

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Н. П. Нефедова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ
для студентов,
обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки
36.03.02 Зоотехния**

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2022

УДК 577.1 (076)

Рецензент

кандидат технических наук, доцент кафедры химия ФГБОУ ВО «КГТУ»
Г. Е. Степанцова

Нефедова, Н. П.

Биологическая химия: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студ. обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния / Н. П. Нефедова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2022. – 41 с.

В учебно-методическом пособии по выполнению лабораторных работ для дисциплины «Биологическая химия» представлены организационно-методические указания, вопросы техники безопасности, методики выполнения лабораторных работ для направления подготовки 36.03.02 Зоотехния, формы обучения очная, заочная.

Табл. 8, список лит. – 9 наименований

Учебное пособие рассмотрено и рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала кафедрой химии 31 мая 2022 г., протокол № 8

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 15 июня 2022 г., протокол № 7

УДК 577.1 (076)

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2022 г.
© Нефедова Н. П., 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	4
1	ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ	5
2	ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ.....	7
3	МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ.....	10
	Тема: Химический состав живых организмов	
	Лабораторная работа № 1. Количественное определение углеводов колориметрическим методом Нельсона.....	10
	Тема: Витамины	
	Лабораторная работа № 2. Проведение качественных реакций на водорастворимые витамины.....	11
	Тема: Ферменты	
	Лабораторная работа № 3. Определение специфичности действия амилазы слюны, изучение влияния температуры на ее активность амилазы.....	15
	Тема: Гормоны	
	Лабораторная работа № 4. Проведение качественных реакций на гормоны.....	19
	Тема: Биологическое окисление	
	Лабораторная работа № 5. Открытие ферментов биологического окисления: каталазы и пероксидазы в биологическом материале.....	21
	Тема: Обмен углеводов	
	Лабораторная работа № 6. Обнаружение дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида.....	23
	Тема: Обмен липидов	
	Лабораторная работа № 7. Изучение методов определения качества жира.....	24
	Лабораторная работа № 8. Получение гидролизата лецитина и установление его состава с помощью качественных реакций.....	28
	Тема: Обмен белков и нуклеиновых кислот	
	Лабораторная работа № 9. Изучение растворимости и реакций осаждения белков.....	30
	Лабораторная работа № 10. Получение гидролизата нуклеопротеидов и установление его состава с помощью качественных реакций.....	33
	Тема: Биохимия молочной железы	
	Лабораторная работа № 11. Количественное определение белка в молоке методом формольного титрования.....	35
	Тема: Биохимия мышечной ткани	
	Лабораторная работа № 12. Разделение белков мышц.....	37
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биологическая химия» предназначено для студентов очной и заочной форм обучения в бакалавриате по направлению подготовки 36.03.02 Зоотехния.

Целью освоения дисциплины «Биологическая химия» является формирование у студентов теоретических и практических знаний по дисциплине и умения их использовать в своей профессиональной деятельности.

Задачами изучения дисциплины являются:

- изучение на молекулярном уровне химического состава живых организмов;
- изучение основных обменных процессов, протекающих в живых организмах, и их связи с деятельностью клеток, тканей, органов и организма в целом;
- приобретение экспериментальных навыков биохимических исследований, умения анализировать полученные результаты экспериментов.

Непременным условием успешного усвоения дисциплины «Биологическая химия» является выполнение лабораторного практикума.

В результате освоения лабораторного практикума студент должен

Знать:

- содержание, структуру и распределение веществ в организме;
- процессы переваривания и всасывания пищевых веществ;
- основные обменные процессы, лежащие в основе жизнедеятельности (синтез, распад, взаимопревращения веществ), их катализ и регуляцию, нарушения обмена веществ;
- правила интерпретации результатов биохимических исследований для определения физиологического состояния животных.

Уметь: применять основные методы биохимических исследований для изучения химического состава и обменных процессов в организме.

Владеть: приёмами мониторинга обменных процессов в организме.

1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Таблица 1. Тематический план лабораторных работ (ЛР)

Номер лабораторной работы	Тема дисциплины	Наименование лабораторной работы	Количество часов ЛР	
			очная форма обучения	заочная форма обучения
1	Химический состав живых организмов	Количественное определение углеводов колориметрическим методом Нельсона	2	-
2	Витамины	Проведение качественных реакций на водо- и жирорастворимые витамины	2	1
3	Ферменты	Определение специфичности действия амилазы слюны, изучение влияния температуры на активность амилазы	4	2
4	Гормоны	Проведение качественных реакций на гормоны	2	1
5	Биологическое окисление	Открытие ферментов биологического окисления: каталазы и пероксидазы в биологическом материале	2	1
6	Обмен углеводов	Обнаружение дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида	2	-
7	Обмен липидов	Изучение методов определения качества жира	2	-
8		Получение гидролизата лецитина и установление его состава с помощью качественных реакций	2	-
9	Обмен белков и нуклеиновых кислот	Изучение растворимости и реакций осаждения белков	4	2
10		Получение гидролизата нуклеопротеидов и установление его состава с помощью качественных реакций	2	1

Номер лабораторной работы	Тема дисциплины	Наименование лабораторной работы	Количество часов ЛР	
			очная форма обучения	заочная форма обучения
11	Биохимия молочной железы	Количественное определение белка в молоке методом формольного титрования	2	-
12	Биохимия мышечной ткани	Разделение белков мышц	4	-
		Итого	30	8

Подготовка к лабораторной работе включает в себя изучение теоретического материала по теме лабораторной работы; внимательное ознакомление с необходимым оборудованием и реактивами, ходом проведения лабораторной работы; подготовка ответов на вопросы для самостоятельной работы; оформление проекта отчета по лабораторной работе.

Обучающийся допускается к выполнению лабораторных работ при наличии у него лабораторного журнала (тетради) с оформленным проектом отчёта по лабораторной работе. Перед его оформлением студенту следует самостоятельно изучить теоретический материал по теме лабораторной работы, используя конспект лекций и рекомендуемую учебную литературу, теоретическое введение для лабораторной работы.

Для повышения качества подготовки к лабораторным занятиям студенту следует ответить на вопросы для самостоятельной работы, приведенные в конце описания каждой лабораторной работы.

Проект отчёта по лабораторной работе должен включать:

- название темы лабораторной работы;
- название лабораторной работы;
- необходимые теоретические сведения по теме данной лабораторной работы;
- цель лабораторной работы и для каждого опыта;
- описание хода работы, уравнения соответствующих реакций, расчётные формулы;
- свободное место в тетради для наблюдений, расчётов и выводов.

Наблюдения и выводы по каждому опыту формулируются и записываются только после выполнения каждого опыта в лаборатории органической и биологической химии. В лабораторном журнале следует предусмотреть поля.

Записи в лабораторном журнале выполняются ручкой, аккуратно и разборчиво. Нельзя стирать записи и пользоваться корректором. В случае ошибки слова и цифры зачеркивают и пишут правильные рядом один раз. На титульном листе лабораторного журнала следует привести его название с указанием названия дисциплины, фамилии и инициалов, а также учебной группы студента.

Перед выполнением лабораторной работы преподаватель проверит у каждого студента наличие оформленного проекта отчета по лабораторной работе, знание им теоретического материала по теме лабораторной работы, хода проведения работы и соответствующих уравнений реакций.

Преподаватель обращает внимание студентов на необходимость соблюдения техники безопасности при выполнении лабораторных работ. Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории и оказание первой помощи приведены в разделе 2.

Лабораторные работы выполняются студентами индивидуально, что позволяет им тщательно наблюдать ход проведения опытов и на его основе самостоятельно делать выводы, увязывая теоретические знания электронного строения, физических и химических свойств исследуемых органических соединений с практическими наблюдениями. Лабораторные работы включают значительное число опытов в виде качественных реакций на соответствующие функциональные группы. Это будет способствовать более глубокому усвоению студентами закономерностей органической химии, строения и свойств соединений разных классов.

Лабораторные работы включают опыты, проводимые капельным методом, не требующим специального обучения. Работа с малыми количествами веществ позволяет правильнее установить оптимальные количественные соотношения между реагентами для проведения соответствующих органических реакций, при этом расход реактивов значительно сокращается и повышается безопасность работы студентов. В ходе выполнения лабораторных работ студенты записывают в лабораторный журнал наблюдения и формулируют выводы по каждому опыту. Преподаватель контролирует правильность выполнения опытов каждым студентом и оформления им отчёта по лабораторной работе.

Студент, выполнивший лабораторную работу, правильно оформивший отчёт по ней (формулирование цели работы, написание уравнения реакций, описание наблюдений, формулирование выводов) и ответивший на вопросы по теме лабораторной работы получает по лабораторной работе оценку «зачтено».

2. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

Работа в химической лаборатории связана с некоторой опасностью, поскольку многие вещества в той или иной степени ядовиты, огнеопасны и взрывоопасны. Опыт показывает, что большинство несчастных случаев, происходящих в лаборатории, является следствием небрежности и невнимательности работающих.

Возможность несчастных случаев может быть исключена при выполнении всех мер предосторожности.

Обычно характер предупредительных мер, обеспечивающих безопасность выполнения эксперимента, зависит от вида работы.

Однако существуют общие правила, выполнение которых обязательно для каждого работающего в лаборатории независимо от того, какой эксперимент он выполняет:

1. Работать одному в лаборатории категорически запрещается, так как в случае несчастного случая будет некому оказать помощь пострадавшему и ликвидировать последствия аварии.

2. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину, порядок и правила техники безопасности, так как поспешность, неряшливость часто приводят к несчастным случаям с тяжелыми последствиями.

3. Каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты и аптечка, содержащая все необходимое для оказания первой помощи.

4. Категорически запрещается в лаборатории курить, принимать пищу, пить воду.

5. Нельзя приступать к работе, пока студенты не усвоили технику ее выполнения.

6. Опыты нужно проводить только в чистой посуде. После окончания эксперимента посуду следует мыть сразу же.

7. В процессе работы необходимо соблюдать чистоту, аккуратность. Следить, чтобы вещества не попадали на кожу лица и рук, так как многие вещества (галогенопроизводные, фенолы, нитросоединения, непредельные соединения и др.) вызывают раздражение кожи и слизистых оболочек.

8. Никаких веществ в лаборатории не пробовать на вкус. Нюхать вещества можно, лишь осторожно направляя на себя пары или газы легким движением руки, а не наклоняясь к сосуду и не вдыхая полной грудью.

9. На всех банках, склянках и другой посуде, где хранятся реактивы, должны быть этикетки (или надпись маркером по стеклу) с указанием названия веществ.

10. Склянки с веществами или растворами необходимо брать одной рукой за горлышко, а другой снизу поддерживать за дно.

11. Категорически запрещается затягивать ртом в пипетки органические вещества и их растворы.

