

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

Б. Ю. Воротников, О. А. Лизоркина, Л. В. Толстикова

БИОХИМИЯ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ
студентами, обучающимися в бакалавриате по направлениям подготовки
19.03.01 Биотехнология, 19.03.03 Продукты питания животного
происхождения,
19.03.04 Технология продукции и организации общественного питания

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2023

УДК 577.1 (076)

Рецензент

кандидат технических наук, доцент кафедры химии Института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» Г. Е. Степанцова

Воротников, Б. Ю., Лизоркина, О. А., Толстикова, Л. В.

Биохимия: учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторных работ студентами обучающимися в бакалавриате по напр. подгот. 19.03.01 Биотехнология, 19.03.03 Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 Технология продукции и организации общественного питания / Б. Ю. Воротников, О. А. Лизоркина, Л. В. Толстикова. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 140 с.

Учебно-методическое пособие является руководством по выполнению лабораторных работ по дисциплинам «Биохимия», «Биохимия пищевых продуктов», для студентов, обучающихся по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 19.03.03 Продукты питания животного происхождения, 19.03.04 Технология продукции и организации общественного питания. В нем представлены вопросы техники безопасности, методики лабораторных работ, вопросы для самоконтроля, список учебной литературы.

Табл. 9, рис. 3, список лит. – 8 наименований

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию методической комиссией Института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 30.09.2022 г., протокол № 10

Учебное пособие рассмотрено и рекомендовано к изданию кафедрой химии 25.10.2022 г., протокол № 02

УДК 577.1 (076)

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Воротников Б. Ю., Лизоркина О. А., Толстикова Л. В., 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ	6
ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ	8
СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ (СЫРЬЯ) И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	15
БЕЛКИ	15
Лабораторная работа № 1. СОПОСТАВЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ, МОЛОКА И ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР	15
Лабораторная работа № 2. ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП В СЛОЖНЫХ БЕЛКАХ	20
Лабораторная работа № 3. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ. НУКЛЕОПРОТЕИДЫ	22
Лабораторная работа № 4. РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ	26
Лабораторная работа № 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА	30
Лабораторная работа № 6.. ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ И ГЛОБУЛИНОВ	33
Лабораторная работа № 7. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЫШЦ	34
Лабораторная работа № 8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО АЗОТУ МЕТОДОМ КЪЕЛЬДАЛЯ	37
Лабораторная работа № 9. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА	41
ВИТАМИНЫ	42
Лабораторная работа № 10. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ	42
Лабораторная работа № 11. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТИТРА	49
Лабораторная работа № 12. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В МОЛОКЕ	52
Лабораторная работа № 13. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С МЕТОДОМ ЙОДОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ	53
Лабораторная работа №14. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Е В ПЕЧЕНИ И МОЛОКЕ	55
Лабораторная работа № 15. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В МОЛОКЕ	58
Лабораторная работа № 16. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ПЕЧЕНИ	60
ФЕРМЕНТЫ	62
Лабораторная работа № 17. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФЕРМЕНТЫ	62
Лабораторная работа № 18. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ	66
Лабораторная работа № 19. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ ПШЕНИЧНОЙ МУКИ	72
Лабораторная работа № 20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ	74
Лабораторная работа № 21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДГИДРОЛАЗ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ РЫБ (ПО МЕТОДУ АНСЕНА)	79
Лабораторная работа № 22. ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ	83
Лабораторная работа № 23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА	86

Лабораторная работа № 24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ β-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ В ДРОЖЖАХ	87
Лабораторная работа № 25. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ В СОЕВЫХ БОБАХ	89
Лабораторная работа № 26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ ПО МЕТОДУ А. Н. БАХА И С. Р. ЗУБКОВОЙ	91
ГОРМОНЫ	93
Лабораторная работа № 27. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ.....	93
УГЛЕВОДЫ	97
Лабораторная работа № 28.КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ.....	97
Лабораторная работа № 29. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ.....	101
Лабораторная работа № 30. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ	104
Лабораторная работа № 31. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ДРОЖЖАХ.....	109
ЛИПИДЫ	111
Лабораторная работа № 32. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА ЛЕЦИТИНА КУРИНОГО ЖЕЛТКА	111
Лабораторная работа № 33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ОМЫЛЕНИЯ.....	114
Лабораторная работа № 34. ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА	116
Лабораторная работа № 35. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ	119
ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ	123
Лабораторная работа № 36. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОАЗОТА ФОРМОЛЬНЫМ ТИТРОВАНИЕМ.....	125
Лабораторная работа № 37. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ.....	128
Лабораторная работа № 38. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ.....	130
Лабораторная работа № 39. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА.....	132
Лабораторная работа № 40. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ЧИСЛА	133
Лабораторная работа № 41. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬДЕГИДНОГО ЧИСЛА БЕНЗИДИНОВЫМ МЕТОДОМ.....	135
Лабораторная работа № 42. ОБНАРУЖЕНИЕ БИООРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА.....	136
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	139

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биохимия» предназначено для студентов очной и заочной формы обучения в бакалавриате по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 19.03.04 Технология продукции и организации общественного питания и может быть рекомендовано по дисциплине «Биохимия пищевых продуктов» для студентов по направлениям подготовки 19.03.04. Технология продукции и организации общественного питания, 19.03.03. Продукты питания животного происхождения.

Дисциплины «Биохимия» и «Биохимия пищевых продуктов» относятся к математическому и естественнонаучному модулю обязательной части блока 1 ОПОП ВО по направлениям подготовки 19.03.01 Биотехнология, 19.03.03. Продукты питания животного происхождения, 19.03.04. Технология продукции и организации общественного питания.

Целью освоения дисциплин является формирование у обучающихся теоретических и практических знаний и умения их использовать в своей профессиональной деятельности.

Задачи дисциплины:

- изучение на молекулярном уровне химического состава живых организмов и пищевых продуктов;
- изучение основных процессов, протекающих в живых организмах и биотехнологических процессах;
- приобретение экспериментальных навыков биохимических исследований, умения анализировать полученные результаты экспериментов.

Непременным условием успешного усвоения дисциплин «Биохимия» и «Биохимия пищевых продуктов» является выполнение лабораторного практикума.

В результате выполнения лабораторного практикума студент должен

уметь:

использовать базовые знания в области биохимии для управления предприятиями с учетом возможных изменений физико-химических свойств пищевого сырья; применять свойства биологических систем при решении профессиональных задач;

владеть:

методами оценки свойств пищевого сырья, продукции питания на основе использования фундаментальных знаний в области биохимии; навыками проведения экспериментальных исследований; правилами безопасной работы в химической лаборатории.

ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Лабораторные работы в пособии разделены на две части. В первой части собраны опыты, позволяющие изучить состав биологических объектов, пищевых систем при помощи современных методов выделения, фракционирования, очистки, физических и химических способов качественного и количественного определения важнейших классов веществ (белки, водо- и жирорастворимые витамины, ферменты, гормоны, углеводы, липиды). Во второй части представлены работы, позволяющие оценить интенсивность биохимических процессов.

К каждой работе приведено краткое введение или пояснение по ходу выполнения. В пособии рассмотрены лишь те теоретические вопросы, которые необходимы для понимания сути выполняемой работы.

В начале описания опытов приводятся список оборудования, посуды, материалов, реактивов и прописи приготовления специальных реактивов.

Лабораторные занятия проводятся в специализированной лаборатории кафедры химии. Лабораторные работы выполняются по методическим указаниям, которые представлены в ЭИОС. Наименование лабораторных работ и количество часов занятий определяются перед началом их проведения в соответствии с учебным графиком.

Перед началом прохождения лабораторных работ студент обязан изучить общие правила работы в лаборатории, пройти собеседование с преподавателем; подготовить конспект необходимых опытов в отдельной тетради (лабораторном журнале). Конспект опытов содержит следующие пункты:

- а) дата проведения лабораторной работы;
- б) название работы;
- в) название опыта;
- г) цель опыта;
- д) ход опыта (описывается кратко, для наглядности описание можно сопровождать рисунками, иллюстрирующими ход работы);
- е) уравнения соответствующих реакций с указанием названий субстрата, главного продукта реакции, характера получаемого аналитического сигнала;
- ж) наблюдения;
- з) выводы.

Наблюдения и выводы студент заполняет в лаборатории по ходу выполнения работы.

В начале занятий преподаватель проверяет, правильность оформления конспекта, уровень подготовки студента по теме занятий. Перед началом лабораторной работы после опроса проводится обсуждение основных трудностей и плохо понятых студентом теоретических вопросов по изучаемой

теме. В конце занятий студенты демонстрируют результаты опытов преподавателю, записывают наблюдения в тетрадь, в выводах формулируют достижение поставленной цели. Лабораторная работа считается выполненной, если даны правильные ответы на вопросы по теме, сделаны все необходимые опыты, полностью оформлен конспект, сформулированы выводы.

Таблица 1 – Тематический план лабораторных работ (ЛР)

№ лабораторной работы	Тема дисциплины	Наименование лабораторной работы	Количество часов ЛР	
			очная форма обучения	заочная форма обучения
1	Химический состав живых организмов и пищевых продуктов	Техника безопасности. Основные компоненты пищевых продуктов	2	1
2	Витамины	Качественные реакции на витамины	6	3
3	Гормоны	Качественные реакции на гормоны	6	2
4	Ферменты	Физико-химические свойства ферментов	6	4
5	Биологическое окисление		6	
6	Обмен углеводов	Количественное определение молочной кислоты	6	
7	Обмен липидов	Фосфолипиды	6	
8	Обмен белков	Нуклеопротеиды	6	
Итого			44	10

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

Практическая работа в лаборатории должна быть построена в соответствии с определенными и обязательными для всех правилами. Каждый работающий в лаборатории должен изучить настоящую инструкцию по технике безопасности, разработанную на основе общих «Правил по технике безопасности и производственной санитарии при работе в химических лабораториях». Кроме того, необходимо изучить правила пожарной безопасности и меры оказания первой помощи при несчастных случаях. Следует ознакомиться с имеющимися в лаборатории средствами пожаротушения и знать их местонахождение.

Перед началом работы в химической лаборатории каждый студент проходит инструктаж по технике безопасности, после чего оформляется соответствующая запись в специальном журнале с обязательной распиской студента и преподавателя, проводшего инструктаж.

Правила безопасности при работе с пробирками. Для опытов используют только сухие пробирки. Нагревание пробирок следует проводить постепенно. Отверстие пробирки должно быть направлено в сторону от себя и соседа, так как при нагревании может произойти выбрасывание жидкости из пробирки. Особенно опасно попадание брызг жидкости в глаза, поэтому нельзя наклоняться над пробиркой и смотреть в ее открытое отверстие. При нагревании пробирку держат не в вертикальном, а в наклонном положении, так как в этом случае брызги ударяются о стенки и остаются в пробирке. При нагревании пробирки ее следует непрерывно вращать и периодически осторожно встряхивать содержимое.

При работе с прибором, имеющим газоотводную трубку, нужно следить, чтобы конец трубки был погружен в жидкость, через которую пробулькивает газ. Убирать горелку из-под пробирки с реакционной смесью можно только после удаления конца газоотводной трубки из жидкости. Если жидкость начинает подниматься по газоотводной трубке, следует сразу опустить пробирку, чтобы уровень жидкости в ней стал ниже конца газоотводной трубки, и продолжить нагревание, пока выделяющийся газ не вытолкнет жидкость из газоотводной трубки.

Правила безопасности при работе с химической посудой. В лабораториях используется только специальная (неповрежденная) химическая посуда.

Все сосуды должны иметь четкую надпись, которую необходимо периодически обновлять.

Использование собранного прибора без предварительной проверки его исправности не допускается.

Оставлять действующий прибор без присмотра не разрешается. При работе с водяными холодильниками необходимо постоянно контролировать непрерывность тока воды.

При перегонке веществ с температурой кипения выше 150 °С необходимо применять холодильник с воздушным охлаждением.

В тех случаях, когда реакция идет при нагревании реакционной смеси до кипения или при перегонке, следует пользоваться круглодонными тонкостенными колбами. Толстостенную посуду нагревать нельзя. Для перегонки жидкостей используют специальные круглодонные колбы, например, колбы Вюрца, Кляйзена, двух- или трехгорлые колбы.

Плоскодонные колбы нельзя применять для работы в вакууме, а также для работы при температуре выше 100 °С. Для отсасывания в вакууме используют толстостенные колбы Бунзена.

Нагревая жидкость в пробирке или колбе, сосуд нужно держать специальным держателем, и отверстие должно быть направлено от работающего.

Перенося сосуды с горячей жидкостью, нужно держать их двумя руками: одной за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (во избежание ожога рук).

При закрывании тонкостенного сосуда пробкой следует держать его за верхнюю часть горла как можно ближе к пробке. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

При переливании жидкостей нужно пользоваться воронкой, поставленной в кольцо штатива над сосудом–приемником переливаемой жидкости.

Химическая посуда должна быть сухой и чистой, так как грязь может изменить ход реакции. Грязную посуду следует мыть сразу же после окончания работ. Для этого можно применять мыло, кальцинированную соду, современные моющие средства. Для удаления из посуды нерастворимых в воде органических веществ пользуются органическими растворителями. Для очистки посуды химическими методами чаще всего применяют хромовую смесь, серную кислоту и растворы щелочей. После тщательной очистки и мытья посуду высушивают в сушильном шкафу.

Правила безопасности при работе с кислотами и щелочами. Неорганические (хлороводородная, азотная, серная), а также сильные органические кислоты при попадании на кожу вызывают химические ожоги. Концентрированные кислоты могут выделять пары, вызывающие раздражение дыхательных путей. Все работы с концентрированными кислотами и щелочами проводят в вытяжном шкафу.

Разбавлять концентрированные кислоты можно только в жаростойкой посуде путем приливания кислоты к воде, а не наоборот.

Щелочи растворяют путем постепенного прибавления к воде небольших кусочков, которые берут пинцетом. Разлитые кислоты и щелочи засыпают песком и после этого производят уборку.

Правила безопасности при работе с металлическим натрием. Металлический натрий воспламеняется при соприкосновении с водой, кислотами, галогенопроизводными и т. д. В лаборатории нарезанный кусочками натрий хранят в толстостенных стеклянных или металлических банках под слоем керосина или вазелинового масла. Перед употреблением кусочки натрия «обсушивают» между листками фильтровальной бумаги и помещают только в сухую пробирку.

Работу с металлическим натрием проводят обязательно вдали от воды или брызгающих водопроводных кранов.

Категорически запрещается выбрасывать остатки натрия в раковину. Их уничтожают, растворяя в спирте. Загоревшийся натрий следует гасить сухим хлоридом натрия.

Правила безопасности при работе с токсичными веществами. Большинство химических веществ в той или иной мере токсично. Меры предосторожности при работе с ними направлены на предотвращение случаев проникновения их в организм через рот, легкие или кожу. В производственной санитарии химические вещества характеризуют значениями *предельно допустимых концентраций* (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, т. е. такими концентрациями, которые при ежедневной работе не могут вызвать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья. Сведения о ПДК некоторых химических веществ приведены в таблице 2. Однако вредность многих органических соединений определяется не только и не столько величиной ПДК их паров, но и другими признаками, такими как летальная доза при попадании в желудочно-кишечный тракт и кровеносную систему, кожноарывное действие и т. п. В более общем виде по степени вредности для человеческого организма химические вещества подразделяют на четыре класса опасности (самый опасный – 1-й класс, наименее опасный – 4-й класс).

Все работы с ядовитыми и сильнодействующими веществами 1 и 2 класса опасности производят в вытяжном шкафу.

При работе с токсическими веществами необходимо ознакомиться с правилами оказания первой медицинской помощи при отравлениях.

Многие органические соединения – ароматические (анилин) и алифатические (диметиламин) амины, ароматические углеводороды (бензол, толуол), галогенопроизводные (хлоробензол, тетрахлорометан) – оказывают вредное воздействие, проникая через дыхательные пути и кожу. Необходимо

осторожно обращаться с этими веществами, не вдыхать их пары, избегать попадания на руки. Если это все же произошло, следует вымыть руки теплой водой с мылом, при вдыхании паров немедленно выйти на свежий воздух.

Таблица 2 – Предельно допустимые концентрации некоторых веществ в воздухе рабочей зоны с указанием их класса опасности

Вещество	ПДК, мг/м ³	Класс опасности	Вещество	ПДК, мг/м ³	Класс опасности
Амины первичные (С7-С9)	1	2	Метанол	5	3
Аммиак	20	4	Муравьиная кислота	1	2
Анилин	0,1	2	В-Нафтол	0,1	2
Ацетон	200	4	Пиридин	5	2
Ацетонитрил	10	3	Пропанол-1	10	3
Бензальдегид	5	3	Серная кислота	1	2
Бензилхлорид	0,5	1	Скипидар	300	4
Бензол	5	2	Тетрагидрофуран	100	4
Бром	0,5	2	Тетрахлорометан	20	2
Бутанол-1	10	3	Толуол	50	3
Бутилацетат	200	4	Триэтиламин	10	3
N-Винилпирролидон	1	2	Уксусная кислота	5	3
Диметиламин	1	2	Фенол	0,3	2
N,N-Диметил анилин	0,2	2	Формальдегид	0,5	2
Диметилформамид	10	2	Хлоробензол	3	3
Диоксан	10	3	Соляная кислота	5	2
1,2-Дихлорэтан	10	2	Циклогексан	80	4
Диэтиламин	30	4	Этанол	1000	4
Камфора	3	3	Этилацетат	200	4
Ксилолы	50	3	Этилхлорид	50	4

Пары бензилхлорида и бензальдегида оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей. В качестве противоядия можно дать пострадавшему понюхать водный раствор аммиака слабой концентрации, затем вывести его на свежий воздух.

Этиленгликоль опасен при попадании внутрь. Он может всасываться и через кожу. Токсическое действие гидроксилamina обусловлено способностью этого соединения вступать в организме в реакции, блокирующие некоторые ферментные системы.

При работе с перечисленными, а также другими химическими веществами, используемыми при выполнении лабораторных опытов, необходимо соблюдать все меры предосторожности.

Категорически запрещается пробовать любые химические вещества на вкус.

При случайном попадании токсичного вещества внутрь рекомендуется вызвать рвоту, давая пострадавшему большое количество теплой воды с несколькими каплями нашатырного спирта. При первых симптомах отравления следует поставить в известность преподавателя, обратиться к врачу или вызвать «Скорую помощь».

Правила безопасности при работе с легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ). Органические растворители, особенно ЛВЖ, – один из главных источников опасности при работе в лаборатории, так как они легко воспламеняются, быстро горят и трудно гасятся. Пары многих органических жидкостей могут образовывать с воздухом взрывоопасные смеси. В зависимости от температуры вспышки в открытом тигле ЛВЖ разделяются на три группы: особо опасные (температура вспышки до 13 °С), постоянно опасные (от 13 до 27 °С) и опасные при повышенной температуре (от 27 до 66 °С). К первой группе относятся ацетон, бензин, гексан, диэтиламин, диэтиловый эфир, петролейный эфир, тетра-гидрофуран; ко второй – метиловый, этиловый, изопропиловый и трет-бутиловый спирты, гептан, диоксан, дихлорэтан, пиридин, толуол, три-этиламин, этилацетат; к третьей – бензилхлорид, бутиловый спирт, диметил-сульфат, уксусный ангидрид, хлоробензол, пиклогексанол.

ЛВЖ нагревают на масляных, песчаных, водяных банях в колбах с обратными холодильниками (но не в открытой посуде). Все работы с ЛВЖ должны проводиться под тягой, вдали от открытого огня. Диэтиловый эфир нагревают только с помощью горячей воды, предварительно нагретой вдали от рабочего места. Во избежание отравления нельзя вдыхать пары ЛВЖ. Отходы ЛВЖ собирают в специальные емкости для слива.

Некоторые органические вещества, например, эфиры – диэтиловый эфир, тетрагидрофуран, диоксан и т. д., при хранении на воздухе образуют пероксиды. Перед началом работы с этими веществами необходимо проверить их на отсутствие пероксидов. Для обнаружения пероксидов несколько миллилитров эфира или другого вещества встряхивают с равным по объему количеством 2 %-ного раствора иодида калия, подкисленного разбавленной соляной кислотой. При наличии пероксидов эфирный слой окрашивается в бурый цвет, а добавление раствора крахмала дает сине-фиолетовое окрашивание.

Категорически запрещается работать с растворителями, в которых обнаружены пероксиды.

Растворители, способные при хранении образовывать пероксиды, нельзя перегонять досуха, даже если в них пероксиды не были обнаружены.

Правила безопасности при работе с бытовым газом. Категорически запрещается оставлять без надзора работающие газовые горелки. Необходимо

поддерживать устойчивое горение газа, не допуская копоти, отрыва или проскока пламени. При проскоке пламени внутрь горелки необходимо закрыть газовый кран горелки, дать ей остыть, а затем зажечь вновь. Если пламя шумит и слегка отрывается от устья горелки, необходимо убавить подачу первичного воздуха.

