

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Практикум по биохимии

Учебно-методическое пособие
по курсу «Биохимия» для студентов
Биологического института
направлений подготовки 06.03.01 биология,
35.03.04 агрономия, 05.03.06 экология и природопользование

Томск 2021

РАССМОТРЕНО И УТВЕРЖДЕНО методической комиссией
биологического института НИ ТГУ

Протокол № 227 от « 16 » декабря 2021 г.

Председатель МК БИ *А.Л. Борисенко*

Пособие составлено в соответствии с программой курсов «Биохимия» и «Биохимия с основами молекулярной биологии» и содержит краткие теоретические положения по основным разделам биохимии, лабораторные работы и методические указания к их проведению.

Для студентов Биологического института, а также для аспирантов и преподавателей.

СОСТАВИТЕЛИ: *М.В. Филонова, М.А. Большакова,
А.А. Чурин*

Содержание

Предисловие.....	5
Общие правила при работе в лаборатории.....	6
Техника безопасности при работе в лаборатории.....	7
Требования к оформлению отчета	8
Тема Белки и аминокислоты	10
<i>Качественные реакции на белки и аминокислоты</i>	10
Работа № 1. Получение растворов белков.....	11
Работа № 2. Качественные реакции.....	12
Работа № 3. Определение аминокислот методом хроматографии	20
<i>Физико-химические свойства белков</i>	25
Работа № 4. Реакции осаждения белков в различных условиях	26
Работа № 5. Обратимое осаждение белков (высаливание)	30
<i>Определение содержания белка в растворе и изоэлектрической точки белков</i>	32
Работа № 6. Определение изоэлектрической точки белка.	32
Работа № 7. Количественное определение содержания белка биуретовым методом	34
Работа № 8. Количественное определение глутатиона.....	38
<i>Сложные белки</i>	41
Работа № 9. Извлечение казеина из молока	41
Работа № 10. Определение остатка фосфорной кислоты в казеине.....	42
Работа № 11. Выделение муцина из слюны и нафтоловая проба на углеводную группировку муцина (реакция Подобедова – Молиша).....	43
Работа № 12. Доказательство наличия углевода в яичном альбумине.....	44
Работа № 13. Гидролиз нуклеопротеинов	45
Тема Ферменты.....	48
<i>Определение специфичности и активности ферментов</i>	49
Работа № 14. Специфичность ферментов.....	49

Работа № 15. Определение активности амилазы по Вольгемуту.....	52
Работа № 16. Определение активности липазы в семенах подсолнечника.....	53
Работа № 17. Определение активности каталазы по Баху и Опарину.....	55
Работа № 18. Определение активности аскорбатоксидазы	57
Работа № 19. Влияние различных факторов на активность ферментов.....	59
Тема Углеводы.....	64
Работа № 20. Качественные реакции на сахара	65
Работа № 21. Реакции на полисахариды	70
Работа № 22. Обнаружение запасных сахаров в растительном материале	72
Тема V Витамины	74
Работа № 23. Качественные реакции на витамины.....	75
Работа № 24. Количественное определение свободной и связанной аскорбиновой кислоты.....	81
Работа № 25. Количественное определение рутина (витамина Р)	83
Работа № 26. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение	84
Тема Липиды.....	86
Работа № 27. Эмульгирование и растворение жиров.....	87
Работа № 28. Гидролиз жира и обнаружение продуктов гидролиза.....	88
Работа № 29. Качественная реакция на желчные кислоты	90
Работа № 30. Определение кислотного числа.....	91
Работа № 31. Определение перекисного числа	93
Работа № 32. Определение числа омыления.....	96
Работа № 33. Определение эфирного числа.....	97
Тема Нуклеиновые кислоты	98
Работа № 34. Визуализация нуклеиновых кислот на агарозном геле.....	99
Литература	103

Предисловие

Биологическая химия относится к наукам, изучающим химическую природу веществ, формирующих из биогенных молекул структуры растительных и животных организмов, а также превращения этих веществ на уровне отдельных тканей и всего организма в целом (метаболизм). Цель биохимии заключается в объяснении биологических процессов на молекулярном и клеточном уровнях, а также изучении регуляторных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность целостного организма.

В биохимии выделяют следующие основные разделы: статическая биохимия (или биоорганическая химия) – изучает химическую природу молекул, формирующих организм; динамическая биохимия – изучает закономерности химических процессов и превращения веществ в живом организме (метаболизм); функциональная биохимия – выявляет роль превращений химических соединений в осуществлении функций клеток, тканей, органов, организма в целом.

Среди наук, изучающих жизнедеятельность живых организмов, биохимия занимает важное место и является в настоящее время динамично развивающейся отраслью знаний. По этой причине для решения научных вопросов требуются квалифицированные специалисты, владеющие не только методами работы на современном оборудовании, но способные проанализировать результаты биохимических исследований.

Освоить приемы и методы биохимических исследований возможно только в лаборатории, оснащенной соответствующим образом.

При работе в лаборатории необходимо придерживаться следующих правил.

Общие правила при работе в лаборатории

1. Студентам запрещается работать в лаборатории в отсутствие преподавателя или лаборанта, а также в неустановленное время.

2. В лабораторию запрещается входить в верхней одежде, класть на столы личные вещи, не относящиеся к учебному процессу.

3. Работать в лаборатории разрешается только в рабочем халате из хлопковой или хлопчатобумажной ткани (не из синтетических тканей!). Рабочий халат должен быть по длине ниже колен и застегиваться спереди. При работе с особо опасными веществами дополнительно надевают длинный фартук из поливинилхлорида и нарукавники. При необходимости для защиты лица и глаз используют защитные маски и очки, для защиты рук – специальные защитные перчатки, а для защиты дыхательных путей – респираторы. Волосы должны быть тщательно убраны (используют шапочку или платок) или заколоты.

4. В лаборатории запрещается принимать пищу и хранить продукты.

5. Лабораторные работы выполняются студентами индивидуально, либо в составе групп по 2-3 человека.

6. Перед тем как приступить к выполнению лабораторных работ, необходимо изучить методику и правила ее безопасного выполнения, подготовить соответствующие материалы, приборы и реактивы.

7. Опыт необходимо проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях. Запрещается проводить в лаборатории какие-либо работы, не связанные непосредственно с выполнением учебных заданий.

8. При работе следует соблюдать тишину, экономить реактивы, электроэнергию, бережно относиться к оборудованию, мебели, посуде. Нельзя оставлять без присмотра

работающие установки, включенные электронагревательные приборы, спиртовки.

9. Запрещается бросать в раковину твердые предметы, бумагу, битое стекло, посуду, агар и т.п.

10. После окончания лабораторной работы студент обязан привести в порядок свое рабочее место: вымыть химическую посуду, протереть поверхность лабораторного стола, выключить нагревательные приборы. Лабораторию можно покидать после выполнения работы с разрешения лаборанта или преподавателя. Перед уходом рекомендуется вымыть руки с мылом.

Техника безопасности при работе в лаборатории

1. Перед проведением опыта необходимо проверить исправность оборудования. При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) необходимо обратиться к преподавателю.

2. Электроплитки при использовании должны стоять на теплоизолирующей, огнестойкой подставке (керамическая плита).

3. В опытах, требующих нагревания, необходимо пользоваться термостойкой посудой, имеющей соответствующую маркировку.

4. Запрещается пользоваться разбитой или треснувшей посудой.

5. Работы с едкими, токсичными и легкоиспаряющимися пахучими веществами необходимо выполнять только в вытяжном шкафу.

6. Не наклоняться над приборами, в которых идет нагревание, упаривание и т.п.

7. Запрещается вдыхать выделяющиеся при реакции газы и пары. Определяя вещество по запаху, не следует делать глубокого вдоха, а осторожно направлять к себе газ или пар рукой.

8. Концентрированные растворы (в первую очередь кислоты) при разбавлении водой всегда приливают к воде, а не наоборот.

9. Пролитые на пол и стол растворы кислот и щелочей вначале необходимо засыпать песком, который необходимо удалить после впитывания реактива, затем нейтрализовать и после чего убирать под руководством преподавателя или лаборанта в соответствии с правилами.

10. Концентрированные/отработанные растворы кислот и щелочей сливают в специальную посуду. Запрещено сливать в раковины и канализацию!

11. При попадании едких веществ на кожу необходимо: если попала **кислота** - промыть пораженный участок водопроводной водой и нейтрализовать слабым раствором пищевой соды; если **щелочь** - промыть пораженный участок водопроводной водой и обработать 3-5% раствором уксусной кислоты.

12. Химические реактивы следует брать шпателем, ложечкой или пинцетом (но не руками!).

13. При отборе жидкостей пипетками используют груши или специальные пипеточные насадки (фингеры). Запрещается засасывание жидкости в пипетки ртом! При переливании растворов необходимо использовать специальные химические воронки.

14. Опасные продукты реакции и отходы сливают только в соответствующие банки в вытяжном шкафу или нейтрализуют.

15. Неизрасходованные реактивы ни в коем случае не высыпают (не выливают) обратно в материальные склянки, а сдают лаборанту.

16. Обо всех произошедших нештатных ситуациях необходимо сообщить преподавателю, лаборанту.

Требования к оформлению отчета

Работа принимается к защите при наличии конспекта и заполненных таблиц, наблюдений и выводов.

Форма отчета

Тема

Цель эксперимента.

Ход работы/краткое описание выполнения работы.

Полученный результат, оформленный в виде текста, таблиц, графиков.

Анализ полученных результатов в виде выводов.

Тема Белки и аминокислоты

Качественные реакции на белки и аминокислоты

Белками называют высокомолекулярные полимерные органические соединения, в состав которых в качестве структурных единиц входят α -L-аминокислоты.

В молекуле белка аминокислоты между собой соединяются пептидными связями ($-\text{CO}-\text{NH}-$), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между карбоксильной ($-\text{COOH}$) группой одной аминокислоты и аминогруппой ($-\text{NH}_2$) другой, согласно генетической информации, закодированной в ДНК, и называется *первичной структурой* белка.

По причине неравномерного распределения заряда вдоль первичной полимерной последовательности происходит формирование закрученных α -спиралей или складчатых структур (параллельные и антипараллельные β -структуры), которые стабилизируются за счет образования водородных связей. Подобная конформация белка называется *вторичной структурой*.

В результате дальнейшего взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков полипептидных последовательностей возникает *третичная структура*. Взаимодействие между отдельными вторичными и третичными структурами может приводить к формированию *четвертичной структуры* белка.

Белки условно можно разделить на две группы: простые и сложные. К *простым* относятся белки, состоящие только из аминокислот. Кроме полипептидной цепи в состав *сложных* белков могут быть включены липиды (липопротеиды), углеводы (гликопротеиды), нуклеиновые кислоты (нуклеопротеиды), различные низкомолекулярные органические и неорганические соединения (фосфорная кислота и ее остатки, ионы металлов, липоевая кислота и др.).

Для обнаружения белка в растворах можно использовать цветные реакции, основанные на выявлении специфических групп и пептидных связей аминокислот в белке. Среди цветных реакций выделяют универсальные на все белки (биуретовая и нингидриновая), и специфические – только на определенные аминокислоты (ксантопротеиновая, Миллона, Фоля и др.). По причине того, что некоторые реакции характерны не только для белков, но и для других соединений, включающих те же функциональные группы, для установления природы полипептидной цепи одного типа реакции будет не достаточно.

Второй тип реакций – реакции осаждения применяются для изучения свойств белков, очищения растворов от белка, разделения отдельных белковых фракций на альбумины и глобулины, и др.

Работа № 1. Получение растворов белков

Материалы и оборудование: колбы на 50-100 мл, мерные цилиндры на 50 мл, воронка, фильтр, весы, неразбавленный белок куриного яйца, мука бобовых растений (гороховая, соевая, бобовая), 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

1.1. Получение раствора растительного белка

Ход работы: 3 г муки бобовых растений насыпать в колбу и залить 20 мл 10% раствора сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Колбу закрыть пробкой, осторожно взбалтывать 3 минуты и оставить на 20-30 минут для экстракции белка в раствор. Затем раствор отфильтровать через смоченный сульфатом аммония фильтр.

В полученном коллоидном растворе будет находиться глобулин, с которым далее можно проводить различные реакции.

1.2. Получение раствора животного белка – яичного альбумина

Ход работы: Белок одного куриного яйца отделяют от желтка и смешивают в колбе с двадцатикратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через вату. В отфильтрованной фракции будет находиться раствор яичного альбумина, а в осадке останется яичный глобулин. Учитывая, что концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%, полученный разбавленный раствор яичного альбумина является приблизительно 0,3 %.

Работа № 2. Качественные реакции

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, фингеры, растворы растительного и животного белка, полученные в работе 1, 1% желатин, концентрированные, серная, азотная и уксусная кислоты, 5% уксуснокислый свинец, концентрированный аммиак, 10% NaOH, 2% CuSO₄, 0,5% нингидрин в 95% ацетоне, 1% сульфаниловая кислота в 5% растворе соляной кислоты, 0,5% нитрит натрия (NaNO₂), 10% карбонат натрия (Na₂CO₃), 0,1% α-нафтола (100 мг α-нафтола в 100 мл 70% этанола), 5% раствор гипобромида натрия, 40% мочевины.

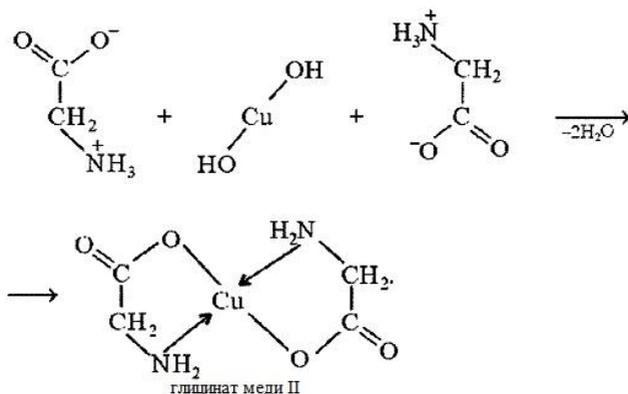
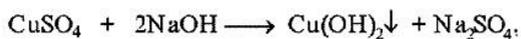
Растворы сульфаниловой кислоты и нитрита натрия хранят в холодильнике перед использованием.

2.1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

Эта реакция получила название от биурета, который образуется при нагревании мочевины.

Биурет дает в щелочной среде с сернокислой медью комплексное соединение, окрашенное в розоватый цвет. Биуретовая реакция получается с несколькими иными оттенками не только с биуретом, но и с другими веществами, содержащими

не менее двух пептидных связей. К таким веществам относятся все белки, а также полипептиды, начиная с некоторых трипептидов. Реакция обусловлена присутствием в белке пептидных связей, которые с ионами меди образуют окрашенные комплексные соединения.



Окраска биуретового комплекса зависит от количества медной соли в растворе и от длины полипептида, с которым связан ион меди. Продукты неполного распада белка дают биуретовую реакцию с красным оттенком, а белки – с фиолетовым. В биуретовой реакции участвуют и некоторые аминокислоты – гистидин, серин и треонин.

Ход работы. Подготовить две пробирки: в одну налить – 1 мл раствора яичного белка, в другую – 1 мл раствора растительного белка. В обе пробирки прилить по 1 мл 10% NaOH и несколько капель CuSO₄. Образующийся осадок гидрата меди в присутствии белка растворяется и окрашивает раствор в фиолетовый цвет.

2.2. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)

При нагревании растворов большинства белков с концентрированной азотной кислотой происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета. Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана, которые содержатся почти во всех белках. При добавлении щелочи желтый цвет переходит в оранжевый, обусловленный образованием аммонийной соли динитротирозина.



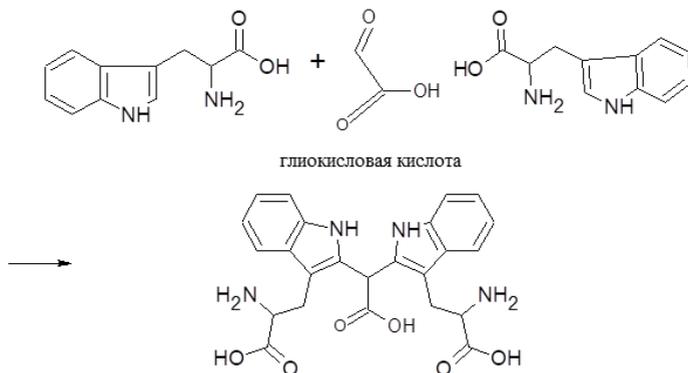
Белки, в которых отсутствуют циклические аминокислоты, ксантопротеиновой реакции не дают. К таким белкам относят желатин, клупеин (белок, содержащийся в молоках или икре сельди), сальмин (белок, содержащийся в молоках семги) и т.д.

Ход работы. Подготовить две пробирки: в первую налить – 1 мл раствора яичного белка, во вторую – 1 мл раствора растительного белка. Затем в каждую пробирку прибавить 5-6 капель концентрированной азотной кислоты. В пробирках появляются осадки свернувшегося под влиянием кислоты белка, который окрашивается при нагревании в желтый цвет.

После охлаждения в каждую пробирку добавляют осторожно по каплям концентрированный раствор аммиака до появления ярко-желтой окраски.

2.3. Реакция Адамкевича

Если к раствору белка добавить концентрированную уксусную кислоту, а затем осторожно по стенке пробирки приливать по каплям концентрированную серную кислоту, то на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Реакция обусловлена наличием в белке триптофана, который, реагируя с глиоксиловой кислотой, находящейся в виде примеси в концентрированной уксусной кислоте, дает окрашенные продукты конденсации. Концентрированная серная кислота участвует в реакции в качестве водоотнимающего вещества.

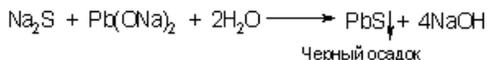
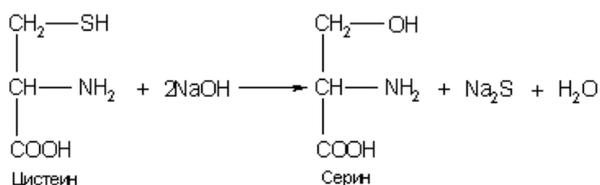


Ход работы. Подготовить три пробирки: в первую налить – 1 мл яичного раствора, во вторую – 1 мл раствора растительного белка, в третью – 1 мл желатина. Затем в каждую пробирку прилить по 1 мл концентрированной уксусной кислоты, и, сильно наклонив пробирки, очень осторожно по каплям добавить по 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешались. В первых двух пробирках на

границе двух слоев жидкости появляется красно-фиолетовое кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость. При нагревании в кипящей бане окраска развивается быстрее.

