyalarga asoslangan: 1) oqsil molekulasi peptid bogʻlari boʻyicha; 2) oqsil molekulasidagi oʻrinbosarlar boʻyicha.

Birinchi turdagi reaksiyalarga *biuret reaksiyasi* misol boʻladi. Mazkur reaksiya ishqoriy muhitda mis ionlarini peptid bogʻlari boʻyicha kompleks birikma hosil qilishiga asoslangan.

Ikkinchi turdagi reaksiyalar aminokislotalarning yon zanjiridagi guruhlarining xossalari asoslangan. Rangli reaksiyalarning tabiatiga qarab oqsillarning tarkibi haqida taxmin qilish mumkin.

Oqsillarning miqdoriy analizi fizik, kimyoviy va biologik metodlar yordamida oʻtkaziladi. Fizik metodlardan refraktometrik, spektrofotometrik va polyarografik metodlar amalda keng qoʻllaniladi.

Kimyoviy metodlar ham xilma xil boʻlib, ulardan eng soddasi umumiy azot miqdorini aniqlashdan iborat. Eng koʻp qoʻllaniladigan kimyoviy metodlardan biri kolorimetrik metod hisoblanadi.

Biologik metodlar faqat fermentativ yoki gormonal faollikka ega boʻlgan oqsillarni aniqlashdagina qoʻllash

Oqsillarga sifat reaksiyalar oʻtkazish uchun dastlab oqsil eritmalari tayyorlanadi. Oqsil eritmalarini turli xil materiallardan tayyorlash mumkin:

Tuxum oqsilini suyultirilmagan eritmasini tayyorlash.

Buning uchun tuxum oqsili sarigʻidan ajrating. Bitta tuxumda taxminan 33 gr oqsil boʻladi. Uning tarkibida 88 % suv, 1 % uglevodlar, 0,5 % mineral moddalar va qolgani oqsil boʻladi. Shunday qilib olingan eritma taxminan 10 %li oqsil eritmasi hisoblanadi.

Tuxum albuminini suyultirilgan eritmasini tayyorlash.

Sarigʻidan ajratilgan tuxum oqsili kolbaga solinng va chayqatib turib oʻn barobar distillangan suv bilan aralashtiring. Bunda albumin eritmada qoladi, globulinlar iviq choʻkma hosil qiladi. Eritmani ikki qavat namlangan doka yoki surpdan oʻtkazib filtrlang. Tuxum oqsilida albuminning miqdori 6 % atrofida boʻladi. Shuning uchun hosil boʻlgan albumin eritmasining konsentratsiyasi taxminan 0,5% ni tashkil qiladi.

Goʻsht oqsili.

Stakanga 40-50 gr yogʻsizlantirilgan, maydalangan goʻsht soling. Uning ustiga natriy xloridning 80-100 ml 10 %li eritmasi quying va aralashmani 15-20 minut davomida aralashtirib tindiring. Soʻng hosil boʻlgan qizil rangli aralashmani buklangan qogʻoz filtrdan yoki ikki qavat dokadan oʻtkazing. Eritmada asosan muskul albumini va globulini boʻladi.

Sut oqsili.

50 ml yangi sutga teng miqdorda ammoniy sulfatning toʻyingan eritmasi qoʻshing. Bunda globulinlar va kazein choʻkmaga tushadi. Aralashma qogʻoz filtrdan oʻtkazing.

Oʻsimlik albumini.

25 gr bugʻdoy uniga 100 ml distillangan suv qoʻshing va aralashmani bir soat davomida kuchli chayqatib turing. Soʻng aralashmani sentrifugalab, tiniq qismi filtrlang. Filtrlangan eritmada asosan bugʻdoy albumini boʻladi.

Ishning borishi.

1. Peptid bogʻlarni aniqlash.

Biuret reaksiyasi. 1-2 ml suyultirilgan oqsil eritmasiga ikki hajm oʻyuvchi natriyning 30 % li eritmasi quying, yaxshilab aralashtiring va 2-3 tomchi mis sulfatning 1 % li eritmasi qoʻshing, yana yaxshilab aralashtiring. Agar oqsilning miqdori kamroq boʻlsa reaksiyaning sezgirligini oshirish uchun oqsil eritmasiga yana 1 ml mis sulfat eritmasi ohistalik bilan qoʻshing (bunda mis sulfat eritmasi aralashmaning ustki qismida boʻlishi kerak). Aralashma biroz turgandan keyin qatlamlar chegarasida binafsha rang hosil boʻladi.