При обнаружении утечки газа необходимо немедленно закрыть кран на вводе газопровода, поставить в известность преподавателя и вызвать аварийную службу по телефону 04.

Правила безопасности при возникновении пожара. При возникновении пожара в лаборатории следует тотчас выключить вентиляцию, газ и все нагревательные приборы, удалить с участка загорания все горючие вещества.

При загорании электрических проводов нужно немедленно выключить ток и тушить загоревшиеся провода песком или сухими огнетушителями (применение воды и пенных огнетушителей недопустимо), известив одновременно дежурного электрика.

Для тушения ЛВЖ используют противопожарные одеяла, песок, порошковые составы, пенные и углекислотные огнетушители. При воспламенении ЛВЖ в каком-либо сосуде его накрывают противопожарным одеялом, чтобы перекрыть доступ воздуха к горячей жидкости. Разлитую горящую жидкость засыпают песком.

При загорании одежды на человеке нужно немедленно закутать его в огнестойкую накидку, одеяло. Пострадавший не должен бегать, метаться, так как это способствует горению.

Пожары, вызванные возгоранием щелочных металлов, нельзя тушить ни водой, ни углекислотными огнетушителями. Применяют сухой песок.

Оказание первой помощи при несчастных случаях. О травмах, ожогах, отравлениях необходимо незамедлительно сообщить преподавателю и воспользоваться медикаментами, противоядиями и приспособлениями, находящимися в лабораторной аптечке.

При термических ожогах сразу же промывают обожженное место спиртом, смачивают 5 %-ным раствором танина в 40 %-ном спирте, затем накладывают компресс из ваты или марли, смоченной этим раствором или винилином. После этого нужно наложить на обожженную поверхность повязку с противоожоговой мазью.

При химических ожогах, возникших вследствие попадания на кожу разъедающего органического вещества, нужно быстро промыть пораженный участок кожи спиртом, затем провести обработку, как при термическом ожоге.

При ожогах концентрированными кислотами промывают обожженное место сильной струей воды, а затем 1 %-ным раствором гидрокарбоната натрия.

При попадании кислот в глаза их следует промыть 1 %-ным раствором гидрокарбоната натрия и стерильной водой комнатной температуры. Лучше пользоваться специальной глазной ванночкой.

При ожогах концентрированными щелочами пораженное место промывают большим количеством воды, а затем 1 %-ным раствором уксусной кислоты. При попадании щелочи в глаза их следует промыть 1-2 %-ным раствором борной кислоты.

При ожогах бромом его смывают спиртом и смазывают пораженное место мазью от ожогов.

При ожогах жидким фенолом побелевший участок кожи растирают глицерином, пока не восстановится нормальный цвет кожи.

При порезах рук стеклом прежде всего удаляют осколки стекла пинцетом или под сильной струей воды, останавливают кровотечение 3 %-ным раствором пероксида водорода, смазывают рану 5 %-ным раствором йода и накладывают повязку. При капиллярном и венозном кровотечении на рану накладывают давящую повязку, при сильных кровотечениях – жгут.

При поражении электрическим током находящемуся в сознании пострадавшему необходимо обеспечить покой и чистый воздух. При прекращении дыхания и сердечной деятельности следует применять искусственное дыхание и непрямой массаж сердца до прибытия «Скорой помощи».

При загрязнении помещения ртутью из разбитого термометра необходимо провести демеркуризацию, т. е. механическую очистку от шариков ртути и химическую обработку кашицей хлорида железа (III), а затем тщательно промыть поверхность 20 %-ным раствором хлорида железа (III), мыльным раствором и чистой водой.

При острых отравлениях чрезвычайно важно оказать неотложную помощь, используя следующие основные принципы:

- вывести (или вынести) пострадавшего из зоны отравления на свежий воздух, удалить яд с кожи или слизистых оболочек, снять загрязненную одежду;
- восстановить нарушенные функции организма (искусственное дыхание, массаж сердца);
- попытаться вывести яд из организма (промывание желудка, рвотные средства, адсорбенты). Вызвать рвоту можно принятием теплого раствора поваренной соли (3-4 чайные ложки на стакан воды);
- применить соответствующие противоядия и медикаменты. Помните, что действие многих химических веществ проявляется не сразу, а по истечении некоторого времени. Даже если меры первой помощи оказались достаточно эффективными и симптомы отравления исчезли, это вовсе не означает, что здоровью пострадавшего не угрожает опасность. Поэтому в случае острого отравления ядовитыми веществами следует немедленно вызвать врача.

СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ (СЫРЬЯ) И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

БЕЛКИ

Лабораторная работа № 1.

СОПОСТАВЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ, МОЛОКА И ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР

Цель: получение практических умений и навыков изучения аминокислотного состава пищевых продуктов и сырья.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ (СЫРЬЯ) И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ. БЕЛКИ

Белки составляют материальную основу химической деятельности клетки. Функции белков в природе универсальны. Среди них различают ферменты, гормоны, структурные (кератин, фиброин, коллаген), транспортные (гемоглобин, миоглобин), двигательные (актин, миозин), защитные (иммуноглобулины), запасные (казеин, яичный альбумин) белки, токсины (змеиные яды, дифтерийный токсин).

По составу белки разделяются на простые и сложные. При гидролизе простых белков образуются только α -аминокислоты. Сложные белки содержат еще простетическую группу, например, фосфопротеины – фосфорную кислоту, гликопротеины – углеводную часть, липопротеины – липидную, нуклеопротеины – нуклеиновые кислоты.

Животные белки более биологически ценны, чем растительные. Приоритетным источником растительных белков при производстве продуктов питания в мировой практике является соя. Важные источники биологически ценного растительного белка – также горох и другие зернобобовые культуры. Однако их белки содержат антипитательные вещества – ингибиторы трипсина и химотрипсина, снижающие активность протеолитических ферментов и переваримость белков.

В связи с повышением потребления таких продуктов, в том числе продуктов из сои, требуется углубленный комплексный подход биохимической оценки качества и функциональных свойств этих продуктов. Предлагаемые методы анализа помогут комплексно оценить состав и качество многих продуктов питания человека.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: штатив с пробирками, стакан лабораторный на 200-250 мл; воронки стеклянные для фильтрования; фильтровальная бумага; встряхивательная машина; микроизмельчитель или мясорубка, центрифуга; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: Белки мышечной ткани (в стакан поместить 40-50 г обезжиренной мышечной ткани животных или рыб, измельченных в микроизмельчителе или мясорубке, добавить 80-100 мл 10 %-ного раствора хлорида натрия и оставить на 15-20 мин. при частом помешивании; затем окрашенную в красный цвет жидкость отфильтровать через бумажный складчатый фильтр или двойной слой марли. В растворе содержатся главным образом мышечные альбумин и глобулин). Белки молока (в колбу поместить 50 мл свежего молока, добавить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, выпавшие в осадок глобулин и казеин отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр. В растворе содержится преимущественно альбумин). Растительный альбумин (в колбу поместить 25 г пшеничной муки, добавить 100 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать и поставить на встряхивательную машину на 1 ч, затем взвесить муки отцентрифугировать, а надосадочную жидкость отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр; отфильтрованный прозрачный раствор содержит преимущественно альбумин пшеничных зерен). Гидроксид натрия, 10 %-ный и 30 %-ный растворы; ацетат свинца, 5 %-ный раствор; сульфат меди, 1 %-ный раствор; нингидрин, 0,1 %-ный водный раствор; азотная кислота, концентрированная; уксусная кислота, ледяная; серная кислота, концентрированная; карбонат натрия, 10 %-ный раствор; α -нафтол, 0,2 %-ный спиртовой раствор; сульфат аммония, насыщенный раствор; нитропруссид натрия, 5 %-ный раствор; реактив Милона (40 г ртути растворить в 57 мл концентрированной азотной кислоты сначала на холоду, затем, слабо нагревая, на водяной бане при 37-40 °С; полученный раствор разбавить двумя объемами воды, дать отстояться и надосадочную жидкость слить); диазореактив (к 1 мл 1 %-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5 %-ном растворе соляной кислоты прибавить 2 мл 0,5 %-ного раствора нитрата калия, затем сильно встряхнуть).

Опыт 1. Биуретовая реакция на пептидную связь

Проба основана на том, что пептидные группы белков и полипептидов образуют с медью комплексные соединения.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку добавить по 3 капли 10 %-ного раствора гидроксида натрия и по 1 капле 1 %-ного раствора сульфата меди. После взбалтывания появляется розово-фиолетовое окрашивание.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Нингидриновая реакция на свободные α -аминокислоты

Проба основана на том, что нингидрин взаимодействует с аминогруппами свободных аминокислот (САК) в α -положении с образованием соединений, окрашенных в фиолетово-розовый цвет.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку осторожно по стенке добавить по 5 капель раствора нингидрина, нагреть.

Появляется фиолетовое кольцо, иногда фиолетово-розовое, со временем меняющееся на синее.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты

Проба основана на том, что фенилаланин, тирозин и триптофан при нагревании с азотной кислотой дают нитросоединения, которые при добавлении гидроксида натрия образуют натриевую соль динитросоединений.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку добавить по 3 капли концентрированной азотной кислоты и нагреть. Осадок белка, скоагулированного под влиянием кислоты, окрашивается в желтый цвет. Пробирки охладить и добавить в каждую по каплям 10 %-ный раствор гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 4. Реакция Миллона на тирозин

Проба основана на том, что свободные фенольные гидроксилы молекул тирозина при взаимодействии с солями ртути дают соединения (сгустки) красно-коричневого цвета.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку добавить по 3 капли раствора реактива Миллона. Появляется осадок скоагулированного белка, так как реактив Миллона содержит соли

ртути и азотную кислоту. Пробирку осторожно нагреть до появления сгустка, окрашенного в красно-коричневый цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 5. Реакция Адамкевича на триптофан

Проба основана на том, что триптофан, взаимодействуя с глиоксиловой кислотой (глиоксиловая кислота – примесь ледяной уксусной кислоты), дает фиолетовое окрашивание.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, во все пробирки добавить равный объем ледяной уксусной кислоты и нагреть, не доводя до кипения. Пробирки охладить и в каждую осторожно по стенке добавить по 5-10 капель концентрированной серной кислоты, которая опускается на дно.

При стоянии появляется фиолетовое кольцо на границе жидкостей.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 6. Реакция на аминокислоты, содержащие серу

Проба основана на том, что при разрушении цистина и цистеина гидроксидом натрия от белка отщепляется сероводород, который с солями свинца дает черный осадок сульфида свинца.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую добавить по 2-4 капли 5 %-ного раствора ацетата свинца и по каплям раствор 30 %-ного гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца. Затем пробирки осторожно нагреть до потемнения раствора в пробирках.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 7. Реакция Паули на гистидин

Проба основана на том, что при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитратом натрия по реакции диазотирования образуется диазобензолсульфоновая кислота, которая с гистидином образует соединение вишнево-красного цвета.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, во все добавить по 5 капель диазореактива, затем перемешать и прилить по 6 капель 10 %-ного раствора карбоната натрия.

Появляется вишнево-красное окрашивание.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 8. Реакция Сакагучи на аргинин

Проба основана на том, что α -нафтол в присутствии окислителя с имеющимися в молекуле белка гуанидиновыми группировками радикалов аргинина образует нафтиларгинин. При дальнейшем окислении образуется нафтохинонимин оранжево-красного цвета.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, во все добавить по 1 мл 10 %-ного раствора гидроксида натрия, затем несколько капель 0,2 %-ного спиртового раствора α -нафтола. Перемешать, прилить 0,5 мл раствора гипобромита натрия и вновь перемешать. Развивается оранжево-красное окрашивание.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 9. Реакция Вуазена на триптофан

Проба основана на том, что триптофан, входящий в состав белков, конденсируется с формальдегидом под действием концентрированной серной кислоты.

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку добавить по одной капле 2,5 %-ного раствора формальдегида, перемешать и прибавить по 4 капли чистой концентрированной соляной кислоты (плотность не менее 1,175), после чего снова перемешать. Через 10 мин. прибавить при взбалтывании по каплям 0,5 %-ный раствор нитрита натрия до появления интенсивного сине-фиолетового окрашивания.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 10. Нитропруссидная реакция на цистеин

В три пробирки налить по 5 капель раствора исследуемых белков, в каждую пробирку прилить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и 2-3 капли 5 %-ного раствора нитропрусида натрия. Затем раствор подщелачить несколькими каплями крепкого раствора аммиака. Если в белке присутствует цистеин, то происходит реакция, в результате которой развивается пурпурное окрашивание.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Как классифицируются аминокислоты, входящие в состав белков?

Каково строение боковых радикалов аминокислот?

Какие связи в структуре белка образуют аминокислоты?

Назовите биохимические функции простых белков.

Лабораторная работа № 2.
ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП В СЛОЖНЫХ БЕЛКАХ

Цель: получение практических умений и навыков изучения состава сложных белков.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых, соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: штатив с пробирками; колба с притертой пробкой на 250 мл; стеклянная воронка для фильтрования; бумажные фильтры; водяная баня.

Материалы и реактивы: молоко (обезжиренное); белок яичный, раствор; серная кислота, концентрированная; тимол, 1 %-ный раствор в спирте; гидроксид натрия, 1 % и 10 %-ные растворы; сульфат меди, 1 %-ный раствор; серная кислота, 10 %-ный раствор; α -нафтол, 0,1 %-ный раствор в спирте; уксусная кислота, 10 %-ный раствор; молибденовый реактив (в колбу на 250 мл поместить 100 мл дистиллированной воды, добавить 7,5 г молибдата аммония и при перемешивании влить 100 мл 32 %-ного раствора азотной кислоты плотностью 1,2 г/см³).

Опыт 1. Открытие гликопротеинов

Проба основана на том, что при взаимодействии фенолов с фурфуролом и его производными (продукты дегидратации углеводов) появляется красное окрашивание.

1. В пробирку № 1 внести 1 мл яичного белка, прибавить 2 капли тимола и по стенке наслоить 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе слоев возникает красное кольцо, указывающее на присутствие углевода в исследуемом растворе.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

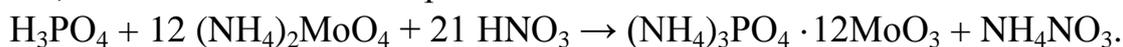
2. В пробирку № 2 внести 1 мл яичного белка, прибавить 2 капли α -нафтола и по стенке наслоить 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе слоев образуется фиолетовое кольцо, указывающее на присутствие углевода в исследуемом растворе.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Качественные реакции на фосфопротеиды

Фосфопротеиды – сложные белки, протетической группой которых является ортофосфорная кислота. Наиболее доступен для изучения фосфопротеид молока – казеин. Он обладает кислыми свойствами и в молоке находится в виде растворимой кальциевой соли.

Проба основана на том, что при гидролизе казеина выделяется фосфорная кислота, которая с молибденовым реактивом образует фосфорномолибденовый аммоний, выпадающий в виде кристаллического осадка желтого цвета:



2.1. Выделение казеина из молока

Казеин выделяют чаще всего путем подкисления молока. Считают, что казеин содержится в молоке в виде казеиногена, который в процессе выделения превращается в казеин.

1) В пробирку налить 2 мл обезжиренного молока, прибавить 2 мл дистиллированной воды и по каплям 10 %-ный раствор уксусной кислоты до выпадения осадка, избегая избытка кислоты.

2) Осадок белка отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр и промыть несколько раз дистиллированной водой.

3) Осадок с фильтра перенести в колбу на 50 мл и растворить в 1 %-ном растворе гидроксида натрия.

4) Раствор отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр в колбу на 50 мл. С полученным фильтратом провести качественные реакции.

2.2. Биуретовая реакция на белки

Налить в пробирку 5 капель фильтрата и добавить 2 капли 10 %-ного гидроксида натрия и 1 каплю 1 %-ного раствора сульфата меди, появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

2.3. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

1) В пробирку внести 5 капель фильтрата, добавить 5 капель 10 %-ного гидроксида натрия, поставить в кипящую водяную баню на 1 мин.

2) После нагревания гидролизат подкислить 10 %-ным раствором серной кислоты, затем прибавить 1 мл молибденового реактива, поставить в кипящую водяную баню и нагреть до кипения. Жидкость окрашивается в желтый цвет.

3) Пробирку достать и охладить под струей воды до выпадения кристаллического осадка лимонно-желтого цвета. С какой аминокислотой связан остаток фосфорной кислоты в казеине?

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Чем отличаются простые белки от сложных?

Каковы биохимические функции сложных белков?

Лабораторная работа № 3. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ. НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Цель: получение практических умений и навыков в изучении нуклеопротеидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Нуклеопротеиды – сложные белки, 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 построены из мононуклеотидов, состоящих из пентоз (рибозы или дезоксирибозы), фосфорной кислоты и азотистого основания (пуринового или пиримидинового). 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.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. ГИДРОЛИЗ НУКЛЕПРОТЕИДОВ

Оборудование: штатив с пробирками; колба на 150 или 200 мл; колба на 100 мл с обратным холодильником (резиновая пробка, в которую вставлена стеклянная трубка, служащая в качестве воздушного холодильника); стеклянная воронка для фильтрования; пипетки; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: дрожжи (можно использовать сухие дрожжи); серная кислота, 5 %-ный раствор.

1) Взвесить 3 г дрожжей (или около 1 г сухих дрожжей) с записью до второго знака, поместить в колбу на 200 мл, прилить 30 мл раствора 5 %-ной серной кислоты, закрыть колбу пробкой с обратным воздушным холодильником, поставить на асбестовую сетку и осторожно кипятить смесь.

2) Через 5 мин. от начала кипения взять первую пробу, предварительно вынуть пробку с воздушным холодильником, отобрать пипеткой 2-3 мл гидролизата.

3) Следующую пробу отобрать через 10 мин. от начала кипения и далее отбор проб повторять через каждые 10 мин., пока не будут получены положительные качественные пробы на все продукты гидролиза нуклеопротеидов.

4) Каждую пробу охладить, отфильтровать и в фильтрате определить продукты гидролиза нуклеопротеидов.

5) Написать схему гидролиза нуклеопротеидов.

2. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПРОДУКТЫ ГИДРОЛИЗА НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

Опыт 1. Биуретовая реакция на полипептиды

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид натрия, 10 %-ный раствор; сульфат меди, 1 %-ный раствор.

В пробирку поместить 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 10 капель 10 %-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1 %-ного раствора сульфата меди до появления сине-фиолетового или красно-фиолетового окрашивания.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Серебряная проба на пуриновые основания

Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором серебра образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в светло-коричневый цвет.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид аммония, концентрированный раствор; азотнокислое серебро, 2-3 %-ный раствор; аммиачный раствор серебра (к 2-3 %-ному раствору азотнокислого серебра добавить концентрированный раствор гидроксида аммония до растворения осадка).

В пробирку поместить 10 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавлять по каплям концентрированный раствор гидроксида аммония до щелочной

реакции по универсальной индикаторной бумаге (1-10 капель) и 10 капель аммиачного раствора серебра. Через 3-5 мин. образуется рыхлый бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы

Опыт 3. Качественные реакции на пентозы

3. 1. Дифениламиновая проба (реакция Дише)

Проба основана на том, что дезоксирибоза ДНК при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислоты, вступает в реакцию с дифениламином с образованием соединения синего цвета, а рибоза РНК – зеленого окрашивания.

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; дифениламиновый реактив (1 г дифениланилина растворить в 100 мл ледяной уксусной кислоты и к раствору добавить 2,75 мл концентрированной серной кислоты).

В пробирку поместить 10 капель фильтрата нуклеопротеидов, прилить 0,5-1 мл дифениламинового реактива, перемешать и нагревать на водяной бане 30 мин. Появляется характерное окрашивание.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

3.2. Проба Троммера

Эта проба, как и две последующие, основана на способности альдегидной группы рибозы и дезоксирибозы восстанавливать в щелочной среде окисные формы металлов (Cu, Fe, Bi) до закисных, а закисные – до свободного состояния. Сахара же в этих условиях дают различные продукты окисления.

Избыток сульфата меди мешает реакции, так как ведет к образованию большого количества гидроксида меди (II), который при нагревании распадается с образованием черного осадка окиси меди (II).

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид натрия, 30 %-ный раствор; сульфат меди, 7 %-ный раствор.

В пробирку поместить 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 5 капель 30 %-ного раствора гидроксида натрия и по каплям 7 %-ного раствора сульфата меди до появления исчезающей мути гидроксида меди (II). Затем пробирку поставить в кипящую водяную баню до выпадения осадка с характерным окрашиванием.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

3.3. Проба Фелинга

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; реактив Фелинга (смешать 5 капель 7 %-ного раствора сульфата меди и 5 капель раствора сегнетовой соли); раствор сегнетовой соли (345 г натрий-калий виннокислого поместить в мерную колбу на 1000 мл, растворить в небольшом количестве дистиллированной воды, добавить 140 г гидроксида натрия и объем раствора довести дистиллированной водой до метки).

