

Vježba br.2.

Izolovanje UH iz biološkog materijala

Trehaloza iz kvasca

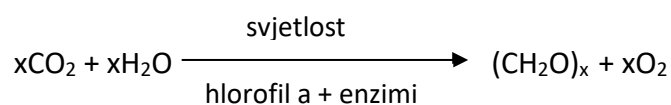
Ugljeni hidrati

Ugljeni hidrati su alkoholi koji sem hidroksilnih grupa u molekulu sadrže još i jednu ili više karbonilnih (aldehidnih ili keto) grupa ili jedan ili više derivata karbonilne funkcije (hemiacetal, hemiketal, acetal, ketal). Molekulske težine mogu biti od 90 (glicerinaldehid) do nekoliko miliona (skrob). Sem ugljenika, vodonika i kiseonika mnogi ugljeni hidrati sadrže još azot, sumpor i/ili fosfor.

U biološkom materijalu ugljeni hidrati su veoma rasprostranjeni; teško da se može naći bilo koji biološki materijal koji ne sadrži bilo slobodne bilo vezane ugljene hidrate. Slobodni i vezani ugljeni hidrati razlikuju se po biološkim funkcijama: slobodni su metaboliti (glukoza, saharoza), depoi energije (skrob, glikogen) ili konstruktivni elementi ćelije (celuloza, hitin); vezani sa molekulima različitih drugih prirodnih proizvoda ugljeni hidrati imaju vitalne funkcije u svim živim ćelijama (riboza, dezoksi-riboza, ramnoza). Ugljeni hidrati se mogu nagomilavati kako u intercelularnom prostoru tako i u posebnim organelama ćelija.

Osnovna hemijska klasifikacija ugljenih hidrata izvršena je na osnovu broja ugljenikovih atoma i broja karbonilnih grupa (ili derivata karbonila) u molekulu; tako se u *monosaharide* svrstavaju ugljeni hidrati sa 3 do 9 ugljenikovih atoma i jednom karbonilnom funkcijom. Kondenzati dvije ili više monosaharidnih jedinica koji sadrže dvije ili više karbonilnih (ili latentno karbonilnih) grupa nazivaju se *di-, tri-, tetra-, oligo- i poli-saharidima* – u zavisnosti od broja monosaharidnih jedinica u molekulu.

Za biosintezu ugljenih hidrata iz neorganskih jedinjenja neophodno je prisustvo hlorofila, a njihovo postojanje je rezultat fotosinteze po opštoj reakcionoj shemi:



Monosaharidi

Prema broju ugljenikovih atoma u molekulu monosaharidi se svrstavaju u trioze, tetroze, pentoze,..., itd., a prema karbonilnoj grupi (tj. derivatu karbonilne grupe) koju sadrže svrstavaju se u aldoze i ketoze.

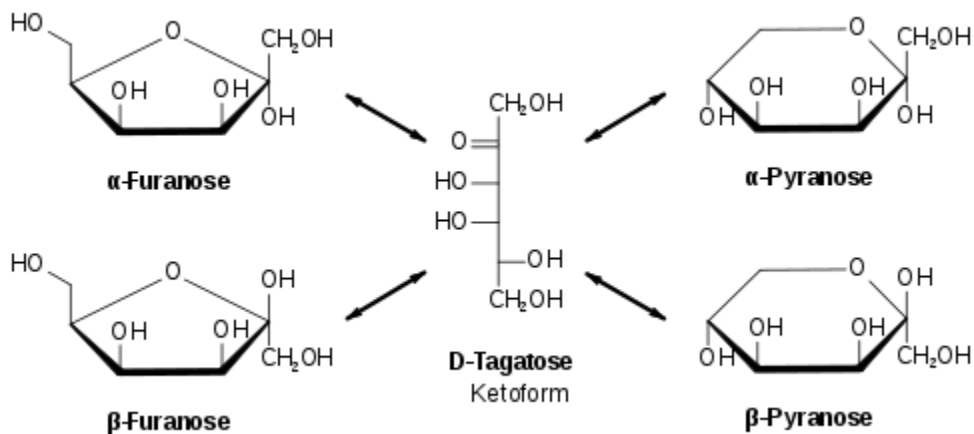
- Trioze su D- i L- glicerin aldehyd i dioksi aceton. Predstaviti njihove strukture:

- Tetroze su epimerni par eritroza i trezoza (aldoze) i D i L eritruuloza (ketoza). Predstaviti njihove strukture:

- Pentoze su: D- i L-arabinoza, riboza, ksiloza i liksoza (aldoze) kao i D- i L-ribuloza i ksiluloza (ketoze). Predstaviti njihove strukture:

- Heksoze su: D- i L-aloza, altoza, glukoza, manoz, guloza, idoza, galaktoza i taloza (aldohexoze), kao i D- i L-fruktoza, sorboza, tagatoza i psikoza. Predstaviti strukture glukoze, manoze, galaktoze i fruktoze:

Utvrđeno je da su monosaharidi ciklična jedinjenja, ciklični hemiacetali ili hemiketali, a mogu biti kako šestočlani (piranoze), tako i petočlani (furanoze) prstenasti sistemi. Hemiketali-ciklični oblici ketoza-obično su samo furanoznog tipa. Aldoze, kao što je to npr. aldopentozna riboza, mogu postojati u svim sledećim oblicima:



Svaki od oblika D-riboze naveden na prethodnoj slici je izolovan i postoji i kao kristalno hemijsko jedinjenje-sem onog oblika u kojem je aldehidna grupa slobodna. Ovaj oblik, međutim, u rastvoru postoji i preko nje se uspostavlja termodinamička i kinetička ravnoteža (zavisno od rastvarača,

temperature, solvatacije i pH) između tri ili svih pet mogućih oblika (što isto važi za sve aldopentoze i aldoheksoze).

Deoksi- ili dezoksi-šećerima nazivaju se monosaharidi u čijim molekulima „nedostaje“ jedna (ili više) OH grupa, gdje jedan (ili više) ugljenikovih atoma nije „oksidovano“. Ovakva jedinjenja nisu nađena slobodna u biološkom materijalu i nema ih u većim koncentracijama iako su veoma rasprostranjena i od velike važnosti. Deoksi riboza je, na primjer, sastavni dio DNA, molekula koji ima odlučujući značaj pri sintezi bjelančevina (pa je znači ima svuda gdje ima bjelančevina), a drugi deoksi šećeri kao sastavni djelovi polisaharida, glikoproteida ili glikozida imaju odlučujuću ulogu u antigenoj specifičnosti organizma u kojima se nalaze.

- Predstaviti strukturu 2-deoksi-D-riboze:

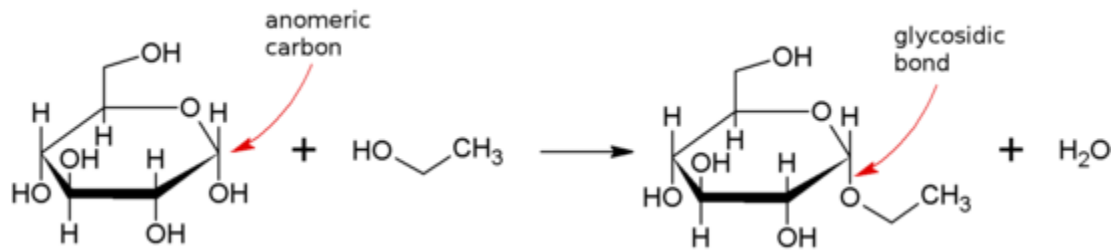
Amino-šećerima se nazivaju monosaharidi u čijim je molekulima jedna ili više hidrosilnih grupa supstituisana amino grupom (često acetil-amino grupom!). Ako je amino grupom supstituisana hidrosilna grupa na anomernom ugljeniku nazivaju se glukozil-, galaktozil-, itd. aminima, dok se pod nazivom glukozamin, galaktozamin, manozamin itd. podrazumijevaju (ako nije drugačije naznačeno!), monosaharidi kod kojih je amino grupa u položaju 2. Amino šećeri nisu nađeni slobodni u biološkom materijalu; nađeni su u antibioticima, ćelijskim opnama nekih bakterija i u nekim konstruktivnim polisaharidima kod insekata i beskičmenjaka. Sijalinska kiselina (acetil neuraminska kiselina) zajedno sa nekoliko heksozamina sastavni je dio složenih (sfingo) lipida gangliozida izolovanih iz nervnih ćelija različitog porijekla.