2.4. Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фолья)

При прибавлении к белку едкой щелочи, уксуснокислого свинца и кипячении раствор начинает темнеть. Это объясняется тем, что щелочь разрушает цистеин и отщепляет серу от белка в виде щелочного сульфида, который при добавлении уксуснокислого свинца образует черный сернистый свинец. Серосодержащая аминокислота метионин более устойчива, и при слабом щелочном гидролизе не разрушается.

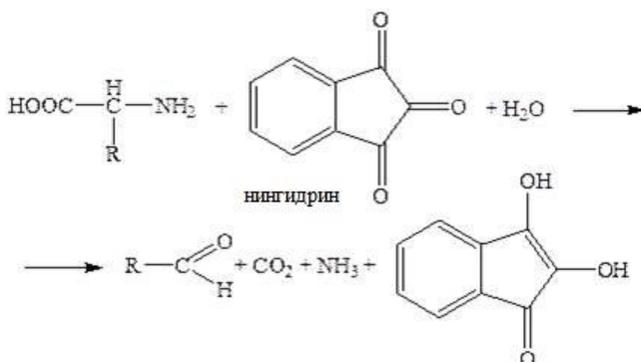


Ход работы. В пробирки налить: в первую – 1 мл яичного раствора, во вторую – 1 мл раствора растительного белка. В каждую пробирку прибавить 2 мл 10% NaOH, затем прилить несколько капель 5% уксуснокислого свинца и нагревать 1-2 минуты. После чего жидкость темнеет во всех пробирках, и через несколько минут выпадает черный осадок сернистого свинца.

2.5. Нингидриновая реакция – реакция на α-аминокислоты.

Если к раствору белка прибавить 0,5% ацетоновый раствор нингидрина и подогреть, то появляется сине-фиолетовое окрашивание вследствие взаимодействия двух молекул нингидрина с аминокислотой.

Аминокислота, реагируя с нингидрином, превращается в аммиак, CO₂ и альдегид.



Освобождающийся аммиак взаимодействует с другой молекулой нингидрина и дает окрашенный в сине-фиолетовый цвет продукт – пурпурный пигмент, имеющий максимум поглощения при 580 нм.



При реакции диазобензосульфоновой кислоты с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета.

Ход работы. В две пробирки налить: по 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% соляной кислоте и по 2 мл 0,5% нитрита натрия. В первую пробирку немедленно прибавить 2 мл яичного раствора, в другую – 2 мл раствора растительного белка. После перемешивания содержимого в каждую пробирку прилить по 6 мл 10% карбоната натрия. После смешивания растворов появляется вишнево-красное окрашивание в результате образования 2,5-Бис-*n*-сульфобензолазогистидина. При наличии в белке тирозина возникает менее интенсивное окрашивание.

2.7. Реакция на аргинин и другие монопроизводные гуанидина (реакция Сакагучи)

Реакция Сакагучи является качественной реакцией на аргинин, гуанидиновая группировка которого, в присутствии α -нафтола окисляется гипобромидом в щелочной среде с образованием продукта конденсации розово-красного цвета.

Ход работы. Подготовить две пробирки: в первую налить – 1 мл яичного раствора, в другую – 1 мл раствора растительного белка. В каждую пробирку с белком прилить 1 мл 10% раствора щелочи, 3 капли раствора α -нафтола, тщательно перемешать и добавить 3 капли 5% водного раствора гипобромид натрия (или NaClO) и снова перемешать. Для стабилизации быстро развивающегося красного окрашивания необходимо немедленно влить 1 мл 40% раствора мочевины.

Задание: записать результаты наблюдений в таблицу (согласно образцу) и сделать вывод. Сравнить изучаемые белки по содержанию той или иной аминокислоты.

Таблица 1

Качественные реакции на аминокислоты

Наименование реакции	Качественная реакция на...	Ход работы	Наблюдения
1.Биуретовая реакция	пептидную связь	1 мл белка + 1 мл 10% NaOH + несколько капель CuSO ₄	а – б –
2.Ксантопротеиновая реакция и др.			а – б –

Примечание: а – яичный белок, б – растительный белок, в – желатин.

Работа № 3. Определение аминокислот методом хроматографии

Для качественного и количественного определения веществ широко используются хроматографические методы. Хроматографический метод впервые был предложен М.С. Цветом и примерен для разделения пигментов листа на колонках с адсорбентом. Различная адсорбируемость пигментов на инертном веществе колонки дала возможность их разделения и изучения свойств. Метод хроматографии на бумаге является модификацией метода, предложенного М.С. Цветом.

Принцип хроматографии на бумаге основан на различии значений коэффициентов распределения веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Одной из фаз обычно является вода, другой – какой-нибудь органический растворитель, лишь частично смешивающийся с водой. Водная фаза является неподвижной, т.к. вода прочно удерживается бумагой или другим инертным материалом, так называемым носителем, тогда как органический растворитель является подвижной фазой. Когда растворитель протекает через участок бумаги, на который были нанесены разделяемые вещества, то происходит распределение этих веществ между подвижной и неподвижной фазами. В результате пятно нанесенной на старт

смеси размывается, и вещества передвигаются на хроматограмме в направлении тока подвижной фазы.

Скорость продвижения веществ на бумаге и расположение на ней зависит от соотношения концентраций веществ в данных фазах. Это соотношение называется коэффициентом распределения (K) и выражается следующим уравнением:

$$K = \frac{\text{концентрация веществ в неподвижной фазе}}{\text{концентрация веществ в подвижной фазе}}$$

Чем меньше K , тем больше будет скорость движения веществ на бумаге. Поэтому вещества, отличающиеся друг от друга по коэффициенту распределения в применяемых фазах, хотя бы незначительно будут разделяться на хроматограммах. Величиной, характеризующей данное вещество по скорости продвижения, является величина Rf (*Retention factor* – фактор удерживания).

$$Rf = \frac{\text{расстояние, пройденное растворенным соединением}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}}$$

В стандартных экспериментальных условиях эта величина для данного соединения является постоянной. Значение Rf варьирует от ряда условий, среди которых основными являются чистота исследуемого вещества, чистота растворителя, стабильность температуры, качество бумаги, однотипность аппаратуры, степень насыщенности парами растворителя и т.д. Величину Rf для любого вещества можно легко определить, т.к. расстояние, пройденное данным соединением и фронтом растворителя, можно измерить на хроматограмме.

Коэффициент распределения и коэффициент Rf тесно связаны между собой. Чем ниже коэффициент распределения, тем выше будет величина Rf и наоборот.

Хроматографирование на бумаге проводят восходящим и нисходящим способами. В обоих случаях растворитель наливают на дно герметичной камеры для насыщения

атмосферы парами растворителя и лишь затем, помещают в камеру бумагу.

При восходящей хроматографии бумажную полосу либо погружают в растворитель вертикально, например, свернув её трубкой, либо подвешивают таким способом, чтобы нижний конец полосы бумаги был погружен в растворитель. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы с образцом, нанесённым недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, находящемся в верхней части камеры, а нижний конец бумаги спускают вниз так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Перед началом хроматографирования лоток заполняют растворителем. При нисходящем способе растворитель продвигается по бумаге сверху вниз, а при восходящем – снизу вверх. Чаще применяют восходящую хроматографию из-за простоты, однако скорость движения растворителя при нисходящей хроматографии гораздо выше, чем при восходящей.

Хроматограммы могут иметь форму прямоугольников, длинных полос, круга. Исследуемые вещества наносятся в одну точку или в отдельные точки вдоль линии «старта», в виде полосы (в зависимости от формы хроматограммы и других причин). Вещества наносят, используя метод накапливания, т.е. концентрирования вещества. Для этого нанесённая капля или тонкая полоска смеси веществ подсушиваются, затем в ту же точку или полоску вторично наносится смесь и т.д. Диаметр капли не должен превышать 0,5 см.

Исследуемый раствор наносят при помощи микропипеток с оттянутым носиком, металлических петель. Для идентификации веществ необходимо иметь набор свидетелей, то есть чистые растворы индивидуальных веществ. Совпадение положения пятен свидетелей и смеси веществ указывают на тождество сравниваемых веществ.

Процесс разделения веществ производят в специальной камере с растворителем, куда помещают подготовленные хроматограммы. После разделения веществ хроматограммы

вынимают из камер и подсушивают, затем проявляют, используя цветные реакции на те или другие вещества. В некоторых случаях для обнаружения пятен пользуются различной флюоресценцией вещества в ультрафиолетовом свете.

Материалы и оборудование: хроматографические столики, вентиляторы, микропипетки, ножницы, линейки, простые карандаши, хроматографическая бумага, крышки от чашек Петри, растворитель (n-бутанол / уксусная кислота / вода в соотношении 4:1:5, смесь готовят перед употреблением); 0,5% нингидрин в подкисленном ацетоне (1 мл ледяной уксусной кислоты на 100 мл ацетона); 0,1% растворы различных аминокислот, подкисленных HCl, набор смесей 0,1% растворов аминокислот.

Ход работы.

1. *Подготовка хроматограмм.* Из хроматографической бумаги (лучше быстрой или средней) вырезать 2 круга, каждый из которых диаметром на 1 см больше диаметра камеры (в качестве упрощенной камеры используют две одинаковые крышки от чашек Петри). От края круга к центру вырезать полоску шириной в 1 см (Рис. 1 А), отрезать часть, а оставшийся язычок отогнуть (длина язычка должна быть равна высоте сосуда с растворителем).

2. *Нанесение пробы на хроматограммы.* Полученную хроматограмму поместить на хроматографический столик так, чтобы центр круга находился в прорези стола. На хроматограмму №1 нанести раствор одной известной аминокислоты методом накапливания в одной точке на линию отгиба в центре круга. Для качественного определения аминокислот достаточно нанести не более 4-5 капель (0,02-0,04 мл). На хроматограмму №2 нанести способом, описанным выше исследуемую смесь аминокислот.

3. *Подготовка камер.* Подготовить камеры, для этого в половину чашек Петри налить растворитель (смесь н-бутилового спирта, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5). Готовые хроматограммы поместить в камеры, при этом края каждой должны опираться на стенки камеры (крышка от чашки Петри), а язычок опущен в растворитель. Сверху камеру закрыть второй крышкой от чашки Петри так, чтобы края обеих крышек совпали и зажали расположенную между ними хроматограмму. Когда фронт растворителя дойдет до краев камеры, необходимо вынуть хроматограммы, отметить карандашом фронт растворителя и высушить в вытяжном шкафу.

4. *Проявление хроматограмм.* Для этого подсушенную хроматограмму опрыскать из пульверизатора или погрузить в проявитель (0,5% ацетоновый раствор нингидрина, подкисленный уксусной кислотой). После обработки проявителем хроматограмму вновь подсушить в вытяжном шкафу, а затем поместить в сушильный шкаф при температуре 80-90 °С на 5-10 мин. При этом между аминокислотами и нингидрином идёт реакция с образованием продукта синевioletового цвета (см. работу № 2.5.).

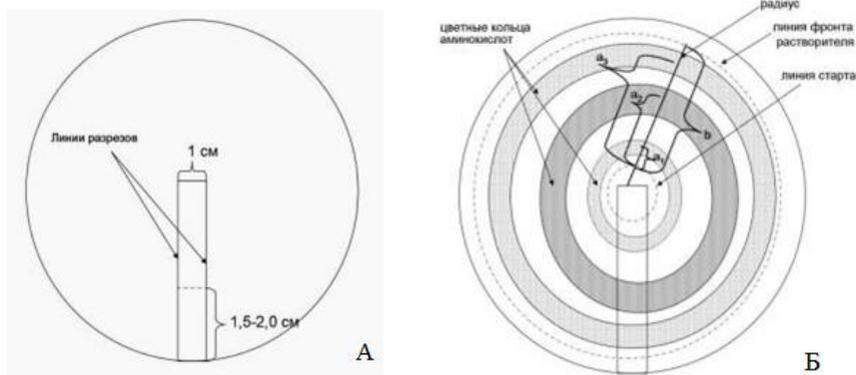


Рис. 1. А – подготовка хроматографической бумаги, Б – хроматограмма после проявления

Интенсивность окраски пропорциональна содержанию аминокислот. Все аминокислоты и пептиды, содержащие свободную α -аминогруппу, дают с нингидрином сине-фиолетовую окраску. Пролин и оксипролин, содержащие замещённые α -аминогруппы, образуют с нингидрином производные несколько иного строения, окрашенные в желтый цвет.

После проявления аминокислот нингидрином на круговых хроматограммах обнаруживают окрашенные пятна по числу взятых аминокислот (Рис. 1 Б). Для вычисления значения R_f определяют расстояние от старта до фронта растворителя и от старта до середины каждого пятна аминокислот на одной и той же прямой линии, проведенной от старта до фронта растворителя. Путь в миллиметрах, пройденный веществом, делят на расстояние, пройденное растворителем.

Задание: на хроматограмме №1 подсчитать R_f пятна одной известной аминокислоты – свидетеля/маркера, на хроматограмме №2, где нанесена смесь аминокислот, подсчитать значение R_f для всех пятен. Используя данные R_f других свидетелей, необходимо идентифицировать имеющиеся в смесях аминокислоты.

Физико-химические свойства белков

Стабильность белковых растворов обусловлена двумя основными факторами: наличием заряда белковой молекулы и гидратной оболочки вокруг нее, которая обусловлена зарядом. Устранение этих факторов приводит к осаждению белка из раствора. Реакции осаждения белков делят на две группы: обратимые и необратимые.

Необратимые реакции осаждения приводят к денатурации белков, при этом разрушается пространственная структура молекулы и белки утрачивают свои естественные биологические и физико-химические свойства. Денатурацию белков можно

вызвать физическими воздействиями (кипячение, замораживание, высокое давление, вибрация, радиоактивное излучение и др.) и химическими осадителями.

При обратимых реакциях осаждения молекулы белка не подвергаются глубоким изменениям (разрушаются четвертичная и до 30% третичной структуры), сохраняют свои нативные (первоначальные) свойства и полученные осадки можно вновь растворить в первоначальном растворителе. К названным реакциям относят: осаждение белков этанолом и ацетоном при температуре минус 3-5 °С, высаливание (осаждение белков нейтральными солями – NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄ и др.

Реакции осаждения применяют для обнаружения белка в растворе, получения безбелковых фильтратов (например, при определении сахаров в молоке или крови), выделения из раствора отдельных групп белков (фракционирования белков).

Работа № 4. Реакции осаждения белков в различных условиях

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, фингеры, электроплитка, водяная баня, раствор яичного белка, 1% уксусная кислота, 10% гидроксид натрия, 1% сульфат меди, 5% ацетат свинца, концентрированные азотная, серная, соляная кислоты, 10% сульфосалициловая кислота, 10% трихлоруксусная кислота, 10% пикриновая кислот, 1% гексациано-(III)-феррат калия, насыщенный раствор хлорида натрия, этанол.

4.1 Осаждение белков при нагревании

При нагревании раствора белка до 60-70°С происходит, как правило, выпадение белка в осадок. Это связано с глубокими нарушениями структуры белковой молекулы. Важную роль в осаждении денатурированного белка играет концентрация водородных ионов (рН). Наиболее полное и быстрое осаждение

происходит в изоэлектрической точке белка. В сильноокислых и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как молекулы белка несут в первом случае положительный, а во втором – отрицательный заряд.

Ход работы. В пять пробирок налить по 1 мл раствора яичного белка (альбумин яиц – кислый белок и в нейтральной среде имеет отрицательный заряд).

Содержимое первой пробирки нагреть до появления опалесценции (помутнения раствора).

К раствору белка во второй пробирке осторожно добавить 2-3 капли 1% уксусной кислоты, нагреть и пронаблюдать вначале появление опалесценции, а затем выпадение белого хлопьевидного осадка белка. (Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии).

К раствору белка в третьей пробирке добавить 1 мл 1% уксусной кислоты и нагреть. (Осадок не образуется, так как в кислой среде частицы белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд).

К раствору белка в четвертой пробирке добавить 1-2 капли 1% уксусной кислоты, и 5 капель насыщенного хлорида натрия и нагреть. (Выпадает осадок вследствие адсорбции ионов электролита (образование двойного электрического слоя) и нейтрализации заряда на частицах белка).

К раствору белка в пятой пробирке добавить 3 капли 10% гидроксида натрия и нагреть. (Осадок не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается).

Задание: результаты опыта оформить в виде таблицы, сделать вывод.

Осаждение белков при нагревании

Температурный режим	Используемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция?

4.2. Осаждение белков солями тяжёлых металлов

Ионы тяжелых металлов при взаимодействии с белками (особенно с группами SH) образуют нерастворимые в воде комплексы. Белок при этом подвергается денатурации.

Ход работы. В две пробирки налить по 1 мл раствора белка и добавить: в первую пробирку прилить – 0,6 мл 1% сульфата меди (образуется бледно-голубой осадок нерастворимый в воде), во вторую 0,6 мл 5% ацетата свинца (образуется осадок нерастворимый в воде). Далее во вторую пробирку добавить по каплям растворитель (5% ацетат свинца) до полного растворения осадка.

4.3. Осаждение белков кислотами

Концентрированные минеральные и некоторые органические кислоты вызывают денатурацию белковых молекул. Кроме того, минеральные кислоты дегидратируют молекулы белка.

1. Осаждение белков минеральными кислотами

Ход работы. В пробирку осторожно налить около 1 мл концентрированной азотной кислоты. Затем, наклонив пробирку, медленно по стенке добавить 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок в виде белого кольца, не растворяющийся в избытке кислоты. Пробу повторить с концентрированной серной и соляной кислотами.

При этом образуются осадки, которые растворяются при добавлении избытка растворителя.

2. Осаждение белков некоторыми органическими кислотами.

Ход работы. В 2 пробирки налить по 2 мл раствора белка и добавить в одну пробирку 4-5 капель 10% сульфосалициловой кислоты, в другую – 5-10 капель 10% трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

4.4. Осаждение белка алкалоидными реактивами

Ход работы. В 2 пробирки налить по 2 мл раствора белка и добавить в одну пробирку 4-5 капель 1% уксусной кислоты и прилить 0,5 мл 10% пикриновой кислоты. Во вторую пробирку добавить 2-3 капли 1% гексациано-(III)-феррата калия. Пронаблюдать выпадение осадка.