В пробирку поместить 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 3-5 капель реактива Фелинга, перемешать и поставить в кипящую водяную баню до выпадения осадка с характерным окрашиванием. Отметить окрашивание осадка.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

3.4. Реакция Толленса

В отличие от двух предыдущих, реакция Толленса является специфичной для пентоз. Она обусловлена взаимодействием флороглюцина с фурфуролом, образующимся из пентозы при нагревании с соляной кислотой, при этом в результате их конденсации появляется красное окрашивание.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; флороглюцин, 0,5 %-ный раствор; соляная кислота, концентрированная.

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеида, добавить 2-3 капли 0,5 %-ного раствора флороглюцина в концентрированной соляной кислоте, поставить в кипящую водяную баню до изменения окраски (кипятить 1 мин.).

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

3.5. Реакция Молиша

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; тимол, 1 %-ный раствор; серная кислота, концентрированная.

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 1-2 капли 1 %-ного раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) прилить 10 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

Опыт 4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Оборудование: штатив с пробирками; колба с притертой пробкой на 250 мл; пипетки; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; молибденовый реактив (в колбу на 250 мл поместить 100 мл дистиллированной воды, добавить 7,5 г

молибдата аммония и при перемешивании влить 100 мл 32 %-ного раствора азотной кислоты плотностью 1,2 г/см³).

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 10-20 капель молибденового реактива и кипятить несколько минут. При охлаждении пробирки под струей воды выпадает кристаллический осадок лимонно-желтого цвета.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Результаты качественного определения составных элементов нуклеиновых кислот записать в таблицу 3, при этом отметив положительные пробы плюсами, отрицательные – минусами. Указать также цвет раствора в пробирках.

Таблица 3 – Результаты исследований гидролизата нуклеопротеидов

Номер опыта	Белок	Фосфорная кислота	Пентозы
1			
2			
3			
4			

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Зачем проводится гидролиз белков?

Приведите примеры использования гидролиза белков при получении пищевых продуктов.

Какими органолептическими характеристиками обладают продукты гидролиза белков?

Лабораторная работа № 4. РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель: получение практических умений и навыков в выделении белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Белки обладают высокой молекулярной массой, что обуславливает выраженный коллоидный характер их водных растворов. Растворы белков рассеивают свет (эффект Тиндаля), способны к гелеобразованию, не проходят через полупроницаемые мембраны. Последнее свойство используют для очистки белков от низкомолекулярных примесей (диализ). Основными факторами агрегативной устойчивости белковых коллоидов являются гидратация частиц и возникновение одноименного электрического заряда.

Выпадению белков из растворов способствует уменьшение гидратации коллоидных частиц (разрушение гидратной оболочки) и значительное снижение или снятие их заряда.

Белки при взаимодействии со многими соединениями (ионами металлов, кислотами и др.) осаждаются. Реакции осаждения белков можно разделить на две группы: 1) осаждение без денатурации (высаливание солями нейтральных щелочных металлов); 2) осаждение с денатурацией (солями тяжелых металлов, нагреванием, минеральными и органическими кислотами, реактивами на алкалоиды).

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Опыт 1. Осаждение белков при нагревании

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня, пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; уксусная кислота, 1 %-ный раствор.

В две пробирки налить по 10 капель раствора яичного белка, в одну из пробирок добавить 1 каплю 1 %-ного раствора уксусной кислоты. Обе пробирки поставить в кипящую водяную баню. Осадок белка появляется в пробирках еще до того, как жидкость закипит. При этом в пробирке с уксусной кислотой осадок выпадает скорее и полнее.

Объясните результаты опыта.

Опыт 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов (меди, свинца, ртути и др.) осаждают белки из растворов необратимо, что связано с образованием нерастворимых в воде металло-белковых комплексных соединений. Кроме того, тяжелые металлы снимают электрический заряд и, вероятно, разрушают четвертичную, третичную и вторичную структуру белка. Такой белок теряет свои биологические свойства. Избыток тяжелых металлов приводит к растворению осадка, что объясняется адсорбцией на белковых частицах ионов металла и их перезарядкой.

Свойствами белков связывать тяжелые металлы широко пользуются в медицинской и ветеринарной практике как противоядием при отравлении солями ртути, свинца и др.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; ацетат свинца, 5 %-ный раствор; сульфат меди, 1 %-ный раствор.

В две пробирки налить по 5 капель раствора белка и медленно по каплям в первую пробирку прибавить раствор ацетата свинца, во вторую – сульфата меди (до появления осадков). Выпавшие хлопья белка при добавлении воды не растворяются.

Добавить в обе пробирки избыток (примерно 6 капель) сульфата меди и ацетата свинца, что ведет к растворению (адсорбционная пептизация) первоначально образовавшегося осадка.

Объясните результаты опыта.

Опыт 3. Осаждение белков минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Осаждение белка объясняется явлениями дегидратации частиц, уменьшения заряда, разрушения ионных связей и т. д. Избыток минеральных кислот (за исключением азотной) растворяет выпавший осадок белков вследствие образования одноименного заряда на белках.

Оборудование: штатив с пробирками

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; азотная кислота, концентрированная; серная кислота, концентрированная; соляная кислота, концентрированная.

В три пробирки осторожно налить по 5-7 капель концентрированных кислот: в первую – серной, во вторую – соляной и в третью – азотной. Во все пробирки осторожно наслоить на кислоту по 5-7 капель раствора яичного белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белка в виде небольшого белого кольца. Каждую пробирку осторожно встряхнуть. Осадок растворяется в первой и второй пробирках; в третьей пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает при встряхивании.

Объяснить результаты опыта.

Опыт 4. Осаждение белков органическими кислотами

Трихлоруксусная кислота (ТХУ) является специфическим реактивом на белок и широко используется в исследовательской практике. Она осаждает только белки и не осаждает продукты их распада – пептиды, аминокислоты и др. Ее применяют для полного удаления белков из биологических жидкостей

(сыворотка крови, молоко и т. д.), при этом продукты распада белков остаются в растворе. При отдельном определении белкового и небелкового азота белки предварительно осаждаются ТХУ.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; сульфосалициловая кислота, 20 %-ный раствор; трихлоруксусная кислота, 10 %-ный раствор.

В 2 пробирки налить по 5 капель раствора белка. В одну пробирку добавить 3-4 капли раствора сульфосалициловой кислоты, в другую – столько же раствора трихлоруксусной кислоты. Белки выпадают в осадок.

Объяснить результаты опыта.

Опыт 5. Осаждение белков реактивами на алкалоиды

Реакции осаждения белков реактивами (пикриновой кислотой, танином, железосинеродистым калием и др.) обуславливаются тем, что белки, как и алкалоиды, имеют аминогруппы. В кислой среде белки перезаряжаются и переходят в катионы, которые образуют нерастворимые солеобразные соединения с реактивами на алкалоиды.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; сульфосалициловая кислота, 20 %-ный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; танин, 10 %-ный раствор; железосинеродистый калий, 5 %-ный раствор; уксусная кислота, 1 %-ный раствор.

В три пробирки налить по 5 капель раствора белка, добавить по 1 капле 1 %-ного раствора уксусной кислоты. Затем в одну пробирку внести 2-3 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты, в другую – 1-2 капли 10 %-ного раствора танина, в третью – 1-2 капли 5 %-ного раствора железосинеродистого калия, взбалтывая содержимое после добавления каждой капли. Во всех пробирках белок выпадает в осадок.

Объяснить результаты опыта.

Опыт 6. Осаждение белков органическими растворителями

Спирт, ацетон и другие органические растворители дегидратируют белки. В результате происходит агрегация (коагуляция) белковых частиц и их осаждение. Если в растворе белка присутствуют соли (NaCl и др.), осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда коллоидных частиц. Реакция осаждения белков спиртом, проводимая на холоде и при непродолжительном контакте его с белком, обратима.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10 %-ный раствор без соли; этиловый спирт.

В пробирку налить 5 капель раствора белка, добавить 15-20 капель спирта. После выпадения осадка разделить его на две пробирки. В одну пробирку немедленно добавить дистиллированной воды до растворения белка, во вторую пробирку добавить воду через 10 мин.

Объяснить результаты опыта.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Зачем осаждают белки?

При получении каких пищевых продуктов используются реакции осаждения белков?

Почему в пищевых продуктах используются низкие концентрации этанола?

Лабораторная работа № 5.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА

Цель: получить практические умения и навыки в изоэлектрическом осаждении белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Белки проявляют как кислотные, так и основные свойства. Являясь амфотерными электролитами, они мигрируют в электрическом поле со скоростью, зависящей от их суммарного заряда и рН среды. При определенном для каждого белка значении рН (*изоэлектрическая точка*) его молекулы электронейтральны. В изоэлектрической точке белок обладает наименьшей растворимостью и наибольшей вязкостью, в результате чего происходит наиболее легкое его осаждение из раствора. Изоэлектрическая точка (рI) – одна из характерных констант белков. Однако если довести раствор белка до изоэлектрической точки, то сам по себе он все же не выпадет в осадок.

Значение рН, отвечающее изоэлектрической точке белка, определяется числом его ионизируемых групп в радикале аминокислот и величинами их pK' . Это значение будет выше 7,0, если белок содержит большое число остатков основных аминокислот (лизин, аргинин), что характерно, например, для рибонуклеазы, или относительно низким, если в белке содержатся преимущественно остатки кислых аминокислот (аспарагиновая, глутаминовая), как в случае пепсина. У большинства глобулярных белков изоэлектрические точки лежат в пределах рН 4,5-6,5.

Определение рJ белка производится по его растворимости в буферных растворах с различным значением рН.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ЖЕЛАТИНА. (МЕТОД 1)

Приборы: штатив с пробирками; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 мл; микробюретки на 10 и 50 мл; колба мерная на 200 мл.

Материалы и реактивы: желатин, 1 %-ный раствор; уксусная кислота (CH_3COOH), 0,1 н. раствор; ацетат натрия (CH_3COONa), 0,1 н. и 1 н. растворы; этиловый спирт; танин, 0,1 %-ный раствор.

1) В шести пронумерованных пробирках создать разную реакцию среды, добавляя 0,1 или 1 н. раствор уксусной кислоты, 0,1 н. раствор ацетата натрия в пропорциях, указанных в таблице 4.

2) В каждую пробирку налить по 1 мл 1 %-ного раствора желатина и взболтать.

3) В четвертую пробирку при перемешивании медленно с помощью пипетки внести этиловый спирт до появления едва заметной мути, отсчитать объем спирта и такое же количество его добавить во все другие пробирки и оставить на 30 мин.

4) После отстаивания отметить пробирку с максимальным помутнением; рН этой пробирки будет соответствовать рJ белка.

5) Записать данные в таблицу 4. Объясните наблюдения.

Таблица 4 – Данные для опытов

Номер пробирки	Раствор уксусной кислоты, мл		рН смеси	Ацетат натрия, 0,1 н. раствор, мл	Вода дистиллированная, мл	Степень помутнения
	0,1 н.	1н.				
1	0,125	-	5,6	1	1,875	
2	0,25	-	5,3	1	1,75	
3	0,5	-	5,0	1	1,50	
4	1,0	-	4,7	1	1,0	
5	2,0	-	4,4	1	-	
6	-	0,4	4,1	1	1,6	

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ЖЕЛАТИНА. (МЕТОД 2)

1) В пять пробирок налить растворы уксусной кислоты и ацетата натрия в количествах, указанных в таблице 5.

2) Во все пробирки добавить по 1 мл раствора желатина, хорошо перемешать.

3) В каждую пробирку прибавить по 4 мл этилового спирта или по 1 мл раствора танина, снова перемешать и оставить на 5 мин.

4) После отстаивания сравнить степень прозрачности растворов в пробирках. Наиболее мутный раствор образуется при pH изоэлектрической точки белка.

5) Запишите данные в таблицу 5. Объясните наблюдения.

Таблица 5 – Количество растворов

Номер пробирки	Состав буферной смеси, мл		pH смеси	Раствор желатина, мл	Этиловый спирт, мл	Степень помутнения
	CH ₃ COOH	CH ₃ COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	0,2	1,8	5,7	1	4	

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ КАЗЕИНА

Оборудование: баня водяная; пробирки стеклянные химические; бюретки прямые с краном на 10 и 50 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 1 мл; колба мерная на 200 мл.

Материалы и реактивы: казеин, 0,1 %-ный раствор (0,2 г казеина поместить в мерную колбу на 200 мл, прилить 5 мл 0,1 н. раствора ацетата натрия и растворить при нагревании на водяной бане, объем раствора довести раствором ацетата натрия до метки); ацетат натрия, 0,1 н. раствор; уксусная кислота, 0,1 н. раствор.

1) Пять пробирок пронумеровать, затем в первую пробирку налить из бюретки 0,25 мл 0,1 н. раствора уксусной кислоты, во вторую – 0,5; в третью – 1,0; в четвертую – 2,0 и в пятую – 4,0 мл.

2) Из другой бюретки в той же последовательности в каждую пробирку прибавить 8,75 мл, 8,5, 8,0, 7,0 и 5,0 мл воды.

3) Во все пробирки прилить пипеткой по 1 мл раствора казеина, содержимое пробирок перемешать и наблюдать за степенью помутнения раствора в них. Там, где помутнение максимально, pH раствора соответствует изоэлектрической точке белка.

4) Запишите данные в таблицу 6. Объясните наблюдения.

Таблица 6 – Данные опыта

Номер пробирки	Уксусная кислота, 0,1 н. раствор, мл	pH смеси	Раствор казеина, мл	Вода дистиллированная, мл	Степень помутнения
1	0,25	5,3	1	8,75	
2	0,5	5,0	1	8,5	
3	1,0	4,7	1	8,0	
4	2,0	4,4	1	7,0	
5	4,0	4,1	1	5,0	

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

В чем проявляется свойство амфотерности белков?

Какие цели преследует изоэлектрическое осаждение?

В каких биохимических процессах получения пищевых продуктов имеет место изоэлектрическое осаждение белков?

Лабораторная работа № 6.

ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ И ГЛОБУЛИНОВ

Цель: получение практических умений и навыков в фракционировании белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными белками. Они содержатся в крови человека, молоке, молочной сыворотке, белке куриного яйца, мышечной ткани, растениях и т. д. В тканях, биологических жидкостях альбумины и глобулины обычно встречаются вместе. Их выделение и разделение основано на различной растворимости в воде и различной высаливаемости минеральными солями – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , NaCl , Na_2SO_4 и др. Так, глобулины высаливаются (обратно осаждаются) в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе этой соли.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: штатив с пробирками; воронки стеклянные для фильтрования; фильтры бумажные.

Материалы и реактивы: раствор белка яиц (белок от трех куриных яиц смешать с 700 мл дистиллированной воды и 300 мл насыщенного раствора хлорида натрия, раствор отфильтровать через несколько слоев марли); сульфат аммония, насыщенный раствор; сульфат аммония, кристаллический; гидроксид натрия, 10 %-ный раствор; сульфат меди, 1 %-ный раствор.

1) В пробирку № 1 налить 2-3 мл раствора яичного белка, добавить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдается выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Через 5-7 мин. мутную жидкость отфильтровать на стеклянной воронке через сухой складчатый фильтр в пробирку № 2.

2) В пробирку № 2 к фильтрату добавить при перемешивании избыток сульфата аммония в порошке до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр в пробирку № 3.

3) В пробирку № 4 налить 5 капель фильтрата из пробирки № 3 и провести биуретовую реакцию. Объяснить результаты опыта.

4) Осадок альбуминов вместе с фильтром перенести в пробирку № 5 и растворить в 4-5 мл воды, взбалтывая содержимое пробирки, затем провести биуретовую реакцию.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Чем отличаются альбумины от глобулинов?

Каковы биохимические функции изученных белков?

Каково назначение процесса высаливания?

Лабораторная работа № 7. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЫШЦ

Цель: получение практических умений и навыков в фракционировании белков мяса.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

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).

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

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

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

2) Из полученного фарша отвесить 2 г, поместить в ступку, добавить небольшое количество битого стекла и пятикратное количество дистиллированной воды и тщательно растереть 5-10 мин.

3) Однородную массу перенести в центрифужную пробирку и провести центрифугирование 10 мин.

4) Надосадочную жидкость из пробирки слить в колбу № 1, к осадку прилить 10 мл дистиллированной воды, тщательно размешать палочкой и опять центрифугировать 10 мин.

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

6) Осадок из центрифужной пробирки перенести в ступку, пробирку ополоснуть 10 мл раствора хлорида натрия, который также вылить в ступку, и тщательно растереть 5-10 мин.

7) Содержимое ступки перенести в центрифужную пробирку и провести центрифугирование 10 мин.

8) Надосадочную жидкость слить в колбу № 2.

9) К осадку в центрифужной пробирке прилить 5-7 мл раствора хлорида натрия, тщательно размешать и опять подвергнуть центрифугированию 10 мин.

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

В центрифужной пробирке остается **фракция белков стромы.**

Опыт 2. Исследование фракции водорастворимых белков

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.

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

Опыт 2.1. Открытие молочной кислоты

В пробирку налить 5 капель раствора фенола, прибавить по каплям раствор хлорида железа до фиолетовой окраски, затем по каплям раствор фильтрата до появления желтого окрашивания вследствие образования молочнокислого железа.

Написать уравнение реакции и выводы.

Опыт 2.2. Открытие креатина

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

В пробирку налить 5 капель раствора фильтрата, прибавить 3 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и 5 капель гидроксида натрия, пробирку поместить в кипящую водяную баню до появления оранжевого окрашивания вследствие образования пикрата креатина.

Написать уравнение реакции и выводы.

Опыт 3. Качественные пробы на солерастворимые белки

Экстракт солерастворимых белков мышц содержит глобулины, главным образом миозин.

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

В пробирку № 2 налить 5 капель экстракта солерастворимых белков, прибавить 5 капель насыщенного раствора сульфата аммония и перемешать.

В пробирку № 5 налить 5 капель экстракта солерастворимых белков и прокипятить.

Объяснить результаты качественных проб.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что представляет собой мясо?

Каково соотношение понятий миофибрилла и саркомер?

Как схематично представить процесс окоченения мышц животного после забоя?

Лабораторная работа № 8.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО АЗОТУ МЕТОДОМ КЪЕЛЬДАЛЯ

Цель: получить практические умения и навыки для определения количества белков.

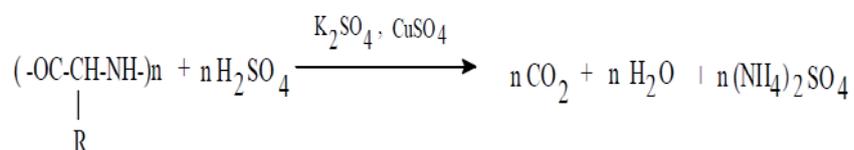
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метод Кьельдаля основан на определении в известном объеме биологической жидкости или в навеске биологического материала количества общего азота. Результат получается несколько завышенным за счет небелковых азотсодержащих веществ.

Общий азот в белках животных тканей – величина довольно постоянная и составляет 15-17 или в среднем 16 %. Таким образом, 16 г азота соответствуют примерно 100 г белка, а 1 г азота – 6,25 г белка ($100:16 = 6,25$).

Число 6,25 называют средним белковым коэффициентом. Умножив найденное количество азота на 6,25, можно вычислить примерное количество белка (так называемого «сырого протеина») в исследуемом материале.

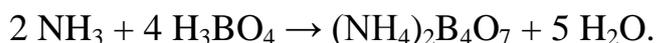
Исследуемый образец сжигают в присутствии концентрированной серной кислоты и катализатора, в результате чего происходит минерализация органических веществ. В качестве катализатора применяют сульфат меди. Для повышения температуры сжигания добавляют сульфат натрия или калия. Органическое вещество окисляется до углекислого газа и воды. Азот при этом превращается в аммиак, который с серной кислотой дает сернокислый аммоний.



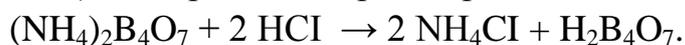
После сжигания серноокислый аммоний разлагается щелочью:



Выделяющийся аммиак отгоняют и поглощают борной кислотой:



Образовавшийся тетраборат аммония (соль слабой кислоты и сильного основания) оттитровывают раствором соляной кислоты:



Как видно из уравнения реакции, отношение NH_4^+ -групп и молекул HCl равно 1:1. Следовательно, 1 мл 0,1н. раствора соляной кислоты, затраченной на титрование, соответствует тысячной доле 0,1 моль азота, т. е. 1,4 мг азота.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: колба Кьельдаля на 50-100 мл; колбы Эрленмейера на 500 и 250 мл; каплеуловитель (насадка Кьельдаля); холодильник Либиха; цилиндры на 10 и 50 мл; бюретка на 25-50 мл; кусочки пензы, фарфора или стеклянные капилляры; промывалка.