12. Во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя и соседей. Нельзя также заглядывать сверху в открыто нагреваемые сосуды во избежание возможного поражения при выбросе горячей массы.

13. После окончания работы необходимо выключить газ, воду, электроэнергию.

14. Категорически запрещается выливать в раковины концентрированные растворы кислот и щелочей, а также различные органические растворители, сильно пахнущие и огнеопасные вещества. Все эти отходы нужно сливать в специальные бутылки.

15. В каждом помещении необходимо иметь средства противопожарной защиты: ящик с просеянным песком и совком к нему, противопожарное одеяло

(асбестовое или толстое войлочное), заряженные огнетушители (желательно со сжиженным углекислым газом).

16. На доступном месте в лаборатории должны находиться медикаменты для оказания первой помощи: растворы танина (в спирте), перманганата калия, борной кислоты, гидрокарбоната натрия, йодная настойка, вата, бинты, пластырь, мази от ожогов.

17. Работа с металлическим натрием (калием)

Металлический натрий хранят в банке под слоем керосина, отвешивание его производится в бюксе с керосином.

Следует остерегаться попадания воды на натрий; приступая к работе с ним, надо тщательно насухо вытереть стол.

Разрезать куски натрия и срезать с него корки следует на куске бумаги. Обрезки натрия (корки) необходимо собирать в банку с керосином, ни в коем случае нельзя выбрасывать в бак для мусора. Бумагу, на которой резали натрий, обезвреживают следующим образом: сняв с нее все, даже мелкие кусочки натрия, и скомкав, обливают ее в раковине сильной струей воды.

Колбу, в которой проводилась реакция с металлическим натрием, нельзя сразу мыть водой; следует уничтожить остатки натрия, растворяя их в спирте. Если заметного количества натрия в колбе не обнаружено, надо все же обмыть стенки колбы небольшим количеством спирта.

18. Меры первой помощи при несчастных случаях

При термических ожогах, чтобы предупредить образование пузырей, нужно сразу же смочить обожжённое место 5%-ным раствором танина в 40%-ном ном этиловом спирте. Лучше положить небольшой тампон из ваты или марли, смоченный этим раствором.

При ожогах крепкими кислотами немедленно убирают их остатки сухим материалом (тряпочками или фильтровальной бумагой) осторожно промокая, затем промывают обожжённый участок сильной струёй вода, накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 1%-ным раствором соды (гидрокарбонат натрия).

При ожогах крепкими щелочами немедленно промывают обожжённый участок сильной струёй воды и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 1%-ным раствором уксусной кислоты.

Если кислота или щёлочь попали в глаз, то его тщательно промывают водой, а затем либо 1%-ным раствором гидрокарбоната натрия (для нейтрализации кислоты), либо 2%-ным раствором борной кислоты (для нейтрализации щёлочи). Легче промывать глаз, пользуясь специальной глазной ванночкой.

При ожоге бромом поражённое место обрабатывают 10–20%-ным раствором тиосульфата натрия, пока не исчезнет бурая окраска от брома, затем промывают большим количеством воды, и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 5%-ным раствором мочевины. Можно поражённое место промыть спиртом.

При ожоге жидким фенолом побелевший участок кожи растирают глицерином до тех пор, пока не восстановится нормальный цвет кожи. Промывают поражённый участок водой и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный глицерином.

При порезах удаляют пинцетом из ранки осколки стекла, смазывают края раны спиртовым раствором йода, положив на рану стерильную повязку, забинтовывают. При сильном кровотечении немедленно перетягивают руку пластичным жгутом из резиновой трубки, лак только остановит кровотечение, жгут надо немедленно снять.

О любом самом незначительном несчастном случае немедленно сообщить преподавателю и лаборанту, не ограничиваться самостоятельным принятием мер.

19. Меры по обеспечению электробезопасности в химической лаборатории:

Особенностью действия электрического тока на человека является его невидимость.

Во время работы в химической лаборатории следует строго выполнять следующие правила электробезопасности:

- включение электрооборудования производить вставкой исправной вилки в исправную розетку;
- если во время работы обнаруживается неисправность электрооборудования или работающий почувствует действие тока, работа должна быть немедленно прекращена и неисправное оборудование должно быть сдано для проверки или ремонта;
- отключать электрооборудование при перерыве в работе и по окончании рабочего процесса.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Описание каждой лабораторной работы включает теоретический материал, касающийся электронного строения и реакционной способности соответствующих классов органических соединений, подробное описание лабораторной работы (перечень необходимых реактивов и ход выполнения опытов), вопросы для подготовки к защите лабораторной работы и учебную литературу.

Лабораторная работа № 1 (2 ч)

Количественное определение углеводов колориметрическим методом Нельсона

Цель работы – формирование навыков и умений количественного определения глюкозы.

Теоретическое введение

Метод основан на способности глюкозы восстанавливать медь $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ в медноартроновом реактиве. При добавлении арсеномолибдатного реактива

происходит восстановление арсеномолибдата аммония и образуется молибденовая синь $\text{MoO}_3 \cdot 7\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Mo}_3\text{O}_8 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Количество молибденовой сини определяется колориметрически.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

1) Оборудование: пробирки или колбы мерные на 25 мл; цилиндры мерные на 50 и 500 мл; колбы на 100 и 1000 мл; пипетки на 1 мл; водяная баня; фотоэлектроколориметр; весы лабораторные электронные.

2) Реактивы: арсеномолибдатный реактив; меднотартроновый реактив.

Ход работы. В одну пробирку или мерную колбу на 25 мл внесите 1 мл раствора глюкозы (опыт), в другую – 1 мл дистиллированной воды (контроль), в обе колбы добавьте по 1 мл меднотартронового реактива, перемешайте, затем колбы поместите в кипящую водяную баню на 20 мин, часто взбалтывайте.

После нагревания колбы охлаждайте 10 мин, прибавьте по 1 мл арсеномолибдатного реактива и взбалтывайте 15–20 мин, затем объем смеси в колбах доведите дистиллированной водой до метки (опыт).

Оптическую плотность исследуемого раствора измерьте напротив контрольного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 500–520 нм. Количество глюкозы определите по стандартной кривой.

Запишите наблюдения и сформулируйте вывод.

Вопросы для самостоятельной работы

1. К какому типу углеводов относится глюкоза?
2. Какие химические реакции лежат в основе количественного определения глюкозы колориметрическим методом Нельсона? Напишите уравнения соответствующих реакций.
3. Напишите уравнение реакции глюкозы с реактивом Фелинга. Какую функциональную группу можно при этом открыть?
4. Какое значение имеет определение глюкозы в крови?

Учебная литература: [1–4, 9]

Лабораторная работа № 2 (2 ч)

Проведение качественных реакций на водо- и жирорастворимые витамины

Цель работы – формирование навыков и умений объяснения, на каких особенностях строения основаны качественные реакции на отдельные витамины, а также умений обнаружения водо- и жирорастворимых витаминов в биологических объектах.

Теоретическое введение

Витамины – низкомолекулярные органические вещества разнообразной химической природы, жизненно важные, незаменимые в питании. Витамины поступают в организм в небольших количествах с пищей, обеспечивают нормальное протекание обменных процессов. Так, витамины (в основном водорастворимые и витамин К) и их производные принимают участие в ферментативном катализе в качестве коферментов и простетических групп,

обеспечивают нормальное состояние и функционирование биологических мембран, выполняют антиоксидантную (Е и С), гормональную (производные витаминов А и Д) и другие функции в организме. В зависимости от растворимости витамины делятся на жирорастворимые (А, Д, К, Е, F) и водорастворимые (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_с, С, Н, Р). К витаминopodobным веществам (В₄, В₈, В₁₀, В₁₁, В₁₃, В₁₅, N, U, F, коэнзим Q) относятся вещества, выполняющие функции витаминов, но в синтезирующиеся в организме. Витамины синтезируются растениями, некоторые - микрофлорой кишечника животных и человека. Содержание большинства витаминов достаточно в обычных продуктах питания.

Наличие витаминов и их последующее количественное определение в продуктах питания, кормах и других объектах может быть обнаружено с помощью качественных цветных реакций.

Витамин А при нагревании с серной кислотой образует окрашенный продукт дегидратации; с уксусной кислотой, насыщенной сульфатом железа (II), образует ретинолсульфат голубого цвета.

Витамин Е окисляется концентрированной азотной кислотой в α-токоферилхинон – красного или желтовато-красного цвета. Метод используется для количественного определения витамина Е. Витамин Е (спиртовой раствор) окисляется хлоридом железа (III) в α-токоферилхинон – красного цвета.

Реакция на рибофлавин основана на его восстановлении водородом, выделяющимся при взаимодействии цинка с концентрированной соляной кислотой, сначала в родофлавин розового цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин и последующем окислении лейкофлавина кислородом воздуха в рибофлавин.

Реакция на витамин С основана на том, что $K_3\{Fe(CN)_6\}$ восстанавливается аскорбиновой кислотой до $K_4[Fe(CN)_6]$, который с ионом железа в степени окисления +3 образует в кислой среде гексациано-(II)феррат железа (берлинскую лазурь).

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет. Координационные связи возникают между ионами железа и атомами кислорода фенольных гидроксильных групп молекулы рутина.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Опыт 1. Качественные реакции на витамин А

Для выполнения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы: витамин А (ретинол), масляный раствор; серная кислота, концентрированная; уксусная кислота, ледяная; сульфат железа, насыщенный раствор; треххлористая сурьма, 33%-ный раствор хлороформа.

а) реакция с концентрированной серной кислотой

Ход работы. В сухую пробирку по стенке опустите 2–3 капли масляного раствора витамина А, затем осторожно опустите 1 каплю серной кислоты. В

месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется синее, затем фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

б) реакция с сульфатом железа (II)

Ход работы. К 1–2 каплям 0,05%-ного раствора витамина А в хлороформе добавьте 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа, и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

Опыт 2. Качественные реакции на витамин Е

Для выполнения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы: α -токоферол, 0,1%-ный раствор в 96%-ном спирте; азотная кислота, концентрированная; хлорид железа (III).

а) реакция с концентрированной азотной кислотой

Ход работы. В сухую пробирку налейте 2–3 капли масляного раствора витамина Е или 4–5 капли 0,1%-ного спиртового раствора витамина Е, прибавьте 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки перемешайте. Пробирку поместите на водяную баню при 70 °С (не выше); образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается и верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

б) реакция с хлоридом железа (III)

Ход работы. В сухую пробирку налейте 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора витамина Е, прибавьте 5 капель хлорида железа (III) и содержимое пробирки тщательно перемешайте. Пробирку поместите в водяную баню при 70 °С до появления красного окрашивания.

Опыт 4. Качественная реакция на витамины группы К

Для выполнения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы: метионин, 0,25%-ный спиртовой раствор или викасол, 0,05%-ный раствор, анилин.