4.5. Осаждение белков органическими растворителями

Ход работы. К 2 мл раствора белка добавить 2 мл органического растворителя (96% этанол) и перемешать, через несколько минут выпадает осадок белка. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия. При добавлении охлажденной воды спирт разбавляется и происходит растворение белка.

Задание: результаты работы по осаждению белков различными реактивами (4.2-4.5) занести в таблицу, сделать вывод.

Осаждение белков различными реактивами

Название группы веществ	Используемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция

Работа № 5. Обратимое осаждение белков (высаливание)

При добавлении к водным растворам белков сульфатов или хлоридов щелочных и щелочно-земельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 и др.) происходит дегидратация коллоидных частиц белка с одновременной нейтрализацией заряда, при этом белки выпадают в осадок без изменения нативной структуры. Такой тип осаждения белков называется высаливанием. Высаливание – обратимый процесс, и после удаления соли (разбавлением водой, диализом) белок вновь приобретает природные свойства. Поскольку разные белки высаливаются при различных концентрациях солей, этот метод используется для фракционирования белков.

Для разделения белков методом высаливания широко применяется сульфат аммония, так как его концентрированные растворы высаливают из нейтральных растворов почти все белки. Глобулины, являясь высокомолекулярными белками, выпадают из раствора при полунасыщении серноокислым аммонием. Альбумины выпадают из растворов при добавлении кристаллического серноокислого аммония, начиная с 65% и до полного насыщения.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, фингеры, воронки, фильтры, раствор яичного белка, неразбавленный яичный белок, 1% уксусная кислота, кристаллический хлористый натрий, кристаллический

серноокислый магний, дистиллированная вода, насыщенный раствор серноокислого аммония, кристаллический серноокислый аммоний, концентрированная азотная кислота.

5.1. Высаливание белков хлористым натрием и серноокислым магнием

Ход работы. В 2 пробирки налить по 3 мл раствора белка и добавить: в первую пробирку тонкоизмельченный хлористый натрий до насыщения, во вторую серноокислый магний. После появления осадка (глобулины) содержимое пробирок отфильтровать. В фильтрате остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок. К фильтрату добавить несколько капель 1% раствора уксусной кислоты, пронаблюдать выпадение в осадок альбуминов.

5.2. Высаливание белков серноокислым аммонием

Ход работы. В пробирку с 1 мл неразбавленного белка налить 5 мл дистиллированной воды, при этом образуется белый хлопьевидный осадок (глобулины). Далее в пробирку по каплям добавить насыщенный раствор серноокислого аммония, после чего происходит растворение выпавшего глобулина. К полученной смеси прилить 6 мл насыщенного раствора серноокислого аммония, после чего происходит выпадение осадка глобулинов. Осадок отфильтровать, и в полученный фильтрат добавить кристаллический серноокислый аммоний до полного насыщения, пронаблюдать выпадение осадка (альбумины). Полученный осадок отфильтровать, и с фильтратом провести пробу на полноту осаждения белка с концентрированной азотной кислотой (ксантопротеиновая реакция).

Задание: результаты опытов занести в таблицу, сделать вывод.

Таблица 4

Высаливание белков

Наименование фракции белка	Употребляемая соль	Степень насыщения	Реакция среды	Наличие осадка (+/-)

Определение содержания белка в растворе и изоэлектрической точки белков

Работа № 6. Определение изоэлектрической точки белка

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, молекулы которых построены из аминокислот, соединенных друг с другом посредством пептидной связи. Свойства белков зависят главным образом от числа пептидных групп, состава аминокислот и их последовательности в пептидной цепочке. Белки являются электролитами, поскольку входящие в их состав ионогенные группы – основные ($-\text{NH}_2$) и кислотные ($-\text{COOH}$) – способны к диссоциации. В зависимости от реакции среды белок отщепляет различные группировки и приобретает либо положительный, либо отрицательный заряд. Такие электролиты называются амфолитами.

При некоторых значениях рН процесс отщепления групп H^+ и OH^- протекает с одинаковой интенсивностью, макромолекулы белка в этом случае электронейтральны, т. е. находятся в изоэлектрическом состоянии и обладают особыми свойствами. Значения рН, соответствующие изоэлектрическому состоянию, называются изоэлектрической точкой белка и для большинства природных белков лежат в слабокислой области ($\text{pH} = 4,5-5,4$). В этом состоянии для белка характерна минимальная

электропроводность, склонность к коагуляции, максимальная способность к адсорбции и ряд других особых свойств. При смешивании раствора белка с буферной смесью, рН которой соответствует ИЭТ, частицы белка изменяют свой заряд, становятся электронеутральными и, следовательно, неустойчивыми в растворе. Добавление водоотнимающих средств, например спирта, ацетона вызывает дегидратацию белковых частиц и способствует выпадению белка в осадок.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, фингеры, 0,1 н раствор уксусной кислоты, 0,1% раствора казеина в 0,1 н растворе ацетата натрия (0,2 г казеина растворяют при нагревании в 5 мл 0,1 н раствора ацетата натрия и доводят в мерной колбе до объема 200 мл раствором ацетата натрия), 0,2 М Na_2HPO_4 , 0,1 М лимонная кислота, 1% желатин, 96% этиловый спирт, дистиллированная вода.

Ход работы. В пять пронумерованных пробирок налить 0,1 н раствор уксусной кислоты и воды в количествах, указанных в таблице 5 (Табл.5).

Таблица 5

Определение изоэлектрической точки казеина

№ пробирки	Количество 0,1 н раствора уксусной кислоты, мл	Количество воды, мл	Количество 0,1% раствора казеина, мл	рН смеси	Степень мутности +/-
1	0,25	8,75	1	5,3	
2	0,50	8,50	1	5,0	
3	1,00	8,00	1	4,7	
4	2,00	7,00	1	4,4	
5	4,00	5,00	1	4,1	

Далее в каждую пробирку с помощью пипетки прилить по 1 мл 0,1% раствора казеина в ацетате натрия и наблюдать за степенью помутнения раствора. Отсутствие помутнения

отмечают знаком «-», наличие и степень помутнения - одним или двумя «+». В пробирке, где отмечено максимальное помутнение, pH раствора соответствует изоэлектрической точке белка.

Сходным образом с использованием данных таблицы 6 (Табл. 6) определить изоэлектрическую точку желатина.

Таблица 6

Определение изоэлектрической точки желатина

№ пробы	Количество 0,2 М Na ₂ HPO ₄ , мл	Количество 0,1 М лимонной кислоты, мл	Количество 1% желатина, мл	Количество этилового спирта, мл	pH смеси	Степень мутности +/-
1	0,25	0,75	0,5	2,0	3,2	
2	0,34	0,66	0,5	2,0	3,7	
3	0,41	0,59	0,5	2,0	4,2	
4	0,48	0,52	0,5	2,0	4,7	
5	0,54	0,46	0,5	2,0	5,2	
6	0,66	0,34	0,5	2,0	5,7	

Задание: результаты занести в таблицы 5 и 6. Оформить выводы по проделанной работе.

Работа № 7. Количественное определение содержания белка биуретовым методом

Самым распространенным химическим методом количественного определения белка является колориметрический метод. Он основан на изменении интенсивности цветных реакций. Биуретовый метод основан способности пептидной группы – CO–NH– образовывать с сульфатом меди в щелочной среде окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых зависит от длины полипептидной цепи и, значит, от концентрации белка.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, дистиллированная вода, 1% бычий сывороточный альбумин (10 мг в мл), биуретовый реактив (0,75 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 3 г калия-натрия виннокислого $\text{NaK}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, затем при энергичном помешивании добавляют 150 мл 10% NaOH и 1 г KJ , объем раствора доводят до 1 литра), фотоэлектроколориметр, кварцевые кюветы, раствор яичного белка неизвестной концентрации (1-2%), миллиметровая бумага.

Ход работы. Необходимо построить калибровочную кривую, для этого в 10 пробирок добавить 1% раствор альбумина и воду в количествах, указанных в таблице 7 (Табл.7), и далее 4 мл биуретового реактива.

Таблица 7

Схема опыта

	Но- мер про- бы	Содержан ие белка в пробе, мг/мл	1% р-р альбу- мина, мл	Вод а, мл	Объем р-ра в пробирк е, мл	Биуретовы й реактив, мл	Оптическ ая плотность р-ов, E
Контроль		-	-	1,0	1	4	
Калибровочная шкала	1	1	0,1	0,9	1	4	
	2	2	0,2	0,8	1	4	
	3	3	0,3	0,7	1	4	
	4	4	0,4	0,6	1	4	
	5	5	0,5	0,5	1	4	
	6	6	0,6	0,4	1	4	
	7	7	0,7	0,3	1	4	
	8	8	0,8	0,2	1	4	
	9	9	0,9	0,1	1	4	
	10	10	1,0	0	1	4	
Опыт		?	-	0	1	4	

В качестве контрольной пробы вместо раствора белка смешать 1 мл дистиллированной воды и 4 мл биуретового реактива. Для подготовки опытного образца к 1 мл раствора, содержащего от 1 до 10 мг белка, добавить 4 мл биуретового реактива. Все пробы перемешать и оставить при комнатной температуре на 30 мин. По истечении указанного времени пробы поместить в кюветы шириной 1 см и провести измерения оптической плотности растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 540-650 нм против контроля.

По полученным результатам построить калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от концентрации белка. Для этого на миллиметровой бумаге на оси абсцисс откладывают количество белка в стандартах (мг/мл), а на оси ординат – соответствующие величины оптической плотности E (Рис. 2).

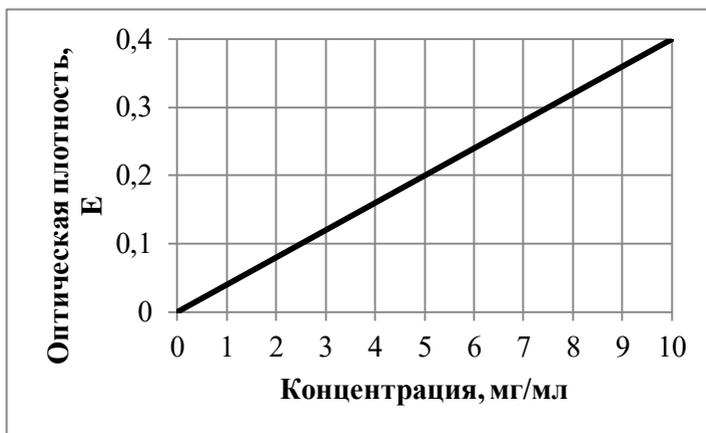


Рис. 2. Калибровочный график для определения содержания белка

Правила работы на фотоэлектроколориметре КМК-2МП (ФЭК):

1. ФЭК необходимо прогреть в течение 20-30 мин перед началом работ при открытом кюветном отделении.

2. Установить необходимую длину волны ручкой 2 и подходящий светофильтр ручкой 5 (Рис. 3).

3. При работе с кюветами, кюветы брать аккуратно, только за ребрышки, таким образом, чтобы на пути прохождения луча излучателя не было отпечатков пальцев.

4. На кювете есть риска (черта), указывающая уровень до которого кювета должна быть наполнена исследуемым раствором,

т.е. мениск раствора должен находиться на уровне риски. Капли раствора, отпечатки пальцев, попавшие на грани кюветы, должны быть тщательно удалены с поверхности кусочком фильтровальной бумаги.

5. При открытом кюветном отделении нажать кнопку «Пуск», а затем кнопку «Ш0». Если прибор показывает значения от 0,05 до 0,9, то прибор настроен верно и на нём можно проводить измерения.

6. Открыть кюветное отделение. Поставить кювету с контролем в дальнее кюветное отделение, а опытную – в ближайшее к исследователю. Опытная проба содержит растворитель, краску, белок. Контроль белка не содержит.

7. Закрыть кюветное отделение. Рычаг переключения должен находиться в положении «К» – контроль. Нажать кнопку «К1». Должна загореться цифра 1.

8. Рычаг переключения кювет переставить в положение «О» – опыт. Нажать кнопку «Д5». Появится символ «5», означающий, что произошло измерение оптической плотности. Отсчет на цифровом табло справа от мигающей запятой соответствует оптической плотности исследуемого раствора.

9. Эти показания записать в тетрадь и далее использовать для вычисления концентрации белка в пробе.

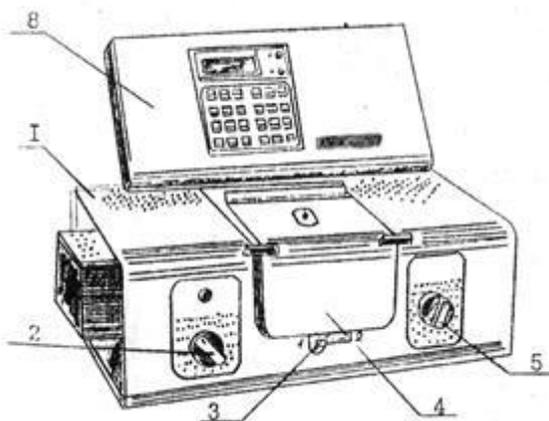
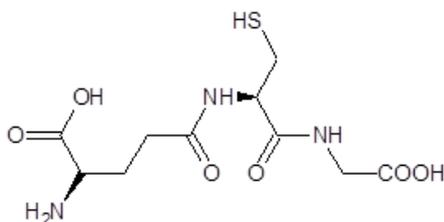


Рис. 3. Схематическое изображение ФЭК, где: 1 – корпус ФЭК, 2 – ручка выбора длины волны, 3 – рычаг переключения кювет, 4 – кюветное отделение, 5 – ручка выбора фильтра, 8 – дисплей.

Задание: рассчитать содержание белка в исследуемом растворе по калибровочному графику. Полученные результаты оформить в выводе, где указать количество белка в исследуемом растворе в следующих единицах: мг в 1 мл раствора, процентное содержание белка в растворе, количество альбумина на 1 куриное яйцо.

Работа № 8. Количественное определение глутатиона

Важную роль в клетках микроорганизмов, растений и животных играет внутриклеточный трипептид глутатион (γ -глутаминилцистеилглицин). Особенностью строения глутатиона является то, что пептидная связь между глутаминовой кислотой и цистеином образована γ -карбоксильной группой бокового радикала глутаминовой кислоты, что возможно в пептидах, но не встречается в молекулах белка:



Глутатион содержится в клетках крови, мышечной ткани, семенах растений, в дрожжевых и плесневых грибах. В биологических тканях он находится в восстановленной и окисленной формах, участвуя в регуляции окислительно-восстановительного состояния. Обладая высокой восстанавливающей активностью, глутатион легко окисляется, предохраняя от окисления другие жизненно важные вещества. Наряду с аскорбиновой кислотой, витамином Е и другими антиоксидантами глутатион входит в систему антиоксидантной защиты клеток.

Восстановление глутатиона катализирует фермент глутатионредуктаза, коферментом которой служит восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ·Н). На долю глутатиона в клетках приходится до 90 % активных низкомолекулярных тиоловых SH-групп. Восстановленная форма глутатиона повышает активность тиоловых ферментов, содержащих в активном центре SH-группу цистеина и, в частности, протеаз, имеющих важное значение в пищевых технологиях и применяемых при переработке пищевого сырья. При старении дрожжей количество глутатиона в них возрастает, а хлебопекарные качества снижаются, поэтому определение глутатиона в дрожжевых клетках может служить для оценки возраста и качества дрожжей.

Метод количественного вычисления глутатиона заключается в определении его восстановленной формы путем окисления SH-групп с помощью KJO_3 .

Материалы и оборудование: мерная колба на 50 мл, коническая колба на 100 мл, пипетки, воронка, бумажный фильтр, фарфоровая ступка с пестиком, дрожжи, 5% HPO_3 , 1,5% раствор KJ , 1% крахмал, насыщенный раствор NaCl (индикатор), 0,001 н. раствор KJO_3 , кварцевый песок, бюретка.

Ход работы. В ступке растереть 2 г дрожжей с кварцевым песком и при помощи дистиллированной воды количественно перенести в мерную колбу объемом 50 мл, доводя объем жидкости до метки. Полученный раствор настоять в течение 5 мин, после чего колбу сильно встряхивать в течение 2-3 мин и профильтровать смесь через бумажный фильтр.

В полученном фильтрате провести определение количества SH -групп и пересчитать на содержание восстановленного глутатиона: в коническую колбу пипеткой внести 10 мл фильтрата, затем добавить 1 мл 1,5% раствора KJ и 5 капель 1% крахмала. Полученный раствор протитровать 0,001 н. раствором KJO_3 до появления устойчивой синей окраски.

Формула для расчёта восстановленного глутатиона ($W_{(\text{GSH})}$):

$$W_{(\text{GSH})} = V_{(\text{KJO}_3)} \times 0,307 \times 250,$$

где $W_{(\text{GSH})}$ – содержание глутатиона в образце дрожжей, взятом на анализ в мг/100 г биологического материала; $V_{(\text{KJO}_3)}$ – объем йодата калия, пошедший на титрование; 250 – коэффициент, позволяющий учесть разведение раствора; 0,307 – титр раствора йодата калия по глутатиону.

Задание: рассчитать количественное содержание восстановленного глутатиона, сделать вывод.

Сложные белки

Фосфопротеины. К фосфопротеинам относятся белки, которые содержат в значительных количествах ортофосфорную кислоту, связанную с оксигруппой серина, реже треонина сложноэфирной связью. К фосфопротеинам относятся: казеин молока, вителлин яичного белка, ихтуллин икры рыб и некоторые другие. Они содержат 1-10% фосфора. Фосфопротеины составляют около 2% от общего количества всех сложных белков головного мозга.

Работа № 9. Извлечение казеина из молока

В молоке казеин содержится в виде кальциевой соли. При подкислении кальциевая соль разлагается, и казеин выпадает в осадок в свободном виде. Избыток кислоты мешает осаждению, так как при рН ниже изоэлектрической точки (изоэлектрическая точка казеина равна 4,7) молекулы белка перезаряжаются и казеин переходит в раствор. В состав казеина входит углеводный компонент, поэтому он является фосфогликопротеином.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки, бумажный фильтр, воронка, молоко, 1% NaOH, 10% уксусная кислота, центрифужные пробирки.