Материалы и реактивы: мышечная ткань; экстракт водорастворимых или солерастворимых белков или белков стромы мышечной ткани; молоко; серная кислота, концентрированная; сульфат меди, обезвоженный; натрий или калий серноокислый; гидроксид натрия, 40 %-ный раствор; борная кислота, 2 %-ный раствор; соляная кислота, 0,1 н. раствор; индикатор смешанный (приготовление смешанного индикатора: 0,082 г метиленовой сини и 0,125 г метилрот растворить в 100 мл 95 %-ного спирта и оставить на сутки; индикатор имеет зеленый цвет в щелочной среде и фиолетовый – в кислой).

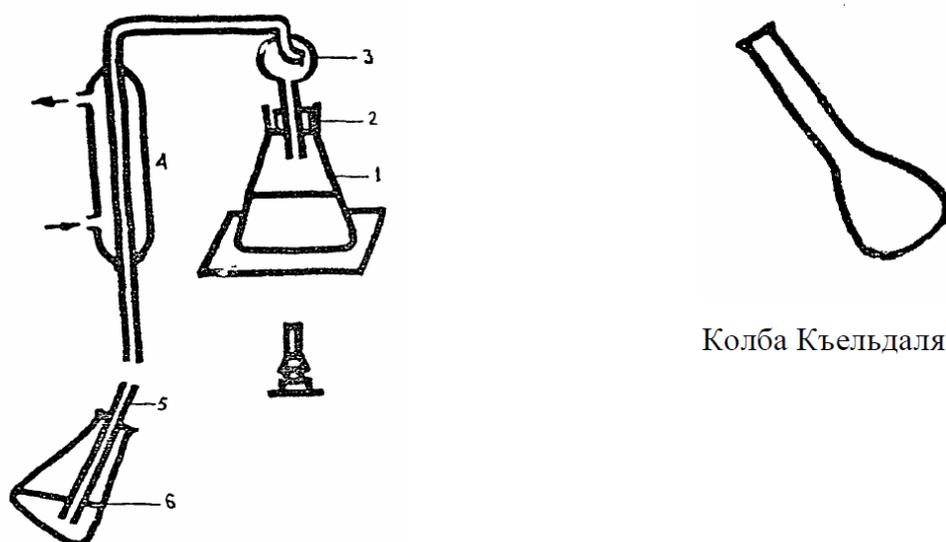
1. МИНЕРАЛИЗАЦИЯ

В колбу Кьельдаля (рисунок 1) внести пипеткой определенный объем (0,5-2 мл) экстракта белков мышечной ткани и добавить несколько кристаллов сульфата меди и половину чайной ложки (около 5 г) сульфата калия. Отмерить цилиндром 10 мл концентрированной серной кислоты, стараясь обмыть горлышко, влить в колбу Кьельдаля.

Минерализацию следует проводить в вытяжном шкафу, так как при сжигании выделяются диоксид и триоксид серы, раздражающие дыхательные

пути. Перемешать содержимое колбы (без встряхивания), поместить колбу наклонно на асбестовой сетке, лежащей на кольце штатива, горлышко колбы прислонить внутри другого металлического кольца, укрепленного на том же штативе.

Нагревание вести при слабом кипячении жидкости (сильное кипячение может привести к потере азота вследствие разложения сульфата аммония) на пламени газовой горелки. Вследствие обугливания органических веществ жидкость в колбе окрашивается в черный, затем темно-бурый, коричневый и желтый цвет. Постепенно, по мере окисления углерода, жидкость обесцвечивается. После обесцвечивания раствора жидкость нагревать еще 5-10 мин., затем отключить горелку и дать колбе охладиться. После полного охлаждения колбу вынуть из вытяжного шкафа.



Колба Кьельдаля

Рисунок 1 – Прибор для отгонки аммиака:

1 – колба для отгонки – колба Эрленмейера на 500 мл; 2 – резиновая пробка; 3 – каплеуловитель; 4 – холодильник Либиха; 5 – отводная трубка; 6 – приемник

2. ОТГОНКА АММИАКА

За время сжигания образца и охлаждения колбы следует собрать прибор для отгонки аммиака (см. рисунок 1) и проверить прибор на герметичность. Для этого в приемник цилиндром налить 50 мл раствора борной кислоты, отводную трубку прибора погрузить в борную кислоту.

В колбу Кьельдаля после полного охлаждения осторожно по стенке (отверстие колбы держать от себя) прилить дистиллированной воды приблизительно до половины, перемешать содержимое колбы и количественно перенести раствор в колбу для отгонки (колба Эрленмейера на 500 мл), ополаскивая с помощью промывалки колбу Кьельдаля 4-5 раз небольшими порциями дистиллированной воды. В колбу для отгонки поместить несколько кусочков фарфора, чтобы избежать толчков при кипении. Затем осторожно по

стенке в колбу для отгонки прилить цилиндром такое количество 40 %-ного раствора гидроксида натрия, которое необходимо для нейтрализации взятой для сжигания серной кислоты и создания щелочной среды. Для определения необходимого объема гидроксида натрия налить в отдельную колбу около 100 мл дистиллированной воды, добавить 10 мл концентрированной серной кислоты, несколько капель смешанного индикатора и из мерного цилиндра маленькими порциями приливать 40 %-ный раствор гидроксида натрия до щелочной реакции. Установленный объем раствора гидроксида натрия, необходимый для нейтрализации серной кислоты, добавить в колбу для отгонки. Такое определение необходимо проводить для каждого нового раствора гидроксида натрия.

В колбу для отгонки осторожно влить гидроксид натрия, чтобы он, стекая на дно колбы, не смешивался с жидкостью, иначе неизбежны потери аммиака.

После добавления гидроксида натрия колбу для отгонки через каплеуловитель присоединить к холодильнику. Убедившись в герметичности прибора, включить холодильник, подставить под колбу горелку, нагреть до кипения. Выделяющийся аммиак через холодильник поступает в приемник с борной кислотой. Конец отводной трубки в начале отгонки должен быть погружен в борную кислоту. После того как основное количество аммиака будет отогнано, отводную трубку можно вынуть из борной кислоты, давая жидкости свободно стекать в приемник с кончика отводной трубки.

Отгонку продолжать до полного удаления аммиака (30-40 мин.). Конец отгонки определяют с помощью индикаторной бумаги, испытывая реакцию каплей жидкости, стекающей с отводной трубки. Конец отводной трубки необходимо обмыть водой из промывалки над приемником перед началом испытания на реакцию среды. Если реакция среды нейтральная, через 5-10 мин. отключить газ.

3. ТИТРОВАНИЕ И РАСЧЕТ

В колбу–приемник добавить 5-10 капель смешанного индикатора до ярко выраженной зеленой окраски и титровать из бюретки (на белом фоне) 0,1 н. раствором соляной кислоты до изменения цвета в фиолетовый (промежуточная окраска сероватого тона).

Расчет количества азота в исследуемом объеме белковой вытяжки производить по формуле:

$$X = n \cdot 1,4 \text{ мг},$$

где X – количество общего азота, мг; n – число мл 0,1 н. раствора соляной кислоты, пошедшее на титрование.

Рассчитать количество и концентрацию «сырого протеина» в исследуемом экстракте белков или в исследуемой ткани.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Зачем знать количество белка в пищевом продукте?

Каков смысл коэффициента пересчета 6,25?

Приведите данные о содержании белка в пищевом продукте, который вы съели на завтрак.

Лабораторная работа № 9.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА

Цель: получить практические умения и навыки в определении небелкового азота.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: стаканы стеклянные лабораторные на 50 мл; палочки стеклянные; воронки для фильтрования; пипетка с одной меткой для прямого слива на 2 мл; колба Кьельдаля на 50-100 мл; колбы Эрленмейера на 500 и 250 мл; каплеуловители (насадка Кьельдаля); холодильник Либиха; цилиндры градуированные на 10 и 50 мл; бюретка на 25-50 мл; промывалка; ступка с пестиком; бумажные фильтры, весы лабораторные электронные; сушильный шкаф.

Материалы и реактивы: исследуемый продукт; серная кислота концентрированная; сульфат меди, обезвоженный; сульфат натрия или калия; гидроокись натрия, 40 %-ный раствор; борная кислота, 2 %-ный раствор; соляная кислота, 0,1 н. раствор; индикатор смешанный (приготовление индикатора см. в лабораторной работе «Количественное определение белков по азоту методом Кьельдаля»), трихлоруксусная кислота (ТХУ), 20 %-ный раствор; кусочки пензы, фарфора или стеклянные капилляры.

К 0,5 г продукта, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С и измельченного в ступке, добавить 5 мл 20 %-ного раствора ТХУ и 4,5 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать и оставить на 1-2 ч. Затем пробу отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр.

Массу навески для дальнейшего расчета массовой доли небелкового азота вычисляют следующим образом:

В 10 мл приготовленного образца – 0,5 г сухого вещества;

В 2 мл приготовленного образца – X г сухого вещества.

$$X = \frac{2\text{мл} \cdot 0,5\text{г}}{10\text{мл}} = 0,1 \text{ г сухого вещества.}$$

Для сжигания взять 2 мл фильтрата. Далее определить азот по методике «Количественное определение белков по азоту методом Кьельдаля» с последующим расчетом результатов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каков химический смысл выражения «небелковый азот»?

Какие биохимические процессы могут привести к его увеличению?

Как изменятся органолептические показатели пищевого продукта при нарастании количества небелкового азота?

ВИТАМИНЫ

Лабораторная работа № 10.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

Цель: получить практические умения и навыки в обнаружении витаминов

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Витамины – низкомолекулярные органические вещества разнообразной химической природы, выполняющие важнейшие биохимические и физиологические функции в живых организмах. Они содержатся в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена целостного организма.

Классификация витаминов основана на их растворимости. В зависимости от растворимости различают жирорастворимые (А, D, К, Е) и водорастворимые (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, Вс, Н, С, Р) витамины, кроме того, выделена отдельная группа так называемых витаминоподобных веществ (В₄, N, В₈, В₁₀, В₁₁, В₁₃, В₁₅, U, F, коэнзим Q).

Витамины отличаются от других органических пищевых веществ следующими признаками: они не входят в состав структуры органов и тканей и не используются организмом в качестве источника энергии. Большинство витаминов является предшественниками коферментов, входящих в состав

важнейших ферментов и ферментных систем, а некоторые выполняют сигнальные функции.

Витамины относятся к незаменимым факторам питания, поскольку в организме человека и животных не синтезируются. Они синтезируются растениями, некоторые – микрофлорой кишечника. Большинство витаминов содержится в достаточных количествах в обычных продуктах питания животного и растительного происхождения – овощах, фруктах, подсолнечном масле, мясе, печени, почках, молоке, сливочном масле, яйцах, хлебе, крупе и др.

Нарушения нормального процесса обмена часто связаны с недостаточным поступлением витаминов в организм или плохим их усвоением – гиповитаминозом. Полное отсутствие витаминов в потребляемой пище, нарушение их всасывания, транспорта и т. д. приводит к развитию ряда тяжелых заболеваний (цинга, рахит, пеллагра и др.) – авитаминозу. Поступление в организм чрезмерно больших количеств витаминов – гипервитаминоз.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

1.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН В₁

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

Материалы и 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.

Опыт 1. Реакция витамина В₁ с диазореактивом

Качественная реакция основана на том, что при взаимодействии сульфаниловой кислоты, нитрита натрия и тиаминхлорида образуется азокраситель оранжево-красного цвета.

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

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция окисления тиамин в тиохром

В щелочной среде под влиянием сильных окислителей тиамин окисляется в тиохром – соединение с сине-голубой флуоресценцией в ультрафиолетовых лучах. Метод используется для количественного определения тиамин.

2-3 мг тиаминхлорида поместить в пробирку, добавить 5-10 капель 5 %-ного раствора гексациано-(III)феррата калия, содержимое тщательно перемешать и нагреть на водяной бане.

Жидкость в пробирке окрашивается в изумрудно-зеленый цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 3. Реакция Преблуба–Мак-Колдума

В пробирку налить 5 капель 0,01 %-ного раствора тиаминхлорида и 10 капель 50 %-ного раствора этилового спирта; пробирку поместить в водяную баню при 50-70 °С на 2 мин. Затем в пробирку добавить одну каплю 4 н. раствора соляной кислоты и 20 капель этилового спирта, тщательно перемешать.

Жидкость в пробирке окрашивается в розовый цвет.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

1.2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИН В₂

Качественная реакция основана на том, что рибофлавин восстанавливается водородом, выделяющимся при взаимодействии цинка с концентрированной соляной кислотой, сначала в родофлавин красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: рибофлавин в таблетках; соляная кислота концентрированная; цинк гранулированный.

1/10 часть таблетки рибофлавина поместить в пробирку и растворить в 0,5 мл воды, наблюдаются окрашивание и флюоресценция раствора. В раствор добавить 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора вновь появляется окрашивание.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

1.3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН РР

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.

Материалы и реактивы: никотиновая кислота (или ее амид), 0,1 %-ный раствор; 2,4-динитрохлорбензол, 1 %-ный спиртовой раствор; гидроксид натрия, 10 %-ный спиртовой раствор; роданбромидный раствор (10 мл 0,1 н. раствора роданида калия или роданида аммония, 1 г кристаллического бромида калия и 1 мл 17 %-ного раствора соляной кислоты поместить в колбу на 25 мл, затем осторожно под тягой по каплям добавить 2 мл брома, раствор используется немедленно после приготовления); спиртовой раствор анилина (свежеперегнаный анилин растворить в 96 %-ном этиловом спирте в пропорции 1:6); этиловый спирт, 96 %-ный; гидроксид натрия, 10 %-ный спиртовой раствор; буферная смесь спиртовая рН 5,29 (1:1).

Опыт 1. Реакция с 2,4-динитрохлорбензолом

В выпарительную чашку поместить 1 мл 0,1 %-ного раствора витамина В₅ и упарить раствор досуха на водяной бане. К сухому остатку добавить 1 мл спиртового раствора 2,4-динитрохлорбензола и тщательно перемешать. Полученный раствор вновь упарить досуха (под тягой!), сухой остаток прокалить 10-15 мин. Затем чашку остудить и к осадку прибавить 5 мл спиртового раствора гидроксида натрия.

Появляется красно-фиолетовая окраска. При стоянии окраска бледнеет и постепенно исчезает.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция с роданбромидом

В пробирку налить 10 капель раствора никотиновой кислоты и поставить в водяную баню при 70 °С (не выше), после чего прибавить 2 капли роданбромидного раствора и 5 капель спиртового раствора анилина. Содержимое колбы перемешать и добавить 2 мл спиртового раствора буфера.

Через некоторое время раствор окрашивается в желтый цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

1.4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН С

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

Материалы и реактивы: сок капусты, картофеля, или витамин С, 0,002 %-ный раствор; метиленовый синий, 0,01 %-ный раствор; гексациано-(III) феррат калия, 5 %-ный раствор; гидроксид калия, 5 %-ный раствор; соляная кислота, 10 %-ный раствор; хлорид железа, 1 %-ный раствор; уксусная кислота, 10 %-ный раствор; 2,6-дихлорфенолиндофенол, свежеприготовленный, 0,02 %-ный раствор.

Опыт 1. Реакция с гексациано-(III)ферратом калия

Реакция 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).

В пробирку налить 1 мл сока капусты, прибавить 2 капли раствора гидроксида калия и 2 капли раствора гексациано-(III) феррата калия, энергично встряхнуть содержимое пробирки. Затем в пробирку добавить 6-8 капель 10 %-ного раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа-(III).

Выпадает синий (или зеленовато-синий) осадок берлинской лазури.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция с метиленовой синью

Проба основана на том, что аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовую синь в бесцветную лейкоформу, а сама окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты

В пробирку налить 1 мл капустного сока, прибавить 1 мл 0,01 %-ного раствора метиленовой сини, перемешать. Закрыв пробкой, пробирку поместить в термостат при 37–40 °С. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается.

После термостатирования пробирку с бесцветным раствором метиленовой сини энергично встряхнуть, не препятствуя поступлению воздуха. Раствор вновь приобретет синий цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

2. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

2.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН А

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: рыбий жир или витамин А (ретинол), масляный раствор; серная кислота, концентрированная; уксусная кислота, ледяная; сульфат железа, насыщенный раствор; треххлористая сурьма, 33 %-ный хлороформенный раствор.

Опыт 1. Реакция Друммонда с концентрированной серной кислотой

Метод основан на том, что под действием концентрированной серной кислоты ретинол дегидратирует с образованием окрашенных продуктов. При смешивании рыбьего жира, содержащего витамин А, с концентрированной серной кислотой образуется соединение красно-бурого цвета.

В сухую пробирку по стенке опустить 2-3 капли масляного раствора витамина А или рыбьего жира, затем осторожно опустить 1 каплю серной кислоты. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в вишнево-красное.

Написать уравнение реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция с сульфатом железа (II)

Витамин А с сульфатом железа образует ретинол сульфат – голубого цвета, каротины – зеленого цвета.

В сухую пробирку поместить 2-3 капли масляного раствора витамина А или рыбьего жира, прилить 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), и 1-2 капли концентрированной серной кислоты.

Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 3. Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин с хлоридом сурьмы образует комплексное соединение (хлористый ретинолят сурьмы) синего цвета. Реакция используется при колориметрическом методе количественного определения витамина А.

В пробирку внести 2 капли масляного раствора витамина А или свежего рыбьего жира и добавить 3 капли 33 %-ного хлороформенного раствора треххлористой сурьмы.

При перемешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

2.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИН E

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

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

Опыт 1. Реакция с концентрированной азотной кислотой

Витамин E окисляется концентрированной азотной кислотой в α -токоферилхинон – красного или желтовато-красного цвета. Метод используется для количественного определения витамина E.

В сухую пробирку налить 2-3 капли масляного раствора витамина E или 4-5 капель 0,1 %-ного спиртового раствора витамина E, прибавить 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки перемешать.

Пробирку поместить на водяную баню при 70 °C (не выше); образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается, и верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция с хлоридом железа (III)

Витамин E (спиртовой раствор) окисляется хлоридом железа (III) в α -токоферилхинон – красного цвета.

В сухую пробирку налить 4-5 капель 0,1 %-ного спиртового раствора витамина E, прибавить 5 капель хлорида железа (III) и содержимое пробирки тщательно перемешать.

Пробирку поместить в водяную баню при 70 °C до появления красного окрашивания.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

2.3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ ГРУППЫ D

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: рыбий жир или витамин D, масляный раствор; анилиновый реактив (смесь анилина и концентрированной соляной кислоты (15:1)); раствор брома в хлороформе (1:60).

Опыт 1. Реакция с анилином на витамин D

В сухую пробирку налить 2 капли рыбьего жира и 10 капель хлороформа, добавить 1 каплю анилинового реактива, содержимое пробирки перемешать. Затем пробирку поместить в кипящую водяную баню, осторожно нагреть при постоянном помешивании до кипения, кипятить около 1 мин. При наличии витамина D желтая эмульсия сначала окрашивается в зеленый цвет, а затем – в

красный. Через 1-2 мин. эмульсия делится на два слоя, из которых нижний окрашен в интенсивно красный цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Бромхлороформная проба на витамин D

В сухую пробирку налить 5 капель рыбьего жира, добавить 5 капель раствора брома в хлороформе. При наличии витамина D жидкость постепенно окрашивается в зеленовато-голубоватый цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

2.4. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ВИТАМИНЫ ГРУППЫ К

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: метионин, 0,25 %-ный спиртовой раствор или викасол, 0,05 %-ный раствор, анилин.

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

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Зачем проводятся качественные реакции на витамины?

Насколько необходимо наличие витаминов в продуктах?

Лабораторная работа № 11.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТИТРА

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет розовую окраску, а восстановленное соединение – бесцветное.

При количественном определении витамина С методом титрования раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола – он восстанавливается витамином С до бесцветной формы – титруемый раствор обесцвечивается. Как только весь витамин С прореагирует с 2,6-дихлорфенолиндофенолом, следующая его капля окрашивает титруемый раствор в розовый цвет (кислая среда).

Зная количество 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса), израсходованное на титрование, и его титр, установленный по аскорбиновой

кислоте, вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе.

При воздействии ряда технологических факторов (тепловая обработка, облучение, присутствие некоторых металлов, хранение) дегидроаскорбиновая кислота превращается в дикетогулоновую, не обладающую витаминными свойствами.