Ход работы. В сухую пробирку налейте 10 капель 0,25%-ного спиртового раствора метионина, или 0,05%-ного раствора викасола, добавьте 5 капель анилина и встряхнуть. При наличии витаминов группы К жидкость окрашивается в красный цвет.

Опыт 5. Качественные реакции на витамин В₁

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками; колба мерная на 200 мл; пипетки.

Реактивы: тиаминхлорид, порошок и 0,01%-ный раствор; основной раствор сульфаниловой кислоты (0,9 г сульфаниловой кислоты поместить в мерную колбу на 200 мл, добавить 9 мл концентрированной соляной кислоты, затем объем раствора довести дистиллированной водой до метки); нитрит натрия, 5%-ный раствор; карбонат натрия, 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; гексациано-(III) феррат калия, 5%-ный раствор; изобутиловый спирт; этиловый спирт, 50%-ный раствор.

а) взаимодействие витамина В₁ с диазореактивом

Ход работы. К 5 каплям основного раствора сульфаниловой кислоты прибавьте 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия. К полученному раствору диазореактива добавьте небольшое количество (на кончике скальпеля) тиаминхлорида и 5–7 капель 10%-ного раствора карбоната натрия. Жидкость окрашивается в оранжево-красный цвет.

б) реакция окисления тиамин в тиохром

Ход работы. К 2–3 мг тиаминхлорида в пробирке добавьте 5–10 капель 5%-ного раствора гексациано-(III) феррата калия и содержимое тщательно перемешайте. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамин в тиохром.

Опыт 6. Качественная реакция на витамин В₂

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

Оборудование: штатив лабораторный с пробирками.

Реактивы: рибофлавин (в таблетках); соляная кислота (конц.); цинк (гранулированный).

Ход работы. 1/10 часть таблетки рибофлавина растворите в 0,5 мл воды, наблюдайте окрашивание и флуоресценцию раствора. В раствор добавьте 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.

Опыт 7. Качественные реакции на витамин С. Реакция с гексациано-(III)-ферратом калия

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 мл (5шт.); термостат на 40 °С.

Реактивы: витамин С, 0,002%-ный раствор; 0,01%-ный раствор; гексациано-(III)-феррат калия, 5%-ный раствор; соляная кислота, 10%-ный раствор; хлорид железа, 1%-ный раствор.

Ход опыта. В пробирку налейте 1 мл сока капусты, прибавьте 2 капли раствора гидроксида калия и 2 капли раствора гексациано-(III) феррата калия, энергично встряхните содержимое пробирки. Затем в пробирку добавьте 6–8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1–2 капли раствора хлорида железа - (III). Выпадает синий (или зеленовато-синий) осадок берлинской лазури.

Опыт 7. Качественные реакции на витамин Р. Реакция с хлоридом железа (III)

Для выполнения опыта необходимы:

Оборудование: водяная баня; пипетки; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1, 2 и 5 мл; колба коническая на 25 мл; чашка выпарительная на 25 мл.

Реактивы: никотиновая кислота (или ее амид), 0,1%-ный раствор; хлорида железа (III) 1 %-ный раствор.

Ход работы. К 1–2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавьте несколько капель 1%-ного раствора хлорида железа (III). Возникает зеленое окрашивание.

Запишите наблюдения для каждого опыта.

Сформулируйте выводы для каждого опыта.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какие органические вещества называются витаминами?
2. Классификация витаминов по растворимости.
3. Приведите формулы, буквенные обозначения и названия отдельных витаминов.
4. Какова связь витаминов с ферментами?
5. Какие методы определения витаминов вам известны?
6. На чем основаны качественные реакции на отдельные витамины?

Учебная литература: [1–4]

Лабораторная работа № 3 (4 ч)

Определение специфичности действия амилазы слюны, изучение влияния температуры на ее активность амилазы

Цель работы – формирование навыков и умений установления специфичности амилазы, изучения влияния температуры, реакции среды активаторов и ингибиторов на активность амилазы.

Теоретическое введение

Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы, обеспечивающих протекание биохимических реакций в организме. Благодаря ферментам, химические реакции в живом организме протекают с большой скоростью при физиологических условиях. Ферменты ускоряют биохимические реакции, понижая энергию активации.

Для ферментов характерна специфичность действия, которая заключается в избирательности по отношению к субстрату или пути превращения.

Активность ферментов зависит от температуры, что объясняется их белковой природой. Воздействие высокой температуры приводит к денатурации молекулы фермента и утрате им возможности ускорять гидролиз 1,4-α-гликозидных связей в полисахаридах крахмала. Низкая температура обратимо инактивирует фермент.

Свойства ферментов в данной лабораторной работе изучаются на примере α-амилазы слюны, ускоряющей гидролиз 1,4-α-гликозидных связей в гликогене, полисахаридах крахмала. Лабораторным субстратом выбран крахмал.

Ход ферментативного гидролиза крахмала при участии α-амилазы контролируется по изменению окраски, возникающей при добавлении в инкубационную среду раствора йода. Нерасщепленный крахмал дает с йодом синее окрашивание. Промежуточные продукты гидролиза крахмала – декстрины (амилодекстрины, эритродекстрины, мальтодекстрины) – от фиолетового до красно-коричневого. Конечный продукт гидролиза крахмала – мальтоза с йодом не реагирует, поэтому цвет инкубационной среды – слабо-желтая окраска раствора йода.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Приготовьте разведенную слюну и контрольный раствор:

Прополоскайте рот два раза дистиллированной водой для удаления остатков пищи. Возьмите в рот 20 мл дистиллированной воды, держите ее во рту около 2 мин. Полученную жидкость слейте в стакан или колбу. Жидкость представляет собой раствор слюны, содержащий амилазу. При изучении свойств амилазы в работе постоянно приходится сравнивать полученную окраску инкубационного раствора после взаимодействия ее с йодом, с окраской контрольного раствора, содержащего не гидролизованный крахмал, для того чтобы установить степень гидролиза, прошедшего под действием фермента. Поэтому в начале работы после приготовления раствора слюны следует приготовить контрольную пробирку № 1, в которую прибавить 5 капель крахмала, 5 капель воды и 1 каплю раствора Люголя (раствор йода в йодистом калии). Раствор окрашивается в сине-фиолетовый цвет. Пробирка № 1 является контрольной для других опытов на протяжении всего хода работы.

Опыт 2. Специфичность амилазы

Для выполнения опыта необходимы:

Приборы: штатив с микропробирками, пипетки, термостат.

Реактивы: раствор слюны; крахмала, 1%-ный раствор; сахароза, 1%-ный раствор; раствор Люголя; жидкость Фелинга.

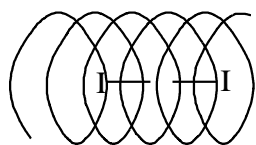
Ход работы. В пробирку № 2 налейте 5 капель раствора слюны и 5 капель раствора крахмала. Полученную смесь поместите в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования смесь разделите на две пробирки, в одну добавить 1 каплю раствора Люголя, а во вторую – 5 капель жидкости Фелинга (раствор нагреть). Сравните полученный результат с контролем.

В пробирку № 3 налить 5 капель раствора слюны и 5 капель раствора сахарозы. Полученную смесь поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования смесь разделите на две пробирки, в одну прилейте 1 каплю раствора Люголя, во вторую – 5 капель жидкости Фелинга (раствор нагреть).

Наблюдения и выводы оформите в виде табл. 2 и напишите уравнения реакций.

Таблица 2. Результаты опыта

Номер пробирки	Фермент	Субстрат	Наблюдения		Выводы
			реакция с раствором Люголя	реакция с жидкостью Фелинга	
1 (контроль)	-	Крахмал			
2	Амилаза	Крахмал			
3	Амилаза	Сахароза			



комплекс амилозы с йодом

Опыт 3. Термолабильность амилазы

Для выполнения опыта необходимы:

Приборы: штатив с микропробирками, пипетки, термостат, кипящая водяная баня, ледяная баня.

Реактивы: раствор слюны, крахмал, 1%-ный раствор; раствор Люголя.

Ход работы. В пробирку № 4 налейте 5 капель раствора слюны, поставьте в кипящую водяную баню, содержимое прокипятите 10 мин. После этого в пробирку добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем (см. п. 2). В пробирку № 5 налейте 5 капель раствора слюны, поставьте на ледяную баню на 10 мин. После этого в пробирку добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя и сравните полученный результат с контролем. Затем пробирку поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем. В пробирку № 6 налейте 5 капель раствора слюны, добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

Наблюдения и выводы оформите в виде таблицы и напишите уравнения реакций.

Таблица 3. Результаты опыта

Номер пробирки	Воздействие	Температура воздействия, °С	Наблюдения (реакция с раствором Люголя)	Выводы
1 (контроль)		Комнатная		
2	Кипячение	100		
3	Охлаждение	0		
4	-	37–40		

Опыт 4. Влияние реакции среды на активность амилазы

Для выполнения опыта необходимы:

Приборы: штатив с микропробирками, пипетки, термостат.

Реактивы: раствор слюны; крахмал, 1%-ный раствор, кислота соляная 0,1 н. раствор; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; раствор Люголя.

Ход работы. В пробирку № 7 налейте 5 капель раствора слюны, 1 каплю дистиллированной воды и 2 капли 0,1 н. раствора соляной кислоты (кислая

среда). После этого в пробирку добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем (см. п. 2).

В пробирку № 8 налейте 5 капель раствора слюны, 1 каплю дистиллированной воды и 2 капли 0,1 н. раствора гидроксида натрия (щелочная среда). После этого в пробирку добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

В пробирку № 9 налейте 5 капель раствора слюны, 3 капли воды (нейтральная среда). После этого в пробирку добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

Наблюдения и выводы оформите в виде таблицы и напишите уравнения реакций.

Таблица 4. Результаты опыта

Номер пробирки	РН среды	Наблюдения (реакция с раствором Люголя)	Выводы
1	<7		
2	>7		
3	≈ 7		

Опыт 5. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Для выполнения опыта необходимы:

Приборы: штатив с микропробирками, пипетки, термостат.

Реактивы: раствор слюны; крахмал, 1%-ный раствор; хлорид натрия; 1%-ный раствор; медь серноокислая, 1%-ный раствор; раствор Люголя.

Ход работы. В пробирку № 10 поместите 5 капель раствора слюны и 1 каплю раствора хлорида натрия, добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

В пробирку № 11 налейте 5 капель раствора слюны и 1 каплю раствора сульфата меди, добавьте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, опишите скорость исчезновения окраски за 5 мин, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

В пробирку № 12 налейте 5 капель раствора слюны и 1 каплю дистиллированной воды, затем прилейте 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, опишите скорость исчезновения окраски за 5 мин, затем поставьте в термостат при 37–40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравните с контролем.