2. Ningidrin reaksiyasi. 2-3 ml suyultirilgan oqsil eritmasiga 3-4 tomchi ningidrinning 95% li atseton (yoki spirt) dagi 1% li eritmasi qoʻshing. Eritma aralashtiring va bir necha minut davomida 70° S li suv hammomida qizdiring. Bunda koʻk-binafsha rang hosil boʻladi.

3. Ksantoprotein reaksiyasi. 1 ml oqsil eritmasiga oq choʻkma yoki sariq rangli loyqa hosil boʻlguncha 5-6 tomchi konsentrlangan nitrat kislota qoʻshing. Qizdirilganda eritma va choʻkma och-yashil rangga kiradi, choʻkma esa deyarli erib ketadi. Aralashmani sovutib kislota eritmasiga qoʻshing, soʻng chayqatmasdan tomchilatib turib ishqoriy muhit hosil boʻlguncha ishqor eritmasi qoʻshing. Bunda choʻkmaga tushgan kislotali albumin erib ketadi va aralashma och-qizil rangga boʻyaladi.

Bu reaksiya oqsil molekulasida aromatik qoldiq mavjud boʻlganda (fenilalanin, tirozin va triptofan) gina boradi. Ayrim oqsillar, masalan, jelatina aromatik qoldiqlar boʻlmaganligi uchun bunday reaksiya bermaydi.

4. Pauli reaksiyasi. Sulfanil kislotasining 1 %li (5 % li xlorid kislotadagi) 1 ml eritmasiga natriy nitritning 2 ml 0,5 % li eritmasi quying, qattiq chayqating va

darhol 2 ml oqsil eritmasi, probirkadagi moddalar aralashtirilgandan so'ng natriy karbonatning 6 ml 10 % li eritmasi qo'shing. Bunda aralashma qizil rangga bo'yaladi. Bu reaksiyani gistidin va tirozin qoldiqlari tutuvchi oqsillarda kuzatish mumkin.

5. Nitroprussid reaksiyasi. Probirkaga 3 ml suyultirilgan oqsil eritmasi quyding, unga shuncha miqdor ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi va 2-3 tomchi natriy nitroprussidning 5 % li eritmasi qo'shing. Keyin aralashmaga bir necha tomchi konsentrlangan ammoniy gidroksid qo'shing. Agar tekshirilayotgan oqsilda sistein bo'lsa alvon (purpur) rang hosil bo'ladi.

Oqsillarni cho'ktirish reaksiyalari.

Ammoniy sulfat ta'sir ettirib cho'ktirish.

Probirkaga 5-6 ml oqsil eritmasi quyding, unga teng hajmda ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi qo'shing va aralashtiring. Globulinlarning cho'kishi natijasida aralashma loyqalanadi. Aralashma filtrlanadi va filtrat ikki qismga bo'linadi. Birinchi qismiga kristall holatdagi ammoniy sulfat erimay qolguncha qo'shiladi. Natijada eritmadagi albuminlar loyqalanib cho'kmaga tusha boshlaydi. Ikkinchi qismi esa qaynaguncha qizdiriladi. Bunda eritmadagi albuminlar denaturatsiyalanadi.

Suvli eritmalarida oqsillar gidratlangan, ularning qutblangan qismlari esa zaryadlangan holatda bo'ladi. Lekin eritmada tuzlarning konsentratsiyasi yuqori bo'lsa oqsil molekulalarining gidrat qobiqlari parchalanadi va oqsil molekulalari zaryadsizlanadi. Natijada oqsil molekulalarining eritmadagi barqarorligi kamayadi va ular koagullanib cho'kmaga tushadi.

Ammoniy sulfat yaxshi cho'ktirish xossasiga ega, oqsillarni neytral muhitda, kuchsiz kislotali muhitda yanada yaxshiroq cho'ktiradi. Boshqa tuzlar, masalan natriy xlorid kislotali muhitdagina oqsillarni cho'ktirish qobiliyatiga ega.

Kristall holdagi tuxum albuminini olish.

Ish uchun kerakli jihozlar va reaktivlar. 50 va 100 ml li o'lchov silindrlari, shisha voronkalar, shisha tayoqchalar, Bunzen kolbasi, Byuxner voronkasi, 50 ml li stakan, qog'oz filtrlar, universal qog'oz indikator, ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi, quruq ammoniy sulfat, 4% li sirka kislotasi eritmasi.

