บทปฏิบัติการที่ 5
สารโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารประกอบบางชนิดที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต
2. เพื่อศึกษาวิธีการวิเคราะห์เบื้องต้นของสารพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน
3. เพื่อนำความรู้พื้นฐานของสารชีวโมเลกุลดังกล่าวมาอธิบายกลไกการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต

ความนำ

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยสารเคมีสองประเภทหลัก คือ **สารอนินทรีย์** และ **สารอินทรีย์** สารประเภทหลังยังแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม กลุ่มที่มีความสำคัญมากและมีบทบาทหลักต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต คือ **สารชีวโมเลกุล(biomolecule)** สารเหล่านี้สามารถจัดเป็นกลุ่มตามลักษณะของสูตรโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ **คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โปรตีน(protein)** และ **ลิพิด(lipid)** ในบทปฏิบัติการนี้จะเน้นเพียง 3 กลุ่มดังกล่าว เพราะเป็นสารองค์ประกอบหลักที่ เป็นส่วนของโครงสร้าง เป็นแหล่งของสารให้พลังงาน และทำหน้าที่เป็นกลไกหลักของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต

1. คาร์โบไฮเดรต

โดยทั่วไป คาร์โบไฮเดรตได้รับการจำแนกย่อยออกมา 4 กลุ่ม คือ **monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide** และ **polysaccharide**

polysaccharide ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีคุณสมบัติที่จะสร้างพันธะกับสารละลายไอโอดีนรวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีต่างกันตามชนิดของ polysaccharide นั้น การตรวจสอบนิยมใช้สารละลายไอโอดีนที่ละลายในสารละลายพอแทสเซียมไอโอไดด์(I_2 in **KI**) polysaccharide พวก **อะไมโลส** เมื่อมีพันธะกับไอโอดีน ได้สารละลาย **สีน้ำเงิน** พวก **อะไมโลเพกติน** ได้สารละลาย **สีน้ำเงินเข้ม** แต่ถ้าเป็นพวก **ไกลโคเจน** จะได้สารละลาย **สีน้ำตาลแดง** สำหรับ**น้ำตาล**ที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวัน มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงได้สารละลาย **ไม่มีสี** เพราะ I_2 ไม่สามารถเข้ามาแทรกได้

ปกติสารพวก polysaccharide ยึดเกาะกันด้วยพันธะ **glycosidic bond** พันธะนี้ถูกทำลายได้ โดย**เอนไซม์** โดย**กรด** และโดย**ความร้อน** ในบทปฏิบัติการนี้จะศึกษาการถูกย่อยสลายโดย

การทำงานของกรดและความร้อน กลไกหลักของปฏิกริยา คือ ความร้อนจะทำให้โมเลกุลของน้ำตาลเกิดการสั่นสะเทือนยังผลให้พันธะไกลโคซิดิกแตก จึงมีพันธะว่างที่จะมาจับกับ H^+ ที่เกิดมาจากการแตกตัวของกรด ทำให้ polysaccharide ถูกย่อยสลายเป็น monosaccharide ได้

monosaccharide ที่ได้นี้สามารถนำมาตรวจสอบได้ด้วย **สารละลายเบเนดิก(Benedic reagent)** ซึ่งประกอบด้วย **copper sulphate, sodium carbonate** และ **sodium citrate** กลไกการทำงานคือ น้ำตาล monosaccharide มีหมู่ –OH หมู่ดังกล่าว ณ ตำแหน่งที่ 1 สามารถเกิด **ปฏิกิริยาออกซิเดชัน** กับ Cu^{2+} ทำให้ Cu ถูกเปลี่ยนมาเป็น **cuprous oxide** (Cu_2O) หรือเป็น **copper oxide** (CuO) ซึ่งจะตกเป็น **ตะกอนสีแดงอิฐ** ระยะเวลาของการเกิดตะกอนสีแดงนี้ จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปริมาณของ –OH ณ ตำแหน่งที่ 1 ในสารละลายนั้น น้ำตาลที่มีคุณสมบัติเกิดตะกอนสีแดงอิฐนี้ เรียกว่า **reducing sugar**