Наблюдения и выводы оформите в виде таблицы и напишите уравнения реакций.

Таблица 5

Номер пробирки	Эффектор	Наблюдения (реакция с реактивом Люголя)		Выводы
		до термостатирования	после термостатирования	
1	NaCl			
2	CuSO ₄			
3	H ₂ O			

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какова биологическая роль ферментов?
2. Что такое профермент, апофермент и кофермент?
3. Что вы знаете о механизме биокатализа?
4. Что понимают под активностью фермента?
5. Какие факторы влияют на активность ферментов?
6. К какому классу относится амилаза, напишите схему соответствующей реакции.
7. Гидролиз каких связей в крахмале ускоряет амилаза?
8. Какие качественные реакции могут быть применены для оценки каталитической активности амилазы? Напишите их уравнения.
12. Какой тип специфичности действия у фермента амилазы?
15. Каков оптимум рН для фермента амилазы?
16. Какие вещества являются активаторами и ингибиторами амилазы? Приведите примеры.

Учебная литература: [1–5]

Лабораторная работа № 4 (2 ч)

Проведение качественных реакций на гормоны

Цель работы – формирование навыков и умений выявления наличия йода в тироксине и пирокатехинового ядра в адреналине, а также установления белковой природы инсулина.

Теоретическое введение

Гормоны – это химические вещества, являющиеся регуляторами жизненных функций. Гормоны преимущественно вырабатываются гипоталамусом, гипофизом и железами внутренней секреции, выделяются в кровь и транспортируются к клеткам-мишеням. Гормоны регулируют количество или активность ферментов, влияя на скорость метаболизма. Гормоны по химической природе могут быть пептидными (или белковыми), не пептидными производными аминокислот и стероидными.

С раствором инсулина проводят реакцию, доказывающие его белковую природу. В щелочной среде пептидные связи в белках претерпевает енолизацию и взаимодействуют с гидроксидом меди (II) с образованием окрашенного в красно-фиолетовый цвет комплексного соединения.

Тироксин можно обнаружить в препарате тиреоидина, получаемом из обезжиренной и высушенной железы крупного рогатого скота. Обнаружение тироксина ведут, отщепляя от него с помощью кислотного гидролиза йодоводородную кислоту и переводя ее в свободный йод, который будучи извлечен хлороформом, придает последнему фиолетовую окраску.

Проба на адреналин основана на наличии в его молекуле ядра пирокатехина, продукт реакции которого с хлорным железом дает изумрудно-зеленое окрашивание. Кроме того, пирокатехин окисляется йодатом калия в кислой среде в о-бензохинон – соединение красно-фиолетового цвета.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Опыт 1. Качественная реакция на белковую природу инсулина.

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с микропробирками, водяная баня.

Реактивы: инсулин, водный раствор, 40 ед.; гидроксид натрия, 30%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; реактив Милона (40 г ртути растворить в 57 мл концентрированной азотной кислоты сначала на холоду, затем – слабо нагревая на водяной бане (37–40 °С); полученный раствор разбавить двумя объемами воды, дать отстояться, надосадочную жидкость слить и использовать для работы).

Ход работы. К 5 каплям инсулина прибавьте двойной объем 30 % раствора гидроксида натрия, хорошо перемешайте и добавляют 2–3 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешайте. Развивается красно-фиолетовое окрашивание. Запишите наблюдения и сделайте вывод.

Опыт 2. Качественная реакция на тироксин.

Для выполнения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, спиртовка

Реактивы: азотная кислота (концентрированная), йодат калия (1 %), хлороформ, препарат тиреоидина.

Ход работы. В пробирку внесите 1–2 микрошпателя препарата тиреоидина и 5 капель концентрированной азотной кислоты. Гидролиз осуществите при осторожном (во избежание вспенивания) нагревании в течение 1–2 мин. Окончив гидролиз, в пробирку добавьте 10 капель 1%-ного раствора йодата калия, перемешайте и охладите. Затем в пробирку добавьте 1–2 мл хлороформа и хорошо встряхните. После отстаивания слой хлороформа (нижний) окрашивается йодом в фиолетовый цвет. Запишите наблюдения, сделайте вывод. Напишите уравнения реакций.

Опыт 3. Качественные реакции на адреналин.

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня.

Реактивы: адреналин, 0,1%-ный раствор; калий йодат, 1%-ный раствор; уксусная кислота; хлорид железа, 3%-ный раствор; пирокатехин, 0,05%-ный раствор.

а) проба на адреналин с йодатом калия

Ход работы. В пробирку поместите 3 капли раствора адреналина, прибавьте 2–5 капель 1%-ного раствора йодата калия и 2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты, затем смесь подогрейте до температуры 60–65 °С. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

б) проба на адреналин с хлорным железом

Ход работы. В одну пробирку поместите 5 капель адреналина, во вторую – столько же 0,05%-ного раствора пирокатехина. В обе добавить несколько капель раствора хлорида железа. В обеих пробирках появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

Запишите наблюдения и сформулируйте выводы для каждого опыта; напишите уравнения реакций.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какие вещества называются гормонами?
2. Связь гормонов с ферментами?
3. Классификация гормонов по месту выработки.
4. Классификация гормонов по химической природе.
5. На чем основаны качественные реакции на инсулин, тироксин и адреналин?

Учебная литература: [2–6]

Лабораторная работа № 5 (2 ч)

Открытие ферментов биологического окисления: каталазы и пероксидазы в биологическом материале

Цель работы – формирование навыков и умений открытия каталазы и пероксидазы в биологическом материале.

Теоретическое введение

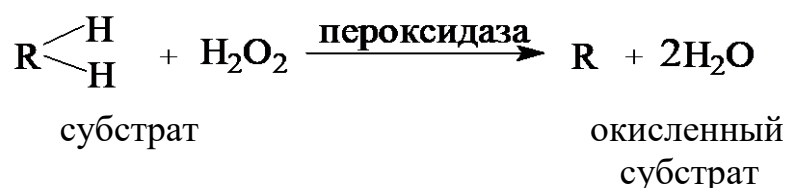
Биологическое окисление – это ферментативное окисление естественных субстратов живыми организмами. Сущностью биологического окисления является дегидрирование окисляемых субстратов. Субстратами биологического окисления являются вещества самого живого организма и вещества, поступающие с пищей. Биологическое окисление позволяет живым организмам получать энергию, необходимые метаболиты и устранять ненужные вещества. В биологическом окислении принимают участие группа ферментов, относящихся к классу «Оксидоредуктазы», в том числе каталаза и пероксидаза, участвующие в обезвреживании пероксида водорода.

Каталаза – фермент, катализирующий реакцию разложения перекиси водорода с освобождением молекулярного водорода:



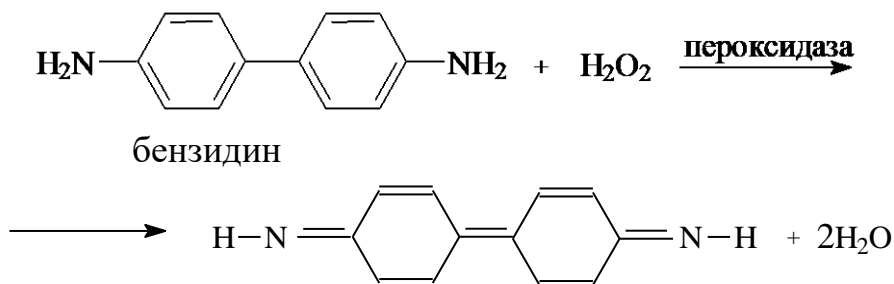
Каталаза очень распространена в тканях животных и растений. У животных особенно богаты каталазой печень и эритроциты. Качественные пробы на каталазу основана на её действии на перекись водорода с выделением газообразного кислорода, которое хорошо заметно.

Пероксидазы катализируют окисление некоторых субстратов с помощью перекиси водорода:



Пероксидазы содержатся в большинстве растительных клеток. В организме животных слабой пероксидазной активностью обладает гемоглобин, миоглобин, цитохромы.

Действие пероксидазы можно обнаружить с помощью цветной реакции



Окисленный бензидин приобретает зеленую, синюю, постепенно переходящую в бурю окраску. Настоящую пробу можно использовать как для открытия ферментов, проявляющих пероксидазную активность, так и для определения свежести некоторых продуктов (например, мяса).

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Опыт 1. Открытие каталазы в биологическом материале.

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, бюретка на 25–50 мл.

Реактивы: Свежая кровь. Сырые – рыба, мясо, печень, морковь, картофель. Вареный картофель. Мука, мел; перекись водорода, 1%-ный раствор.

Ход работы. Пронумеровать 8–9 пробирок.

В пробирку № 1 налейте 2–3 мл дистиллированной воды, добавьте 1–2 капли свежей крови и 1 мл раствора H_2O_2 . В остальные пробирки поместите соответственно по 2–3 кусочка рыбы, мяса, овощей, муки, вареного картофеля, мела и прилейте по 3–4 мл раствора H_2O_2 . Интенсивность выделения пузырьков кислорода для каждого варианта опыта обозначьте одним или несколькими плюсами. Запишите наблюдения, сделайте вывод и напишите уравнение реакции.

Опыт 2. Открытие пероксидазы в крови (бензидиновая проба).

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы: разведенная водой кровь. Вытяжка из мяса (приготовление: мясной фарш залейте водой в соотношении 1:4, настоять в течение 10 мин, отфильтруйте). Вытяжка из хрена (приготовление: 250 г хрена разотрите на терке, добавьте к полученной каше 250 мл 0,05%-ного раствора углекислого натрия, настаивайте в течение 4–5 ч, отфильтровать через два-три слоя марли),

перекись водорода, 3%-ный раствор. Бензидин, 0,02%-ный спиртовой раствор (или 1%-ный раствор в ледяной уксусной кислоте).

Ход работы. В четыре пробирке налейте по 5 капель раствора бензидина и по 5 капель раствора перекиси водорода. В первую пробирку добавьте 5 капель разведенной крови, во вторую – 5 капель мясной вытяжке, в третью – 5 капель вытяжки из хрена, в четвертую – 5 капель воды. Отметить изменение окраски жидкости в пробирках.

Запишите наблюдения, сделайте вывод и напишите уравнение реакции.

Вопросы для самостоятельной работы

1. В чем состоит сущность и значение биологического окисления?
2. Где в дыхательной цепи образуется пероксид водорода?
3. Какие ферменты участвуют в обезвреживании пероксида водорода?

Напишите уравнения соответствующих реакций.

4. На чем основано качественное открытие каталазы и пероксидазы в биологическом материале?

Учебная литература: [2, 4, 5]

Лабораторная работа № 6 (2 ч)

Обнаружение дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида

Цель работы – формирование навыков и умений обнаружения некоторых ферментов катаболизма глюкозы.