Ход работы: В пробирку внести 2 мл молока и 2 мл воды, а затем осторожно по каплям прибавить 10% раствор уксусной кислоты до выпадения осадка. Казеин выделяется в виде хлопьевидного осадка, который отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой 2-3 раза.

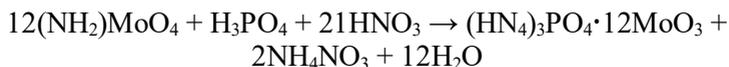
Можно получить промытый осадок казеина путем многократного центрифугирования с водой при 8 тыс. об/мин в течение 3-х минут.

Отмытый осадок казеина растворить в 1% растворе NaOH. Полученный раствор вновь фильтровать через бумажный фильтр или отцентрифугировать. С фильтратом или надосадочной жидкостью провести биуретовую реакцию.

Работа № 10. Определение остатка фосфорной кислоты в казеине

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, воронки, пробки со стеклянной трубкой, водяная баня, пинцет, лакмусовая бумага, порошок казеина, 10% NaOH, концентрированная азотная кислота, молибденовый реактив (15% раствор молибдата аммония смешивают с концентрированной азотной кислотой в соотношении 110:90).

Ход работы: Для доказательства наличия остатка фосфорной кислоты в казеине предварительно необходимо провести гидролиз в присутствии едкого натрия или калия. Для гидролиза 100 мг порошка казеина растворить в пробирке с 3 мл 10% раствора NaOH. Пробирку закрыть пробкой со стеклянной трубкой в качестве холодильника и кипятить в течение часа на водяной бане. Затем жидкости дать остыть и нейтрализовать ее концентрированной азотной кислотой (12-15 капель) до слабокислой реакции на лакмус. При этом выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белка (пептоны). После отстаивания жидкость профильтровать и провести молибденовую пробу на фосфорную кислоту, т.е. к 2 мл молибденового реактива прибавить 1 мл гидролизата и подогреть несколько минут на водяной бане. Выпадает небольшое количество осадка фосфорномолибденовокислого аммония лимонно-желтого цвета:



Гликопротеины. Гликопротеины (гликопротеиды) – это сложные белки, простетической группой которых являются углеводы. Углеводный компонент может содержать нейтральные сахара, аминосахара, уоновые кислоты и некоторые другие соединения. У некоторых гликопротеинов углеводная часть прочно связана с белком и легко от него отделяется. Простетические группы некоторых гликопротеинов могут встречаться в тканях и в свободном состоянии. К ним относятся мукополисахариды.

В состав мукополисахаридов помимо гексоз могут входить гексозамины (глюкозамин, галактозамин), гексуоновые (чаще всего глюкуроновая) кислоты, уксусная и серная кислоты и другие вещества.

В зависимости от состава различают кислые и нейтральные мукополисахариды. К кислым относятся гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты и гепарин.

В состав нейтральных мукополисахаридов входят нейтральные сахара (галактоза, манноза, L-фукоза), сиаловые кислоты. Нейтральные мукополисахариды входят в состав слизистых секретов – слюны, желудочного сока, содержатся в плазме крови, в гормонах и т. д.

Гликопротеины, в состав которых входят мукополисахариды, получили название мукопротеидов. К ним относятся муцины, входящие в состав многих тканей и особенно в большом количестве встречающиеся в хрящах, костной и соединительной ткани, слюне и т. д. Гликопротеины не растворимы в воде, хорошо растворимы в щелочах и осаждаются при подкислении.

Работа № 11. Выделение муцина из слюны и нафтоловая проба на углеводную группировку муцина (реакция Подобедова – Молиша)

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, центрифуга, центрифужные пробирки, воронки, бумажный фильтр, концентрированная уксусная кислота,

концентрированная серная кислота, 1% спиртовой раствор α -нафтола, стеклянные палочки.

Ход работы. В центрифужную пробирку собирать около 2 мл слюны и по каплям добавить концентрированную уксусную кислоту. Выпадает осадок муцина, труднорастворимый в избытке уксусной кислоты. Осадок отцентрифугировать в течение 3 минут при 7 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость слить, а осадок палочкой перенести из центрифужной пробирки в чистую стеклянную пробирку. К осадку добавить 2-3 капли 1% спиртового раствора α -нафтола, перемешать и по стенке осторожно наслоить 1-2 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев жидкости в пробирке постепенно появляется фиолетово-красное кольцо, вызванное образованием фурфурола в результате дегидратации моносахаридов под действием кислот.

Работа № 12. Доказательство наличия углевода в яичном альбумине

Альбумины относят к простым белкам, но в яичном альбумине был обнаружен углеводный компонент.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, раствор яичного альбумина, 1% спиртовой раствор α -нафтола, 1% спиртовой раствор тимола, концентрированная серная кислота.

Ход работы. В две пробирки налить по 2-3 мл разбавленного раствора яичного альбумина, прибавить в одну из них 0,5 мл 1% спиртового раствора α -нафтола, в другую пробирку добавить такой же объем 1% спиртового раствора тимола и хорошо перемешать. В обе пробирки осторожно по стенке наслоить концентрированную серную кислоту. В первой пробирке при стоянии на границе растворов наблюдают фиолетовое, а во второй – красное кольцо. Окрашенные кольца возникают за счет

реакции фурфурола (образуется при взаимодействии кислоты с углеводной частью белка) с α -нафтолом или тимолом.

Работа № 13. Гидролиз нуклеопротеинов

Нуклеопротеины представляют собой сложные белки, содержащие в качестве простетической группы нуклеиновые кислоты. Они играют важную биологическую роль, являясь структурными элементами клетки (из этих белков состоит основная масса клеточного ядра) и выполняя важнейшие специфические функции в живом организме. Деление клеток, биосинтез белков, передача наследственной информации тесно связаны с нуклеопротеинами, в частности с входящими в их состав нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК).

Нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, построенными из большого числа нуклеопротеинов, которые состоят из гетероциклического основания (пуринового или пиримидинового) и углеводного компонента (рибозы или 2-деоксирибозы), а также фосфорной кислоты.

При проведении кислотного гидролиза сложные белки нуклеопротеины распадаются на составные части: белки, преимущественно основного характера (протамины и гистоны), и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе образуются пуриновые и пиримидиновые основания, углеводы (рибоза и дезоксирибоза) и фосфорная кислота, которые можно обнаружить с помощью специальных реакций. Нуклеопротеины могут быть выделены из тканей, богатых ядерным веществом (зобной железы, семенников, сперматозоидов и др.). Особенно богаты нуклеопротеинами дрожжи, на примере которых проводят исследование химического состава нуклеопротеинов.

Материалы и оборудование: колба на 100 мл с воздушным холодильником, пробирки в штативе, воронки, бумажный фильтр, тяга, электроплитка, цилиндр, дрожжи, 10% NaOH, 1%

CuSO₄, 10% H₂SO₄, дистиллированная вода, флороглюциновый реактив (0,2 г флороглюцина растворяют в 100 мл 30% HCl), концентрированная соляная кислота, молибденовый реактив (см. работу 10).

Ход работы. В колбу объемом 100 мл поместить 1 г дрожжей и добавить 20 мл 10% серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрыть пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятить под тягой в течение одного часа. Через час после начала кипения, нагревание жидкости прекратить, дать ей остыть, довести в цилиндре водой до первоначального объема и профильтровать. С фильтратом проделать качественные реакции на составные части нуклеопротеинов:

1. Биуретовая проба на полипептиды. К 0,5 мл гидролизата прибавить 1 мл 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% медного купороса (жидкость окрашивается в бледно-фиолетовый цвет).

2. Качественная реакция на пентозную группировку (рибозу). Качественной реакцией на рибозу является реакция Толленса с флороглюцином. Она обусловлена взаимодействием флороглюцина с фурфуролом, образующимся из пентозы при нагревании с HCl. При этом образуется продукт конденсации красного цвета. В пробирку налить 1 мл флороглюцинового реактива, добавить 0,5 мл дрожжевого гидролизата, 1 мл концентрированной HCl и нагреть до кипения. Через 2-3 минуты развивается розово-красное окрашивание. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

3. Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 0,5 мл дрожжевого гидролизата прилить 1 мл молибденового реактива (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте). Смесь слегка нагреть. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения

фосфорномолибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.
Полученные данные занести в таблицу.

Таблица 8

Качественные реакции на открытие составных частей нуклеопротеинов

Наименование сложного белка	Наименование протетической группы	Химическая структура протетических групп	Употребляемые реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция?

Задание: сделать вывод по блоку работ – сложные белки.

Контрольные вопросы по теме «Белки»

1. Назовите протеиногенные аминокислоты и приведите их классификацию.
2. Для решения каких задач на практике используют качественные реакции на белки и аминокислоты?
3. При помощи какой качественной реакции можно выявить в смеси аминокислот аргинин?
4. Почему для разделения свободных аминокислот используют как полярный, так и неполярный растворители?
5. Какие факторы влияют на растворимость белков и их стабильность в растворе?
6. Почему при величине pH, соответствующей изоэлектрической точке белка, его растворимость минимальна?
7. Почему после работы с солями и растворами тяжелых металлов или при отравлении ими полезно употреблять молоко или молочные продукты?
8. Как называется процесс обратимого осаждения белков из растворов с помощью нейтральных солей и в чем заключается его механизм?

9. Приведите примеры фосфопротеинов, в чем заключается их биологическая роль?

10. Какие белки содержат в качестве простетической группы нуклеиновые кислоты, опишите их биологическую роль в организме?

Тема Ферменты

Ферменты или энзимы представляют собой специфические белковые комплексы, которые катализируют биохимические реакции в клетках живого организма. Синтезируются в клетках.

Из всего многообразия ферментов по строению выделяются две основные группы: простые (состоят только из аминокислот, протеины) и сложные, которые содержат белковый компонент (апофермент) и небелковую часть (кофермент, простетическая группа). Во многих случаях фермент не столько катализирует реакцию, сколько делает эту реакцию возможной, иначе при отсутствии катализатора подобная реакция не смогла бы произойти.

Ферменты характеризуются высокой избирательностью или специфичностью действия. Различают относительную (групповую) специфичность, когда ферменты воздействуют на определенный тип химических связей или группы и катализируют один тип реакций; абсолютную специфичность, когда ферменты катализируют только одну реакцию с единственным субстратом; стереоспецифичность – ферменты действуют только на определенные стереоизомеры (энантиомеры, цис-, транс-изомеры).

В зависимости от типа катализируемых реакций ферменты подразделяются на шесть классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы (синтетазы). С 2018 года был обособлен отдельный седьмой класс транслоказ. Каждый класс делится на подклассы и подподклассы.

Определение специфичности и активности ферментов

Работа № 14. Специфичность ферментов

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, фарфоровая ступка с пестиком, колба объемом 100 мл, воронки, фильтры, цилиндры, пипетки на 1 мл и 5 мл, воронка Бюхнера, колба Бунзена, насос Комовского, водяная баня, термостат, дрожжи, соевая мука, кварцевый песок, бумажный фильтр, 0,1М фосфатный буфер (рН 7,0), 1% крахмал, 1% сахароза, реактив Фелинга, 0,1 М соляная кислота, 2% мочевины, 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

Приготовление реактива Фелинга. Раствор «А» – 346 г сегнетовой соли $C_4H_4OKNa \cdot 4H_2O$ и 103,2 г NaOH, довести водой до 1 л. Раствор «Б» – 69,28 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, воды до 1 л. Оба раствора следует хранить отдельно, смешивая в равных количествах непосредственно перед использованием.

Приготовление препарата уреазы для определения специфичности фермента. К 8 г соевой муки прибавить 46 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и перемешать, внести несколько капель толуола и оставить на ночь, после чего отфильтровать.

14.1. Выделение β -фруктофуранозидазы

Ход работы. Взвесить 2 г сухих дрожжей и растереть в фарфоровой ступке с кварцевым песком с добавлением 5 мл фосфатного буфера. Затем в ступку добавить 20 мл буфера, нагретого до 60 °С, и через 30 мин профильтровать через бумажный фильтр и воронку Бюхнера в колбу Бунзена с помощью насоса Комовского, или центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин. Полученный фильтрат должен быть прозрачным.

!Важно – часть фильтрата необходимо убрать в холодильник для проведения работы 19.

14.2. Специфичность β -фруктофуранозидазы

Фермент β -фруктофуранозидаза, или сахараза, или инвертаза расщепляет только сахарозу и не расщепляет крахмал и другие полисахариды.

Ход работы. В одну пробирку налить 4-5 мл раствора крахмала, в другую пробирку налить 4-5 мл раствора сахарозы. В обе пробирки добавить по 1 мл раствора β -фруктофуранозидазы и перемешав содержимое каждой пробирки, поставить их на 10 мин в водяную баню или в термостат при температуре 37-38°C. Далее проделать качественную реакцию на сахара – пробу Фелинга. Для этого в пробирки с опытными растворами внести 1-2 мл реактива Фелинга (предварительно слив между собой растворы «А» и «Б» в соотношении 1:1), перемешать и нагреть. Если в результате действия фермента произошел гидролиз субстрата, то при наличии сахаров выпадает красный осадок оксида меди (I).

14.3. Специфичность амилазы

Амилаза катализирует реакцию гидролитического расщепления крахмала и не действует на дисахариды (сахарозу, мальтозу и др.).

Ход работы. В одну пробирку налить 4-5 мл раствора крахмала, в другую 4-5 мл сахарозы. В обе пробирки прибавить по 1 мл разбавленной слюны (1:50) и, перемешав содержимое каждой пробирки, поставить на 10 мин в водяную баню или в термостат при температуре 37-38°C. Далее провести пробу Фелинга для установления специфичности фермента.

14.4. Обнаружение и специфичность уреазы

Уреаза (класс гидролаза, подкласс амидгидролаза) обладает абсолютной субстратной специфичностью действия и ускоряет расщепление амидной связи только мочевины с образованием углекислого газа и аммиака:



Уреаза содержится в бобах, сое, а также в некоторых бактериях и является очень устойчивым ферментом активным в широком диапазоне pH. Оптимум ее действия находится близко к нейтральной среде.

Ход работы. 1. *Обнаружение уреазы.* В пробирку наливают 2-3 мл раствора мочевины и добавляют при помешивании 0,5 г соевой муки. Реакцию проводят при комнатной температуре. Через несколько минут наблюдают выделение аммиака, что определяют по запаху и появлению красного оттенка содержимого пробирки при добавлении нескольких капель фенолфталеина.

2. *Определение специфичности фермента.* В две пробирки налить по 1 мл 5% раствора мочевины и добавить по 5 капель 1% спиртового раствора фенолфталеина. В одну из пробирок добавить 5 мл препарата уреазы, в другую дистиллированную воду и перемешать. Через некоторое время в одной из пробирок (с урезой) наблюдается окрашивание в розовый цвет.

Задание: сделать вывод о специфичности различных ферментов.

Работа № 15. Определение активности амилазы по Вольгемуту

Метод определения активности амилазы по Вольгемуту основан на нахождении максимального разведения слюны, при котором происходит полное расщепление крахмала. За единицу активности амилазы принимают количество фермента, необходимое для расщепления 1 мл крахмала за 30 мин при 37°C. В норме амилазная активность слюны равна 160-320 единиц Вольгемута.

Материалы и оборудование: термостат, пробирки в штативе, пипетки на 1, 2 и 5 мл, цилиндр, слюна, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы. В 10 пронумерованных пробирок налить по 1 мл воды. В пробирку №1 добавить 1 мл слюны, предварительно разведенной в 10 раз (1 мл слюны + 9 мл воды). Содержимое пробирки №1 хорошо перемешать, отобрать 1 мл смеси (суммарное разведение в 20 раз) и перенести в пробирку №2, вновь хорошо перемешать и перенести 1 мл смеси в пробирку №3 и т.д. Из пробирки №10 1 мл смеси отобрать и слить. Далее во все пробирки добавить по 1 мл воды и по 2 мл раствора крахмала (начиная с последней пробирки!).

Содержимое пробирок перемешать и поместить пробирки в термостат при температуре 37°C на 30 мин. По истечении времени пробирки вынуть, охладить, добавить по 1 капле реактива Люголя и перемешать. Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, красный, синий цвета. Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число).

Активность амилазы

Разведение слюны	Номер пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
Окрашивание йодом										

Пример: рассчитываем разведение слюны в нужной пробирке, если это четвертая, то разведение слюны в ней – 160 раз. Далее производим расчет амилазной активности слюны: 1/160 мл слюны катализирует превращение 2 мл крахмала соответственно 1 мл слюны x мл крахмала

Отсюда: $x = 2 \times 160 = 320$ единиц Вольгемута.

Задание: заполнить таблицу, рассчитать активность амилазы в единицах Вольгемута, сделать вывод.

Работа № 16. Определение активности липазы в семенах подсолнечника

Липазы принадлежат к классу гидролаз, под их действием нейтральные жиры расщепляются до глицерола и свободных жирных кислот. Особенно богаты липазами семена растений, содержащие в качестве основного запасного вещества жиры. К ним относятся подсолнечник, клещевина, разнообразные орехи. Активность липаз увеличивается при набухании и прорастании семян, когда происходит интенсивная утилизация запасных веществ семени (в случае масличных семян – жиров).

Субстратом для определения активности липаз в семенах масличных и злаковых культур служит растительное масло. Жирорасщепляющую активность липаз определяют методом титрования свободных жирных кислот, образующихся при гидролизе.

Материалы и оборудование: конические колбы на 100 мл с пробкой, весы, масло, фосфатный буфер рН 7,4 (Раствор «А»: 3,12 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ развести в 100 мл дистиллированной воды). Раствор «Б»: 7,17 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ развести в 100 мл дистиллированной воды. Смешать 19 мл раствора «А» и 81 мл раствора «Б» для приготовления буфера с рН 7,4), молотые семена подсолнечника, дистиллированная вода, шейкер, бюретка, 0,05 н водный раствор КОН, фенолфталеин, водяная баня, электроплитка.

Ход работы. 1. *Подготовка опытного образца.* В коническую колбу емкостью 100 мл поместить 3 г (с точностью до 0,01 г) масла, 2 мл фосфатного буфера и сильно встряхнуть. Затем добавить 1 г размолотых семян, 3 мл воды температурой 20 °С, плотно закрыть пробкой и поместить на шейкер на 1 ч.