2. โปรตีน

โปรตีนเป็นสารที่เกิดจาก **กรดอะมิโน** ($R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-\overset{\overset{O}{||}}{C}-OH$) ที่มาต่อกันด้วย **พันธะเพปไทด์** (**peptide bond**) โดยโปรตีนอยู่ในรูปของ เอนโซม์ และในเซลล์ หรือในของเหลวของสิ่งมีชีวิต โปรตีนบางชนิดอยู่ในรูปของเหลว หรือสภาพอื่น โดยทำหน้าที่หลากหลายที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบอื่นของสิ่งมีชีวิต

สารเคมี เช่น กรด เบส และ แอลกอฮอล์ รวมถึงปัจจัยทางฟิสิกส์ เช่น ความร้อน มีบทบาทสำคัญที่ทำให้โปรตีนเกิด **การเสียสภาพ(denature)** ตกตะกอน หรือจับตัวเป็นก้อน โดยมีกลไกเนื่องมาจากการดูดน้ำออก(**salting out**)จากโมเลกุล หรือ มีสารอื่นที่ละลายน้ำได้ดีกว่าโปรตีนจึงมาดูดน้ำออกจากโมเลกุลของโปรตีนเข้ามาในโมเลกุลของสารนั้น(**salting in**)

พันธะเพปไทด์ทำหน้าที่เชื่อมต่อกรดอะมิโนเข้าด้วยกัน จนได้เป็นโมเลกุลใหญ่ของ **พอลิเพปไทด์**(โปรตีน) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ **สารละลาย biuret** $CuSO_4$ ที่มีอยู่ในสารละลาย biuret เมื่ออยู่ในสภาวะด่างจะทำปฏิกิริยากับโปรตีน ได้สารประกอบเชิงซ้อน **สีม่วง** (**violet**) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า **ปฏิกิริยาไบยูเรต(biuret reaction)**

3. ลิพิด

ลิพิด คือสารประกอบที่เกิดการรวมกันของ **กรดไขมัน** ($R-\overset{\overset{O}{||}}{C}-OH$) และ **แอลกอฮอล์** ถ้าจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลมีน้อย ก็สามารถละลายน้ำได้ ถ้ามีมากก็ไม่ละลายน้ำ โดยอาจอยู่ในรูปของ น้ำมัน หรือ ไข(wax) สารเคมีที่ละลายลิพิดได้ดี คือ **ตัวทำละลายอินทรีย์(organic**

solvent) สารประกอบบางชนิด เช่น **สารพวกฟอสเฟต** สามารถมีพันธะกับลิพิดได้ดี ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีขึ้น

การมีขั้ว(**polarity**) หรือ **การไม่มีขั้ว**(**non polar**) มีผลต่อการละลายของลิพิดแตกต่างกัน โดยทั่วไป ตัวทำลายที่นำมาใช้ละลายลิพิดนิยมใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติของ **การไม่มีขั้ว** เช่น **CCl_4** รองลงมาคือ **แอลกอฮอล์** สำหรับ **น้ำ** เป็นสารละลายมีขั้วมากจึงละลายลิพิดไม่ได้

ตามปกติ ลิพิดไม่ละลายน้ำ แต่อาจกระจายอยู่กับน้ำได้ในสภาพแขวนลอยเป็นหยดน้ำมันขนาดเล็กที่เรียกว่า **อีมัลชัน**(**emulsion**) การทำให้สภาวะอีมัลชันดำรงอยู่ได้นานโดยไม่มีการรวมตัวกลับมาเป็นลิพิดอีก จำเป็นต้องเติมสารบางชนิดลงไป สารดังกล่าวเรียกว่า **emulsifying agent** หรือ **stabilizing agent** ได้แก่ สารพวกเกลือ นอกจากนี้ยังมีสารบางชนิดที่ช่วยลิพิดละลายน้ำได้ คือ พวกสารซักฟอก สบู่ ที่ทำให้เกิดลักษณะ **micell** เนื่องจากสารพวกนี้จะมีส่วนที่เป็น polar และ non polar อยู่ภายในโมเลกุล

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง 12 หลอด
2. ตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์
3. ที่ตั้งหลอดทดลอง
4. แปรงล้างขวด
5. อ่างน้ำเดือด
6. ปิเปต
7. หลอดหยด และลูกยาง
8. ไม้หนีบ