Теоретическое введение

Гликолиз – основной путь катаболизма глюкозы. В анаэробных условиях гликолиз является единственным процессом в организме, который поставляет энергию. Анаэробный распад углеводов является единственным источником энергии у ряда анаэробных организмов, таких как дрожжи, а также в некоторых клетках высших организмов (например, в эритроцитах). В аэробных условиях гликолиз протекает до образования пирувата, который далее аэробно окисляется до углекислого газа и воды. Высвобождающаяся энергия при катаболизме углеводов аккумулируется в макроэргических связях АТФ. Аэробный распад глюкозы поставляет гораздо больше энергии, чем анаэробный гликолиз. Промежуточные продукты окислительного распада глюкозы могут быть использованы для синтеза аминокислот, липидов и других биомолекул.

3-фосфоглицериновый альдегид в ходе гликолиза дегидрогеназой 3-фосфоглицеринового альдегида окисляется в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту. В ходе реакции происходит образование восстановленной формы НАД, которую обнаруживают по восстановлению метиленового синего в лейкосоединение.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование. Пробирка.

Реактивы: глюкоза, 2%-ный раствор; дрожжи, метиленовый синий, 0,002%-ный раствор.

Ход работы. В пробирку внесите кусочек дрожжей (величиной с горошину), несколько капель раствора глюкозы, разотрите содержимое стеклянной палочкой до получения равномерной взвеси. Добавьте каплю раствора метиленового синего, перемешайте содержимое пробирки стеклянной палочкой. Поставьте пробирку в штатив, наблюдайте обесцвечивание метиленового синего, начинающееся со дна пробирки.

Запишите наблюдения для каждого опыта, сформулируйте выводы для каждого опыта и напишите уравнения реакций.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какой биохимический процесс называется гликолизом?
2. До образования каких продуктов гликолиз протекает в анаэробных и аэробных условиях?
3. Напишите суммарные уравнения анаэробного и аэробного гликолиза.
4. Напишите уравнение реакции, катализируемой дегидрогеназой 3-фосфоглицеринового альдегида.
5. На чем основано качественное открытие дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида?

Учебная литература: [2–4, 8]

Лабораторная работа № 7 (4 ч)

Изучение методов определения качества жира

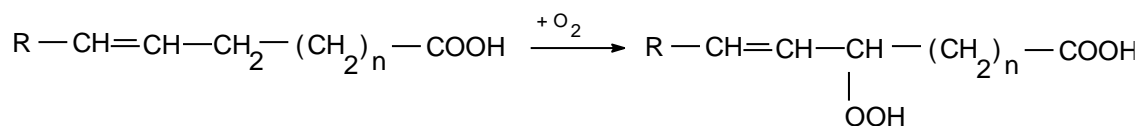
Цель работы – формирование навыков и умений определения кислотного и перекисного числа жира.

Теоретическое введение

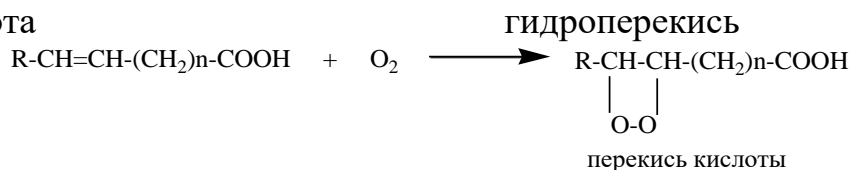
При хранении жиров происходят процессы гидролиза и окисления. Гидролиз жиров – это гидролитическое расщепление жира под действием воды на жирные кислоты и глицерин:

При окислении жиры подвергаются более глубоким изменениям, в большинстве случаев являющихся причиной пищевой порчи жиров. При этом вкус и запах жиров приобретают неприятные специфические свойства, оцениваемые как прогоркание. Такие жиры непригодны к употреблению.

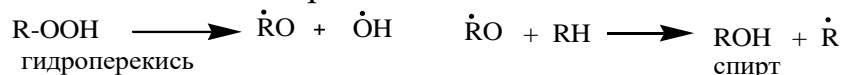
В основе окисления жиров лежит взаимодействие их с кислородом воздуха. Устойчивость жиров к окислению определяется прежде всего их жирнокислотным составом. Ненасыщенные жирные кислоты жиров окисляются быстрее, чем насыщенные. Свободные жирные кислоты окисляются легче ацилглицеринов. Представления о механизме окисления органических веществ, в том числе и жиров, основаны на перекисной теории Баха-Энглера и теории цепных вырожденно-разветвленных реакций Н. Н. Семенова. Согласно теории Баха-Энглера окисление жиров начинается с замещения атома водорода у углерода в α -положении по отношению к двойной связи или α - и β -положении по отношению к карбоксильной группе кислородом воздуха с образованием гидроперекисей, когда кислород воздуха присоединяется по месту разрыва двойной связи – циклических перекисей:



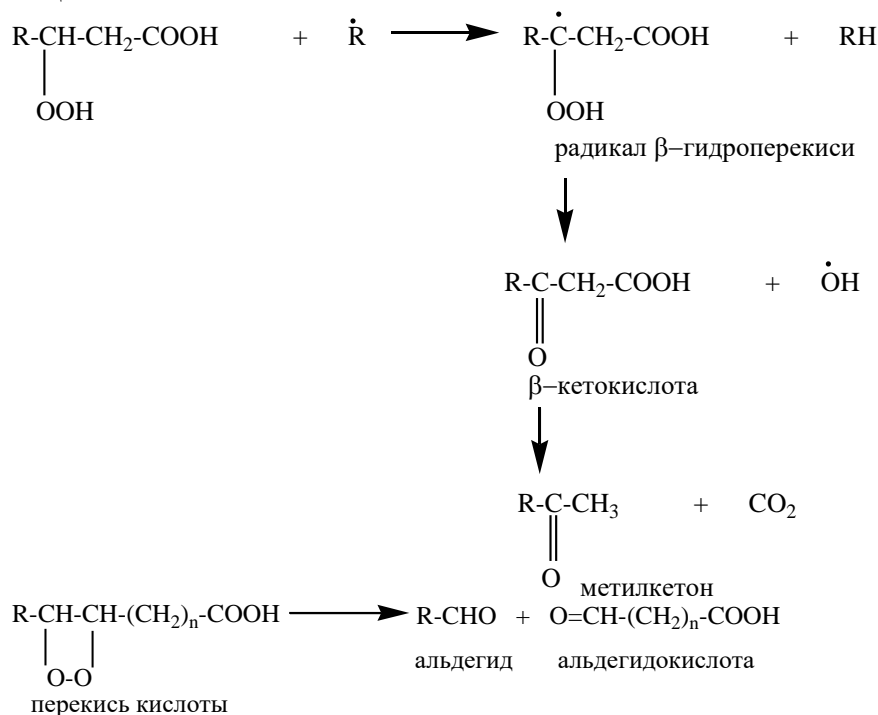
кислота



Перекисные соединения (пероксиды, гидропероксиды) играют особую роль в процессах автокаталитического окисления жиров. Они дают начало разветвлениям свободнорадикальных цепей окисления.



Этот радикал может взаимодействовать с O_2 с образованием гидроперекиси кислоты или с гидроперекисью, что можно представить в виде следующей схемы:



По такому пути образуются разветвленные цепи свободнорадикального процесса, ускоряется автоокисление, вызываемое непропорционально высоким увеличением содержания перекисных соединений.

Считают, что преобладающими инициаторами окисления в пищевых продуктах являются гидропероксиды. Скорость возникновения гидропероксидов и последующее образование вторичных продуктов окисления жиров зависят от доступа кислорода.

Интенсивность образования перекисных соединений – показатель глубины окисления, но даже при высоких значениях перекисного числа в жирах органолептические признаки прогорклости могут не выявляться, ибо пероксиды не создают ощущения прогорклости. Превращение пероксидов в соединения, называемые вторичными, сопровождается прогорклым вкусом и запахом.

Конечными продуктами окисления жиров являются низкомолекулярные насыщенные и ненасыщенные альдегиды и кетоны с длиной цепи 6, 8, 9, 12 углеродных атомов, дикетоны, диальдегиды, а также низкомолекулярные кислоты – муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, кротоновая. Носителями запаха, свойственного прогорклым жирам, являются летучие альдегиды, горького вкуса – низкомолекулярные кислоты.

При решении вопросов разработки полноценных кормов и кормления животных и рыб определяют состав компонентов кормов и самих кормов, а также их качество. Для решения этих вопросов разработаны ряд показателей (константы жира) таких как кислотное число и перекисное число.

Кислотное число жира измеряется количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира (масла). Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты жира или масла оттитровывают 0,1 н. раствором гидроксида калия.

Перекисное число измеряется количеством граммов йода, выделенными из йодистого калия перекисями, содержащимися в 100 г жира.

Опыт. 1. Определение кислотного числа

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: колба коническая на 200 мл; цилиндр мерный на 50–100 мл; бюретка на 25–50 мл; баня водяная; весы лабораторные электронные.

Реактивы: исследуемый жир животный или масло растительное; нейтральная смесь спирта и диэтилового эфира (1:1) (для нейтрализации к смеси спирта и эфира прибавить 1–2 капли фенолфталеина и затем по каплям спиртовой раствор гидроксида калия до появления слабого розового окрашивания); фенолфталеин, 1%-ный раствор; гидроксид калия, 0,1 н. раствор в 96%-ном спирте.

Ход опыта. Взвесьте 3–5 г исследуемого жира и запишите результат до второго знака взвесить в конической колбе на 200 мл, твердый жир расплавьте на водяной бане. В колбу к жиру прилейте 50 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1) и добейтесь растворения жира. К раствору жира добавьте 1 мл фенолфталеина и оттитруйте 0,1 н. раствором гидроксида калия до появления розовой окраски, не исчезающей 1 мин.

Кислотное число рассчитайте по формуле:

$$X = \frac{v \cdot k \cdot 5,6}{m},$$

где X – кислотное число жира или масла в мг КОН на 1 г жира; v – количество 0,1 н. раствора гидроксида калия, израсходованное на титрование взятой навески жира или масла, в мл; m – навеска жира в г; 5,6 – количество мг гидроксида калия, соответствующее одному мл 0,1 н. раствора; K – поправка на титр щелочи.

Сформулируйте вывод.

Опыт 2. Определение перекисного числа

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: колбы конические с притертыми пробками на 200–250 мл; микробюретка на 5–10 мл с ценой деления 0,01–0,02 мл; пипетки на 0,5–2,0 мл; цилиндры измерительные на 10 и 100 мл; весы лабораторные электронные; баня водяная.