2. *Подготовка контрольного образца.* В коническую колбу емкостью 100 мл 1 г муки из семян и налить 3 мл воды, смесь хорошо перемешать и нагревать в течении 5 мин на кипящей водяной бане. Затем охладить, добавить 3 мл масла плотно закрыть пробкой и поместить на шейкер на 1 ч.

По истечении этого времени полученные образцы оттитровать 0,05 н раствором КОН с 2-3 каплями фенолфталеина.

Активность липазы выражают в миллилитрах 0,1 н раствора щелочи, необходимой для нейтрализации жирных кислот, образующихся при ферментативном гидролизе, в 1 г жира. Активность липазы (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a-b}{N};$$

где (a - b) – разница между количеством 0,05 н раствора КОН, израсходованного на титрование опытного и контрольного образцов; N – навеска жира, г; 2 – поправочный коэффициент для перевода 0,05 н раствора КОН в 0,1 н.

Таблица 10

Результаты титрования проб

№ п/п	Исследуемый материал	Объем КОН, пошедшего на титрование, мл (опыт)	Объем КОН, пошедшего на титрование, мл (контроль)	Активность липазы
1	Сухие семена			
2	Проросшие семена			

Задание: заполнить таблицу, сделать вывод о процессах, происходящих при прорастании семян.

Работа № 17. Определение активности каталазы по Баху и Опарину

Каталаза относится к сложным ферментам (гемопротеинам), катализирует расщепление пероксида водорода на воду и кислород:



Активность определяется по количеству расщепленной перекиси водорода.

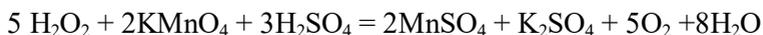
Материалы и оборудование: ступка с пестиком, колбы на 100 мл, цилиндр, воронка, бумажный фильтр, бюретка, весы, дистиллированная вода, водяная баня, электроплитка, 1% перекись водорода, 0,1 н. раствор KMnO_4 , 10% H_2SO_4 .

Ход работы. Взвесить 2-3 грамма исследуемого материала, растереть в ступке и настоять в течение одного часа с 50 мл воды. Жидкость отфильтровать через складчатый фильтр или отцентрифугировать. Для опыта взять две порции фильтрата по 15-20 мл. Одна проба – опытная, вторую пробу прокипятить в течение 1-2 минут, она служит контролем. К опытной и

контрольным пробам прибавить по 20 мл воды и по 3 мл 1% раствора перекиси водорода. Обе пробы оставить на 15 мин при комнатной температуре.

Через 15 мин к опытной и контрольной пробам прибавить по 5 мл 10% раствора серной кислоты. Оставшуюся перекись водорода, не разложенную ферментом, оттитровать, 0,1 н раствором KMnO_4 до исчезающей в течение 1-2 мин слабо розовой окраски раствора.

Титрование идет по уравнению:



Деятельность каталазы, т.е. количество разложенной перекиси водорода, выражают в мл 0,1 н. раствора KMnO_4 и пересчитывают на 1 г навески. Активность каталазы (V) определяют по формуле:

$$V = \frac{(b-a) \times K \times C}{M \times C_1 \times t},$$

где a и b – количество перманганата калия, пошедшее на титрование соответственно опытной и контрольной проб, мл; K – поправка к 0,1 н раствору перманганата калия; C – объем всей вытяжки, мл; C_1 – объем вытяжки, взятой для определения, мл; M – навеска растительного материала, г; t – время, ч.

Зная, что каждому мл 0,1н. раствора KMnO_4 соответствует 1,7 мг H_2O_2 в реакции, можно выразить активность в мг перекиси водорода, разложенной ферментом.

Задание: результаты расчета по разным объектам исследования свести в таблицу и сделать выводы об активности каталазы у различных растений.

Работа № 18. Определение активности аскорбатоксидазы

Аскорбатоксидаза это фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую, в качестве функциональной группы содержит медь (0,24%). Аскорбатоксидаза содержится во многих высших растениях, таких как тыква, капуста, кабачки, огурцы и т.д. Она ответственна за разрушение витамина С при технологической переработке этих растительных материалов.

Метод основан на измерении количества неокисленной аскорбиновой кислоты с помощью титрования.

Материалы и оборудование: микробюретки, пипетки, фарфоровые ступки, мерные колбы на 50 мл, стаканы на 50 мл, воронки, центрифуга, бумажные фильтры, биологический материал (капуста, проростки овса, кукурузы). Буферная смесь МакИльвейна, аскорбиновая кислота (1мг/мл), 5% метафосфорная кислота, 0,001н йодат калия, 0,001н 2,6-дихлорфенолиндофенол, йодистый калий, 1% серная кислота, 1% крахмал.

Приготовление буферной смеси МакИльвейна: 0,2 М раствор Na_2HPO_4 и 0,1 М раствор лимонной кислоты смешивают в соотношении 12,63:7,37 и доводят рН раствора до 6,0.

Приготовление 0,001н раствора йодата калия: навеску 356,8 мг KIO_3 , высушенного в течение 2 ч при 102 °С, растворяют в воде в мерной колбе емкостью 1 л. В другую колбу на 1 л отмеряют 100 мл этого раствора и доводят водой до мерной черты.

Приготовление 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола: 60 мг краски помещают в мерную колбу на 200 мл, прибавляют 100-150 мл дистиллированной воды и 4-6 капель 0,01н раствора щелочи. Взбалтывают в течение 10 мин и доводят дистиллированной водой до метки и фильтруют в сухую колбу. Реактив устойчив в течение трех суток, хранить в темноте.

Ход работы. 2 г свежего растительного материала растирают в ступке в присутствии буферной смеси МакИльвейна. Растертую массу переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят буферной смесью до метки и перемешивают. Далее гомогенат фильтруют или центрифугируют (10 минут при 3000 об/мин).

В стакан на 50 мл наливают 2 мл фильтрата и 2 мл раствора аскорбиновой кислоты. Полученную смесь выдерживают при температуре 25 °С в течение часа. По окончании времени экспозиции добавляют 2 мл 5% раствора метафосфорной кислоты. Одновременно готовят контрольную пробу. Для этого в стакан вносят 2 мл фильтрата 2 мл 5% раствора метафосфорной кислоты, затем 2 мл аскорбиновой кислоты. Каждая проба титруется 0,001н раствором йодата калия (1 мл 0,001 н раствора КJО₃ равен 0,088 мг аскорбиновой кислоты). В последнем случае пробу титруют до появления синей окраски в присутствии нескольких кристаллов КJ и нескольких капель крахмала.

Активность фермента (X), выраженную в миллиграммах окисленной аскорбиновой кислоты на 1 г сырой ткани вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a-b) \times T \times V_1}{V_2 \times M},$$

где а – количество краски или йодата, израсходованной на титрование контрольной пробы, мл; b – количество краски и йодата, израсходованной на титрование опытной пробы, мл; Т – титр краски или йодата; V₁ – объем всей вытяжки, мл; V₂ – объем фильтрата взятого на титрование, мл; М – навеска материала, г.

Работа № 19. Влияние различных факторов на активность ферментов

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, фарфоровая ступка с пестиком, стеклянные палочки, пипетки на 1 и 5 мл, термостат, воронки, предметные стекла, водяная баня, дистиллированная вода, стакан, слюна в разведении 1:100 и 1:50, 0,2 М Na_2HPO_4 , раствор 0,1 М лимонная кислота, 0,5% крахмал, 1% крахмал, 1% NaCl , 0,1% йод в 0,2% йодистом калии, лед, 1% сахароза, Фелингова жидкость, 1% сульфат меди, дрожжи или раствор β -фруктофуранозидазы (полученной в раб. 14.1).

19.1. Влияние pH среды на активность амилазы слюны

Для каждого фермента существует определенное значение реакции среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменение pH вызывают снижение или полное торможение деятельности фермента. В основе этого лежит нарушение структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра).

Ход работы. В семь пробирок налить растворы 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице 10 (Табл.10). Таким образом получают буферные растворы с pH от 5,6 до 8,0. В каждую пробирку добавить по 0,5 мл 0,5% крахмала, 0,5 мл 1% раствора NaCl и по 0,5 мл слюны, разведенной в 50 или 100 раз.

Содержимое пробирок перемешать и пометить в водяную баню или термостат при температуре 38°C на 5-10 минут в зависимости от индивидуальных особенностей активности слюны. Затем во все пробирки добавить по 1 капле раствора йода в йодистом калии, перемешать, пронаблюдать окраску и

определить значение рН, при котором амилаза действует наиболее активно. Оптимум рН для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала.

Таблица 10

Влияние рН среды на активность амилазы слюны

№ п р о б ы	Количество 0,2М р-ра Na_2HPO_4	Количество 0,1М р-ра лимонной кислоты, мл	рН смеси	Кол-во 0,5% р-ра крахмала и 1-% NaCl , мл	Кол-во разведенной 1:100 слюны (амилаза), мл	Окрашивание (реакция с йодом)
1	0,58	0,42	5,6	0,5	0,5	
2	0,63	0,37	6,0	0,5	0,5	
3	0,69	0,31	6,4	0,5	0,5	
4	0,77	0,23	6,8	0,5	0,5	
5	0,87	0,13	7,2	0,5	0,5	
6	0,94	0,06	7,6	0,5	0,5	
7	0,97	0,03	8,0	0,5	0,5	

Задание: результаты работы зафиксировать в таблице и сделать вывод о том, чему равен оптимум рН для функционирования амилазы слюны.

19.2. Влияние температуры на активность амилазы слюны

Одним из характерных свойств ферментов является термоллабильность, т.е. чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция. В некотором ограниченном интервале температуры скорость ферментативной реакции повышается с ростом температуры. Коэффициент, показывающий, во сколько раз повышается

скорость реакции при повышении температуры на 10 °С, называется температурным коэффициентом.

Для многих биохимических реакций при повышении температуры на 10 °С скорость удваивается и аналогично при понижении температуры на 10 °С уменьшается вдвое. Для большинства ферментов максимальная ферментативная скорость наблюдается при 38-40 °С. Эта температура называется температурным оптимумом. При дальнейшем повышении температуры происходит разрыв связей, поддерживающих вторичную и третичную структуру, т.е. происходит тепловая денатурация, сопровождающаяся потерей каталитической активности.

Скорость расщепления крахмала под влиянием амилазы определяют по окрашиванию раствора крахмала и продуктов его гидролиза йодом.

Ход работы. В четыре пробирки налить по 5 мл 1% раствора крахмала. Первую пробирку поместить в термостат при 100 °С, вторую – в термостат при 40 °С, третью – в лед, четвертую оставить при комнатной температуре. Через 10 минут во все пробирки (оставляя их в тех же условиях) прибавить по 1 мл раствора слюны (1:100) и перемешать стеклянной палочкой. Через 1 минуту из всех пробирок отобрать по одной капле и провести на стеклянных пластинах йодные пробы. Отбор проб проводить через каждые 2 минуты до прекращения изменения окраски пятна. По изменению окрашивания йодных проб судят о степени гидролиза в каждой пробирке.

Задание: составить таблицу, куда занести результаты опыта, помечая буквой «С» (синяя окраска), буквой «К» (окраска красных тонов), буквой «Ж» (желтая окраска). На основании опытных данных сделать вывод о величине температурного оптимума для амилазы слюны.

19.3. Влияние температуры на активность β -фруктофуранозидазы

Ход работы. В четыре пронумерованные пробирки налить по 1 мл раствора β -фруктофуранозидазы. Пробирку №1 поставить в сосуд со снегом или толченым льдом, содержимое пробирки №2 тщательно прокипятить, пробирку №3 поставить в термостат при температуре 35 °С, пробирку №4 оставить при комнатной температуре. Далее во все пробирки долить по 5 мл раствора сахарозы и перемешать, затем пробирку №1 немедленно погрузить в снег или лед, пробирку №3 поставить в термостат при 35 °С. Через 15 минут во все пробирки прилить по 5 мл Фелинговой жидкости и нагреть в кипящей бане. Выпадает красный осадок Cu_2O , по количеству которого судят о влиянии температуры на активность фермента.

Задание: сделать вывод о влиянии температуры на активность β -фруктофуранозидазы.

19.4 Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны

Помимо температуры и рН, большое влияние на активность ферментов оказывает присутствие в растворе некоторых химических соединений. Одни из них повышают активность ферментов (активаторы), другие понижают (ингибиторы). В роли активаторов ферментов могут быть различные микроэлементы и водорастворимые витамины.

Металлы в роли активаторов в одних случаях могут прочно связываться с ферментами, в других – входить в белковую структуру, образуя истинные металлоэнзимы. Ингибиторы по характеру действия делят на обратимые и необратимые. Обратимые ингибиторы разделяют на конкурентные (конкурирующие с субстратом за активный центр ферментов) и неконкурентные.

Ход работы. Для получения ферментного препарата амилазы слюны необходимо ополоснуть рот водой, затем набирать 10-20 мл дистиллированной воды, выдержать во рту 2-3 мин, слить в стакан и профильтровать через бумажный фильтр.

В три пронумерованные пробирки налить по 1 мл раствора амилазы слюны. В пробирку №1 добавить 2 капли дистиллированной воды (контроль); в пробирку №2 – две капли 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №3 – две капли 1% раствора сульфата меди. Затем в каждую пробирку налить по 0,5 мл 0,5% раствора крахмала, перемешать и поставить пробирки в штатив в водяную баню при 37 °С, либо оставить при комнатной температуре.

Через каждые 2 мин из каждой пробирки необходимо отобрать пробы по 1-2 капли на предметные стекла, добавляя по 1 капле раствора йода в йодистом калии до прекращения изменения окраски пятна, и установить степень гидролиза крахмала в разных вариантах опыта.

Задание: составить таблицу, в которой отметить окраску крахмала в процессе гидролиза, через каждые 2 мин после действия раствора йода в йодистом калии. Сделать вывод по полученным данным о действии активатора и ингибитора на активность α -амилазы.

Контрольные вопросы по теме «Ферменты»

1. Какую химическую природу имеют ферменты?
2. Укажите отличия ферментов от небелковых катализаторов?
3. По какому принципу классифицируют ферменты?
4. К какому классу относятся ферменты β -фруктофуранозидазы и амилаза?
5. Какие изменения нативной конформации ферментов, приводящие к утрате их активности, происходят при нагревании раствора слюны?

6. Какое значение имеет система антиоксидантной защиты у живых организмов?

7. С чем связано снижение активности фермента при изменении кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума pH?

8. Каким образом влияет концентрация субстрата на скорость реакции?

9. Что принимают за единицу активности фермента

Тема Углеводы

Углеводы – органические вещества, содержащие карбонильную и несколько гидроксильных групп. По строению углеводы являются многоатомными спиртами с альдегидной или кетонной группой. Углевод, который невозможно превратить в более простое соединение с помощью гидролиза, называется моносахаридом. Различают моносахариды; олигосахариды, включающие до 10 моносахаридных звеньев; полисахариды, цепи которых могут включать десятки тысяч моносахаридных звеньев.

Источником углеводов на планете является фотосинтез в растениях. Около 80% массы сухого вещества растений составляют углеводы. У животных организмов содержание углеводов составляет меньшее количество – 2% от сухой массы животных тканей. Углеводы служат источником энергии, структурным материалом для построения клеток, обеспечивая пластические функции. Моносахариды (рибоза и дезоксирибоза) являются компонентами нуклеиновых кислот (РНК и ДНК), которые служат основными информационными молекулами живых организмов.

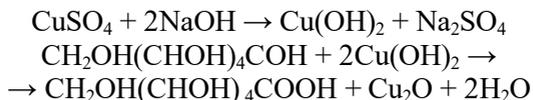
Работа № 20. Качественные реакции на сахара

Одним из характерных свойств сахаров является их способность восстанавливать окисные соединения в закисные, то есть сахара обладают восстанавливающими свойствами. Это свойство обусловлено наличием в молекуле сахара свободной альдегидной или кетонной группы. Следовательно, такой способностью обладают все моносахариды, а также часть дисахаридов (мальтоза, лактоза и другие) и сложные углеводы после их гидролиза.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки на 1, 2, 5 мл, водяная баня, колбы конические объемом 50 мл, воронки; 2% растворы глюкозы, сахарозы, лактозы; 10% NaOH, 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, реактив Фелинга, состоящий из двух растворов «А» и «Б», смешиваемых в равных количествах непосредственно перед использованием, концентрированные азотная, серная и соляная кислоты; 3% спиртовые растворы тимола и α -нафтола, 20% HCl, 5% хромовокислый калий, 10% уксуснокислая медь, 1% пикриновая кислота, раствор метиленовой сини (1:1000).

20.1. Реакция Троммера

Реакция основана на восстановлении гидрата окиси меди в оксид меди (I) в присутствии редуцирующих, или восстанавливающих сахаров:

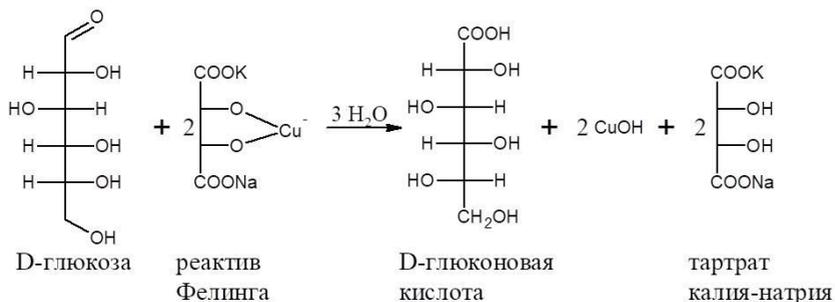


Ход работы. В пробирку налить 2 мл 2% раствора глюкозы или любого редуцирующего сахара, затем добавить 0,5 мл 4% раствора медного купороса и 1 мл 10% раствора едкой щелочи.

При нагревании синего раствора, содержащего $\text{Cu}(\text{OH})_2$ происходит образование тяжелого осадка оксида меди (I) кирпично-красного цвета, который выпадает в осадок на дно пробирки. При значительном избытке сахара содержимое пробирки окрашивается в оранжевый или кирпично-красный цвет.

20.2. Реакция Фелинга

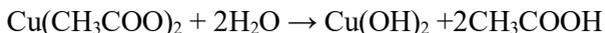
Эта реакция является модификацией реакции Троммера, в которой вместо гидрата окиси меди используется медный алкогольат сегнетовой соли. Химизм данной реакции тот же, что и в реакции Троммера. Проба Фелинга имеет некоторые преимущества в том отношении, что избыток $\text{Cu}(\text{OH})_2$ находится в растворенном состоянии в виде алкоголята меди и не мешает реакции.