Оборудование: колбы конические на 50 мл (4 шт.); колбы мерные на 25, 50 и 1000 мл; пипетка градуированная на 10 мл; ступка фарфоровая с пестиком; стеклянные воронки для фильтрования; фильтровальная бумага; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: исследуемый материал (сухие ягоды шиповника, хвоя, капуста, картофель); аскорбиновая кислота, 0,1 %-ный раствор; соляная кислота, 5 %-ный раствор; серная кислота, 2 %-ный раствор; йодид калия (КJ), кристаллический; крахмал, 1 %-ный раствор; йодат калия (KJO_3) 0,001 н. раствор (0,03568 г KJO_3 растворить в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1000 мл и при тщательном перемешивании объем раствора довести дистиллированной водой до метки); 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор (0,25 г 2,6-дихлорфенолиндофенола поместить в мерную колбу на 1000 мл, прилить 700 мл дистиллированной воды, взболтать, добавить 300 мл буферной смеси; оставить на сутки; на следующий день раствор отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр, фильтрат тщательно перемешать и определить титр приготовленного раствора); буферная фосфатная смесь (1/15 M), приготовленная по Серенсену, (раствор 1: 9,078 г KH_2PO_4 поместить в мерную колбу на 1000 мл, добавить небольшое количество дистиллированной воды и при перемешивании объем раствора довести дистиллированной водой до метки; раствор 2: 11,867 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ поместить в мерную колбу на 1000 мл, добавить небольшое количество дистиллированной воды и при перемешивании объем раствора довести дистиллированной водой до метки. Растворы 1 и 2 хранить отдельно, перед началом анализа их смешать в пропорции 2:3, тогда $\text{pH} = 6,9-7,0$); битое стекло или кварцевый песок.

Установку титра приблизительно 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола провести по аскорбиновой кислоте в день работы.

Определение титра раствора: в мерную колбу на 50 мл поместить 2 мл 0,1 %-ного раствора аскорбиновой кислоты, тщательно перемешивая, объем раствора довести 2 %-ной серной кислотой до метки. В две конические колбы налить по 5 мл приготовленного раствора аскорбиновой кислоты, при перемешивании добавить кристаллики (около 5-10 мг) йодида калия (КJ), 5 капель 1 %-ного раствора крахмала и оттитровать содержимое одной колбы 2,6-дихлорфенолиндофенолом, другой – 0,001 н. раствором йодата калия

(KJO₃). Титрование ведут осторожно до появления едва заметного синего окрашивания и отмечают затраченный на титрование объем йодата калия. Так как в первом и втором случае были оттитрованы одинаковые объемы аскорбиновой кислоты, количества затраченных йодата калия и дихлорфенолиндофенола эквивалентны друг другу.

Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте провести по формуле:

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b},$$

где T – количество миллиграммов аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты в мг, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия; а – количество 0,001 н. раствора йодата калия, израсходованного на титрование раствора аскорбиновой кислоты, в мл; б – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, в мл.

1. Навеску исследуемого материала (сухие ягоды шиповника – 2 г, хвои – 2, капусты – 10, картофеля – 10 г) взвесить с записью до второго знака, поместить в фарфоровую ступку, тщательно растереть с небольшим количеством измельченного стекла, добавляя маленькими порциями 20 мл 5 %-ного раствора соляной кислоты до получения жидкой однородной кашицы.

2. Содержимое ступки количественно перенести в мерную колбу на 100 мл (ступку и пестик 4-5 раз тщательно обмыть кислотой, сливая ее по стеклянной палочке в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены еще 30 мл 5 %-ной соляной кислоты, затем при перемешивании довести объем раствора дистиллированной водой до метки (конечная концентрация соляной кислоты 2,5 %). Полученную смесь оставить на 5-10 мин.

3. После стояния содержимое колбы тщательно перемешать, отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр, фильтрат (V) использовать для определения витамина С.

4. В коническую колбу на 50 мл отмерить пипеткой определенный объем (V1) полученного экстракта (шиповника – 2 мл, хвои – 10, капусты – 10, картофеля – 10 мл) и оттитровать из бюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с (опыт).

5. В коническую колбу на 50 мл отмерить пипеткой 4 мл 5 %-ной соляной кислоты и 21 мл воды и оттитровать из бюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с (контроль).

6. На основании средней величины титрования, полученной из двух-трех определений, определить содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = \frac{T \cdot (A_1 - A_2) \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты в мг/100 г; T – титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте, т. е количество аскорбиновой кислоты в мг, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; A₁ – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование опытной пробы, в мл; A₂ – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование контрольной пробы, в мл; V₁ – объем фильтрата, взятый для титрования, в мл; V – общий объем приготовленного экстракта в мл; m – масса анализируемого вещества в г; 100 – для пересчета на 100 г исследуемого материала.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каков химизм данной работы?

Лабораторная работа № 12.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В МОЛОКЕ

Оборудование: колбы конические на 50 и 100 мл; цилиндр мерный на 100 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл; бюретка для титрования на 10-25 мл.

Материалы и реактивы: молоко свежее; щавелевая кислота, насыщенный раствор; хлорид натрия, насыщенный раствор; 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДИФ), 0,001 н. раствор (0,2 г ДИФ поместить в мерную колбу на 1000 мл и объем раствора довести дистиллированной водой до метки, перелить в посуду с притертой пробкой, закрыть и хранить в холодильном шкафу).

1) В колбу на 100 мл отмерить 50 мл молока; для осаждения белков внести 4 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты и 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия, перемешать.

2) Содержимое колбы отфильтровать на стеклянной воронке через складчатый фильтр в сухую колбу.

3) В три сухие колбы на 50 мл налить по 10 мл фильтрата, каждую пробу оттитровать 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолин-дофенола до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 с.

4) На основании средней величины титрования, полученной из двух-трех определений, определить содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot 0,088 \cdot 2}{V_1}$$

где X – содержание витамина С в молоке в мг %; V – общий объем раствора 64 мл (50 мл молока + 4 мл щавелевой кислоты + 10 мл хлористого натрия); V_1 – объем пробы, взятой для титрования, 10 мл; V_2 – объем 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование пробы, в мл; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия, в мг; 2 – для перевода результатов в мг % (объем молока, взятого на исследование, 50 мл нужно умножить на 2, т. е. $50 \cdot 2 = 100$ мл).

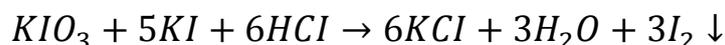
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Где больше витамина С: в молоке или масле, полученном из него?

Лабораторная работа № 13.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С МЕТОДОМ ЙОДОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

Метод основан на том, что при взаимодействии йодида и йодата калия в кислой среде выделяется йод:



Образовавшийся йод окисляет аскорбиновую кислоту в дегидроаскорбиновую.

В качестве индикатора реакции используем раствор крахмала. Как только вся аскорбиновая кислота прореагирует с йодом, следующая его капля окрасит раствор крахмала в синий цвет.

1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В СОКАХ

Оборудование: колбы конические на 100 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 20 мл или цилиндр мерный на 100 мл; бюретка для титрования на 10-25 мл.

Материалы и реактивы: сок; йодид калия (KI), 1 %-ный раствор; крахмал, 1 %-ный раствор; соляная кислота, 5 %-ный раствор; йодат калия (KIO_3), 0,1 н. раствор

1) В три колбы на 100 мл отмерить по 0,5 мл 1 %-ного раствора йодида калия, 2 мл крахмала, 1 мл 5 %-ного раствора соляной кислоты, затем добавить 20 мл исследуемого сока и провести титрование 0,1 н. раствором йодата калия до появления стойкого слабо-синего окрашивания. Для наблюдения за изменением окраски рядом с титруемым раствором разместить эталон – стакан с исследуемым соком.

2) На основании средней величины титрования, полученной из двух-трех определений, рассчитать содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = 0,088 \cdot V \cdot 5,$$

где X – содержание витамина С в 20 мл исследуемого сока в мг %; V – объем йодата калия, пошедшего на титрование, в мл; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты в мг, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия; 5 – для перевода результатов в мг% (объем сока, взятого на исследование 20 мл, умножить на 5, т. е. $20 \cdot 5 = 100$ мл).

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ

Оборудование: колбы конические на 100 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл или цилиндр мерный на 10 мл; бюретка для титрования на 10-25 мл, ступка фарфоровая с пестиком; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: капуста, картофель; йод, 0,003 н. раствор; крахмал, 1 %-ный раствор; соляная кислота, 5 %-ный раствор.

1) Взвесить 2 г исследуемого материала с записью до второго знака, натереть на терке в чашку Петри или мелко порезать и тщательно растереть в фарфоровой ступке с небольшим количеством измельченного стекла, добавляя маленькими порциями 10 мл 5 %-ного раствора соляной кислоты до получения жидкой однородной кашицы.

2) Хорошо перемешанную массу отфильтровать на стеклянной воронке через вату в коническую колбу на 50-100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды.

3) В фильтрат прилить 1мл 1 %-ного раствора крахмала и оттитровать рабочим раствором 0,003 н. йода до появления синего окрашивания.

4) На основании средней величины титрования, полученной из двух-трех определений, определить содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = \frac{0,264 \cdot V \cdot 100}{m},$$

где 0,264 – количество аскорбиновой кислоты в мг, соответствующее 1 мл 0,003 н. раствора йода; V – количество 0.003 н. раствора йода, израсходованного на титрование, в мл; m – количество вещества, взятое на анализ, в г; 100 – для пересчета на 100 г исследуемого материала.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каков химизм данной работы?

Лабораторная работа №14.
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Е В ПЕЧЕНИ
И МОЛОКЕ

Метод основан на том, что при окислении токоферолов хлорным железом образуется комплекс двухвалентного железа с α, α^1 -дипиридилем, окрашенного в желто-коричневый цвет, имеющего максимум поглощения при 520 нм.

Оборудование: колба коническая на 100 мл с притертой стеклянной пробкой; колбы круглодонные на 100, 200 мл; колба на 100-150 мл с обратным холодильником; пробирки центрифужные; воронки делительные на 100-200 мл; воронки стеклянные для фильтрования; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1; 2 и 5 мл; цилиндры градуированные на 50, 100 мл; ступка с пестиком или гомогенизатор; баня водяная; фотоколориметр или спектрофотометр; центрифуга; весы лабораторные электронные, фильтры бумажные.

Материалы и реактивы: печень, молоко (молозиво) животных; масляный концентрат витамина Е в ампулах (100 мг); этиловый спирт, 96 %-ный раствор, ректификат; бензол (свежеперегнанный); гексан; гидроксид калия, 60 %-ный раствор; диэтиловый эфир (без перекисных соединений), х. ч.; сульфат натрия безводный; железодипиридиловый реактив (250 мг хлорида железа и 500 мг α, α^1 -дипиридила поместить в мерную колбу на 1000 мл, затем объем раствора довести уксусной кислотой до метки; реактив годен для использования через 7-10 дней после приготовления; хранить при комнатной температуре в посуде из темного стекла, срок хранения не ограничен); источник газообразного азота (баллон с азотом, редуктор).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В ПЕЧЕНИ

1) Печень измельчить в гомогенизаторе, взвесить 1 г измельченной печени с записью до второго знака, поместить в круглодонную колбу на 100-150 мл, снабженную обратным холодильником, добавить 1 мл 60 %-ного раствора гидроксида калия, 3 мл 96 %-ного этилового спирта, 20 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

2) Колбу соединить с обратным холодильником, поставить на водяную баню и провести омыление при 80 °С до полного растворения печени, затем колбу отсоединить и охладить.

3) Охлажденный омыленный образец перенести в делительную воронку и трижды провести экстрагирование диэтиловым эфиром, используя по 20 мл эфира на каждую экстракцию, сливая экстракты в одну и ту же коническую колбу на 100 мл, закрывая стеклянной пробкой.

4) Объединенный эфирный экстракт перелить в делительную воронку, промыть дистиллированной водой не менее трех раз для удаления щелочи (проба на лакмусовую бумагу), после этого слить и измерить объем экстракта, поместить в коническую колбу на 100 мл, закрыв стеклянной пробкой (V).

5) 2 мл эфирного экстракта перенести пипеткой для прямого слива в пробирку, выпарить эфир на водяной бане в токе азота при 50 °С (V₁).

6) К сухому остатку в пробирке прилить 1 мл бензола, добавить 2 мл железодипиридинового реактива, перемешать (опыт) и оставить на 20 мин. Одновременно готовится контрольная проба (1 мл бензола + 2 мл железодипиридинового реактива). Пробы следует оберегать от света.

7) Через 20 мин. величину оптической плотности исследуемых проб измерить против контроля на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре или на спектрофотометре при длине волны 520 нм в кювете шириной 0,5 см.

8) Концентрацию витамина Е в печени, молоке (молозиве) определяют по формуле:

$$X = \frac{E \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m \cdot 1000},$$

где X – концентрация витамина Е в %; E – количество витамина Е, найденное по калибровочной кривой, в мкг; V – общий объем эфирного экстракта в мл; V₁ – объем выпаренного эфирного экстракта 2 мл; m – навеска печени в г или объем молока (молозива) в мл; 1000 – пересчет мкг в мг; 100 – пересчет на 100 г исследуемого материала.

Примечание. При анализе сырья с большим содержанием каротиноидов (печень) необходимо проводить их осаждение. Для этого при анализе молока и печени к 2-3 мл эфирного экстракта добавить 0,2-0,3 мл серной кислоты. Содержимое тщательно перемешивать 2-3 мин., встряхнуть и центрифугировать при 1,5-2 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость перенести в чистые центрифужные пробирки. Остатки кислоты нейтрализовать 0,2 мл 2 %-ного раствора гидроксида калия. Смесь перемешивать 1-2 мин. и центрифугировать 5 мин. Далее определение содержания витамина Е в экстракте провести по вышеизложенной методике (п. п. 3-8).

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В МОЛОКЕ (МОЛОЗИВЕ)

1) 100 мл молока (25 мл молозива) налить в колбу на 200 мл, добавить 10 мл 60 %-ного раствора гидроксида калия и 20 мл 96 %-ного этилового спирта, для проведения реакции омыления колбу поместить в термостат при 37 °С на 72 ч. В первый день омыления реакционную жидкость в колбе периодически взбалтывать.

2) Далее определение проводить так же, как и при определении витамина Е в печени (п.п. 3–8).

3. ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

1) Количество витамина E' , участвующего в реакции, определить по калибровочному графику.

Калибровочный график строится для каждой партии железодипиридинового реактива.

Для приготовления стандартных растворов витамина Е используют ампулы, содержащие 100 мг витамина Е (токоферолацетата) в виде масляного концентрата.

1) В колбу на 100-150 мл поместить ампулу витамина Е и резким ударом шпателя разбить ампулу, затем прилить 2 мл 60 %-ного водного раствора гидроксида калия и 10 мл 96 %-ного этилового спирта, смесь перемешать.

2) Для омыления липидов колбу соединить с обратным воздушным холодильником, поместить в водяную баню при 80 °С на 35 мин., затем колбу отсоединить от холодильника и охладить.

3) В колбу с охлажденным омыленным раствором добавить 20 мл дистиллированной воды и перенести количественно в делительную воронку для экстракции витамина Е бензолом. Для проведения первой экстракции в делительную воронку влить 40 мл бензола, для двух последующих – по 20 мл, сливать каждый экстракт в одну и ту же коническую колбу на 150 мл, закрывая стеклянной пробкой.

4) Объединенный бензольный экстракт промыть в делительной воронке 3-4 раза дистиллированной водой до удаления следов щелочи (проба на лакмусовую бумагу).

5) Бензольный экстракт слить из делительной воронки в колбу на 100 мл, добавить 5-7 г безводного сульфата натрия, закрыть стеклянной пробкой и высушить.

6) Обезвоженный экстракт отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл, сульфат натрия промыть на фильтре небольшим количеством бензола, после чего объем экстракта довести бензолом до метки.

Полученный основной стандартный раствор витамина Е (токоферола) имеет концентрацию 90 мг %.

7) Рабочий раствор витамина Е (2,25 мг %) готовится разбавлением основного стандартного раствора в 40 раз (1 мл основного раствора + 39 мл бензола).

8) Для построения калибровочного графика из рабочего раствора витамина Е приготовить серию растворов (таблица 7):

Таблица 7 – Серия растворов

Номер пробирки	Концентрация растворов, мкг/ мл	Приготовление растворов, мл	
		Количество рабочего раствора	Количество бензола
1	2,25	1	9
2	4,50	2	8
3	6,75	3	7
4	9,00	4	6
5	13,50	6	4
6	18,00	8	2

9) Растворы каждой концентрации для реакции взять в объеме 1 мл, прибавить 2 мл железодипиридинового реактива и перемешать. Одновременно приготовить контрольную пробу (1 мл бензола + 2 мл железодипиридинового реактива). Пробы оставить на 20 мин., оберегая от света.

10) Через 20 мин. величину оптической плотности исследуемого раствора измерить против контроля на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре или на спектрофотометре при длине волны 520 нм в кюветах шириной 0,5 см.

11) На основании полученных результатов построить калибровочный график.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каковы функции витамина С?

Лабораторная работа № 15.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В МОЛОКЕ

Оборудование: колбы конические на 100 мл с притертой стеклянной пробкой; колбы круглодонные на 100 и 250 мл с обратным воздушным холодильником; воронка делительная на 200 мл; колбы мерные на 25 мл (2 шт.); мерные цилиндры с носиком на 25 мл (4 шт.); пипетки с одной меткой для прямого слива на 1, 2 и 5 мл; фотоколориметр; баня водяная.

Материалы и реактивы: молоко; гидроксид кальция, 60 %-ный раствор; этиловый спирт, 96 %-ный раствор; диэтиловый эфир; сульфат калия, 60 %-ный раствор; сульфат натрия, прокаленный; этиловый спирт, абсолютный; азотная кислота ($d=1,4$); серия стандартных спиртовых растворов α -токоферола с возрастающей концентрацией (от 100 до 400 мкг в 1 мл).

1) В колбу на 250 мл, снабженную воздушным обратным холодильником, влить 100 мл молока, добавить 5 мл 60 %-ного раствора гидроксида калия, 20 мл 96 %-ного этилового спирта, перемешать.

2) Колбу соединить с обратным холодильником, поставить в кипящую водяную баню на 2 ч.

3) Полученный гидролизат охладить, добавить 20 мл дистиллированной воды, количественно перенести в делительную воронку.

4) Извлечение α -токоферола проводится диэтиловым эфиром в три приема: для проведения первой экстракции в делительную воронку влить 50 мл, для двух последующих – по 25 мл эфира, сливая каждый эфирный экстракт в одну и ту же колбу на 150 мл, закрывая стеклянной пробкой.

5) Объединенный эфирный экстракт перенести в делительную воронку, промыть 3-4 раза дистиллированной водой до полного удаления щелочи (по фенолфталеину).

6) Эфирный экстракт слить из делительной воронки в колбу на 150 мл, добавить 5-7 г безводного сульфата натрия, закрыть стеклянной пробкой и высушить.

7) Обезвоженный экстракт отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр в мерную сухую колбу на 100 мл, сульфат натрия промыть на фильтре небольшим количеством эфира, который присоединить к основному экстракту.

8) Эфир испарить на водяной бане в вытяжном шкафу или на роторном испарителе.

9) Полученный сухой остаток поместить в колбу на 100 мл с обратным холодильником, растворить в 5 мл абсолютного спирта, прилить 1 мл концентрированной азотной кислоты, колбу присоединить к холодильнику и поместить в кипящую водяную баню на 3 мин. для окисления α -токоферола (опыт).

10) В колбу на 100 мл с обратным холодильником налить 5 мл абсолютного спирта, прилить 1 мл концентрированной азотной кислоты, присоединить к обратному холодильнику, поставить в кипящую водяную баню на 3 мин. (контроль).

11) Обе колбы (опыт и контроль) охладить и поставить в темное место на 15 мин. для развития окраски.

12) Опытную и контрольную реакционные смеси перенести количественно в мерные колбы на 25 мл и довести абсолютным этиловым спиртом до метки.

13) Оптическую плотность окрашенного раствора определить на фотоколориметре с синим светофильтром (470 нм) против контроля, по ее величине определяют содержание витамина Е в исходном растворе по калибровочной кривой.

14) Для построения калибровочной кривой 5 мл каждого из серии стандартных спиртовых растворов α -токоферола с определенной

концентрацией поместить в колбу на 100 мл, снабженную обратным холодильником, добавить 1 мл концентрированной азотной кислоты и поместить в кипящую водяную баню на 3 мин. Дальнейшие операции идентичны описанным для контрольной и опытной проб (п. п. 9, 10, 11, 12). Полученные величины экстинций окрашенных стандартных растворов откладывают по оси ординат, а соответствующие им количества α -токоферола – по оси абсцисс.

15) Содержание α -токоферола определить по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot d}{a \cdot 1000}$$

где X – содержание витамина E в 1 г испытуемого материала в мг; C – найденное по калибровочной кривой количество витамина E в 1 мл раствора в мкг; V – общий объем исследованного раствора с учетом всех разведений в мл; d – плотность исследованного раствора молока; m – масса молока в г; 1000 – коэффициент для перевода мкг в мг.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каковы функции витамина E?