Реактивы: гипосульфит натрия, 0,01 н. титрованный водный раствор; иодид калия (KI), насыщенный при комнатной температуре водный раствор; хлороформ; уксусная кислота ледяная, крахмал растворимый, 1%-ный водный раствор.

Ход опыта. Взвесьте около 0,8 г жира с записью до второго знака в конической колбе с притертой пробкой на 200 мл, твердый жир расплавьте на водяной бане.

По стенке колбы, смывая следы жира, влейте из цилиндра 10 мл хлороформа, затем из другого цилиндра – 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем быстро влейте 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора йодида калия, закройте колбу пробкой, перемешайте содержимое вращательным движением колбы и поставьте в темное место на 3 мин. Достаньте колбу из темного места, добавьте 100 мл дистиллированной воды, в которую заранее был добавлен 1 мл 1%-ного раствора крахмала. Содержимое колбы оттитруйте 0,01 н. раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски. Параллельно, для проверки чистоты реактивов, в коническую колбу с притертой пробкой на 200 мл влейте из цилиндра 10 мл хлороформа, затем из другого цилиндра – 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем быстро влейте 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора йодида калия, закройте колбу пробкой, перемешайте содержимое вращательным движением колбы и поставьте в темное место на 3 мин. Достаньте колбу из темного места, добавьте 100 мл дистиллированной воды, в которую заранее был добавлен 1 мл 1%-ного раствора крахмала. Содержимое колбы оттитруйте 0,01 н. раствором гипосульфита натрия до исчезновения синей окраски (контроль). Реактивы считаются пригодными для проведения испытания, если на контрольное определение пошло не более 0,07 мл 0,01 н раствора гипосульфита.

Перекисное число исследуемого жира рассчитайте по формуле:

$$X = \frac{V - V_1 \cdot K \cdot 0,00127 \cdot 100}{m},$$

где X – перекисное число в % йода; V – объём 0,01 н. раствора гипосульфита натрия, израсходованный на титрование исследуемого раствора (с жиром), в мл; V₁ – объём 0,01 н. раствора гипосульфита натрия, израсходованный на титрование контрольного раствора (без жира), в мл; m – масса навески исследуемого жира в г; K – коэффициент поправки к раствору гипосульфита натрия для пересчета на точный 0,01 н. раствор; 0,00127 – количество граммов йода, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора гипосульфита.

Сравните полученный результат с показателями степени окисления жира, приведенными в таблице.

Таблица 6. Показатели степени окисления (порчи жира)

Перекисное число в % йода	Степень окислительной порчи
До 0,03	Свежий
От 0,03 до 0,06	Свежий, не подлежит хранению
От 0,06 до 0,10	Сомнительной свежести
Более 0,10	Испорченный

Сформулируйте вывод о качестве заданного образца жира.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Что такое прогоркание жиров?
2. Какие факторы способствуют прогорканию жиров?
3. Какие химические процессы протекают при прогоркании жиров?
4. Опишите процессы гидролиза жиров и окисления жирных кислот.
5. Укажите первичные и вторичные продукты прогоркания.
6. Какие продукты порчи жиров вызывают неприятный запах и горький вкус прогорклого жира?
7. Чем опасно применение кормов для животных и рыб с прогорклым жиром?

Учебная литература: [5, 9]

Лабораторная работа № 8 (2 ч)

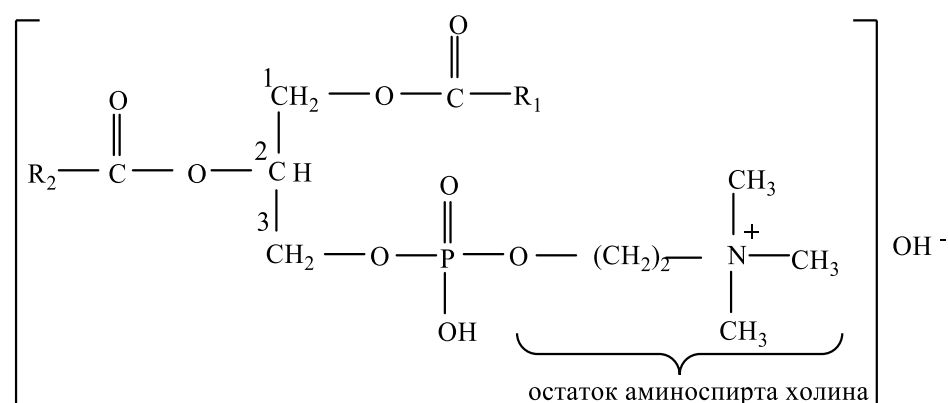
Получение гидролизата лецитина и установление его состава с помощью качественных реакций

Цель работы – формирование навыков и умений проведения реакции гидролиза фосфолипидов и открытия с помощью качественных реакций продуктов гидролиза.

Теоретическое введение

Лецитин (фосфатидилхолин) относится к группе глицерофосфолипидов.

Молекулы глицерофосфолипидов построены из остатков трехатомного спирта глицерина, насыщенных и ненасыщенных высших жирных кислот и гидросилсодержащей полярной молекулы (холина, этаноламина, серина и др.). Например, α-лецитин (фосфатидилхолин):



Их наличие можно открыть с помощью соответствующих качественных реакций с продуктами щелочного гидролиза.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

Приборы: штатив с сухими пробирками, стакан на 50 мл, водяная баня, воронка диаметром 3–5 см, фарфоровая ступка, фильтровальная бумага.

Реактивы: вареный желток куриного яйца, этиловый спирт, ацетон, едкий натр (10 %), уксусная кислота, молибденовый реактив (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте), универсальный индикатор, безводный гидросульфат калия, глицерин, фуксинсернистая кислота.

Ход работы. В ступке разотрите 1/5 часть куриного желтка и при перемешивании добавьте 15 мл горячего спирта. Смесь отфильтруйте в сухую пробирку. Фильтрацию повторить до получения прозрачного фильтрата. Далее работу ведите с полученным фильтратом.

1. Обнаружение лецитинов. В сухую пробирку налейте 2–3 мл ацетона и по каплям добавляйте фильтрат до появления мутности. Объясните результат опыта.

2. Гидролиз лецитинов. В широкую пробирку поместите около 3 мл полученного фильтрата, добавьте 3 мл щелочи и кипятите в течение 5 мин на водяной бане. После кипячения гидролизат слабо подкислите уксусной кислотой (проверить индикаторной бумагой). На поверхность жидкости всплывают жирные кислоты, в растворе остаются глицерин, фосфорная кислота и холин. Отделите раствор от жирных кислот фильтрованием.

3. Проба на холин. При кипячении ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, который образуется из холина. Триметиламин обнаруживают также по окрашиванию влажной красной лакмусовой бумажки в синий цвет.

4. Проба на фосфорную кислоту. К 2–3 мл отфильтрованного гидролизата в пробирке прилейте 1–2 мл молибденового реактива и нагрейте на водяной бане до 50–60 °С. Выпадает желтый осадок.

5. Открытие глицерина. К фильтрату добавьте по каплям 10%-ный раствор гидроксида натрия до нейтральной по лакмусу реакции и выпарьте досуха на водяной бане. К сухому остатку прибавьте несколько капель воды и пятикратное количество безводного гидросульфата калия. Нагревайте пробирку осторожно, но сильно (в вытяжном шкафу) до проявления белых густых паров. Отметьте (осторожно!) резкий раздражающий запах акролеина. У отверстия пробирки подержите фильтровальную бумагу, смоченную раствором фуксинсернистой кислоты. Появляется ярко розовое пятно. Реакция с фуксинсернистой кислотой является качественной реакцией на альдегиды, в данном случае на акролеин.

Запишите наблюдения и сформулируйте выводы для каждого опыта; напишите уравнения реакций.

Вопросы для подготовки к защите лабораторной работы

1. Приведите классификацию липидов.
2. Охарактеризуйте строение и биологическое значение фосфолипидов.
3. Напишите формулу и реакцию гидролиза α -лецитина.
4. В каких условиях можно провести его гидролиз?
5. Какими качественными реакциями можно открыть продукты гидролиза?

Учебная литература: [2–4, 6, 7]

Лабораторная работа № 9 (4 ч)

Изучение растворимости и реакций осаждения белков

Цель работы – формирование навыков и умений изучения растворимости белков куриного яйца в воде, в присутствии нейтральных солей в малой и большой концентрациях; проведения диализа белков; проведения реакций осаждения белков при нагревании и изучения влияния рН, нейтральных солей в больших концентрациях на этот процесс; умения высаливать белки куриного яйца.

Теоретическое введение

Процесс растворения связан с гидратацией частиц белка – связыванием воды ионогенными и полярными группами. При этом ионогенные группы в диссоциированном состоянии притягивают диполи воды за счёт ион-дипольных взаимодействий, а неионогенные полярные группы и пептидные связи белков образуют с водой водородные связи. Вокруг белка образуется гидратная оболочка.

Растворимость белков в воде определяется природой и количеством функциональных групп, которые оказываются на поверхности молекулы белка при её пространственной укладке в нативную конформацию.

подавляющее большинство белков является гидрофильными веществами, хорошо растворимыми в воде.

Факторами устойчивости белка в растворе являются наличие заряда и гидратной оболочки. Их нарушение по каким-либо причинам будет понижать устойчивость белка в растворе в воде и способствовать выпадению белка в осадок (коагуляции).

Коагуляция – сближение и склеивание частиц белка, вследствие чего увеличивается их размер и они выпадают в осадок. Различают обратимую коагуляцию, когда при устранении факторов, её вызвавших белок может снова вернуться в прежнее состояние и необратимую коагуляцию, при которой происходят глубокие нарушения структуры молекулы белка и белок не может вернуться в прежнее состояние.

Растворимость белков в воде возрастает при добавлении нейтральных солей в небольших концентрациях. Это явление называют солевым растворением. Оно объясняется тем, что нейтральные соли в малых концентрациях, увеличивая диэлектрическую постоянную среды, увеличивают степень диссоциации белка, при этом на поверхности белка в результате адсорбции и диффузии образуется слой ионов, который обеспечивает стабилизацию раствора белка.

Высокие концентрации нейтральных солей обратимо осаждают (высаливают) белки из водных растворов. Физико-химическая природа высаливания до конца не выяснена. Предполагают, что белок адсорбирует ионы соли с противоположным зарядом, снимая с белка заряд; нейтральные соли в высоких концентрациях оттягивают на себя диполи воды от заряженных групп белка и тем самым лишают белок гидратной оболочки.

Осадок белка после высаливания можно снова растворить в воде, при этом наблюдается восстановление его свойств, например ферментативной активности, антигенных свойств и т.д.

Для изучения растворимости и реакций осаждения белка в работе применяются белки куриного яйца, которые имеют разный заряд на поверхности, имеют разную растворимость в воде, и им требуются разные концентрации соли для высаливания.