Ishning borishi. Ikki tuxum oqsili sarig'idan ajratiladi va kavsharlangan probkani o'lchov silindriga solinadi. Unga teng miqdorda ammoniy sulfatning to'yingan eritmasi (1 l suvga 757 gr quruq tuz hisobida) qo'shiladi, probka bilan berkitiladi va yaxshilab aralashtiriladi.

Aralashma yarim to'yinganda globulinlar cho'kmaga tushadi. Cho'kma filtrlanadi. Filtrlash hajmi kichikroq boshqa o'lchov kolbasida o'tkaziladi. Tiniq filtratga yaxshilab maydalangan ammoniy sulfat kristallari 100 ml ga 13,5 gr hisobidan qo'shiladi va kristallar to'la erib ketguncha shisha tayoqcha bilan aralashtiriladi. Bunda ammoniy sulfatning 70 % li eritmasi hosil bo'ladi va albuminlar cho'kmaga tushadi. Cho'kma Byuxner voronkasi yordamida filtrlanadi va 50 ml li stakanga o'tkazilib minimal hajmdagi suvda eritiladi. Hosil bo'lgan eritmaga asta sekin aralashtirib turib rN 4,7-4,8 ga yetguncha 4 %li sirka kislotasi eritmasi qo'shiladi. So'ng eritmaga yo'qolmaydigan loyqa hosil bo'lguncha oz-ozdan amoniy

sulfatning to'yingan eritmasi chayqatib turib qo'shiladi. Stakan toza oyna bilan yopiladi va sovutgichga qo'yiladi. Bir yoki bir necha sutkadan keyin albuminning ignasimon kristallari hosil bo'ladi.

Oqsillarni kislotali gidrolizi.

Oqsillarni soddaroq birikmalargacha parchalash gidroliz yordamida amalga oshirilishi mumkin. Buning uchun 20 % li xlorid kislota, 30 % li sulfat kislota, 5 n. li o'yuvchi natriy eritmasi yoki 15 %li bariy gidroksid eritmalaridan foydalanish mumkin. Bunda peptid bog'lar parchalanadi va kichik molekulyar massali birikmalar-peptonlar hosil bo'ladi. Oqsil to'la parchalanganda esa aminokislotalar aralashmasi hosil bo'ladi.

50 ml hajmli tubi yumaloq kolbaga 20 ml oqsil eritmasi quyiladi va unga 5 ml konsentrlangan xlorid kislota qo'shiladi. Kolba uzun shisha nay o'rnatilgan probka bilan berkitiladi.

Gidrolizning boshlanishi va oxirida neytrallangan oqsil eritmasida Biuret reaksiyasi o'tkaziladi. Oqsillar ko'k-binafsha rang, peptonlar esa qizil rang beradi. Takrorlash uchun savollar va topshiriqlar.

1. Biuret reaksiyasi jarayonida qanday o'zgarishlar sodir bo'ladi? Tegishli reaksiya tenglamalarini yozing.
2. Oqsillarni cho'kishi qanday jaryonlarga asoslangan?
3. Nima uchun har xil oqsillar har xil sharoitlarda cho'kmaga tushadi?
4. Qanday oqsillar suvda yaxshi eriydi va nima uchun?

3. TUXUM ALBUMININI TUZ BILAN CHO'KTIRISH ORQALI AJRATIB OLISH.

KAZEINNI IZOELEKTRIK NUQTASINI ANIQLASH.

Darsning maqsadi: Talabalarni oqsillarning cho'ktirish jarayonlari bilan tanishtirish, oqsillarning ayrim fizik -kimyoviy xossalari o'rganish va tajribalar o'tkazish malakasini rivojlantirish.

Darsning rejasi:

1. Mashg'ulotning nazariy qismini takrorlash.
2. Tajribalarni bajarish
3. Tajribalar natijalarini muhokama qilish.

Dars uchun kerakli jixozlar: 100 ml hajmli o'lchovli silindr, stakan, sentrifuga (vakuum-filtrlagich qurilmasi), SF-26, ammoniy sulfat, bitta tovuq tuxumi, dializ membranasi, 2 l hajmli dializ kamerasi.

Nazariy qism.

Oqsillar har xil birikmalar, masalan kislotalar, spirtlar, metallarning ionlari bilan ta'sirlashadi, shuningdek, erituvchi molekulasi uchun raqobatlashadi. Aksariyat holatlarda bunday ta'sirlashuv natijasida oqsillar cho'kmaga tushadi.