Među najrasprostranjenije amino šećere svrstavaju se D-glukozamin, D-galaktozamin, sijalinska kiselina, muraminska kiselina (monosaharidi), kao i (polimerni) hitin, hijaluronska kiselina, hondroitin i heparin.

- Predstaviti strukture: D-glukozamina, D-galaktozamina, muraminske kiseline i amino glukuronske kiseline:

Disaharidi

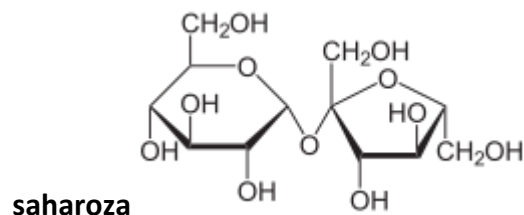
Disaharidi postaju glikozidnim vezivanjem dvije monosaharidne jedinice.

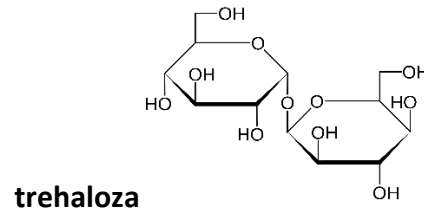
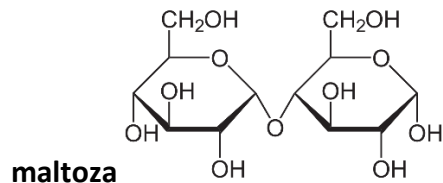
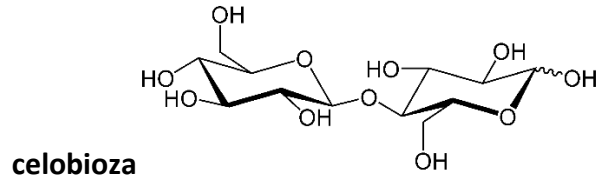
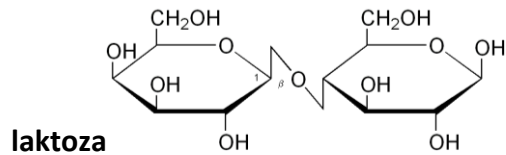


Pošto je za glikozidno vezivanje dovoljna jedna hemiacetalna hidrosilna grupa, to druga hemiacetalna hidrosilna grupa – iz drugog monosaharida može ostati slobodna, takav disaharid ("redukujući" disaharid) ima sve hemijske osobine monosaharida. Sa druge strane, dvije monosaharidne jedinice mogu biti glikozidno vezane (preko kiseonika) anomernim ugljenikovim atomima, ovakav disaharid, acetal, ne pokazuje reakcije monosaharida koje potiču od karbonilne grupe.

Mjesto vezivanja dvije monosaharidne jedinice kod neredukujućih disaharida je znači jasno, takvi disaharidi su vezani 1,1 glikozidnom vezom (dvije aldose) ili 1,2 – glikozidnom vezom (aldoza i ketoza). Redukujući disaharidi mogu biti vezani 1,2, 1,3,11,6 glikozidnom vezom (najčešće 1,4 i 1,6 – glikozidna veza). Ugljenikov atom monosaharidne jedinice koja ima slobodnu karbonilnu grupu koji je angažovan u glikozidnoj vezi određuje se tako što se izvrši potpuno metilovanje disaharida i zatim hidroliza pod blagim uslovima: ugljenikov atom koji je učestvovao u glikozidnoj vezi ostaje nemetilovan.

Među najrasprostranjenije disaharide ubrajaju se saharoza, maltoza, laktoza, trehaloza i celebioza.