Ход работы. К 2 мл раствора глюкозы или фруктозы прилить 1 мл реактива Фелинга, перемешать и нагреть. Выпадает красный осадок оксида меди (I).

20.3. Реакция Барфедда

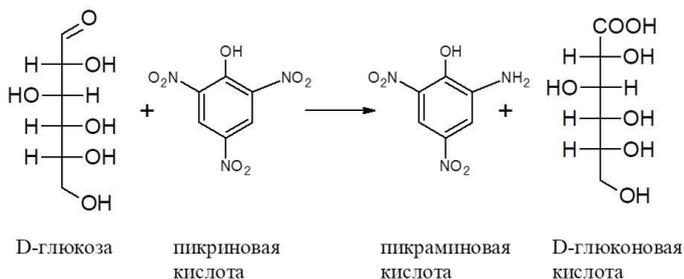
Ход работы. В пробирку налить 2 мл раствора сахара и 2 мл 10% раствора уксуснокислой меди. Смесь нагреть до образования осадка оксида меди (I) кирпично-красного цвета.



Ввиду того, что уксуснокислая медь слабо реагирует с водой, образуется сравнительно мало гидрата окиси меди и, следовательно, мало осадка оксида меди (I).

Реакция Барфедда менее чувствительная, чем реакции Троммера, Фелинга и «серебряного зеркала».

20.4. Реакция с пикриновой кислотой



Ход работы. К 2 мл раствора глюкозы прилить 0,5 мл 10% раствора NaOH, 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты (тринитрофенол) и нагреть. Раствор приобретает темно-красное окрашивание, которое обусловлено превращением пикриновой кислоты в пикраминовую.

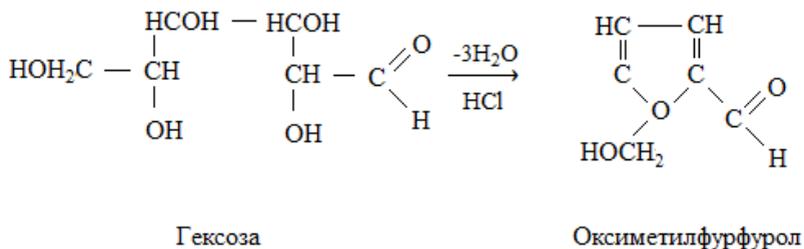
20.5. Реакция, доказывающая, что сахароза не обладает восстанавливающими свойствами

Ход работы. В пробирку налить 2 мл 2% раствора сахарозы, затем добавить 0,5 мл 4% раствора медного купороса и 1 мл 10% раствора едкой щелочи и нагреть.

При нагревании раствора образования оксида меди (I) не происходит. При наличии в растворе сахарозы примеси редуцирующих сахаров в следовых количествах наблюдается появление небольшого осадка оксида меди (I). Для реакции необходимо пользоваться химически чистой сахарозой.

20.6. Тимоловая проба

Замкнутая структура сахаров, которая образуется при действии на сахар крепких кислот, способна давать цветные реакции с рядом органических соединений – таких, как тимол, α -нафтол, резорцин и другими. Эта замкнутая структура носит название фурурола, образующегося из пентоз, и оксиметилфурурола, образующегося из гексоз. Такая структура образуется при нагревании сахаров с крепкими кислотами и сопровождается образованием трех молекул воды за счет отщепления гидроксильных групп и водорода, стоящих у второго, третьего или четвертого углеродных атомов пентоз и гексоз.



Ход работы. В две пробирки налить по 1 мл раствора глюкозы и сахарозы. В каждую пробирку прилить по 3-4 мл крепкой соляной кислоты и несколько капель 3% спиртового раствора тимола $\text{CH}_3(\text{C}_3\text{H}_7)\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$. Содержимое пробирок нагревать не менее 3 мин на бане.

В каждой пробирке появляется красное или розовое окрашивание. Интенсивность окрашивания зависит от концентрации сахара в растворе. Окраска раствора обусловлена образованием окрашенного комплекса тимола и циклического соединения оксиметилфурфуrolа.

20.7. Реакция Молиша

Реакция основана на образовании фурфуrolа и оксиметилфурфуrolа.

Ход работы. К 2 мл раствора любого сахара добавить две капли 3% спиртового раствора α -нафтола, взболтать и затем осторожно, по стенке пробирки прилить около 2 мл крепкой серной кислоты.

При этом образуется кольцо красно-фиолетового цвета. Характерная реакция образования фурфуrolа или оксиметилфурфуrolа и присоединение α -нафтола происходит, следовательно, на границе соприкосновения кислоты и раствора сахара. Фурфуrol, оксиметилфурфуrol и α -нафтол под действием серной кислоты дают окрашенное хиноидное соединение.

20.8. Реакция Фелинга с раствором сахарозы до и после гидролиза

Ход работы. В две пробирки налить по 2 мл раствора сахарозы. Во вторую пробирку прилить 2-4 капли 20% раствора HCu и нагреть. Содержимое второй пробирки охладить и нейтрализовать раствор. Затем в обе пробирки долить 2-4 мл

реактива Фелинга и нагреть. В первой пробирке осадка не образуется, во второй пробирке выпадает красный осадок оксида меди (I). Объясните, почему это произошло.

20.9. Реакции с другими дисахаридами

Ход работы. К 2 мл раствора лактозы прилить 4 мл реактива Фелинга и нагреть. Выпадает красный осадок оксида меди (I), что указывает на то, что дисахариды содержат свободные полуацетальные (гликозидные) гидроксилы.

20.10. Нитрохромовая реакция (реакция на группу OH)

Ход работы. К 2 мл сахара прилить 5 мл концентрированной азотной кислоты и 5-10 капель 5% раствора хромовокислого калия K_2CrO_4 . Содержимое пробирки осторожно подогреть до появления синего окрашивания раствора.

Задание: сделать выводы по представленным реакциям.

Работа № 21. Реакции на полисахариды

Полисахариды отличаются друг от друга химической природой повторяющихся моносахаридных единиц, степенью разветвления и длиной цепи. Полисахариды содержат редуцирующий гликозидный гидроксил на конце цепи и поскольку доля его относительно всей микромолекулы весьма невелика, то полисахариды не проявляют восстановительных свойств.

Материалы и оборудование: штативы с пробирками, стеклянные палочки, пипетки, капельницы, водяная баня, дистиллированная вода, термостат, 1% крахмал, 10% NaOH, реактив Люголя, концентрированная соляная кислота, вата, 80%

и 3% растворы серной кислоты, реактив Фелинга, 1% сульфат меди, 10% бикарбонат натрия.

21.1. Реакция крахмала с йодом

При взаимодействии крахмала с йодом образуются комплексные адсорбционные соединения, окрашивающиеся при реакции с крахмалом в синий цвет. При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойких комплексов крахмала с йодом. Обесцвечивание происходит также при добавлении гидроксида натрия или калия. Исчезновение окраски при нагревании и добавлении щелочей обусловлено тем, что в образовании комплексов принимает участие молекулярный йод, а не йодид-ионы.

Ход работы. В пробирку поместить 2 мл 1% раствора крахмала, и внести по 1-2 капли реактива Люголя. Содержимое пробирки перемешать и пронаблюдать появление окрашивания. Затем содержимое пробирки разлить в две чистые пробирки. Одну пробирку поместить на баню или в термостат при 100 °С, а в другую добавить 1 мл 10% раствора гидроксида натрия. Пронаблюдать исчезновение окраски. Пробирку из термостата охладить и пронаблюдать вновь появление окраски.

21.2. Гидролиз крахмала и обнаружение продуктов гидролиза

При нагревании крахмала с минеральными кислотами происходит полный гидролиз с образованием глюкозы, которую можно обнаружить качественными реакциями.

Ход работы. В две пробирки поместить по 5 мл 1% раствора крахмала: в одну из них добавить 1 мл концентрированной соляной кислоты, вторая пробирка является контрольной.

Пробирки поместить в термостат при 100 °С на 15 минут, затем в обеих пробирках провести реакцию Троммера или Фелинга. Пронаблюдать изменение окраски в пробирке с гидролизатом и отсутствие таковой в контрольной пробе.

21.3. Гидролиз целлюлозы и обнаружение продуктов гидролиза

Целлюлоза не расщепляется ферментами желудочно-кишечного тракта человека. Гидролиз целлюлозы минеральными кислотами происходит значительно медленнее, чем крахмала, и требует предварительной обработки целлюлозы 80% раствором серной кислоты.

Ход работы. Небольшое количество ваты (100-200 мг) поместить в пробирку, залить 3% раствором серной кислоты и прокипятить 10-15 минут. Работу проводить в вытяжном шкафу. В другой пробирке такое же количество ваты обработать небольшим количеством 80% раствора серной кислоты (около 0,5 мл) до полного растворения ваты, затем добавить дистиллированную воду (примерно 0,5-1 мл) и кипятить 5 минут. После охлаждения содержимое пробирок нейтрализовать бикарбонатом натрия и провести реакцию Фелинга. Положительная реакция Фелинга свидетельствует о том, что произошел гидролиз целлюлозы и образовался восстанавливающий продукт – β , D-глюкопираноза.

Задание: сделать выводы по проведенным реакциям.

Работа № 22. Обнаружение запасных сахаров в растительном материале

Материалы и оборудование: штативы с пробирками, кристаллическая глюкоза и сахароза, 20% раствор соляной кислоты, растительный материал, реактив Фелинга, воронки,

фильтры, электроплитка, водяная баня, дистиллированная вода, 10% карбонат натрия.

Ход работы. Сначала необходимо провести контрольный опыт. Для этого необходимо взять три пробирки и поместить в первую щепотку глюкозы, во вторую и третью – сахарозы. Добавить во все пробирки небольшое количество дистиллированной воды. К раствору первой и второй пробирок прилить равные объемы фелинговой жидкости и нагреть до кипения. В третью пробирку добавить 2-3 капли 20% соляной кислоты и прокипятить в течение одной минуты. Затем, для нейтрализации кислоты, добавить раствор карбоната натрия до прекращения выделения углекислого газа. После прилить равный объем фелинговой жидкости и вновь довести до кипения. Отметить, образуется ли в пробирках осадок, и объяснить почему.

Для определения редуцирующих сахаров исследуемые растения мелко нарезать. Затем поместить в отдельные пробирки, примерно на $\frac{1}{4}$ пробирки, залить водой и нагреть в кипящей водяной бане в течение 5-10 мин. После этого вытяжки профильтровать в сухие пробирки. Половину полученного фильтрата перенести в чистую пробирку. С первой порцией фильтрата провести реакцию на редуцирующие сахара сразу, а с другой после ее гидролиза соляной кислотой.

Задание: сделать выводы о содержании запасных сахаров в растительном материале.

Контрольные вопросы по теме «Углеводы»

1. Какая взаимосвязь существует между структурой и функцией углеводов?
2. Какие функциональные группы сахаров обеспечивают их способность к окислению?

3. На чем основаны качественные реакции на углеводы? Каково их практическое значение?

4. Приведите примеры дисахаридов, которые относятся к редуцирующим.

5. В каких условиях протекает гидролиз ди- и полисахаридов?

Тема V Витамины

Витамины – это группа низкомолекулярных веществ органической природы, которые обеспечивают нормальное протекание и регуляцию биохимических реакций, обеспечивающих метаболизм. Витамины непосредственно не участвуют в пластических и энергетических процессах, не синтезируются в организме и необходимы в малых количествах. Для большинства витаминов их действие заключается в участии в биохимических реакциях в качестве кофактора фермента, регулирующего соответствующую ферментативную реакцию.

Витамины поступают в организм в основном с пищевыми продуктами растительного и животного происхождения. Лишь незначительное количество витаминов способно синтезироваться кишечной микрофлорой. Например, биотин, фолиевая кислота, витамин К.

Состояние, вызванное недостаточным поступлением витаминов в организм, что приводит к нарушению обмена веществ, называется гиповитаминозом. При отсутствии в рационе какого-либо витамина наблюдается развитие авитаминоза. При чрезмерном применении витаминов (в основном, жирорастворимых) развиваются гипervитаминозы.

В 1974 году была принята классификация, основанная на физико-химических свойствах, в частности, по отношению к растворителям. Витамины делятся на растворимые в воде (В1 – тиамин, В2 – рибофлавин, В3 – пантотеновая кислота и др.) и растворимые в жирах (А – ретинол, D – кальциферол и др.).

Также выделяют группу витаминоподобных веществ: липоевая кислота, холин, карнитин, оротовая кислота, инозит, витамин В15, ПАБК (парааминобензойная кислота), витамин U.

Работа № 23. Качественные реакции на витамины

Материалы и оборудование: штативы с пробирками, ультрафиолетовая лампа, пипетки, раствор рыбьего жира в хлороформе, спиртовой раствор α -токоферола, рыбий жир или масляный раствор витамина А, концентрированная серная и азотная кислота, ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа, 1% FeCl_3 , 2% красная кровяная соль, 2,5% молибденово-кислый аммоний в 1,5% H_2SO_4 , 0,025% раствор цистеина, 10% NaOH , 5% раствор тиамин, 5% гексацианоферрат (III) калия, изобутиловый спирт, 1% раствор витамина В6, 0,01% раствор метиленового синего, спиртовой раствор витамина К, водяная баня, растительный материал, ступка с пестиком, марля, 0,1% аскорбиновая кислота, сок капусты или картофеля, пробирка с пробкой, термостат на 37 °С.

23.1. Обнаружение витамина А

Витамин А (ретинол) объединяет группу жирорастворимых родственных соединений – изопреноидов. В группу витамина входят ретинол, ретиналь и ретиноевая кислота, а также каротины из группы каротиноидов, имеющих растительное происхождение. Например, в организме β -каротин под действием ферментов превращается в витамин А, поэтому каротины называют провитаминами, т. е. предшественниками витамина А. В качестве источника витамина выступают продукты животного происхождения (печень, почки, сливочное масло, рыбий жир).

Биологическая функция витамина А заключается в регуляции генов, ответственных за чувствительность клеток к ростовым факторам и гормонам. Так, ретиноевая кислота обеспечивает

нормальное развитие эмбриона за счет стимуляции деления и дифференцировки клеток быстро делящихся тканей. Ретиналь участвует в акте зрения, связываясь с белком опсином и последующим образованием родопсина – пигмента клеток сетчатки глаза.

Суточная потребность взрослого человека в витамине А составляет 1-2,5 мг (5000 МЕ).

1. Реакция с серной кислотой

Ход работы. В сухую пробирку внести 0,5 мл раствора рыбьего жира в хлороформе и 0,1 мл концентрированной H_2SO_4 . Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

2. Реакция с сульфатом железа

Ход работы. В пробирку налить 0,1 мл рыбьего жира или масляного раствора витамина А, добавить 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, переходящее в розово-красное.

23.2. Обнаружение витамина Е

Витамин Е (токоферол), группа веществ, объединяющая восемь близких по структуре соединений, из которых наиболее важными являются α -, β - и γ -токоферолы. При этом, наибольшая биологическая активность наблюдается у α -токоферола.

Недостаток витамина Е в кормах приводит к нарушению половой функции у самок и самцов в животноводстве, нарушается функция нервной системы, возникает мышечная слабость (дистрофия). У человека наблюдаются дегенеративные изменения в печени, нарушение репродуктивной функции, функции клеточных мембран и снижение чувствительности из-за нарушения целостности миелиновой оболочки нейронов.

Предполагается, что витамин Е препятствует окислению липидов в структуре клетки.

Источники: растительные масла, зерновые продукты, салат, ягоды шиповника, капуста. Суточная потребность – 20-30 мг.

1. Реакция с хлоридом железа

Ход работы. В сухую пробирку внести 0,5 мл спиртового раствора α -токоферола, добавить 0,5 мл 1% раствора $FeCl_3$, тщательно перемешать содержимое пробирки и нагреть. Появляется красное окрашивание жидкости.

2. Реакция с концентрированной азотной кислотой

Витамин Е, взаимодействуя с концентрированной азотной кислотой, окисляется с образованием токофил-хинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет. Метод используется для количественного определения витамина Е.

Ход работы. В сухую пробирку налить 2-3 капли масляного раствора витамина Е (или 4-5 капель 0,1% спиртового раствора токоферола), прибавить 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку нагреть в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

23.3. Обнаружение витамина К

Витамин К (витамин коагуляции, филлохинон), производное нафтохинона, участвует в образовании белка плазмы крови – протромбина (фактор II), а также еще трех белковых факторов (VII, IX и X) и обеспечивает нормальную свертываемость крови. При недостатке витамина наблюдается увеличение времени кровотечения, нарушаются процессы свертывания крови.

Источник – микрофлора кишечника. Суточная потребность составляет условно 0,2-0,3 мг. Возможно поступление

нафтохинонов с пищей (печень животных, шпинат, капуста, тыква, ягоды рябины).

Витамин К в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Ход работы. В пробирку налить 1 мл спиртового раствора витамина К или 0,1% спиртового раствора викасола (водорастворимый препарат витамина К), добавить 2 капли 0,025% раствора цистеина и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание.

23.4. Качественные реакции на витамин В1

Витамин В1 (тиамин) в форме тиаминпирофосфата выступает в качестве кофактора при окислительном декарбоксилировании α -кетокислот (пирувата и α -кетоглутарата) при биологическом окислении глюкозы. Недостаток тиамина в пище вызывает у человека болезнь бери-бери (неврологические расстройства). Источники витамина: черный хлеб, оболочки злаковых и бобовых, гречневая крупа. В организме животных витамин В1 в наибольшем количестве содержится в почках, печени, сердечной мышце, мозгах. Суточная потребность – 2-3 мг.

В щелочной среде под влиянием сильных окислителей тиамин окисляется, образуя тиохром, обладающий в ультрафиолетовых лучах сине-голубой флуоресценцией. Метод используется для количественного определения тиамина.

Ход работы. В пробирку внести 1 мл 5% раствора тиамина, добавить 2-3 капли 10% раствора гидроксида натрия, затем прибавить несколько капель 5% раствора гексацианоферрата (III) калия до появления зеленовато-желтого окрашивания. Раствор несколько раз встряхнуть, прибавить 1 мл изобутилового спирта и снова встряхнуть. Далее жидкости дать отстояться для разделения слоев. При освещении спиртового слоя ультрафиолетовыми лучами наблюдается голубая

флуоресценция, обусловленная наличием тиохрома – продукта окисления тиамина.