Лабораторная работа № 16.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА A В ПЕЧЕНИ

Метод основан на том, что витамин A с соляной кислотой в 1,3-дихлор-2-пропаноле образует соединение розово-фиолетовой окраски, что позволяет его содержание определять колориметрически.

Оборудование: колба круглодонная на 25 мл с обратным воздушным холодильником; воронка делительная на 250 мл; цилиндры измерительные с носиком на 20-25 мл (4 шт.); пипетки с одной меткой для прямого слива на 1, 2, 5 и 10 мл; ступка с пестиком; водяная баня; фотоэлектроколориметр; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: печень, гидроксид калия, 20 %-ный спиртовой раствор; диэтиловый эфир; сульфат натрия, хлороформ (освобожденный от влаги и свежеперегнанный); гидриновый реактив (2 мл концентрированной соляной кислоты поместить в колбу на 100 мл, при перемешивании прилить 98 мл 1,3-дихлор-2-пропанола, раствор хранить в темном прохладном месте).

1) Печень измельчить в гомогенизаторе, отвесить 5 г с записью до второго знака.

2) Пробу поместить в колбу, снабженную обратным воздушным холодильником, добавить 10 мл 20 %-ного спиртового раствора гидроксида

калия, присоединить холодильник, поместить в кипящую водяную баню на 30 мин. до полного растворения печени, затем колбу отсоединить и охладить.

3) Охлажденный раствор печени перенести в делительную воронку и трижды провести экстрагирование, используя 10-15 мл диэтилового эфира на каждую экстракцию, сливая каждый экстракт в одну и ту же колбу на 100 мл, закрывая стеклянной притертой пробкой.

4) Объединенный эфирный экстракт перенести в делительную воронку, промыть 3-4 раза дистиллированной водой до полного удаления щелочи (по фенолфталеину).

5) Эфирный экстракт слить из делительной воронки в колбу на 100 мл, добавить 5-7 г безводного сульфата натрия, закрыть стеклянной пробкой и высушить.

6) Обезвоженный эфирный экстракт перенести в делительную воронку и дважды промыть эфиром по 5 мл.

7) Экстракт перенести в выпарительную чашку, эфир выпарить на водяной бане при 40 °С в вытяжном шкафу, осадок растворить в 5 мл хлороформа.

8) В чистую пробирку отобрать 1 мл хлороформенного экстракта, прибавить 2 мл гидринового реактива, энергично перемешать, поместить в термостат при 25 °С на 5 мин.

9) После инкубирования оптическую плотность окрашенного раствора определить на фотоколориметре с зеленым светофильтром.

10) Содержание витамина А определить по формуле:

$$X = \frac{E_1 \cdot V \cdot 100 \cdot 0,03 \cdot 3}{E_2 \cdot V_1 \cdot m},$$

где X – количество витамина А в пробе в мг/100 г; E_1 – экстинкция исследуемого раствора; E_2 – экстинкция стандартного рабочего раствора; V – общий объем эфирного экстракта в мл (5 мл); V_1 – для анализа взят 1 мл из общего объема экстракта и разбавлен в 3 раза (3); m – масса исследуемого материала в г (5 г); 0,03 – 1 мл рабочего раствора по величине экстинкции соответствует 0,03 мг витамина А.

Приготовление стандартного раствора: 10 мг метилового фиолетового и 2,3 мг сафронина поместить в мерную колбу на 1000 мл, при перемешивании объем раствора довести дистиллированной воды до метки (раствор можно хранить в темноте 5 мес.).

Приготовление рабочего стандартного раствора (используют в качестве эталона сравнения, готовят перед использованием): в колбу или стакан на 50 мл налить 12 мл стандартного раствора, добавить 13 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. 1 мл рабочего раствора по величине экстинкции (E) соответствует 0,03 мг витамина А.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Какие пищевые продукты являются источниками водорастворимых витаминов?

Какие пищевые продукты являются источниками жирорастворимых витаминов?

Приведите величины потребности человека в витаминах – минимальную и максимальную.

ФЕРМЕНТЫ

Лабораторная работа № 17.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФЕРМЕНТЫ

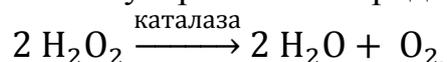
Цель: получение практических умений и навыков в изучении действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Ферменты – специфические белки, которые играют роль биологических катализаторов, обеспечивающих многообразные превращения в организме. Они входят в состав всех клеток и тканей живых организмов. Благодаря ферментам, химические реакции в живом организме протекают с большой скоростью при обычной температуре тела и без участия сильнодействующих химических реагентов.

В основе действия ферментов лежит их способность взаимодействовать с субстратами с образованием фермент-субстратного комплекса. В результате этого происходит активация субстрата, который в дальнейшем вступает в реакции при значительно сниженной энергии активации с высокой скоростью.

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



Каталаза относится к классу оксидоредуктаз (I-й класс), действующих на пероксид водорода в качестве акцептора (2-й подкласс). Шифр каталазы – I.2.1.3. Это гемопроteid, сложный белок из группы гемсодержащих хромпроteidов – катализирует разложение ядовитого для живых структур пероксида водорода в различных клетках и тканях.

Каталаза снижает энергию активации пероксида водорода с 18 ккал/моль (без катализатора) до 2 ккал/моль. В результате ее действия скорость реакции увеличивается, например, при 25 °С в $3 \cdot 10^{11}$ раза. Каждая молекула каталазы расщепляет около 5 млн. молекул пероксида водорода в минуту при 0 °С.

Фермент каталаза содержится в некоторых сырых продуктах – молоке, картофеле и др. Ее обнаруживают, используя ее способность разлагать гидроксид водорода с выделением газа кислорода.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых, соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Опыт 1. Обнаружение каталазы в пищевых продуктах

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, термостат.

Материалы и реактивы: молоко сырое и кипяченое; кусочки сырого и вареного мяса; кусочки сырого и вареного картофеля; пероксид водорода (H_2O_2), 3 % -ный раствор.

В две пробирки налить по 5 капель пероксида водорода. В первую пробирку добавить 5 капель сырого молока, во вторую – 5 капель кипяченого. В первой пробирке наблюдают выделение газа, который испытывают тлеющей лучинкой. Вместо молока можно взять кусочки сырого и вареного мяса или сырого и вареного картофеля.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Обнаружение оксидоредуктазы в молоке

Опыт основан на способности оксидоредуктазы восстанавливать метиленовую синь (при этом раствор обесцвечивается).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня.

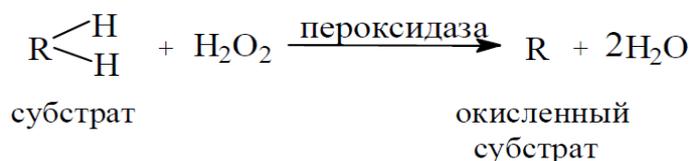
Материалы и реактивы: молоко сырое и кипяченое; формальдегид, 5 % -ный раствор; метиленовая синь, 0,1 % -ный спиртовой раствор.

В первую пробирку налить 5 капель свежего молока, во вторую – столько же кипяченого. Затем в обе пробирки добавить по 3 капли формальдегида и по 3 капли 0,1 %-ного спиртового раствора метиленовой сини. Обе пробирки поставить в водяную баню при 70 °С и нагревать до обесцвечивания раствора метиленовой сини в одной из пробирок.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

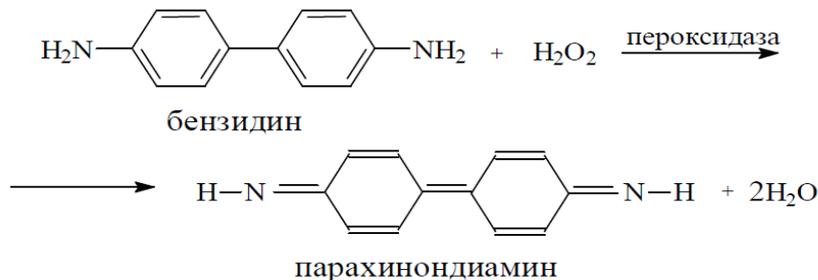
Опыт 3. Открытие пероксидазы в животном и растительном материале (бензидиновая проба)

Пероксидазы – гемосодержащие хромопротеиды, катализирующие окисление некоторых субстратов с помощью пероксида водорода:



Фермент пероксидаза широко распространен в природе. Особенно в больших количествах он встречается в растительных тканях (хрене, картофеле и др.). В животных организмах встречается преимущественно в крови, мышцах, молоке (реакцией на пероксидазу в молочной промышленности контролируют эффективность пастеризации молока).

Проба основана на том, что пероксидазы с бензидином образуют окрашенный продукт:



Окисленный бензидин приобретает зеленую, затем синюю, постепенно переходящую в бурую окраску.

Бензидиновую пробу можно использовать как для открытия ферментов, проявляющих пероксидазную активность, так и для определения свежести некоторых продуктов (например, мяса).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: вытяжка из мяса (мясной фарш залить водой в пропорции 1:4, настаивать 10 мин., затем отфильтровать); вытяжка из хрена (250 г хрена растереть на терке, добавить к полученной каше 250 мл 0,05%-ного раствора углекислого натрия, настаивать 4-5 ч, затем отфильтровать через 2-3 слоя марли), пероксид водорода, 3 %-ный раствор; бензидин, 0,02 %-ный спиртовой раствор (или 1 %-ный раствор в ледяной уксусной кислоте).

В четыре пробирки налить по 5 капель раствора бензидина и по 5 капель раствора пероксида водорода. В первую пробирку добавить 5 капель мясной вытяжки, во вторую – 5 капель вытяжки из хрена, в третью – 5 капель воды.

Отметить изменение окраски жидкости в пробирках. Результаты записать в таблицу.

Опыт 4. Открытие пероксидазы в растительном материале (проба на гваякол)

Проба основана на том, что пероксидаза катализирует окисление многих фенолов в присутствии перекисей, например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамида и др. Так, при окислении гваякола пероксидазой картофеля образуется продукт коричневого цвета

Материалы и реактивы: сырой и вареный картофель; гваякол, 5 % -ный спиртовой раствор; пероксид водорода, 1 %-ный раствор.

На тонкий срез картофеля сырого и вареного нанести 1-2 капли спиртового раствора гваякола и 1-2 капли раствора пероксида водорода.

На сыром картофеле сразу же образуется пятно коричневого цвета – продукт окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 5. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Тирозиназа (катехолоксидаза) относится к группе ферментов, окисляющих фенолы и родственные им соединения, в частности, тирозин. По химической структуре тирозиназа является металлопротеидом, содержащим медь в количестве 0,20-0,25 %. Медь служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится во многих растениях, грибах, а также в отдельных органах и тканях животных.

Под влиянием тирозиназы тирозин окисляется до красного пигмента, а при дальнейшем окислении переходит в черный пигмент меланин. Превращение красного пигмента в меланин может протекать и в отсутствие тирозиназы, достаточно действия кислорода воздуха.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки с одним делением для прямого слива на 1 мл; стеклянная воронка для фильтрования; ступка с пестиком; фильтры бумажные; термостат; баня водяная.

Материалы и реактивы: картофель сырой; тирозин, 0,1 %-ный раствор.

Для получения ферментного препарата тирозиназы сырой картофель очистить от кожуры, верхние слои клубня в количестве 2-4 г порезать кусочками и растереть в ступке с 10 мл дистиллированной воды до однородной массы, затем отфильтровать через два слоя марли.

В две пробирки отмерить по 1 мл фильтрата. Одну пробирку поместить в кипящую водяную баню, содержимое прокипятить 1-2 мин., затем охладить водопроводной водой. Далее в обе пробирки добавить по 1 мл 0,1 %-ного раствора тирозина, перемешать и поместить на водяную баню при 37-40 °С, периодически энергично встряхивая пробирки для лучшего соприкосновения содержимого с воздухом, до образования продуктов окисления черного цвета.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 6. Открытие уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины на углекислый газ и аммиак. Уреаза содержится в соевых бобах, вырабатывается некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетка с одной меткой для прямого слива на 5 мл; баня водяная.

Материалы и реактивы: соевая мука; мочевины, 2 %-ный раствор; фенолфталеин, 1 %-ный раствор.

В две пробирки налить по 5 мл раствора мочевины и внести по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавить 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхнуть и поставить в водяную баню при 37-40 °С на 5-10 мин. Выделяющийся аммиак в первой пробирке определить по запаху или по окрашиванию влажной лакмусовой бумажки в синий цвет у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каково соотношение понятий (субстрат, продукт, фермент) в изучаемой Вами биохимической реакции?

Что изучает раздел науки энзимология?

Лабораторная работа № 18.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Цель: получение практических умений и навыков в регулировании процессов ферментализа.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Свойства ферментов изучаются в работе на примере амилазы слюны, субстратом амилазы является крахмал.

О ходе ферментативного гидролиза крахмала можно судить по изменению окраски, возникающей при добавлении раствора йода в инкубационную среду.

Крахмал дает с йодом синее окрашивание.

Декстрины (амилодекстрины, эритродекстрины, мальтодекстрины) в зависимости от длины цепочки – фиолетовое или красно-коричневое окрашивание.

Конечный продукт гидролиза крахмала под действием амилазы – *мальтоза* – с йодом не реагирует, и цвет инкубационной среды сохраняет слабо-желтую окраску раствора йода.

Опыт 1. Приготовление разведенной слюны

Прополоскать рот два раза дистиллированной водой для удаления остатков пищи. Взять в рот 20 мл дистиллированной воды, держать ее во рту около 2 мин. Полученную жидкость слить в стакан или колбу. Жидкость представляет собой раствор слюны, содержащий амилазу, – фермент, катализирующий гидролиз 1,4- α -гликозидных связей в молекуле крахмала.

Опыт 2. Приготовление контрольного раствора

При изучении свойств амилазы в работе постоянно приходится сравнивать полученную окраску инкубационного раствора после взаимодействия ее с йодом, с окраской контрольного раствора, содержащего негидролизированный 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 остается контролем для других опытов на протяжении всего хода работы.

Опыт 3. Специфичность амилазы

Приборы: штатив с микропробирками, пипетки, термостат.

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

В пробирку № 2 налить 5 капель раствора слюны и 5 капель раствора крахмала. Полученную смесь поместить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования смесь разделить на две пробирки, в одну добавить 1 каплю раствора Люголя, а во вторую - 5 капель жидкости Фелинга (раствор нагреть). Сравнить полученный результат с контролем (см. п. 2).

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

Результаты опыта оформить в виде таблицы:

Номер пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция с раствором Люголя	Реакция с жидкостью Фелинга	Наблюдения
2	амилаза	крахмал			
3	амилаза	сахароза			
1 (контроль)	-	крахмал			

Написать соответствующие уравнения реакции действия амилазы на сахарозу и крахмал; реакции взаимодействия продуктов гидролиза с жидкостью Фелинга и раствором Люголя и выводы.

Опыт 4. Термолабильность амилазы

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

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

В пробирку № 4 налить 5 капель раствора слюны, поставить в кипящую водяную баню, содержимое прокипятить 10 мин. После этого в пробирку добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем (см. п. 2).

В пробирку № 5 налить 5 капель раствора слюны, поставить на ледяную баню на 10 мин. После этого в пробирку добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя и сравнить полученный результат с контролем. Затем пробирку поставить в термостат при 37-40°С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем.

В пробирку № 6 налить 5 капель раствора слюны, добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем.

Результаты опыта оформить в виде таблицы и написать выводы:

Номер пробирки	Воздействие	Температура воздействия	Реакция с раствором Люголя	Наблюдения
4	кипячение	100 °С		
5	охлаждение	0 °С		
6	-	37-40 °С		
1 (контроль)		комнатная		

Опыт 5. Влияние реакции среды на активность амилазы

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.

В пробирку № 7 налить 5 капель раствора слюны, 1 каплю дистиллированной воды и 2 капли 0,1 н. раствора соляной кислоты (кислая среда). После этого в пробирку добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем (см. п. 2).

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

В пробирку № 9 налить 5 капель раствора слюны, 3 капли воды (нейтральная среда). После этого в пробирку добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем

Результаты опыта оформить в виде таблицы написать выводы:

Номер пробирки	РН среды	Реакция с раствором Люголя	Наблюдения
7	<7		
8	>7		
9	≈ 7		

Опыт 6. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

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.

В пробирку № 10 поместить 5 капель раствора слюны и 1 каплю раствора хлорида натрия, добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, описать скорость исчезновения окраски за 5 мин, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем.

В пробирку № 11 налить 5 капель раствора слюны и 1 каплю раствора сульфата меди, добавить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю раствора Люголя, описать скорость исчезновения окраски за 5 мин, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем.

В пробирку № 12 налить 5 капель раствора слюны и 1 каплю дистиллированной воды, затем прилить 5 капель раствора крахмала и 1 каплю

раствора Люголя, описать скорость исчезновения окраски за 5 мин, затем поставить в термостат при 37-40 °С на 10 мин. После термостатирования окраску раствора сравнить с контролем.

Результаты опыта оформить в виде таблицы и написать выводы:

Номер пробирки	Эффектор	Реакция с реактивом Люголя	Наблюдения	
			термостатирование	
			до	после
1	NaCl			
2	CuSO ₄			
3	H ₂ O			

Опыт 7. Зависимость скорости ферментативных реакций от количества фермента

Приготовить ряд растворов фермента по убывающей концентрации и установить скорость реакции (по времени) для каждого разведения.

Приборы: штатив с микропробирками; стакан стеклянный на 50-100 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 мл и 10 мл; пипетка градуированная на 10 мл; термостат.

Материалы и реактивы: раствор слюны (1 мл слюны и 9 мл дистиллированной воды), разбавленный в 10 раз; крахмал, 0,25 %-ный раствор; раствор Люголя (1 г йода и 2,5 г йодида калия поместить в мерную колбу на 100 мл, прилить 20 мл дистиллированной воды, по растворению объем раствора довести дистиллированной водой до метки).

1. Налить в четыре пробирки по 1 мл дистиллированной воды. В пробирку № 1 отмерить 1 мл слюны, предварительно разбавленной водой в 10 раз. Тщательно перемешать содержимое пробирки № 1 (проба 1), 1 мл полученного раствора перенести в пробирку № 2, тщательно перемешать (проба 2). После перемешивания 1 мл раствора перенести в пробирку № 3, тщательно перемешать (проба 3). После перемешивания 1 мл раствора перенести в пробирку № 4, тщательно перемешать (проба 4). В результате получают слюну, разведенную в 20, 40, 80, 160 раз.

2. Во все четыре пробирки (пробы 1, 2, 3, 4) налить по 3 мл воды. Затем добавить в каждую пробирку по 4 мл 0,25 %-ного раствора крахмала. Добавление крахмала надо начинать с пробирки № 1 (пробы 1), содержащей амилазу в наименьшей концентрации. Быстро перемешать содержимое пробирок и поместить в термостат при 37 °С.

3. В 16 микропробирок внести по 1,0 мл сильно разбавленного раствора Люголя для анализа результатов гидролиза (п. 4).

4. Сразу после помещения пробирок в термостат, затем через определенные промежутки времени, например, через 3 мин., из каждой пробирки взять несколько капель и прибавить их в приготовленные заранее

пробирки (каждая проба в отдельную пробирку). В начале термостатирования пробы должны дать синее окрашивание, а затем красно-фиолетовое, красное (декстрины) и в конце (мальтоза) – желтое окрашивание раствора Люголя. Отметить время от начала опыта до отрицательной пробы с раствором Люголя для каждой из четырех пробирок, т. е. окончание гидролиза крахмала амилазой.

Результаты опыта оформить в виде таблицы, написать выводы:

Время взятия пробы, мин	Номер пробы	Номер пробирки	Реакция с раствором Люголя (окраска пробы)
0	1	1	
	2	2	
	3	3	
	4	4	
3	1	5	
	2	6	
	3	7	
	4	8	
6	1	9	
	2	10	
	3	11	
	4	12	
9	1	13	
	2	14	
	3	15	
	4	16	

5. На основании полученных результатов построить график, отложить на оси абсцисс относительную концентрацию (разведение) амилазы, а по оси ординат – соответствующее время в минутах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Как изменится скорость ферментативной реакции при повышении температуры?

Зачем в пищевых технологиях используется холодильное оборудование с точки зрения биохимии?

Лабораторная работа № 19.
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ
ПШЕНИЧНОЙ МУКИ

Цель: получение практических умений и навыков в определении активности фермента.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Амилазы катализируют гидролиз полисахаридов – крахмала и гликогена. В растительных организмах содержатся α и β -амилазы, в животных – только α -амилаза. Особенно много амилаз образуется в проросшем зерне. Под воздействием амилаз полисахариды расщепляются до мальтозы. При этом β -амилаза в отличие от α -амилазы способна расщеплять только 1-4 α -гликозидные связи.

Амилазы имеют различную устойчивость к температуре и кислой среде. α -Амилаза сохраняет свою активность при нагревании до 70 °С, в то время как β -амилаза в этих условиях полностью инактивируется. Увеличение кислотности до рН = 3,3 оказывает ингибирующее действие на α -амилазу, β -амилаза устойчива к изменению рН среды.