Saharoza i laktoza su veoma rasprostranjeni kao slobodni prirodni šećeri; saharoza je sastojak biljaka, voća (plodova) i pčelinjeg meda (eksploatiše se iz šećerne repe i šećerne trske) a laktoza je jedini šećer koji se javlja u mlijeku sisara - a ima je u mokraći za vrijeme trudnoće. Maltoza je enzimatski degradacioni proizvod skroba, sem malih količina (klice biljaka) nema je slobodne u biološkom materijalu. Celobioza je degradacioni proizvod celuloze, usled prisustva različitih enzima "biza" u mnogim biljnim i životinjskim organizmima, selobioza se takođe može naći slobodna u biološkom materijalu.

Principi izolovanja i analitika

Ugljeni hidrati koji se u biološkom materijalu nalaze slobodni u principu se izoluju ekstrakcijom; ostale materije koje se takođe nađu u ekstraktu odstranjuju se na pogodan način od slučaja do slučaja. Postupak počinje tako što se material isitni ili homogenizuje (za šta je najčešće dovoljan običan mikser) pa se zatim ekstrahuje vodom. Vodeni ekstrakt se odvoji cijeđenjem ili centrifugiranjem a ekstrahovane supstance koje nisu ugljeni hidrati uklone se iz rastvora na pogodan način (npr. Bjelančevine se odstranjuju koagulacijom zagrijavanjem ili pomoću 5% rastvora trihlorsirćetne kiseline). Ugljeni hidrati koji se u biološkom materijalu nalaze vezani (glikoproteini, glikolipidi, glikozidi) izoluju se tako što se posle homogenizacije material prvo podvrgne hidrolizi, polisaharidi koji se ne rastvaraju u vodi (npr. celuloza) izoluju se posebnim postupcima.

Za kvalitativno i kvantitativno dokazivanje i određivanje ugljenih hidrata koiriste se često hromatografske metode, naročito hromatografija na papiru.

Eksperimentalni dio:

Trehaloza iz kvasca

Trehaloza je α -D-glukopiranozil- α -D-glukopiranozid. Otkrivena je u klicama raži. Izolovana je iz mladih gljiva, viših biljaka, raznih vrsta morskog bilja, iz hemolimfe insekata. Iz kvasca su je prvi izolovali Koh i Koh 1925 g, u potrazi za faktorom rasta kvasca, ostavili su alkoholni ekstrakt kvasca da stoji nekoliko mjeseci pri čemu je iskristalisala trehaloza.

Metoda koja se primjenjuje u ovoj vježbi sastoji se u ekstrakciji kvasca, deproteinizaciji ekstrakta i kristalizaciji trehaloze iz rastvora.

Potreban material:

Suvi pekarski kvasac (32 g ili 100 g običnog kvasca)

zasićen rastvor $\text{Ba}(\text{OH})_2$

95% etanol

aktivni ugalj

0.1 M HCl

20% ZnSO_4

1% fenolftalein

70% etanol

Metoda:

U erlenmajeru od 250 mL pažljivo napraviti homogenu kašu od 16 g suvog pekarskog kvasca i 34 mL vode. Dodati 125 mL 95% etanola, promućkati i ostaviti da stoji 30 min (povremeno promućkati tokom 30 min). Procijediti kroz Bihnerov lijevak i talog isprati 3 puta u porcijama od po 15 mL 70% etanola.

U spojene filtrate dodati 10 mL 20% ZnSO_4 , 0.5 mL fenolftaleina i toliko zasićenog $\text{Ba}(\text{OH})_2$ da se javi boja fenolftaleina (oko 25 mL). Dodati 1 g aktivnog uglja i zagrijati – miješajući reakcionu

smješu – na vodenom kupatilu do temperature od 70°C. Čim se ova temperatura postigne procijediti kroz Bihnerov lijevak (upotrijebiti deblji sloj filtera, tako da ugalj ne prolazi u filtrat). Ohlađeni rastvor podesi se na pH=7 pomoću 0.1 M HCl i koncentruje u vakuum isparivaču (vodenom kupatilu) do zapremine od oko 10 cm³.

Ovaj sirupasti ostatak se ohladi, pa se postepeno pomiješa sa 40 mL 95% etanola i ostavi da stoji preko noći.

Ovako spora kristalizacija daje kristale duge po 15 mm. Kristalizacija se može ubrzati hlađenjem rastvora na 0°C ili dodavanjem viška etanola.