23.5. Качественные реакции на витамин В6

Активностью витамина В6 (пиридоксин) обладают производные пиридина пиридоксол, пиридоксаль и пиридоксамин, а фосфорилированные производные пиридоксала и пиридоксамина выполняют коферментную функцию витамина. Витамин В6 в форме пиридоксальфосфата является простетической группой у аминотрансфераз, а также участвует в декарбоксилировании кислот, что приводит к образованию биогенных аминов. Источник витамина – пивные дрожжи, мясо, рыба, бобовые, зерновые и их отруби. Витамин В6 синтезируется микрофлорой кишечника, поэтому его дефицит встречается редко. Суточная потребность – 2-3 мг, для беременных – 6-7 мг.

Качественное определение витамина В6 основано на том, что при взаимодействии с раствором хлорида железа (III) он образует комплексную соль фенолята железа красного цвета.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В6 добавить равное количество 1% раствора хлорида железа и перемешать. Появляется красное окрашивание.

23.6. Качественная реакция на аскорбиновую кислоту

Витамин С (аскорбиновая кислота) является производным лактонов, в частности, L-гулоновой кислоты. Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем, вследствие чего легко окисляется. Биологическая роль витамина заключается в широком участии в окислительно-восстановительных процессах, в реакциях обмена. У приматов, морских свинок и человека отсутствует фермент синтеза аскорбиновой кислоты, поэтому витамин должен поступать с пищей. Источником

витамина могут выступать шиповник, рябина, черная смородина, лук (зеленый, репчатый), ягоды, щавель, капуста, цитрусовые, картофель, желативно без термической обработки, и др. Аскорбиновую кислоту нельзя хранить на свету и во влажной среде. Суточная потребность в витамине С у взрослого человека колеблется, в зависимости от условий жизни, в пределах 70-120 мг.

Гиповитаминоз витамина С приводит к цинге, что проявляется слабостью, утомляемостью, кровоточивостью десен, кровоизлияниями из-за ломкости сосудов, хрупкостью костей, подавлением регенераторных процессов в организме, развитием анемии.

1. Реакция с раствором калия гексацианоферрата

Ход работы. Для обнаружения витамина С в исследуемых объектах растительный материал растереть в ступке или на терке, а сок отжать через марлю; из сухих плодов, свежей хвои приготовить водную вытяжку, которая будет содержать витамин С. Полученный сок и вытяжку из различных объектов разлить по пробиркам. К 1 мл сока, вытяжки прилить по 0,5 мл 2% раствора красной кровяной соли $K_3Fe(CN)_6$. Содержимое пробирок перемешать и добавить по 1 мл 2,5% раствора молибденово-кислого аммония $(NH_4)_2MoO_4$. В присутствии витамина С появляется кирпично-красное окрашивание раствора. По интенсивности окраски можно судить о содержании витамина С в растительных продуктах. Подобного рода реакцию проводят с раствором аскорбиновой кислоты какой-либо выбранной концентрации. Пробирки располагают по убывающей интенсивности окраски и сравнивают со стандартной пробиркой, содержащей раствор чистой аскорбиновой кислоты.

2. Реакция аскорбиновой кислоты с метиленовым синим

Аскорбиновая кислота на свету восстанавливает метиленовый синий до бесцветной лейкоформы окисляясь в дегидроаскорбиновую кислоту.

Ход работы. К 1 мл 0,5% раствора витамина С (молока, сока капусты или картофеля) добавить 1 мл 0,01% раствора метиленового синего, перемешать и закрыть пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку поместить в термостат при температуре 37-40 °С. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается.

Задание: сделать вывод по полученным данным.

Работа № 24. Количественное определение свободной и связанной аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота (витамин С) способна восстанавливать 2,6-дихлор-фенолиндофенол (краска Тильманса). При этом она из восстановленной формы переходит в окисленную форму (дегидроаскорбиновую кислоту).

Водный раствор краски окрашен в синий цвет. При восстановлении она обесцвечивается, а в кислой среде имеет розовую окраску. Изменение окраски используется для количественного и качественного определения витамина С.

Материалы и оборудование: микробюретки, пипетки на 10 мл, фарфоровые ступки, стаканы на 50 и 100 мл, воронки, весы, фильтры, цилиндры на 50 и 100 мл, мерные колбы на 50 мл, конические колбы на 100 мл, капуста, проростки гороха, овса и других растений, 1% HCl, 2% HPO₃, 0,001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (60 мг сухой краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 200 мл, добавляют 4-5 капель 0,01 н раствора щелочи. После сильного

взбалтывания в течение 10 минут колбу доливают водой до метки и, перемешав, фильтруют в чистую сухую емкость из темного стекла. Хранят в холодильнике не более 7 суток).

Ход работы: Навеску материала 1-2 г растереть в ступке до однородной массы и быстро залить 10 мл 1% раствора HCl. Полученную массу смыть в мерную колбу на 50 мл. Ступку несколько раз ополоснуть 2% раствором метафосфорной кислоты и слить в колбу с материалом, затем колбу долить 2% раствором метафосфорной кислоты до метки. 1% раствор HCl извлекает из материала свободную и связанную аскорбиновую кислоту, а 2% раствор HPO_3 извлекает только свободную аскорбиновую кислоту, а также осаждает белки и повышает устойчивость аскорбиновой кислоты.

Содержимое колбы взболтать и оставить стоять для осаждения белков и частиц растительного материала. Прозрачную жидкость осторожно отфильтровать в сухую колбу на 50-100 мл. Из полученного фильтрата взять две пробы по 10 мл и оттитровать из микробюретки 0,001 н раствором краски Тильманса (2,6-дихлорфенолиндофенола) до появления ясного розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5-1,0 мин.

Параллельно необходимо определить восстанавливающую способность смеси кислот, применяемых для экстракции. Для этого взять 4 мл 1% раствора HCl и 16 мл 2% раствора HPO_3 , смешать их. Из полученной смеси отобрать 10 мл пипеткой и оттитровать тем же раствором краски до розового окрашивания. Полученную, обычно очень небольшую, величину (0,08-0,1 мл) необходимо отнять от данных титрования опытной пробы.

Расчет результатов. Известно, что 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

Количество аскорбиновой кислоты (X) в миллиграммах-процентах в образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{100 \times T \times a \times V}{M \times C},$$

где Т – титр 0,001 н. раствора краски по аскорбиновой кислоте (0,088 мг или близкая величина); а – количество краски, пошедшей на титрование, мл; V – объем всей вытяжки, мл; М – навеска материала, г; С – количество вытяжки, взятой на титрование, мл.

Задание: рассчитать содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом объекте. Сделать вывод.

Работа № 25. Количественное определение рутина (витамина Р)

К группе витамина Р относятся вещества – производные флавона. Рутин регулирует проницаемость стенок кровеносных сосудов, участвует в процессах тканевого дыхания. Источником выступают продукты с содержанием витамина С, цветы и листья гречихи, листья чайного дерева, цитрусовые и др. Суточная потребность – 30-50 мг.

Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится как рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н, раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Материалы и оборудование: микробюретки, пипетки на 10 мл, мерные колбы на 50 мл, воронки, растительный материал чай или сухие ягоды), 0,05 н раствор перманганата калия, индигокармин, дистиллированная вода.

Ход работы. Навеску чая или сухих ягод (100 мг) через воронку перенести в мерную колбу 50 мл. Довести до метки

горячей дистиллированной водой и провести экстракцию в течение 5 мин. 10 мл экстракта перенести в коническую колбу, добавить 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина. Оттитровать 0,05 н раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

Расчет процентного содержания рутина в растительном материале производят по следующей формуле:

$$X = \frac{3,2 \times A \times 50 \times 100}{V \times m \times 1000},$$

где X – содержание витамина Р в миллиграмм-процентах, 3,2 – количество рутина в мкг, окисляемое 1 мл 0,05 н. раствора перманганата калия, пошедшее на титрование; m – количество сухого вещества в граммах, взятое для анализа; A – количество миллилитров 0,05 н. раствора перманганата калия, пошедшее на титрование V – количество мл вытяжки взятое для титрования; 50 – объем экстракта; 100 – общее количество вещества в граммах для расчета процентного содержания витамина; 1000 – коэффициент для перевода микрограммов в миллиграммы.

Задание: рассчитать содержание рутина в исследуемом объекте. Сделать вывод.

Работа № 26. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение

Фолиевая кислота построена из производного птеридина, парааминобензойной (ПАБК) и глутаминовой кислот. Витамин играет важную роль в метаболизме глутамата, глицина, серина, гистидина, холина и бетаина. Ее производные играют роль в биосинтезах путем включения углерода в пуриновый скелет и в синтезе тимина.

Принцип метода: фолиевая кислота хорошо растворима в 0,1 н. р-ре гидроксида натрия. При экстрагировании фолиевой

кислоты из дрожжей и ультрафиолетовом облучении наблюдается интенсивно голубая флюоресценция (при концентрации, равной 0,001%).

Материалы и оборудование: ступка с пестиком, пробирки в штативе, дрожжи, 0,1 н и 0,005 н растворы NaOH, ледяная уксусная кислота, 0,4% перманганат калия, 3% пероксид водорода, кварцевый песок, центрифуга, индикаторная бумага.

Ход работы. В ступку поместить 10 г дрожжей, добавить 10 мл 0,1 н раствора NaOH, 2 г кварцевого песка и растереть в течение 5 мин. Затем центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. К 10 каплям надосадочной жидкости прилить 20 капель ледяной уксусной кислоты (рН 3,0) и, приблизительно, 10 капель 0,4% раствора KMnO_4 так, чтобы розовое окрашивание не исчезло в течение 10 мин (если окраска исчезла, следует прилить еще несколько капель KMnO_4). Через 10 мин удалить избыток перманганата калия путем добавления 4-5 капель 3% раствора H_2O_2 и прилить 0,005 н раствор едкого натрия (приблизительно, 5 мл) до рН 4,0-4,5 в присутствии индикаторной бумаги.

Поместить пробирку с содержимым в флюороскоп. При ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе в флюороскопе наблюдается интенсивно голубая флюоресценция.

Задание: провести выделение и обнаружение фолиевой кислоты. Сделать вывод.

Контрольные вопросы по теме «Витамины»

1. Какую роль играют витамины в жизнедеятельности организма?
2. Опишите причины и последствия отсутствия или недостаточности витаминов в продуктах питания человека.

3. Какая связь существует между витаминами и ферментами?
4. В чем заключается биохимическая роль аскорбиновой кислоты в организме. Напишите условия, обеспечивающие ее сохранность в пищевых продуктах.
5. Какие принципы лежат в основе количественного определения витаминов в биологических материалах?

Тема Липиды

Липиды – это неоднородная группа соединений, плохо растворимых в воде и хорошо растворимых в неполярных растворителях. Данная группа веществ существенно различаются по своей химической структуре и функциям. Липиды играют ведущую роль в обеспечении энергетических и структурных процессов любого организма.

Являясь одним из преобладающих компонентов клеточных мембран, липиды участвуют в формировании межклеточных контактов, передаче регуляторных сигналов, обеспечении проницаемости мембраны. Кроме энергетической функции, липиды обеспечивают формирование защитных водоотталкивающих и термоизоляционных свойств покровов у животных и растений.

Наибольшее распространение получила классификация на основе структурных особенностей строения липидов. По этой классификации различают: 1) жирные кислоты; 2) воска; 3) фосфолипиды; 4) гликолипиды; 5) стероиды, каротиноиды и терпеноиды.

Работа № 27. Эмульгирование и растворение жиров

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки Пастера, растительное масло, бензин, желчь, раствор яичного белка, 1% раствор мыла, 1% Na_2CO_3 , дистиллированная вода.

27.1. Получение эмульсии жира

Жиры нерастворимы в водной среде. Процесс гидролиза с последующим перевариванием поступивших с пищей липидов специальными ферментами желудочно-кишечного тракта – липазами, возможен только после эмульгирования жиров (липазы отсутствуют в ротовой полости и желудке). Основную роль в этом процессе играют поверхностно активные желчные кислоты, поступающие в двенадцатиперстную кишку. Желчные кислоты препятствуют слиянию капелек жира, при этом уменьшая поверхностное натяжение на поверхности двух фаз – воды и жира, что способствует образованию эмульсии и облегчению процесса гидролиза жира.

Эмульсию жира легко получить при его взбалтывании с водой. При добавлении поверхностно активных веществ эмульсия становится более стойкой.

Ход работы. В пять пробирок налить по 3 капли растительного масла. Добавить в первую пробирку 1 мл дистиллированной воды, во вторую – 1 мл желчи, в третью – 1 мл раствора яичного белка, в четвертую – 1 мл 1% раствора мыла, в пятую – 1 мл 1% раствора углекислого натрия. Все пробирки тщательно взболтать. Через 5 мин пронаблюдать сохранение эмульсии.

Задание: результаты опыта занести в таблицу, отмечая, сохранилась ли образовавшаяся эмульсия, и степень ее дисперсности. Сделать выводы.

Эмульгирование жира

Название жира	Эмульгатор				
	Мыло (1)	Вода (2)	Желчь (3)	Белок (4)	Сода (5)
Растительное масло					

27.2. Растворение жира

Жир хорошо растворяется в эфире, ацетоне и других веществах. Для растворения жира в некоторых растворителях, например в спирте, необходимо подогревание.

Ход работы. В пробирку налить 0,5 мл жира (масла), прибавить 2-3 мл бензина, перемешать. Наблюдать растворение жира.

Задание: провести реакцию. Сделать вывод.

Работа № 28. Гидролиз жира и обнаружение продуктов гидролиза

Основную массу липидов пищи представляют триацилглицеролы, в меньшей степени фосфолипиды и стероиды. Постадийный гидролиз триацилглицеролов осуществляется панкреатической липазой. Липаза гидролизует жиры преимущественно в положениях 1 и 3, поэтому основными продуктами гидролиза являются моноацилглицеролы, свободные жирные кислоты, глицерол.

Гидролиз жиров при промышленном производстве проводят либо при воздействии перегретого пара, либо при нагревании в водной среде в присутствии щелочей и минеральных кислот. Наибольшее значение имеет реакция омыления жиров, в

результате которой образуются мыла – соли высших жирных кислот.

Материалы и оборудование: пробирки в штативе, пипетки Пастера, водяная баня, растительное масло, 10% спиртовый раствор КОН, 30% NaCl, 5% CaCl₂, 10% Pb(CH₃COO)₂, 10% серная и соляная кислоты, 10% NaOH, 2% CuSO₄, дистиллированная вода.

28. 1. Получение жидкого мыла

Ход работы. В пробирку налить 0,5 мл масла, добавить 6 мл 10% спиртового раствора КОН и осторожно подогреть на водяной бане, непрерывно перемешивая путем встряхивания. В результате реакции омыления образуется жидкое мыло. Полученное мыло разлить в 5 пробирок и провести опыты, представленные ниже.

28.2. Физико-химические свойства и обнаружение продуктов гидролиза жиров

1. Высаливание мыла

Ход работы. В пробирку с жидким мылом прилить 1-2 мл 30% раствора хлористого натрия. Происходит выделение мыла из раствора (высаливание).

2. Получение нерастворимых мыл кальция и свинца

Ход работы. Взять две пробирки с жидким калийным мылом и прибавить в одну 0,5-1 мл 5% раствора хлористого кальция, а в другую 0,5-1 мл 10% раствора уксуснокислого свинца. Образуются осадки нерастворимых мыл кальция и свинца.

3. Разложение мыла минеральными кислотами

Ход работы. В четвертую пробирку с жидким мылом прибавить равный объем 10% раствора серной или соляной кислоты. Поместить в кипящую водяную баню до образования на поверхности раствора жирного слоя высших карбоновых кислот.

4. Обнаружение глицерина

Ход работы. В пробирку налить 2-3 мл гидролизата, добавить равный объем 10% раствора гидроксида натрия и 3-5 капель 2% раствора сульфата меди. Содержимое пробирки тщательно перемешать. Пронаблюдать образование синей окраски в результате образования глицерата меди.

Задание: написать уравнения реакций, описанных выше.

Работа № 29. Качественная реакция на желчные кислоты

Желчные кислоты образуются из эфиров холестерина в печени и поступают в двенадцатиперстную кишку с желчью. В просвете кишечника желчные кислоты, в основном гликохолевая и таурохолевая (конъюгаты с глицином и таурином соответственно), являются амфифильными и служат в качестве как эмульгирующих, так и стабилизирующих образовавшуюся эмульсию агентов.

При формировании эмульсионной капли полярные части молекул желчных кислот ориентированы наружу к водной среде, в результате чего поверхность всех частиц приобретает одноименный электрический заряд. Возникшее электростатическое взаимодействие приводит к взаимному отталкиванию частиц эмульсии.

Присутствие желчных кислот можно обнаружить в реакции Петтенкофера, когда желчные кислоты дают пурпурное

окрашивание с оксиметилфурфуролом, который образуется из гексозы в присутствии концентрированной серной кислоты.

Материалы и оборудование: часовые стекла, стеклянные палочки, желчь, 20% сахароза, концентрированная серная кислота.

Ход работы. На сухое часовое стекло, под которое положен лист белой бумаги, нанести 1 каплю желчи и 1 каплю 20% раствора сахарозы и хорошо перемешать стеклянной палочкой. Рядом нанести 3 капли концентрированной серной кислоты (стекло после этого не следует сдвигать с места). Через некоторое время на месте слияния капель наблюдается развитие красноватой окраски, которая при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

Задание: провести реакции, сделать выводы.

Работа № 30. Определение кислотного числа

Кислотным числом (к.ч.) или кислотностью жира называется количество миллиграммов едкого калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла. Это число указывает на качество масла. Сертифицированное высококачественное масло должно быть изготовлено из зрелых семян, так как они содержат мало свободных жирных кислот. Масло, полученное из незрелых семян, содержит много свободных жирных кислот, что снижает качество масла. Кислотное число такого низкокачественного масла будет высоким - более 2.

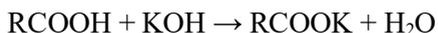
При хранении масла в нем может происходить увеличение свободных жирных кислот. Этот процесс связан с расщеплением жира ферментом липазой. Таким образом, величина кислотного числа масла непостоянна (Табл. 12).