ระเบียบวิธี

1. **การศึกษาคุณสมบัติบางประการของคาร์โบไฮเดรต** แบ่งออกเป็น 3 หน่วย คือ

1.1 การทดสอบชนิดของ polysaccharide โดยใช้สารไอโอดีน(**iodine test**) สารละลายที่ใช้ทดสอบ คือ สารละลายไอโอดีนในสารละลายพอแทสเซียมไอโอไดด์(**I_2 in KI**)

1.1.1 นำหลอดทดลองมา 6 หลอด เติมสารละลายตัวอย่างหลอดละ 2 ml แล้วเติมน้ำอีก 1 ml สารละลายตัวอย่างได้แก่ (i) **น้ำ** (ii) monosaccharide ชนิด **glucose**(aldo sugar) (iii)monosaccharide ชนิด **fructose**(keto sugar) (iv) disaccharide ชนิด **sucrose** (v) polysaccharide พวกแป้ง(starch) และ (vi) polysaccharide พวก glycogen(น้ำตับบด)

1.1.2 เติมสารละลาย I_2 in KI ลงในทั้ง 6 หลอด หลอดละ 3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น

1.2 การสลายสาร polysaccharide

1.2.1 นำหลอดมา 6 หลอด เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการจะทดสอบเช่นเดียวกันกับสารละลายในข้อ 1.1.1 เติมสารละลายเบเนดิกลงในทั้ง 6 หลอด หลอดละ 2 ml แล้วต้มต่อไปอีก 1-3 นาที สังเกต **สีที่เกิดขึ้น** และ **เวลาที่เกิดการเปลี่ยนสี**

1.3 การตรวจสอบหาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยสารละลายเบเนดิก

1.3.1 นำหลอดทดลองมา 4 หลอด เติมสารละลาย (i) **glucose** (ii) **sucrose** (iii) **starch** และ (iv) **น้ำตับบด** ตามลำดับ โดยเติมลงไปหลอดละ 2 ml ตามมาด้วยการเติมกรด **conc. HCl** ลงไปหลอดละ 1 ml แล้วต้มอีก 2 นาที ตั้งหลอดไว้เพื่อให้เย็นลงมาที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงหยด **สารละลาย I_2 in KI** ลงไปหลอดละ 2 หยด สังเกต **การเปลี่ยนแปลง** แล้วต้มต่อไปอีก 3 นาที ทำให้เย็นลงเช่นเดิม แล้วจึงเติม **สารละลาย I_2 in KI** ลงไปอีก สังเกต **การเปลี่ยนแปลง**

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของโปรตีน

ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ **ไข่ขาว(egg albumin)** การทดลองแบ่งออกเป็น 2 หน่วย คือ

2.1 การเปลี่ยนสภาพของโปรตีนโดยปัจจัยทางเคมี

2.1.1 นำหลอดลองมา 5 หลอด เติมตัวทำละลายต่างๆ ดังต่อไปนี้ หลอดละ 2 ml ตามลำดับ

1. H_2O	2. 95 % ethanol
3. conc. HCl	4. 1M NaOH
5. 30 % $(NH_4)_2SO_4$	

2.1.2 เติมไข่ขาวลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 5 หยด ตั้งไว้ 5 นาที (หลอดที่มี H_2O นำไปต้ม 2 นาทีก่อนการบันทึกผล) **สังเกตการเปลี่ยนแปลงในรูปของตะกอน** ในแต่ละหลอด

2.2 คุณสมบัติการละลายน้ำได้ของโปรตีน

2.2.1 เติม H_2O ลงไปในทุกหลอด หลอดละ 2 ml **สังเกตการเปลี่ยนแปลง**

2.3 พันธะเพปไทด์ของโปรตีน

2.3.1 นำหลอดที่มี NaOH มาเติม NaOH ลงไปอีก 1 ml. แล้วเติม $CuSO_4$ 1 หยด **สังเกตสีที่เกิดขึ้น**

3. **การศึกษาคุณสมบัติบางประการของลิพิด**

ลิพิดที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ **น้ำมันพืช**

3.1 การละลาย(solubility)ของน้ำมันพืช

3.1.1 นำหลอดทดลองมา 4 หลอด หลอดที่ 1 และ 2 ใส่ **น้ำ** หลอดที่ 3 ใส่ **ethanol** หลอดที่ 4 ใส่ **CCl_4** โดยใส่ลงไปหลอดละ 2 ml.