С повышением температуры до 40 °С растворимость большинства белков возрастает, а при температурах выше 40–50 °С большинство белков утрачивает стабильность, начинается их денатурация, сопровождающаяся резким снижением растворимости в области нейтральных значений рН.

Денатурация это частичное или полное разрушение пространственной структуры белковой молекулы за счёт разрыва слабых связей при сохранении первичной структуры. Она сопровождается потерей биологической активности (разрушается активный центр) и изменением ряда физико-химических свойств.

Механизм денатурации состоит в развёртывании полипептидной цепи. денатурированные белки приобретают вид случайных хаотических петель и клубков.

Дополнительные воздействия при изучении осаждения белков при нагревании (изменение рН раствора, высаливающие реагенты) будут препятствовать или способствовать их осаждению.

Белки, являясь природными полимерами, из-за больших размеров молекул не могут проходить через полупроницаемую мембрану. На этом основан диализ – метод их очистки от низкомолекулярных примесей.

Соли тяжелых металлов вызывают денатурацию белков, образуют нерастворимые комплексные соли с белками.

Опыт 1. Растворимость белков

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки

Реактивы: яичный белок, хлористый натрий, 5%-ный р-р.

Ход работы. В пробирку поместите по 2 капли яичного белка. В первую пробирку добавьте 1–2 мл воды, содержимое перемешайте и оставьте на 5 мин. Яичный альбумин растворяется, яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка. Во вторую пробирку добавьте 1–2 мл раствора хлористого натрия. Содержимое перемешайте. Полученный раствор содержит альбумин и глобулин. Солевой раствор используйте для диализа. Запишите наблюдения и сформулируйте вывод

Опыт 2. Диализ

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с центрифужными пробирками, стеклянная трубка (длина 120, диаметр 7 мм), один конец которой закрыт перепонкой из коллодия или целлофана. Пипетки.

Реактивы: солевой раствор белка, полученный в предыдущем опыте. Азотнокислое серебро, 1%-ный р-р; сернокислая медь, 1%-ный р-р; едкий натр, 10%-ный р-р.

Ход работы. В пробирку налейте около 5 мл дистиллированной воды. В трубку для диализа внесите 0,5–1 мл раствора белка. Конец трубки, закрытый перепонкой, осторожно опустите в пробирку с водой. Через 5 мин выньте трубку. Диализат из центрифужной пробирки разлейте пополам в две пробирки. В одной пробирке проведите биуретовую реакцию, во вторую добавьте несколько капель раствора азотнокислого серебра для обнаружения хлоридов. Зарисуйте прибор. Запишите наблюдения и сформулируйте вывод, напишите уравнения реакций.

Опыт 3. Осаждение белков при нагревании

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы: белок яичный, 10%-ный р-р без соли (приготовление раствора белка: белок куриного яйца отделить от желтка, смешайте с 10-кратным объемом воды и отфильтруйте через несколько слоев марли). Уксусная кислота, 10%-ный р-р; уксусная кислота, 1%-ный р-р; едкий натр, 10%-ный р-р; хлористый натрий, насыщенный раствор.

Ход работы. В шесть пронумерованных пробирок налейте 5 капель раствора белка. В пробирки № 2 и 3 добавьте по 1 капле 1%-ного раствора уксусной кислоты. В пробирки № 4 и 5 добавьте по 5 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты. В пробирку № 6 добавьте 1 каплю раствора едкого натра. В пробирки № 3 и 5 добавьте по 2 капли насыщенного раствора хлористого натрия. Все пробирки нагрейте до кипения. Отметьте, в каких пробирках появился осадок. Интенсивность образования осадка обозначьте несколькими плюсами. Результаты опыта представьте в виде таблицы.

Таблица 7. Результаты опыта

Номер пробирки	Содержимое пробирки	Наблюдения	Выводы
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Опыт 4. Высаливание белков

Для проведения опыта необходимы:

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, воронки диаметра 3–5 см, фильтровальная бумага.

Реактивы: яичный белок, солевой раствор (приготовление солевого раствора белка: белки трех куриных яиц отделить от желтков, смешайте с 700 мл дистиллированной воды и 300 мл насыщенного раствора хлористого натрия и

отфильтруйте через несколько слоев марли). Серноокислый аммоний, насыщенный раствор. Серноокислый аммоний, кристаллический порошок.

Ход работы. К 15 каплям раствора белка добавьте равный объем насыщенного раствора серноокислого аммония и перемешайте. Получается полунасыщенный раствор серноокислого аммония, в котором выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтруйте. В фильтрате остаются альбумины. К фильтрату добавьте порошок серноокислого аммония до полного насыщения. Выпадает осадок альбуминов. Запишите наблюдения и сделайте вывод.

Опыт 5. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Для проведения опыта необходимы:

Оборудование: штатив с пробирками

Реактивы: белок яичный, 10%-ный р-р без соли; уксуснокислый свинец, 5%-ный р-р; серноокислая медь, 1%-ный р-р.

Ход работы. В две пробирки налейте по 1 капле раствора белка. В первую пробирку прибавьте 1 каплю раствора уксуснокислого свинца, во вторую – 1 каплю серноокислой меди (до появления осадков).

Добавьте в обе пробирки избыток, примерно 10 капель, соответствующих солей до растворения осадков (адсорбционная пептизация). Объясните результаты опыта.

Запишите наблюдения и сформулируйте вывод.

Вопросы для самостоятельной лабораторной работы

1. Охарактеризуйте процесс растворения белков в воде.
2. Какие факторы влияют на растворимость белков?
3. Какие связи и взаимодействия лежат в основе образования гидратной оболочки?
4. Приведите факторы устойчивости белка в растворе.
5. Охарактеризуйте коагуляцию белков.
6. Какой процесс называется диализом? На чем он основан? В каких целях он применяется?
7. Какой процесс называют высаливанием белков? Каков его механизм?
8. Охарактеризуйте влияние нейтральных солей в малых концентрациях на растворимость белков в воде.
9. Почему белки могут высаливаться при разных концентрациях солей?
10. Какой процесс называют денатурацией белка? Какие факторы могут его вызывать?

Учебная литература: [2, 4, 5, 6, 8]

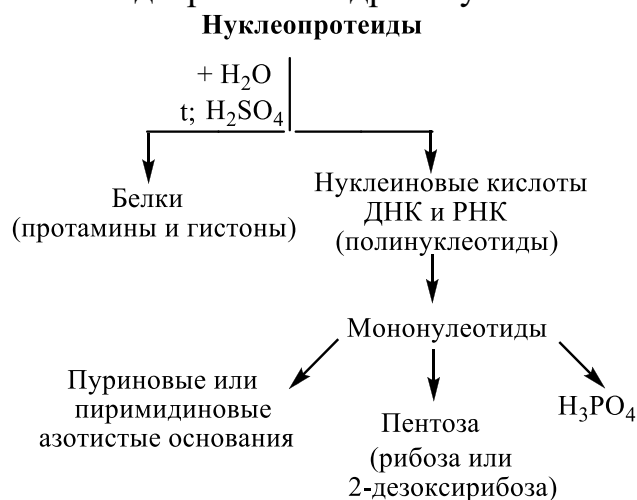
Лабораторная работа № 10 (2 ч)

Получение гидролизата нуклеопротеидов и установление его состава с помощью качественных реакций

Цель работы – формирование навыков и умений проведения реакции гидролиза нуклеопротеидов и открытия с помощью качественных реакций продуктов гидролиза.

Теоретическое введение

Нуклеопротеиды – одна из важнейших групп сложных белков. Нуклеопротеиды входят в состав цитоплазмы и клеточных ядер. Органы, богатые клеточными ядрами, содержат много нуклеопротеидов. Особенно богаты нуклеопротеидами зубная и поджелудочная железы, дрожжи и т.д. Нуклеопротеиды состоят из простого белка (чаще всего гистона или протамина) и нуклеиновой кислоты. Нуклеиновые кислоты состоят из нуклеотидов, построенных из пентозы (рибозы или дезоксирибозы), фосфорной кислоты и азотистого основания (пуринового или пиримидинового). Обнаружено, что при кипячении с 5%-ным раствором серной кислоты нуклеопротеиды распадаются на белок, фосфорную кислоту, пентозу и азотистые основания. Белковая часть молекулы постепенно также подвергается гидролизу.



Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для проведения лабораторной работы необходимы:

Приборы: штатив с пробирками; колба на 100 мл с резиновой пробкой, через которую пропущена стеклянная трубка, служащая в качестве воздушного холодильника; стеклянная воронка.

Реактивы: дрожжи (можно использовать сухие дрожжи); серная кислота 5%-ный раствор; едкий натр 10%-ный раствор; сернокислая медь, 1%-ный раствор; молибденовый реактив (молибдат аммония, раствор в азотной кислоте); сода в порошке; Фелингова жидкость; фильтровальная бумага.

Ход работы. В колбу поместите около 3 г дрожжей (или около 1 г сухих дрожжей), прилейте 30 мл раствора серной кислоты 5%-ной, закройте колбу пробкой с обратным воздушным холодильником и осторожно кипятите смесь. Через 5 мин от начала кипения отберите первую пробу, для чего, вынув предварительно пробку, отлейте 2–3 мл гидролизата. Следующую пробу отберите через 10 мин от начала кипения и далее отбор проб повторяйте через каждые 10 мин, пока не будут получены все продукты гидролиза нуклеопротеидов.

Для обнаружения белка к 10 каплям фильтрата добавьте 5 капель раствора щелочи и 1 каплю сернокислой меди. При взбалтывании, при наличии белка или полипептидов, появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Для обнаружения фосфорной кислоты к каплям фильтрата добавьте 5 капель молибденового реактива и нагрейте до кипения. В присутствии фосфорной кислоты медленно образуется желтый кристаллический осадок фосфомолибдата аммония

Для обнаружения пентоз 10 капель фильтрата нейтрализуйте содой (добавляйте маленькими порциями до прекращения выделения углекислого газа), добавьте 4–5 капель Фелинговой жидкости, нагрейте. В присутствии пентоз образуется красно-кирпичный осадок меди.

Результаты внесите в таблицу, отметьте положительные пробы плюсами, отрицательными – минусами.

Таблица 8. Результаты качественных проб

Номер пробы	Белок	Фосфорная кислота	Пентозы

Сформулируйте выводы для каждого варианта опыта.

Вопросы для подготовки к защите лабораторной работы

1. Какие белки относят к нуклеопротеидам?
2. Охарактеризуйте их строение.
3. Какие простые белки входят в состав нуклеопротеидов?
4. Какие виды нуклеиновых кислот существуют в природе?
5. Приведите отличия в строении ДНК и РНК.
6. Какие пентозы входят в состав нуклеиновых кислот? Приведите их формулы и названия.
7. Каково строение нуклеозида, нуклеотида?
8. Напишите формулы рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Назовите их.
9. В каких условиях можно провести гидролиз нуклеопротеидов?
10. Каким качественными реакциями можно открыть продукты гидролиза? Напишите соответствующие уравнения реакций.