Амилазы играют большую роль в хлебопекарном и бродильном производстве как основные ферменты, катализирующие процесс расщепления крахмала.

Активность амилазы оценивают: по количеству мальтозы, образовавшейся за определенный период времени; по времени, которое требуется для исчезновения окраски с йодом; колориметрическим методом.

За единицу амилолитической активности принято количество фермента, катализирующее расщепление 1 г растворимого крахмала при 30 °С за 1 ч при оптимальных условиях для действия фермента.

На практике чаще пользуются понятием амилолитической способности (АС), которое показывает, сколько граммов крахмала может быть гидролизовано за 1 ч (при тех же условиях) под воздействием единицы ферментного препарата (в граммах или кубических сантиметрах).

Принцип метода заключается в определении интенсивности окраски йодкрахмальных компонентов на фотоэлектроколориметре.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов,

подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: колбы конические на 50 мл; колбы мерные на 50 мл; пипетки градуированные на 1 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1, 2 и 3 мл; пробирки на 10 мл; фотоколориметр; термостат; баня водяная; холодильник; центрифуга; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: растворимый крахмал, 2 %-ный раствор; пшеничная мука; кварцевый песок; хлорид натрия, 1%-ный раствор; уксуснокислый кальций (сухой); 0,3 %-ный раствор йода в 3%-ном растворе йодида калия (KI); соляная кислота, 1н. и 0,1 н. растворы; хлорид натрия, 1 %-ный раствор; ацетатный буфер, 0,2 н. рН 5,5 (57,4 мл 1 н. уксусной кислоты поместить в мерную колбу на 500 мл, добавить 50 мл 1 н. раствора гидроксида натрия и объем раствора довести дистиллированной водой до метки).

1. Выделение ферментного препарата:

1) Взвесить 3 г муки с записью до второго знака, поместить в фарфоровую ступку и растереть с небольшим количеством битого стекла, приливая по частям 15 мл 1%-ного раствора хлорида натрия, до однородной массы.

2) Однородную массу перенести в стакан, затем для выделения белков поставить в холодильник на 1-1,5 ч, перемешивая раствор палочкой через каждые 15-20 мин.

3) После выделения белков раствор перенести в центрифужные пробирки и центрифугировать 10 мин при 4000-5000 об/мин.

4) Прозрачную надосадочную жидкость из пробирок слить в коническую колбу и использовать в качестве ферментного препарата для определения активности амилаз.

2. Определения суммарной активности амилаз:

1) В две сухие пробирки налить по 3 мл 0,2 н. ацетатного буфера (Рн = 5,5) и по 3 мл 2 %-ного раствора крахмала, затем нагреть в водяной бане до 40°C.

2) В одну пробирку прилить 1 мл ферментного препарата (опыт), в другую – 1 мл воды (контроль).

3) Содержимое пробирок перемешать и поставить в термостат при 40 °С на 30 мин. За это время крахмал под действием амилаз гидролизуетеся до мальтозы. В каждую пробирку внести по 2 мл 1 н. раствора соляной кислоты для инактивации фермента.

4) Из каждой пробирки отобрать пипеткой по 0,5 мл смеси и поместить в мерные колбы на 50 мл, в которые перед этим налито по 30-40 мл воды, 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты, 5 капель 0,3 %-ного раствора йода в 3 %-ном растворе йодида калия. Объем раствора в каждой колбе довести

дистиллированной водой до метки, тщательно перемешать, затем интенсивность окраски измерить на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре и длине волны 590 нм.

5) Вычислить аминолитическую способность ферментного препарата по формуле:

$$AC = \frac{2 \cdot C \cdot (E_k - E_0)}{E_k},$$

где AC – амилолитическая способность 1 мл ферментного препарата за 1 ч/г; E_k , – оптическая плотность контрольного раствора; E_0 – оптическая плотность исследуемого раствора; C – количество внесенного крахмала в г (0,06 г); 2 – коэффициент пересчета AC для времени инкубации 1 ч.

3. Определение активности α - и β -амилазы:

1) В оставшуюся часть (5-8 мл) ферментного препарата добавить на кончике шпателя сухого уксуснокислого кальция и поставить в водяную баню при 70 °С на 15 мин, затем быстро охладить. α -амилаза при таких условия инактивируется практически полностью.

2) Раствор использовать для определения α -амилазной активности по вышеописанной методике.

3) Активность β -амилазы определяют по разности между суммарной активностью амилаз и активностью α -амилазы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Какие субстраты, реагенты и продукты участвуют и образуются в результате ферментализа амилазой?

К какому классу и подклассу по международной классификации относится амилаза?

Лабораторная работа № 20.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

Цель: получение практических умение и навыков определения активности липолитических ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Активность ферментов обычно определяют по скорости убыли субстрата, на который действует фермент, или по скорости накопления продуктов ферментативной реакции, которую катализирует данный фермент.

За международную единицу активности фермента принят катал (кат), представляющий собой количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата за 1 с.

1 нкат (нанокатал) = $1 \cdot 10^{-9}$ кат.

Липаза – гидролитический фермент, широко распространенный в животных и растительных организмах. Особенно много липазы содержится в поджелудочной железе, мышцах, семенах масличных растений, а также в значительном количестве её образуют микроскопические (плесневые) грибы и некоторые бактерии. У каждого вида растений есть свои собственные липазы, значительно различающиеся по свойствам, однако в отличие от многих других ферментов специфичность липаз очень низка, и любая липаза может расщеплять различные жиры.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ЛИПАЗЫ СЕМЯН МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР

В растениях присутствуют липазы, проявляющие свою активность при различных значениях pH. Различают кислую, нейтральную и щелочную липазы, которые максимально активны соответственно в кислой, нейтральной или щелочной среде. В семенах масличных культур содержатся в основном кислые и щелочные липазы.

Липаза катализирует реакцию расщепления жира на глицерин и жирные кислоты. При этом жирные кислоты можно нейтрализовать щелочью. По количеству щелочи, пошедшей на титрование свободных жирных кислот, образующихся за определенный промежуток времени, судят об активности липазы.

Активность липазы выражают в мл 0,1 н. гидроксида натрия, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз из 10 г масличных семян.

Оборудование: конические колбы с притертыми пробками на 100 и 250 мл; делительная воронка на 500 мл; мерные цилиндры на 100 и 500 мл; пипетки с одним делением для прямого слива на 1, 3 и 5 мл; бюретка для титрования; термостат; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: ферментный экстракт; очищенное подсолнечное масло; смесь 96 %-ного этилового спирта с эфиром (4:1); гидроксид натрия, 0,1 н. спиртовой раствор; тимолфталейн, 1 %-ный спиртовой

раствор в 80 %-ном этиловом спирте; фосфатный буфер, РН=8 (13,60 г KH_2PO_4 поместить в мерную колбу на 1000 мл; при перемешивании объем раствора довести до метки); боратный буфер, РН = 8 (85,6 мл раствора тетрабората натрия (7,455 г хлорида калия и 6,184 г борной кислоты (H_3BO_3) поместить в мерную колбу на 100 мл и объем раствора довести дистиллированной водой до метки), поместить в мерную колбу на 100 мл добавить 46,1 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, перемешать и объем раствора довести дистиллированной водой до метки).

Получение ферментного препарата: взвесить 10 г тонкоразмолотых семян масличных культур из средней пробы, поместить в колбу на 100 мл, добавить 40 мл фосфатного буфера и поставить в стряхивательный аппарат на 30 мин., затем содержимое колбы перелить в центрифужные пробирки и центрифугировать 5 мин. при 5 тыс. об./мин., затем надосадочную жидкость слить в коническую колбу на 50 мл и использовать в качестве ферментного экстракта.

Очистка подсолнечного масла: 300 г подсолнечного масла поместить в делительную воронку на 500 мл, добавить 50 мл 2 %-ного водного раствора гидроксида натрия, взболтать и дать отстояться, щелочной раствор слить; затем масло в воронке промыть несколько раз 100 мл дистиллированной воды до отрицательной реакции с фенолфталеином; после отстаивания воду отделить, а масло просушить, добавив 20-30 г безводного хлористого кальция. Затем отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр в сухую коническую колбу и использовать в работе.

1) В две конические колбы отмерить по 1 мл очищенного подсолнечного масла, по 5 мл боратного буфера (рН=8,0), затем в одну колбу добавить 3 мл ферментного препарата (опыт), в другую – внести 3 мл предварительно прокипяченного (в течение 5-10 мин) ферментного препарата (контроль).

2) Колбы поместить в термостат при 37-40 °С на 30 мин.

3) После инкубации в колбы прилить по 50 мл смеси этилового спирта с эфиром и взболтать.

4) После отстаивания провести титрование 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида натрия в присутствии нескольких капель тимолфталеина до появления слабо-голубого окрашивания.

5) Расчет провести по следующей формуле:

$$A = 2 \cdot T \cdot (a - b),$$

где X – активность липазы в мл 0,1 н. гидроксида натрия, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз из 10 г семян; а – количество 0,1 н. гидроксида натрия, израсходованного для титрования исследуемого образца (с ферментом), в мл; б – количество 0,1н.

гидроксида натрия, израсходованного для титрования контрольного образца (без фермента), в мл; T – поправка к титру 0,1 н. гидроксида натрия; 2 – коэффициент пересчета для времени инкубации 1 ч.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ МОЛОКА

Большое влияние на процессе переваривания жиров оказывает желчь, содержащая соли желчных кислот. Желчные кислоты взаимодействуют с жирами и маслами с образованием чрезвычайно тонкой эмульсии, диаметр частиц которой не превышает 0,5 мк. Эмульгирование жира приводит к значительному увеличению поверхности соприкосновения жира с водным раствором липазы и повышению скорости ферментативного гидролиза жира. Соли желчных кислот, кроме того, активируют малоактивную липазу поджелудочной железы.

В качестве субстрата обычно берут молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется липазой на глицерин и жирные кислоты. Об активности липазы судят по количеству образовавшихся жирных кислот за определенный промежуток времени. Количество жирных кислот в пробах молока, взятых до гидролиза и в процессе гидролиза, определяют методом титрования раствором щелочи.

Оборудование: колбы конические на 100 мл (18 шт.); пипетки для прямого слива с одной меткой на 1 и 10 мл; бюретка на 15-20 мл; воронка стеклянная для фильтрования; цилиндр мерный на 50 мл; ступка с пестиком; термостат на 37 °С; марля.

Материалы и реактивы: молоко, прокипяченное и охлажденное до 37 °С; поджелудочная железа (свежая); желчь; фенолфталеин, 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; липаза лиофилизированная (из поджелудочной железы свиньи), мезим или фестал.

Получение препарата липазы: при отсутствии в продаже лиофилизированного препарата фермента липазу можно получить из свежей или свежзамороженной поджелудочной железы свиньи, быка или другого животного. Для этого поджелудочную железу очистить от жира, пропустить через мясорубку и тщательно растереть в ступке с тройным количеством воды (при растирании можно добавить песок или толченое стекло). Полученную смесь отфильтровывать на стеклянной воронке через 2-3 слоя марли.

Надо помнить, что липаза легко разрушается, особенно при действии кислот, поэтому в хранившейся даже небольшое время панкреатической железе липаза уже не открывается.

1) В три конические колбы на 100 мл налить по 50 мл молока, в колбы № 1 и № 2 (опыт) добавить по 2 мл препарата липазы или по 1 мл раствора лиофилизированной липазы (мезима или фестала), содержащего 1 мг препарата

в 1 мл, в колбу № 3 (контроль) – столько же предварительно прокипяченного препарата фермента. В колбу № 1 добавить 5-6 капель желчи (для активирования липазы).

2) Содержимое колб быстро перемешать, сейчас же отобрать пипеткой по 10 мл жидкости и перенести их в три другие колбы на 100 мл (для титрования).

3) Первые колбы (№ 1, 2 и 3) поставить в термостат или в водяную баню при 37-40 °С на 90 мин.

4) В колбы для титрования (№ 4, 5 и 6) добавить по 10 мл воды и по 2-3 капли раствора фенолфталеина. Оттитровать содержимое каждой колбы 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания при непрерывном и тщательном помешивании.

5) Результаты титрования записать в таблицу.

6) Через 15, 30, 60 и 90 мин. (еще четыре раза) после начала инкубации отобрать из колб № 1, 2 и 3 по 10 мл, поместить в сухие колбы и во все добавить по 10 мл воды и по 2-3 капли раствора фенолфталеина. Оттитровать содержимое каждой колбы 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания при непрерывном и тщательном помешивании. Данные занести в таблицу:

Стояние в термостате, мин.	Затрачено на титрование 0,1 н. NaOH, мл		
	Номер опыта		
	1	2	3
0			
15			
30			
60			
90			

7) Для построения графика, показывающего действие липазы во времени в зависимости от наличия или отсутствия желчи, по оси абсцисс отложить время, а по оси ординат – объем в миллилитрах 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование свободных жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени, в опытах 1, 2 и 3.

На основании полученных результатов сделать вывод о влиянии желчи на переваривание жира.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Чем отличается химический липолиз от биохимического?

Какова роль процесса эмульгирования в расщеплении жиров?

Лабораторная работа № 21.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ПЕПТИДГИДРОЛАЗ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ РЫБ
(ПО МЕТОДУ АНСЕНА)

Цель: получение практических умений и навыков изучения протеолиза.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метод определения суммарной протеолитической активности пептидгидролаз рыбного сырья основан на гидролизе белка казеината натрия ферментным препаратом из рыбного сырья с последующей инактивацией фермента и осаждением непрогидролизованного белка трихлоруксусной кислотой. В полученном фильтрате определяют количество прогидролизованного белка по содержанию образовавшегося тирозина колориметрическим методом с применением реактива Фолина.

За единицу протеолитической активности принимают количество фермента, которое за 1 мин. при 30 °С превращает в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние казеинат натрия в количестве, соответствующем 1 мк молю тирозина.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: стаканы и колбы лабораторные; стаканы для взвешивания (бюксы); пробирки стеклянные на 20 мл; пипетки с одним делением для прямого слива на 1, 2, 4 и 5 мл; термостат; стеклянная воронка для фильтрования; магнитная мешалка; рН-метр; фотоэлектроколориметр; весы лабораторные электронные; гомогенизатор; марля.

Материалы и реактивы: казеинат натрия, 2 %-ный раствор с рН 6,2±0,2 (субстрат); универсальный буферный раствор, 0,1 М раствор; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10 %-ный раствор; карбонат натрия (Na₂CO₃), 0,5 М раствор; реактив Фолина (основной раствор).

Приготовление ферментного препарата: измельчить пищеварительный тракт рыб, отобрать необходимое для анализа количество внутренностей в стаканчик для микроизмельчения, добавить такое же количество дистиллированной воды (пропорция 1:1). Для лучшего измельчения тканей

рекомендуется сначала внести в гомогенизатор часть требуемого объема воды, измельчать смесь в течение 5 мин., затем долить оставшееся количество воды для получения пропорции 1:1 и измельчать еще 5 мин. Для предотвращения процесса микробиологической порчи в приготовленную смесь добавить 10 %-ный раствор толуола. Затем приготовить 5 %-ный раствор препарата фермента в дистиллированной воде. Полученный препарат тщательно взболтать, отфильтровать на стеклянной воронке через слой марли и использовать в работе.

1) В две пробирки на 10 мл влить по 2 мл субстрата и поместить в термостат при 30 °С на 10 мин.

2) После термостатирования в обе пробирки быстро добавить по 2 мл приготовленного ферментного препарата, встряхнуть и поставить на гидролиз в термостат при 30 °С ровно на 10 мин.

3) После термостатирования в обе пробирки добавить по 4 мл 10 %-ного раствора ТХУ, смесь быстро перемешать, поставить пробирки в термостат при 30 °С еще на 20 мин. для обеспечения полного осаждения белков (в том числе ферментов) и высокомолекулярных продуктов его гидролиза, т. е. для прерывания ферментативной реакции.

4) После термостатирования осадки отфильтровать на стеклянных воронках через бумажные складчатые фильтры в две сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен.

5) Отобрать из пробирок по 1 мл фильтрата, поместить в две сухие пробирки, в обе добавить по 5 мл 0,5 М раствора карбоната натрия, перемешать, быстро прилить по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина и оставить на 20 мин.

6) После стояния, за минуту до колориметрирования, растворы отфильтровать через воронки с бумажными фильтрами. После прохождения реакции с реактивом Фолина растворы приобретают голубую окраску, интенсивность которой определить по величине оптической плотности на фотоэлектроколориметре при длине волны 670 нм (красный светофильтр) в кюветах на 10 мм.

7). Контрольный раствор готовится путем прибавления реактивов в обратной последовательности: к 2 мл раствора ферментного препарата того же разведения, как и в опыте, добавить 4 мл ТХУ, выдержать в термостате при 30 °С 10 мин, затем внести 2 мл субстрата. Через 20 мин. стояния в термостате раствор отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр, отобрать в сухую пробирку 1 мл фильтрата, при перемешивании внести 5 мл 0,5 М карбоната натрия и 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. Оптическую плотность измерить на фотоэлектроколориметре при длине волны 670 нм (красный светофильтр) в кюветах на 10 мм.

Измерение на фотоэлектроколориметре проводить в следующем порядке:

налить в обе кюветы дистиллированную воду и установить стрелку гальванометра на 0. Затем из левой кюветы вылить воду и налить контрольный раствор. Определить его поглощение E_k против воды. После этого налить в кювету испытуемый раствор и измерить его поглощение E_o против воды.

Истинное поглощение раствора составляет разность опытного и контрольного ($E_o - E_k$). Для обеспечения точности анализа величина оптической плотности должна находиться между 0,3–0,6. При расчетах используют среднее значение, полученное из двух параллельных опытов.

Для расчета протеолитической активности комплекса пептидгидролаз внутренних органов необходимо построить калибровочный график по тирозину, оптическая плотность которого выражается в микромолях тирозина. Затем по калибровочному графику вычислить тирозиновый эквивалент, т. е. его оптическую плотность, которую бы дал 1 микромоль тирозина в 1мл (1 микромоль тирозина составляет 1,5-1,7). Найденный тирозиновый эквивалент (ТЭ) подставить в формулу (1), приведенную ниже. ТЭ устанавливается для каждой новой партии реактива Фолина и каждой марки фотоэлектроколориметра.

Построение калибровочного графика: 181,19 мг чистого тирозина поместить в мерную колбу на 1000 мл и объем раствора довести 0,2 н. соляной кислотой до метки. Из этого исходного 10^{-3} М раствора тирозина приготовить дальнейшие разведения следующим образом:

Раствор 1: в мерную колбу на 50 мл поместить 1 мл исходного раствора тирозина и объем раствора довести 0,2 н. соляной кислотой до метки. Концентрация тирозина (C_1) составляет $0,2 \cdot 10^{-4}$ М или 0,2 мкм/мл. Последующие растворы готовят аналогичным образом.

Раствор 2: 2 мл исходного раствора, $C_2 - 0,4 \cdot 10^{-4}$ М или 0,04 мкм/мл;

раствор 3: 3 мл исходного раствора, $C_3 - 0,6 \cdot 10^{-4}$ М или 0,06 мкм/мл;

раствор 4: 4 мл исходного раствора, $C_4 - 0,8 \cdot 10^{-4}$ М или 0,08 мкм/мл;

раствор 5: 5 мл исходного раствора, $C_5 - 1,0 \cdot 10^{-4}$ М или 0,10 мкм/мл;

раствор 6: 6 мл исходного раствора, $C_6 - 1,2 \cdot 10^{-4}$ М или 0,12 мкм/мл;

раствор 7: 7,5 мл исходного раствора, $C_7 - 1,5 \cdot 10^{-4}$ М или 0,15 мкм/мл;

раствор 8: 10 мл исходного раствора, $C_8 - 2,0 \cdot 10^{-4}$ М или 0,20 мкм/мл.

Затем в восемь микробиологических пробирок внести по 1 мл тирозина разной концентрации, в каждую из них добавить при постоянном перемешивании по 5 мл 0,5 М карбоната натрия и по 1 мл рабочего раствора Фолина. Интенсивность окраски измерить на фотоэлектроколориметре против контрольного раствора с красным светофильтром (длина волны 760 мкм) в кюветах на 10 мм.

Приготовление контрольного опыта: в колбу на 50 мл влить 1 мл дистиллированной воды (вместо раствора тирозина) и объем раствора довести 0,2 н. соляной кислотой до метки. Реакционной жидкости дать постоять 20 мин.

Для большей точности рекомендуется приготовить три навески тирозина и провести описанным выше способом три параллельных опыта. По средним данным, полученным из трех опытов (значений оптической плотности E), растворов тирозина строят калибровочный график (рисунок 2).