3.1.2 เติมน้ำมันพืชหลอดละ 5 หยด **สังเกตการแบ่งชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันพืช** ใช้จุกยางหรือนิ้วหัวแม่มือปิดปากหลอด เขย่า แล้วตั้งไว้ 5 นาที **สังเกตการเปลี่ยนแปลง**

3.2 การเกิดอีมัลชัน

3.2.1 นำทดลองมา 2 หลอด เติมน้ำมันพืชลงไปหลอดละ 2 ml. แล้วจึงเติม Na_2CO_3 1 ml. ลงไปในหลอดที่ 1 และเติมน้ำสบู่ 1 ml. ลงไปในหลอดที่ 2 เขย่า แล้วตั้งไว้ 3 นาที บันทึกผลการทดลอง(อาจใช้หลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 มาเติมด้วย น้ำสบู่ และ Na_2CO_3 เลยก็ได้)

บันทึกผล

1. ตารางบันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 1: คาร์โบไฮเดรต

	น้ำ	กลูโคส	ฟรุกโตส	ซูโครส	น้ำแป้ง	น้ำต้มตับ
ทดลองด้วยสาร I_2 in KI ทดสอบด้วยสารเบเนดิกซ์						
หลังต้มกรด 2 นาที	—		—			—
หลังต้มกรดครบ 5 นาที	—		—			—

2. ตารางบันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 2: โปรตีน

	H_2O	95%ethanol	Conc.HC1	1 M.NaOH	30%$(NH_4)_2SO_4$
หลังเติมสารโปรตีน 5 นาที					
หลังต้ม 2 นาที		–		–	
หลังเติมน้ำ 2 ml.					
หลังเติมสาร $CuSO_4$	–	–	–		

3. ตารางบันทึกผลการทดลองตามระเบียบวิธีที่ 3: ลิพิด

	หลอดที่ 1 H_2O	หลอดที่ 2 H_2O	หลอดที่ 3 ethanol	หลอดที่ 4 CCl_4
หลังเติมน้ำมันพืชเขย่าครบ 5 นาที				
หลังเติม Na_2CO_3		-		
หลังเติมน้ำสบู่	-			

สรุปและวิจารณ์ผล

ให้นักศึกษาสรุปและวิจารย์ผลการทดลองตามหัวข้อต่อไปนี้

1. การศึกษาคุณสมบัติของคาร์โบไฮเดรต
   1.1 การตรวจสอบสารพอลิแซกคาไรด์
   1.2 การตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์
   1.3 การทำลายพันธะของพอลิแซกคาไรด์
2. การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน
   2.1 ความสามารถการละลายของโปรตีน
   2.2 การตรวจหาพันธะเพปไทด์
3. การศึกษาคุณสมบัติของลิพิด
   3.1 ความสามารถในการละลายของลิพิด
   3.2 การเกิดอีมัลชัน และการเกิดฟองสบู่

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 5

1. ภายหลังการรับประทานอาหารพวกพอลิแซกคาไรด์ สารพวกนี้จะถูกทำให้เป็นโมเลกุลเดี่ยวได้ ด้วยกระบวนการใด
2. การตรวจหาน้ำตาลในเลือด ควรเลือกใช้ระเบียบวิธีใด ระหว่างการนำโปรตีนมาแช่ในด่างเป็นเวลานาน กับการแช่ในกรดเป็นเวลานาน สภาวะใดจะทำให้โปรตีนเสียสภาพมากที่สุด
3. การทำให้ลิพิดมีความสามารถละลายน้ำได้ จะต้องมีระเบียบวิธีอย่างใด
4. เมื่อนำน้ำมันมาผสมกับน้ำ แล้วเติมน้ำปลาลงไป จะเกิด emulsion ขึ้นได้หรือไม่ เพราะเหตุใด

บรรณานุกรม

สมชัย อวเกียรติ **ปฏิบัติการชีวเคมี** (เอกสารประกอบการสอน) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม, **2536**

Gornall, A. G., C. J. Bardawell, and M. M. J. David, 1949 **Biological Chemistry**

Hauk, P. B., B. L. Oser, and W. H. Summerson, 1954 **Practical Physiological Chemistry**

Renee, R., Alexander, et al.., 1 **985** **Basic Biochemical Methods**

Smith, et al, **1983** **Principle of Biochemistry, General Aspects, 7th edit.**