Учебная литература: [2, 4, 6–8]

Лабораторная работа № 11 (2 ч)

Количественное определение белка в молоке методом формольного титрования

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА

Цель работы – формирование навыков и умений количественного определения белка в молоке.

Теоретическое введение

Молоко вырабатывается в молочной железе, содержит белки (простые и сложные), нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК), витамины, липиды, углеводы (моно-, олиго- и полисахариды), макро-, микроэлементы и другие соединения, необходимые для активного роста детенышей в постэмбриональный период. В молоке присутствуют биогенные молекулы: аминокислоты (незаменимые и заменимые), пептиды, азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил), углеводы (моно-, олиго- и полисахариды), липиды (жирные кислоты, нейтральные липиды, фосфолипиды, сфинголипиды, стероиды), витамины, гормоны, биологически активные вещества. Субстраты и метаболиты для синтеза биогенных молекул в лактоциты поступают из крови в виде низкомолекулярных соединений.

Основным белком молока является казеин – фосфопротеид, обладающий способностью к самопроизвольному формированию мицелл в присутствии ионов кальция, цитратов и фосфатов. Казеин характеризуется высокой биологической ценностью благодаря содержанию в его составе полного набора аминокислот, фосфора. С казеином соединен кальций. Все это обуславливает высокие питательные качества казеина для человека.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для проведения количественного определения необходимы:

Оборудование: пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл; колбы Эрленмейера или стакан химический на 100 мл; бюретка для титрования.

Материалы и реактивы: свежее молоко; формалин, 30–40%-ный раствор; натрий гидроксид, 0,1 н. раствор; фенолфталеин, 1%-ный раствор.

Ход анализа

1) В колбу (или химический стакан) на 100 мл отмерьте пипеткой 10 мл молока (кислотность не выше 22°), прибавьте 10 капель раствора фенолфталеина и оттитруйте из бюретки 0,1 н. раствором гидроксида натрия до не исчезающего при взбалтывании слабо-розового окрашивания.

2) В колбу прибавьте: 2 мл 30–40%-ного раствора формалина, свежее нейтрализованного 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания по фенолфталеину.

3) Содержимое колбы взболтайте до обесцвечивания молока и запишите показания бюретки (V_1).

4) Продолжите титрование до окраски жидкости, в точности соответствующей окраске молока до прибавления формалина, и показания бюретки вновь запишите (V_2).

5) Содержание белков в молоке рассчитайте по формуле:

$$X_b = (V_2 - V_1) \cdot 1,94,$$

где X_b – содержание белков в молоке в %; $(V_2 - V_1)$ – количество 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на второе титрование в мл; 1,94 – коэффициент пересчета.

6) Содержание казеина в молоке рассчитайте по формуле:

$$X_k = (V_2 - V_1) \cdot 1,51,$$

где X_k – одержание казеина в молоке в %; $(V_2 - V_1)$ – количество 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на второе титрование в мл; 1,51 – коэффициент пересчета.

Сформулируйте вывод.

Вопросы для подготовки к защите лабораторной работы

1. Охарактеризуйте состав молока.
2. Какие биохимические процессы протекают в молочной железе? .
3. Назовите основные белки молока и опишите строение казеинов.
4. Какова роль кальция в образовании мицелл казеина?

Учебная литература: [1, 3–5]

Лабораторная работа № 12

Разделение белков мышц

Цель работы – формирование навыков и умений разделения белков мышц и проведения качественных реакций на отдельные группы белков.

Теоретическое введение

Мышечная ткань содержит большое количество белков. Часть их растворяется в воде – это альбумины, образующие миогеновую фракцию.

Часть белков растворяется в очень слабых растворах нейтральных солей (0,03 М раствор хлорида калия) – это фракция глобулинов.

Если остаток ткани после извлечения альбуминов и глобулинов обработать более крепким солевым раствором (0,5–0,6 М растворы хлорида калия), то в раствор перейдет миозин, сходный по свойствам с глобулинами, а останутся нерастворимыми белки стромы.

Помимо протеинов в мышцах присутствуют протеиды: нуклеопротеиды, хромпротеиды (миоглобин, каталаза).

Экстракт водорастворимых белков мышц содержит альбумины, часть миозина и другие, а также растворимые в воде экстрактивные вещества, в состав которых входят азотистые экстрактивные вещества (креатин, карнозин, картинин, аминокислоты и др.), вещества, не содержащие азота (молочная кислота). В водный экстракт переходят и минеральные вещества.

Экстракт солерастворимых белков мышц содержит глобулины, главным образом миозин.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

Для выполнения лабораторной работы необходимы:

Приборы: колба на 100 мл (две); палочка стеклянная; ступка с пестиком; пробирки центрифужные; воронка стеклянная для фильтрования; бумажные фильтры; гомогенизатор; весы лабораторные электронные.

Материал и реактивы: мясо или рыба; хлорид натрия, 10%-ный; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; фенол, 2%-ный раствор; хлорид железа, 1%-ный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; сульфат аммония, насыщенный раствор, битое стекло.

Опыт 1. Экстрагирование водорастворимых и солерастворимых белков

Ход анализа

1) Мясо или рыбу тщательно освободите от жира, костей и соединительной ткани и измельчить (два-три раза) в гомогенизаторе.

2) Из полученного фарша отвесьте 2 г, поместить в ступку, добавьте небольшое количество битого стекла и пятикратное количество дистиллированной воды и тщательно растирайте 5–10 мин.

3) Однородную массу перенесите в центрифужную пробирку и проведите центрифугирование 10 мин.

4) Надосадочную жидкость из пробирки слейте в колбу № 1, к осадку прилейте 10 мл дистиллированной воды, тщательно размешайте палочкой и опять центрифугируйте 10 мин.

5) После центрифугирования надосадочную жидкость присоедините к первому экстракту в колбе № 1 – фракция водорастворимых белков.

6) Осадок из центрифужной пробирки перенесите в ступку, пробирку ополосните 10 мл раствора хлорида натрия, который также вылейте в ступку, и тщательно растирайте 5–10 мин.

7) Содержимое ступки перенесите в центрифужную пробирку и проведите центрифугирование 10 мин.

8) Надосадочную жидкость слейте в колбу № 2.

9) К осадку в центрифужной пробирке прилейте 5–7 мл раствора хлорида натрия, тщательно размешайте и опять подвергните центрифугированию 10 мин.

10) После центрифугирования надосадочную жидкость присоедините к первому экстракту в колбе № 2 – фракция солерастворимых белков.

В центрифужной пробирке остается фракция белков стромы.

Опыт 2. Исследование фракции водорастворимых белков

Ход анализа

В пробирку налить 2–3 мл водного экстракта, поместите ее в кипящую водяную баню, нагрейте содержимое пробирки до кипения; происходит коагуляция белка. Раствор отфильтруйте от хлопьев белка на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр, фильтрат используйте для открытия молочной кислоты и креатина.

Опыт 2.1. Открытие молочной кислоты

В пробирку налейте 5 капель раствора фенола, прибавьте по каплям раствор хлорида железа до фиолетовой окраски, затем по каплям раствор фильтрата до появления желтого окрашивания вследствие образования молочно-кислого железа.

Опыт 2.2. Открытие креатина

Эта реакция применяется для качественного и количественного определения креатинина, а также креатина, который легко переходит в креатинин.

В пробирку налейте 5 капель раствора фильтрата, прибавьте 3 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и 5 капель гидроксида натрия,

пробирку поместите в кипящую водяную баню до появления оранжевого окрашивания вследствие образования пикрата креатина.

Опыт 3. Качественные пробы на солерастворимые белки

Ход анализа

В пробирку № 1 налейте 10 капель воды и по каплям прибавьте экстракт солерастворимых белков до появления мути.

В пробирку № 2 налейте 5 капель экстракта солерастворимых белков, прибавьте 5 капель насыщенного раствора сульфата аммония и перемешайте.

В пробирку № 5 налейте 5 капель экстракта солерастворимых белков и прокипятите.

Объясните результаты качественных проб.

Сформулируйте выводы для каждого этапа опыта; напишите уравнения реакций.

Вопросы для подготовки к защите лабораторной работы

1. Какова биохимическая роль мышечной ткани, ее строение и химический состав?

2. Чем отличается в строении поперечно-полосатая мышечная ткань от гладкой мышечной ткани? Опишите химический состав мышечной ткани.

3. Какова локализация различных белков в структурах мышечного волокна?

4. Опишите строение основных сократительных белков мышц.

5. Какие азотистые экстрактивные вещества обнаружены в мышечной ткани животных?

6. Какова роль креатинфосфата в биоэнергетике мышечной ткани?

7. Опишите механизм синтеза креатинфосфата.

8. Расскажите о роли ионов Ca^{2+} в инициации мышечного сокращения.

Учебная литература: [1, 2, 4, 6, 8]

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных: фундам. и клин. аспекты: учебник / С. Ю. Зайцев, Ю. В. Конопатов. – 2-е изд., испр. – Санкт-Петербург: Лань, 2005. – 383 с.
2. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии: учеб. по напр. и спец. «Химия» и «Биология» / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: Агар, 1999. – 507 с.
3. Биохимия животных: учебник / под ред. А. В. Чечеткина. – Москва: Высшая школа, 1982. – 511 с.
4. Метревели, Т. В. Биохимия животных: учеб. пособие / Т. В. Метревели, Н. С. Шевелев. – Санкт-Петербург: Лань, 2005. – 296 с.
5. Филиппович, Ю. Б. Практикум по общей биохимии: учеб. пособие для студ. хим. спец. пед. институтов / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова. – 2-е изд., перераб. – Москва: Просвещение, 1982. – 311 с.
6. Сергеева, Н. Т. Биологическая химия: методические указания к лабораторным работам по биологической химии по специальности 31.16 / Н. Т. Сергеева, Н. Ф. Зубина. – Калининград: КТИРПиХ, 1990. – 81 с.
7. Сергеева, Н. Т. Практикум по биохимии: учеб. пособие / Н. Т. Сергеева. – Калининград: Изд-во ФГОУ ВПО «КГТУ», 2005. – 207 с.
8. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии: учеб. пособие / А. А. Чиркин. – Минск: Новое знание, 2002. – 496 с.
9. Чиркин, А. А. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А. А. Чиркин. – Минск: Высшая школа, 2017. – 432 с. (ЭБС «Университетская библиотека онлайн»).

Локальный электронный методический материал

Наталья Павловна Нефедова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Редактор Е. Билко

Уч.-изд. л. 3,2. Печ. л. 2,6

Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1