Amfoter elektrolit sifatida oqsillar musbat va manfiy guruhlarga dissotsiyanadi. rN ning ma'lum qiymatlarida oqsil eritmasidagi ionlangan guruhlarning nisbati tenglashadi va eruvchanligi minimal bo'ladi. Mana shu qiymat oqsilning izoelektrik nuqtasi hisoblanadi.

Ishning umumiy izohi. Tuxum oqsilidan bosqichma-bosqich tuz bilan cho'ktirish orqali (oldindan 50% li to'yintirilishdan tushgan cho'kmani olib tashlab), hamda dializ yo'li bilan albumin qismi ajratiladi.

Ishning borishi. Tuxum oqsili sarig'idan ajratiladi va silindrga solinadi, so'ngra uning hajmi suv bilan 50 ml ga yetkaziladi, hosil bo'lgan oqsil eritmasiga 15,65 gr quruq ammoniy sulfat asta sekin aralashtirib qo'shiladi. Tuzning hammasi erigandan so'ng yarim to'yingan tuz eritmasidan tushgan globulinlar cho'kmasi sentrifugaga qilinib (minutiga 3000-5000 ayl.) yoki qalin qog'ozda filtrlanib ajratiladi. Filtrat silindrga yig'iladi, hajmi o'lchanib tuz erishi qulay bo'lishi uchun stakanga o'tkaziladi va eritmada ammoniy sulfatning miqdori 70 % gacha yetkaziladi. Tuzning miqdori quyidagi formula bo'yicha hisoblanadi:

$$X = [0,515 \cdot V \cdot (c_2 - c_1)] : [1 - (0,272 \cdot c_2)]$$

Bu yerda X-berilgan to'yinish darajasi uchun olingan tuzning miqdori, gr da;

V-oqsil eritmasining hajmi, ml da;

S₁-tuzning dastlabki to'yinish darajasi % da ;

S₂-tuzning berilgan to'yinish darajasi.

Kerakli miqdordagi ammoniy sulfat erigandan so'ng loyqalangan aralashma cho'kma hosil bo'lishi bo'lishi uchun 30-40 minut qoldiriladi. Ovalbumin cho'kmasi globulinlar kabi ajratib olinadi. Cho'kma (agar filtrlash qo'llanilsa filtr qog'oz bilan birgalikda) oz hajmdagi suv bilan aralashtirilib dializ qopchasiga solinadi va tuzni chiqarib yuborish uchun dializ qilinadi. Buning uchun dializ qopchasi iliq suv bilan ho'llanib bir uchi bog'lanadi va voronka yordamida oqsil eritmasi bilan to'ldiriladi. Dializ 4 marta 20 mM pH 7,4 bo'lgan fosfat bufer eritmasida, har galgi almashinish bir soatdan kam bo'lmagan holda olib boriladi.

Dializning dastlabki ikki soatini suv bilan olib borish mumkin. Dializatdagi ovalbuminning konsentratsiyasi 260 va 280 nm da yutilishi bo'yicha nomogramмага asosan aniqlanadi.

Sutdan kazein ajratib olish.

200 ml hajmli stakanda 30 ml sut 4 hajm suv bilan suyultiriladi va unga aralashtirib turib sirka kislotaning 0,1 % li eritmasi kazein cho'kishi to'xtaguncha qo'shiladi. Kislotaning miqdori ortib ketmasligi zarur, chunki kazein mo'l miqdordagi kislota eritmalarida eriydi. Kazein filtrlanadi, suv bilan yuviladi va yog'lar va boshqa aralashmalardan tozalash uchun natriy karbonatning 0,1 % li eritmasida eritiladi. Bunda kazein erib ketadi, yog' esa eritmaning yuzasida qoladi. Aralashma nam filtrdan o'taziladi.

Kazeinning natriyli tuzi bo'lgan filtrat yana sirka kislotaning 0,1 % li eritmasi yordamida cho'ktiriladi. Cho'kmaga tushgan kazein filtrlanadi, filtr qog'oz orasiga olinib imkoni boricha quritiladi va suvsizlantirish uchun havonchada 15-20 ml spirt bilan maydalanadi. So'ng kazeindan yog' qoldiqlarini ketkazish uchun katta probirkada efir bilan, keyin metil spirti va xloroformning 1:1 nisbatdagi

aralashmasi bilan chayqatiladi. Olingan toza kazein quritilgandan keyin oq rangli kukun holatida bo'ladi.