Таблица 12

Кислотные числа для подсолнечного масла

Подсолнечное масло	КЧ, мг КОН/г жира
Рафинированное	0,40
Рафинированное гидратированное	1,25
Гидратированное 1-го сорта	2,25
Гидратированное 2-го сорта	6,00
Нерафинированное высшего сорта	1,50
Нерафинированное 1-го сорта	2,25

Принцип метода состоит в том, что масло нейтрализуют титрованным раствором КОН, в результате чего между едким калием и находящимися в масле свободными жирными кислотами идет следующая реакция:



Жирная кислота

Соль жирной кислоты

По количеству раствора КОН, затраченного на нейтрализацию кислот, судят о величине кислотного числа.

Материалы и оборудование: колбы конические на 100 мл, бюретки, цилиндры на 20 мл, 96% спирт, эфир, 0,1 н спиртовой раствор едкого калия, 1% спиртовой раствор фенолфталеина, 1% спиртовой раствор тимолфталеина в капельницах, титрованный 0,1 н раствор HCl, различные масла.

Ход работы. Для определения кислотного числа в сухую коническую колбу на 100 мл поместить навеску масла от 2 до 3 г, растворить в 20 мл смеси спирта и эфира (1:1) или только в 20 мл спирта, добавить несколько капель фенолфталеина, и титровать спиртовым 0,1 н. раствором едкого калия до слабо-розовой окраски, не исчезающей при встряхивании раствора.

Если для исследования был взят темноокрашенный жир, в котором трудно наблюдать появление розовой окраски, вместо

фенолфталеина берут 1% спиртовой раствор тимолфталеина и титруют до появления синей окраски.

Кислотное число (КЧ) вычисляют по формуле:

$$\text{КЧ} = \frac{V \times T_{\text{КОН}} \times 1000}{M},$$

где V – количество миллилитров КОН; $T_{\text{КОН}}$ – титр (для нахождения количества щелочи в граммах); M – величина навески масла в граммах.

Пример расчёта: навеска масла – 2,0 г; на титрование израсходовано – 0,3 мл 0,1 н. КОН; титр раствора КОН – 0,0056,

$$\text{КЧ} = \frac{0,3 \times 0,0056 \times 1000}{2} = 0,75$$

Титр КОН определяется по соляной кислоте с известным титром.

Задание: рассчитать кислотное число и определить качество масла.

Работа № 31. Определение перекисного числа

Кислоты, входящие в состав жиров могут окисляться и образовывать перекиси в присутствии кислорода воздуха. Этот процесс наблюдается при порче жиров, а также при их высыхании. Следовательно, перекисное число служит показателем окислительных изменения жиров.

Содержание перекисей, или так называемое перекисное число, принято выражать количеством миллиграмм йода, выделенного перекисями из 100 г жира (в процентах) или в миллимолях активного кислорода на килограмм жира (ммоль активного кислорода/кг).

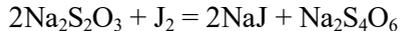
Таблица 13

Зависимость степени окислительной порчи жира от перекисного числа

Перекисное число		Степень порчи жира
мг I ₂ /100 г	ммоль активного кислорода /кг	
до 0,03	3	Свежий
0,03–0,06	3–5	Свежий, но не подлежит хранению
0,06–0,10	5–8	Сомнительной свежести
более 0,10	8	Испорченный

Определение перекисного числа основано на том, что перекисные соединения в кислой среде реагируют с йодистым калием, выделяя из него йод. Выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия.

По количеству тиосульфата, затраченного на связывание выделившегося йода, вычисляют перекисное число.



Материалы и оборудование: конические колбы на 100 мл, бюретка, весы, дистиллированная вода, жир, хлороформ, ледяная уксусная кислота, 50% йодид калия (к 50 г йодида калия добавить 50 мл дистиллированной воды). Использовать только свежеприготовленный раствор, хранить в темной посуде. Для проверки перед анализом к 0,5 мл раствора йодида калия добавить 30 мл уксусной кислоты и хлороформа в соотношении 3:2 и две капли 0,5% раствора крахмала. В случае появления голубой окраски, которая обесцвечивается при добавлении более чем одной капли 0,01 н раствора тиосульфата натрия, раствор йодида калия готовят заново), 1% раствор крахмала, 0,01н тиосульфат натрия.

Ход работы. Взвесить около 1 г жира и поместить в коническую колбу на 100 мл прилить 10 мл хлороформа (или 10

мл спирта этилового) и 15 мл ледяной уксусной кислоты. Затем внести 1 мл свежеприготовленного 50% раствора йодида калия. Смесь тщательно перемешать, закрыть пробкой и оставить в темном месте при температуре 15–25 °С. В случае расслоения реакционной смеси необходимо добавить растворителя. Спустя 3 минуты в колбу влить 75 мл дистиллированной воды, в которую заранее добавить 5 капель 1% раствора крахмала, до появления фиолетово-синей окраски. Выделившийся йод оттитровать 0,01 н раствором тиосульфата натрия до молочно-белой окраски, устойчивой в течение 5 с (опыт).

Контрольный опыт проводят параллельно, вместо жира вносят 1 мл воды, добавляют 10 мл хлороформа (или 10 мл спирта), 15 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл 50% раствора йодида калия, 75 мл воды, в которую заранее добавить 5 капель 1% раствора крахмала, и оттитровывают полученную смесь 0,01 н раствором тиосульфата натрия. Если на контрольное измерение идет более 0,1 мл 0,01 н раствора тиосульфата натрия, то необходимо проверить реактив.

Вычисление результатов (ПЧ) проводят по следующей формуле:

$$\text{ПЧ} = \frac{(V_0 - V_k) \times 0,001269 \times 100}{m},$$

где V_0 – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование опытного образца, мл;
 V_k – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контрольного образца, мл;
0,001269 – титр 0,01 н раствора тиосульфата натрия, г/мл;
100 – коэффициент пересчета на 100 г анализируемого жира;
 m – масса исследуемого жира, г.

Перекисное число (ПЧ, ммоль $\frac{1}{2}O/kg$) жира рассчитать по формуле:

$$ПЧ_0 = \frac{(V_0 - V_k) \times 0,01 \times 100}{m} \times 1000,$$

где 0,01 – концентрация раствора тиосульфата натрия, ммоль/мл; 1000 – коэффициент пересчета на килограмм.

Для пересчета перекисного числа в единицах ммоль активного кислорода/кг (ПЧ₀) необходимо величину перекисного числа, выраженную в процентах (ПЧ₁), умножить на коэффициент – 78.

$$ПЧ_0 = 78 \times ПЧ_1$$

Задание: рассчитать перекисное число и определить качество масла.

Работа № 32. Определение числа омыления

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира, как свободных, так и входящих в состав триацилглицеринов. Число омыления для различных жиров колеблется в пределах 200-300 мг (Табл. 14).

Таблица 14

Число омыления некоторых масел

Масло	Число омыления
Сливочное масло	216-240 мг
Свиное сало	195-203 мг
Оливковое масло	185-196 мг
Подсолнечное масло	189,9-190,6 мг
Пальмовое масло	196,0-210 мг
Соевое масло	191,6-192,1 мг
Пчелиный воск	88-103 мг

Материалы и оборудование: колба на 100 мл, масло, цилиндр, 0,5 н спиртовой КОН, водяная баня, дистиллированная вода, фенолфталеин, бюретка, 0,5 н НСl.

Ход работы. В колбу помещают 1 г масла, вливают 20 мл 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия, соединяют с обратным холодильником и помещают на 40-50 минут в кипящую водяную баню. Не следует допускать испарения спирта через холодильник (недостающее количество спирта можно добавить после окончания гидролиза). То же самое продельвают с контрольной колбой, в которой масло заменено на 1 мл воды (контроль). По истечении времени нагревания колбы охлаждают, добавляют по 4 капли фенолфталеина, по 10 мл воды, перемешивают и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения розовой окраски.

По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления (ЧО):

$$\text{ЧО} = \frac{(V_1 - V_2) \times 28,055}{m},$$

где V_1 – количество 0,5 М раствора соляной кислоты, израсходованное на контрольное титрование, мл, V_2 – то же на опытное титрование; 28,055 – титр 0,5 н гидроксида калия, мг/мл); m – навеска масла, г.

Задание: рассчитать число омыления и определить подлинность масла.

Работа № 33. Определение эфирного числа

Эфирным числом (ЭЧ) называется число миллиграммов гидроксида калия, образующихся при омылении триацилглицеринов, содержащихся в 1 г жира. Это число

определяют как разницу между числом омыления (ЧО) данного жира и его кислотным числом

$$(КЧ): ЭЧ = ЧО - КЧ.$$

Задание: рассчитать эфирное число изучаемого масла.

Контрольные вопросы по теме «Липиды»

1. На чем основана классификация липидов, назовите основные классы?
2. Перечислите основные функции липидов в жизнедеятельности организма
3. Какова сущность процесса эмульгирования жиров, его физиологическое значение?
4. Почему при набухании и прорастании семян активность липаз увеличивается?
5. С использованием каких числовых параметров можно охарактеризовать качество масла?

Тема Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновая кислота (НК) – высокомолекулярное органическое соединение, биополимер (полинуклеотид), состоящий из мономеров нуклеотидов. Нуклеотид – это химическое соединение трех веществ: азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил), углевода (моносахарида – дезоксирибозы или рибозы) и фосфорной кислоты. Нуклеотиды соединены между собой фосфодиэфирными связями. Кроме главных азотистых оснований в нуклеиновых кислотах присутствуют небольшие количества нетипичных (минорных) оснований (псевдоуридин, дигидроуридин, метиладенозин и др.). Комплекс, состоящий из

азотистого основания и углевода, называется нуклеозидом или гликозиламином.

Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации. Во всех клеточных организмах всегда присутствуют оба типа нуклеиновых кислот – ДНК и РНК. При этом вирусы содержат только либо ДНК, либо РНК.

Нуклеиновые кислоты имеют первичную, вторичную, третичную структуры.

Работа № 34. Визуализация нуклеиновых кислот на агарозном геле

Материалы и оборудование: весы, переносной штатив для заливки геля, гребенка, кювета для проведения электрофореза, силовой блок, ДНК-маркер, раствор бромфенолового синего для молекулярных работ, 25 мМ раствор EtBr, Tris-base, уксусная кислота, EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), агароза, мерная колба на 0,5 или на 1 л, колба коническая (250 мл), перчатки, очки/щитки с УФ защитой, образцы ДНК или ПЦР-продукты, автоматические пипетки, наконечники для пипеток.

Важно! Все работы проводят в перчатках.

Ход работы. 1. *Приготовление TAE (Tris-Acetate-EDTA) буфера.* В мерную колбу на 1 л налить 500 мл деионизованной воды и добавить 4,84 г Tris base (MW=121,14), 1,14 мл уксусной кислоты (конц.) и 0,2 мл 0,5М EDTA (MW=292,24) и хорошо перемешать. Измерить рН полученного раствора и при необходимости довести до 8,5. Далее полученный раствор довести до метки 1 л деионизованной водой (вода, очищенная от ионов примесей).

2. *Получение и заливка геля в переносном лотке.*

Взять лоток для заливки геля и при помощи регулировочных винтов установить подставку для лотка горизонтально (Рис. 4).

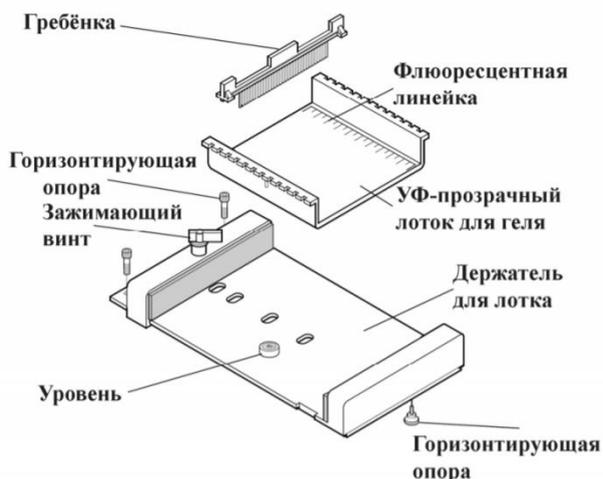


Рис. 4. Переносной лоток для заливки геля.

Отодвинуть подвижную стенку держателя к краю подставки – для этого ослабить зажимающий винт, повернув его и слегка вытянув вверх. Далее поместить лоток для геля одной из открытых его сторон вплотную к неподвижной стенке держателя, тогда как подвижную стенку придвинуть вплотную к лотку с другой стороны. Зафиксировать стенки держателя в плотно прижатом к лотку положении – для этого повернуть зажимающий винт и одновременно вдавить его вниз. Когда зажимающий винт попадёт в один из разъёмов, повернуть его до упора в любую сторону. После чего установить одну или несколько гребёнок, фиксируя её/их в соответствующих пазах по бокам лотка.

В колбе из термостойкого стекла объемом 250 мл приготовить 100 мл 1 % агарозного геля из ТАЕ буфера и агарозы, тщательно перемешать, и поместить на водяную баню. Нагревать, осторожно помешивая, до полного растворения агарозы. Полученный гель остудить до температуры 50-60 °С. Добавить в гель необходимое количество EtBr, для чего

рассчитать концентрацию EtBr для данного объема геля (конечная концентрация EtBr должна составлять 2 мкМ). Добавлять EtBr вытяжном шкафу, погружая носик пипетки в расплавленную агарозу. После чего плавно покачивая перемешать гель и влить его в лоток, избегая образования пузырей. Лоток накрыть фольгой (EtBr является светочувствительным) и дать гелю затвердеть при комнатной температуре в течение 30-40 минут.

Из застывшего геля аккуратно вытащить гребёнку, затем отодвинуть подвижную стенку держателя к краю подставки – для этого ослабить зажимающий винт, повернув его и слегка вытянув наверх. Далее аккуратно достать лоток с гелем из держателя, стараясь не повредить гель; при затвердевании агарозы гель может прилипнуть к стенке держателя. Перенести лоток с гелем в кювету для электрофореза. Установить лоток с гелем так, чтобы лунки для нанесения образцов располагались со стороны отрицательного электрода. Затем заполнить кювету электродным буфером (1× TAE) до метки, гель должен быть покрыт слоем буфера 2-5 мм.

3. Нанесение образцов на гель.

Автоматической пипеткой в первую и последнюю лунки внести 6 мкл готовый к использованию ДНК-маркера. Затем, в строго определенном порядке внести образцы, отрицательный и положительный контроли, для этого 5 мкл образца смешать с 1 мкл лидирующего красителя (бромфеноловый синий). Нанесение образцов необходимо проводить аккуратно, чтобы не проколоть лунку геля. Порядок нанесения образцов зафиксировать в тетради (Рис. 5). Также обязательно записать состав геля, напряжение и время разгонки образцов.

Далее кювету для электрофореза закрыть крышкой и подключить источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от отрицательного электрода к положительному. При этом более короткие молекулы ДНК будут двигаться быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют такие факторы, как

концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера.



Рис.5. Пример фиксации в рабочей тетради порядка нанесения образцов на агарозный гель

После окончания электрофореза (от 10 до 60 минут) гель переносят в трансиллюминатор, излучающий свет в ультрафиолетовом диапазоне, для визуализации. Результат фиксируют на электронный носитель (компьютер, цифровая фотокамера). Далее, используя данные ДНК-маркера, определить по полученной картинке размеры полос на геле в п.н.

Задание: произвести расчеты реактивов для приготовления геля, провести электрофорез, подсчитать количество пар нуклеотидов в нанесенных образцах.

Контрольные вопросы по теме «Нуклеиновые кислоты»

1. Какие вещества являются мономерами нуклеиновых кислот? При помощи каких химических связей они соединены в полинуклеотидные цепи?
2. Какие методы выделения и исследования нуклеиновых кислот вы знаете?
3. Опишите основные этапы проведения электрофореза в агарозном геле.

Литература

1. *Таганович А.Д., Олецкий Э.И., Коневалова Н.Ю., Лелевич В.В.* Биологическая химия. Практикум: учеб. пособие. Минск: Новое знание, 2014. 347 с.

2. *Чернов Н.Н., Березов Т.Т., Лукашева Е.В. и др.* Биохимия: практикум: учеб. пособие. Ростов н/Д: Феникс, 2017. 205 с.

3. *Дрюк В.Г., Скляр С.И., Карцев В.Г.* Биологическая химия: учебное пособие для вузов. 2-е изд., перераб. и доп. Москва: Юрайт, 2021. 292 с. URL: <https://urait.ru/bcode/474423> (дата обращения: 29.11.2021).

4. *Ершов Ю.А., Зайцева Н.И.* Биохимия: учебник и практикум для вузов / под ред. С.И. Щукина. 2-е изд., испр. и доп. Москва: Юрайт, 2021. 323 с. URL: <https://urait.ru/bcode/469840> (дата обращения: 29.11.2021).

5. *Лещук Р.И., Вайшла О.Б., Войцековская С.А.* Практикум по биохимии. 2-е изд. перераб. и доп. Томск: Томский государственный университет, 2002. 192 с.

6. *Нельсон Д.Л.* Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 1 Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. Т. П. Мосоловой / под ред. А.А. Богданова, С. Н. Кочеткова. Москва: БИНОМ. Лаб. знаний, 2020. 694 с.

7. *Рогожин В.В.* Практикум по биохимии: учеб. пособие. СПб.: Издательство «Лань», 2013. 544 с.

8. *Строев Е.А., Макарова В.Г., Матвеева И.В.* Практикум по биологической химии: учеб. пособие. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2012. 384 с.

9. *Филлипович Ю.Б.* Основы биохимии. М.: Изд. Флинта, 1999. 508 с.

10. *Чиркин Л.А.* Практикум по биохимии: учеб. пособие Мн.: Новое знание, 2002. 512 с.

Учебное издание

Филонова Мария Васильевна
Большакова Марина Александровна
Чурин Алексей Александрович

Практикум по биохимии

Учебно-методическое пособие
по курсу «Биохимия» для студентов биологического института
направлений подготовки 06.03.01 биология,
35.03.04 агрономия, 05.03.06 экология и природопользование

Издание подготовлено в авторской редакции

Отпечатано на участке цифровой печати
Издательства Томского государственного университета
Заказ № 4907 от «23» декабря 2021 г. Тираж 30 экз.