Kazeindagi fosfat kislota qoldig'ini aniqlash.

100 gr kazeinda taxminan 0,8 gr fosfor fosfat kislota shaklida bo'ladi. Kazeindagi fosforni aniqlash uchun kazein konsentrlangan sulfat va nitrat kislotalarning aralashmalarida yoqiladi. 0,05 gr kazein o'tga chidamli probirkada 0,3 ml konsentrlangan sulfat kislota va shuncha nitrat kislota bilan aralashtiriladi. Probirka qum hammomida qizdiriladi. Aralashma qorayib qo'ng'ir tusga kiradi. 10 minutdan keyin, agar aralashma rangsizlanmasa, ikki tomchi nitrat kislota qo'shib yana qizdiriladi. Bu jarayon aralashma rangsizlanmaguncha davom ettiriladi. So'ng qolgan nitrat kislota yo'qotish uchun ikki ml suv qo'shib qizdiriladi. Shundan so'ng aralashma fenoltalein bo'yicha o'yuvchi natriyning 5 n. eritmasi bilan neytrallanadi. Bunda ortiqcha ishqor qo'shib yubormaslik kerak, agar ishqor ko'payib ketsa kislota eritmasi bilan neytrallanadi. Eritma ikki qismga bo'linadi va quyidagi usullar bilan fosfat kislota borligi aniqlanadi.

1. Ammoniy molibdatning nitrat kislota-dagi 2 ml eritmasiga 1 ml tekshirilayotgan eritma qo'shiladi aralashma ohista qizdiriladi. Bunda ammoniy fosforomolibdat ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$) ning sariq rangli cho'kmasi hosil bo'ladi.
2. 2 ml gidrolizatga keskin hid hosil bo'lguncha asta sekin konsentrlangan ammoniy gidroksid eritmasi qo'shiladi. So'ng unga teng hajmda magnezial aralashma qo'shiladi. Probirka devoriga shisha tayoqcha bilan ishqalansa MgNH_4PO_4 ning kristallari hosil bo'ladi.

Kazeinning izoelektrik nuqtasini aniqlash.

Beshta probirkaga quyidagi tartibda sirka kislota-ni 0,1 n. eritmasidan quyiladi: birinchisiga-0,25 ml, ikkinchisiga-0,5 ml, uchinchisiga-1,0 ml, to'rtinchisiga-2,0 ml, beshinchisiga-4,0 ml. Xuddi shunday tartibda probirkalarga 8,75 ml, 8,5 ml, 8,0 ml, 7,0 ml va 5,0 ml suv qo'shiladi.

Kazeinning 0,1 % li eritmasi quyidagicha tayyorlanadi: 0,2 gr kazein suv hammomida qizdirib turib natriy atsetatning 5 ml 0,1 n. li eritmasida eritiladi va eritmaning hajmi natriy atsetat eritmasi bilan 200 ml ga yetkaziladi.

Tayyorlangan kazein eritasidan yuqoridagi aralashmalarga 1,0 ml dan qo'shiladi va ulardagi loyqalanish darajasi aniqlanadi. Loyqalanish eng yuqori bo'lgan eritmaning pH i kazeinning izoelektrik nuqtasi hisoblanadi. Kazein eritmasi qo'shilgandan keyin hosil bo'lgan aralashmalarning pH i tegishli ravishda 5.3, 5.0, 4.7, 4.4, 4.1 ga teng bo'ladi.

Takrorlash uchun savollar va topshiriqlar.

1. Izoelektrik nuqta deb nimaga aytiladi?
2. Kazein oqsillarning qaysi sinfiga mansub?
3. Nima uchun kazeinni yog'sizlantirish kerak?
4. Kazeinning izoelektrik nuqtasi qiymati nechaga teng?
5. Nima uchun oqsillar izoelektrik nuqtada cho'kmaga tushadi?

АДАБИЁТЛАР:

1. Ю.Б.Филиппович и др. Практикум по общей биохимии. М. Просвещение. 1982.
2. Биоорганик кимёдан амалий машғулотлар. Олий ўқув юртлари талабалари учун қўлланма. Т. ТошДУ. 1995.
3. А.Қ.Қосимов ва бошқалар. Биохимиядан амалий машғулотлар. Т. Ўзбекистон. 1989.
4. Ж.Жалилов. Органик химиядан практикум. Т. Ўқитувчи. 1967.