Для построения калибровочного графика по полученным данным на оси абсцисс отложить количество тирозина (С) в мкм/мл, на оси ординат – соответствующие значения оптической плотности (E).

Например:

Номер раствора	Концентрация тирозина С, мкм/мл	Оптическая плотность раствора E
1	0,02	0,037
2	0,04	0,070
3	0,06	0,100
4	0,08	0,127
5	0,10	0,151
6	0,12	0,190
7	0,15	0,220
8	0,20	0,310

Тогда калибровочный график будет иметь следующий вид:

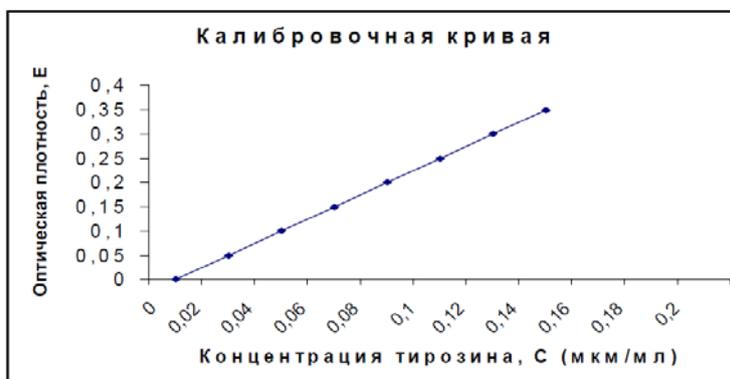


Рисунок 2 – Зависимость концентрации тирозина от оптической плотности

На основании этого графика вывести тирозиновый эквивалент (ТЭ).

Тирозиновый эквивалент – это та оптическая плотность, которую дал бы 1 мкм тирозина в 1 мл. На нашем графике 0,1 мкм тирозина в 1 мл дает оптическую плотность – 0,151; 1 нм тирозина - 1,51. Значит, ТЭ = 1,51.

Расчет протеолитической активности внутренних органов рыб провести по следующей формуле (1):

$$ПС = \frac{E \cdot 4}{ТЭ \cdot 10 \cdot m} , \quad (1)$$

где ПС – протеолитическая активность внутренних органов рыб, в ед./г; Е – оптическая плотность при толщине кюветы 10 мм (Е₀-Е_к); 4 – объем реакционной смеси, в мл; ТЭ – тирозиновый эквивалент; 10 – время гидролиза субстрата, в мин.; m – количество гомогената сырья, взятого на протеолиз, в г на 1 мл.

Пример расчета: взята навеска 5 г гомогената сырья и растворена в 100 мл буферного раствора (в мерной колбе на 100 мл), из которой взят на анализ 1 мл.

$$m = \frac{5 \cdot 1}{100} = 0,05 \text{ г}; \quad E = 0,5; \quad TЭ = 1,5.$$

Найденные величины подставляем в формулу (1):

$$ПС = \frac{0,5 \cdot 4}{1,5 \cdot 10 \cdot 0,05} = 2,6 \text{ ед./г}.$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каковы функции протеолитических ферментов?

Лабораторная работа № 22.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ

Цель: получение практических умений и навыков интенсификации протеолиза.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метод основан на том, что процесс накопления тирозина в мышечной ткани рыбы зависит от активности протеолитических ферментов, содержание которых можно определить колориметрическим методом.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: колба на 200 мл (2 шт.); мерная колба на 200 мл (2 шт.); мерная колба на 50 мл с притертой пробкой (7 шт.); колба на 200 мл с обратным холодильником; пипетка, градуированная на 1 и 10 мл (3 шт.); стеклянная

воронка для фильтрования (2 шт.); фильтровальная бумага; стеклянная палочка с резиновым наконечником; часовое стекло; ступка с пестиком; гомогенизатор; фотоэлектроколориметр; водяная баня; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: мороженая рыба, соленая рыба (предварительно выдержанная в 5 %-ном растворе хлорида натрия в течение недели); гидроксид натрия, 0,5 н. раствор; хлорид натрия, 5 %-ный раствор; фенольный реактив, разбавленный двумя объемами воды.

Приготовление фенольного реактива: в колбу на 150 мл, снабженную обратным холодильником, поместить 10 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 2,5 г молибденовокислого натрия (можно заменить фосфорно-молибденовокислым натрием), прилить 75 мл воды, 5 мл 85 %-ной фосфорной кислоты (орто) и 10 мл концентрированной соляной кислоты, содержимое осторожно перемешать; колбу присоединить к холодильнику и поставить в кипящую водяную баню, нагревать 10 ч при умеренном кипячении. По окончании кипячения колбу отсоединить от холодильника, охладить, прибавить 15 г сульфата лития, 5 мл воды и несколько капель брома. Избыток брома удалить кипячением без холодильника (под вытяжкой) 15 мин., затем жидкость охладить, отфильтровать через стеклянную воронку с бумажным фильтром в мерную колбу на 100 мл и объем раствора довести дистиллированной водой до метки, хранить в темной склянке.

1) Два образца рыбы, один – мороженой рыбы (контроль), другой – предварительно выдержанной в 5 %-ном растворе хлорида натрия в течение недели (опыт), тщательно измельчить в гомогенизаторе.

2) Взвесить на часовом стекле по 20 г опытного и контрольного фарша с записью результата до второго знака.

3) Навески количественно перенести в ступки и с небольшим количеством холодной дистиллированной воды тщательно растереть стеклянной палочкой с резиновым наконечником до получения кашицеобразной гомогенной массы.

4) Количественно перенести пробы в мерные колбы на 200 мл с небольшим количеством дистиллированной воды и добавить в каждую колбу горячей дистиллированной воды примерно на 2/3 её объема, содержимое колбы тщательно перемешивать (хорошо взболтать) 10-15 мин.

5) Колбы поставить в кипящую водяную баню на 10 мин.

6) После нагревания колбы охладить под краном до комнатной температуры и объем обеих колб довести дистиллированной водой до метки (200 мл).

7) Отфильтровать содержимое обеих колб на стеклянных воронках через бумажные складчатые фильтры в чистые сухие колбы на 200 мл.

8) Приготовление исследуемого раствора (опыт): 1 мл фильтрата поместить в мерную колбу на 50 мл, добавить 10 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия, прилить 3 мл фенольного реактива, при перемешивании объем раствора довести дистиллированной воды до метки, плотно закрыть пробкой и содержимое колбы тщательно перемешать. Колбу оставить на 10 мин. (раствор окрашивается в голубой цвет).

9). Приготовление холостой пробы (контроль): в мерную колбу 50 мл поместить 10 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия, прилить 3 мл фенольного реактива и довести объем раствора дистиллированной водой до метки, плотно закрыть пробкой; содержимое тщательно перемешать. Колбу оставить на 10 мин. (раствор окрашивается в голубой цвет).

10) Величину оптической плотности двух исследуемых растворов и контрольного измерить при длине волны 656 нм на красном светофильтре.

11) Содержание тирозина в мороженой и соленой рыбе вычислить по формуле:

$$X = \frac{E \cdot \Phi \cdot 200 \cdot 100}{n \cdot m \cdot t},$$

где X – содержание тирозина, в мг %; E – оптическая плотность, в %; Φ – фактор пересчета, учитывающий количество тирозина, в мг, приходящееся на одну единицу оптической плотности; 200 – объем, в котором содержится навеска фарша, в мл; 100 – множитель перевода в %; n – количество исследуемого раствора, взятое для цветной реакции, в мл; m – навеска фарша в г; t – толщина слоя кюветы, в мм.

Фактор пересчета заменяет калибровочную кривую, поскольку в данном случае мы имеем пропорциональную зависимость между содержанием тирозина в растворе и показаниями оптической плотности.

12) Определение фактора пересчета: приготовить раствор тирозина, содержащий 0,02 мг тирозина в 1 мл раствора. В мерные колбочки на 50 мл или цилиндры налить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мл приготовленного раствора тирозина и по п.п. 8-11 методики, описанной выше, провести анализ и измерить соответственно показания оптической плотности.

Фактор пересчета вычисляется для каждой взятой концентрации тирозина и берется как среднее арифметическое из всех определений по формуле:

$$\Phi = \frac{k \cdot t}{E},$$

где Φ – фактор пересчета; k – содержание тирозина в данной мерной колбе на 50 мл, в мг; E – соответствующая оптическая плотность; t – толщина слоя кюветы, в мм.

Фактор пересчета определяется для каждого вновь приготовленного «фенольного реактива» и периодически проверяется (примерно через месяц).

13) При расчете тирозина вместо фактора пересчета можно пользоваться калибровочным графиком. Он строится по тем же данным, по которым вычисляется фактор пересчета. Тогда расчетная формула будет следующей:

$$X = \frac{c \cdot 200 \cdot 100}{n \cdot m},$$

где X – содержание тирозина, в мг %; c – содержание тирозина в 50 мл окрашенного раствора, найденное по калибровочному графику, в мг; n – количество исследуемого раствора, взятое для цветной реакции, в мл; m – навеска фарша, в г.

14) Влияние хлорида натрия на активность протеолитических ферментов рыбы определить по разности содержания тирозина в соленой и мороженой рыбе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Каковы функции активаторов и ингибиторов?

Лабораторная работа № 23.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

Цель: получение практических умений и навыков в изучении действия ферментов.

Трипсин относится к протеиназам (протеолитическим ферментам). Он катализирует реакцию разрыва пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с данным ферментом.

Оборудование: колбы конические на 100 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл; баня водяная; термостат.

Материалы и реактивы: раствор казеина; раствор трипсина; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; раствор формалина; фенолфталеин, 1 %-ный раствор.

1) В колбу отмерить 50 мл раствора казеина, подогреть на водяной бане до 35-37 °С, и прилить 2 мл трипсина.

2) Сразу из колбы отобрать 10 мл раствора и определить в нем аминный азот методом формольного титрования, описанным в лабораторной работе № 36 «ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОАЗОТА ФОРМОЛЬНЫМ ТИТРОВАНИЕМ».

3) Колбу с казеином и трипсином поставить в термостат при 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин. отобрать по 10 мл раствора и в каждой пробе определить содержание аминного азота.

4) Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота (в миллиграммах), а по горизонтали – время (в минутах).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

В процессе изготовления каких пищевых продуктов имеет место протеолиз?

К какому классу относятся ферменты, участвующие в протеолизе?

Лабораторная работа № 24.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ В ДРОЖЖАХ

Цель: получение практических умений и навыков в определении активности ферментов расщепляющих углеводы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

β -фруктофуранозидаза содержится во всех растительных организмах, известна как сахараза или инвертаза. Этот фермент гидролизует только β -фруктозиды (сахарозу, рафинозу и др.). Сахароза под действием β -фруктофуранозидазы расщепляется на глюкозу и фруктозу. Активные препараты этого фермента получают из дрожжей и применяют в кондитерской промышленности для инверсии сахарозы. Образующийся инвертный сахар препятствует кристаллизации сахарозы в кондитерских изделиях.

Об активности фермента судят по количеству образовавшегося за 30 мин. инвертного сахара, содержание которого можно определить титрованием жидкости Фелинга.

Метод основан на том, что для полного раскисления 10 мл жидкости Фелинга (исчезновение синей окраски) требуется 0,05 г редуцирующих сахаров, поэтому, приливая из бюретки в кипящую жидкость Фелинга исследуемый раствор сахара до полного ее раскисления, можно определить, в каком объеме исследуемой жидкости содержится 0,05 г сахара.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с

преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: колбы конические на 200 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 и 5 мл; пипетка градуированная на 1 мл; цилиндры мерные на 10 и 100 мл; воронка стеклянная для титрования; фильтры бумажные; часовое стекло; термостат; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: свежие прессованные дрожжи; сахароза, 5 %-ный раствор; сульфат меди, 6 %-ный раствор; толуол; жидкость Фелинга; индикатор (желтая кровяная соль в ледяной уксусной кислоте, пропорция 1:1).

Получение ферментного препарата. Взвесить 5 г свежих прессованных дрожжей с записью до второго знака, поместить в фарфоровую ступку и растереть с кварцевым песком до однородной массы, затем добавить при перемешивании 15 мл воды и 0,5 мл толуола в качестве антисептика. Смесь поставить в термостат при 25-30 °С на 20 мин., периодически встряхивать. Затем смесь отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр. Прозрачный фильтрат содержит β-фруктофуранозидазу.

1) В одну коническую колбу на 200 мл внести 1 мл экстракта фермента (опыт), в другую – 1 мл этого же экстракта фермента, предварительно подвергнутого кипячению 2 мин. (контроль), в обе колбы прилить по 5 мл 5 %-ного раствора сахарозы и поставить для ферментативного гидролиза в термостат при 37 °С на 30 мин.

2) После термостатирования в обе колбы добавить по 4 мл 6 %-ного раствора сульфата меди для инактивации фермента, затем в каждую колбу прилить по 90 мл воды.

4) Для определения содержания редуцирующих сахаров в конические колбы на 200 мл (опыт и контроль) отмерить по 10 мл жидкости Фелинга, прилить по 40 мл воды, нагреть до кипения и оттитровать раствором сахара (из пипетки). Каждый раз после прибавления 1 мл сахара жидкость Фелинга нагревать вновь до кипения. Конец титрования определяется по исчезновению у жидкости Фелинга синей окраски и по реакции с индикатором. Для этого капли отстоявшегося исследуемого раствора на часовом стекле смешать с каплей индикатора. Если капля окрашивается в красно-бурый цвет, титрование следует продолжить.

5) Активность β-фруктофуранозидазы определить по разности содержания инвертного сахара в контрольной и опытной пробах.

Пример. Пусть на титрование жидкости Фелинга в контроле было израсходовано 5 мл раствора сахара, в опыте – 2 мл. Из этого следует, что 0,05 г инвертного сахара содержится в 5 и 2 мл соответственно контрольного и

опытного образцов. Содержание инвертного сахара в контрольном образце составит $(0,05 \cdot 100) : 5 = 1$ г, в опытном образце – $(0,05 \cdot 100) : 2 = 2,5$ г. Это означает, что под воздействием β -фруктофуранозидазы за 30 мин. образовалось 1,5 г инвертного сахара, за 1 ч – 3 г. Следовательно, амилолитическая активность ферментного препарата составляет 3 г/мл.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Какова стереоспецифичность исследуемого фермента?

В каких пищевых продуктах содержится исследуемый субстрат?

Лабораторная работа № 25.

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ В СОЕВЫХ БОБАХ

Цель: получение практических умений и навыков в изучении состава соевых бобов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В соевых бобах, а также в продуктах переработки сои содержится фермент уреазы, который принимает участие в гидролизе мочевины до аммиака и углекислого газа. В сырых соевых бобах активность уреазы составляет около 2 единиц. Довольно часто уреазу относят к вредным веществам. В действительности же она является белковым соединением, активность которого снижается по мере усиления режима термической обработки. При этом снижается и активность протеаз.

Сущность метода заключается в измерении рН фосфатного буферного раствора, который образуется в результате воздействия уреазы на содержащуюся в растворе мочевины.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: стаканы химические на 100 и на 150 мл; палочки стеклянные; колбы конические на 500 и 1000 мл; колбы мерные на 100, 500 и 1000 мл; цилиндр на 50 мл; лабораторная мельница; баня водяная для

поддержания температуры 30 ± 2 °С; электроплитка бытовая; термометр жидкостной (0-50 °С); сито с отверстиями на 0,25 мм; рН-метр; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: исследуемый продукт (бобы сои или продукты ее переработки); мочевины; известь натронная; фосфатный буфер с рН около 7; калий фосфорнокислый однозамещенный (или натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный); калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный (или натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный или натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный); вода дистиллированная без углекислого газа.

1. Подготовка дистиллированной воды. Дистиллированную воду прокипятить в течение 15 мин. для удаления углекислого газа и охладить в колбе, закрываемой пробкой, снабженной трубкой с натронной известью.

2. Приготовление буферных растворов. При отсутствии стандарт-титров буферный раствор готовят следующим образом.

Приготовление буферного раствора А. Взвесить (запись результата до третьего знака) две пробы однозамещенной и двузамещенной солей калия или натрия фосфорнокислого в количествах, соответствующих приведенным в таблице 8. Навески поместить в мерную колбу на 1000 мл и объем раствора довести подготовленной дистиллированной водой до метки. Полученный раствор А хранить в темном месте не более 1 мес.

Приготовление буферного раствора Б. Навеску мочевины из расчета 1,5 г мочевины на 50 мл раствора А поместить в мерную колбу на 500 или 1000 мл и объем раствора довести раствором А до метки. Раствор Б хранить в темном месте не более 10 дней.

Таблица 8 – Калий или натрий фосфорнокислый (однозамещенный и двузамещенный) для приготовления буферных растворов, г

Масса однозамещенной соли		Масса двузамещенной соли		
KH_2PO_4	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Na_2HPO_4 безводный	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3,4		3,5		
3,4			5,7	
3,4				8,95
	3,9	3,5		
	3,9		5,7	
	3,9			8,95

3. Подготовка образца. Из средней пробы методом диагонального деления отобрать пробу для анализа массой около 10 г.

Пробу измельчить для прохода не менее 60 % ее через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, просеянный материал вновь смешать с остатком на сите и использовать для взятия навески.

При маслянистости продукта более 2 % после измельчения его обезжирить.
Допускается использование содержимого патронов, оставшегося после определения масла в соевых продуктах.

1) Взвесить три пробы измельченного материала по 1 г с записью результата до второго знака и поместить в стеклянные стаканы на 100 и 150 мл.

2) В один стакан прилить 50 мл раствора А и поместить в водяную баню при $30 \pm 2^\circ\text{C}$ на 30 мин.

3) Во второй и третий стаканы с интервалом в 5 мин. прилить по 50 мл раствора Б и немедленно поставить в ту же водяную баню на 30 мин., при этом следует каждые 5 мин. перемешивать содержимое стаканов стеклянными палочками, закончить перемешивание за 5 мин. до конца нагревания.

4) После термостатирования надосадочную жидкость из каждого стакана декантировать в стаканчики прибора и определить рН каждого раствора в соответствии с инструкцией по эксплуатации рН-метра.

5) Активность уреазы в единицах рН вычислить по формуле:

$$A = pH_1 - pH_0 ,$$

где pH_1 – значение рН в основном измерении (с раствором Б); pH_0 – значение рН в основном измерении (с раствором А).

6) За окончательный результат измерения принять среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений, расхождения между которыми не должны превышать 30 % от среднего арифметического рН при доверительной вероятности 0,95. Все вычисления проводятся с записью результата до второго десятичного знака.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Содержат ли пищевые продукты из соевых бобов активные ферменты?

К какому классу ферментов относится уреазы?

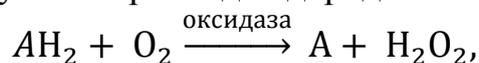
Лабораторная работа № 26.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ ПО МЕТОДУ А. Н. БАХА И С. Р. ЗУБКОВОЙ

Цель: получение практических умений и навыков в определении активности оксидоредуктаз.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В процессе окисления ряда веществ в растительных организмах под действием оксидаз образуется пероксид водорода:

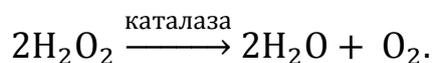


где AH_2 – субстрат; А – окисленный субстрат.

Пероксид водорода в повышенных концентрациях оказывает токсическое действие на цитоплазму клеток.

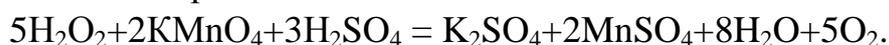
Каталаза – сложный белок, хромопротеид, простетическая группа которого представлена железопорфириновым кольцом.

Под действием фермента каталазы пероксид водорода разлагается на воду и кислород:



Активность каталазы может быть выражена количеством пероксида водорода, разложенного за 30 мин. при определенных условиях опыта.

Количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного пероксида водорода ферментом, определяют по разности между опытным и контрольным титрованием:



ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: конические колбы на 200 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 2 и 20 мл; фарфоровая ступка с пестиком; мерная колба на 100 мл; воронка стеклянная для фильтрования, весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: сырое растительное сырье (картофель, морковь); пероксид водорода, 1 %-ный раствор; перманганат калия, 0,1 н. раствор; серная кислота, 10 %-ный раствор; карбонат кальция.

1) Взвесить 1 г сырого растительного сырья с записью до второго знака, поместить в ступку и растереть с небольшим количеством битого стекла до однородной массы, постепенно добавляя 2-3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавить на кончике шпателя карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа.

2) Растертую массу количественно перенести в мерную колбу на 100 мл, объем жидкости довести дистиллированной водой до метки.

3) Экстракт фермента оставить на 30-60 мин., затем отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр.

4) В одну коническую колбу на 200 мл поместить 20 мл экстракта фермента (опыт), в другую – 20 мл прокипяченного экстракта фермента

(контроль), в обе колбы добавить по 2 мл 1 %-ного раствора пероксида водорода и оставить стоять на 30 мин при комнатной температуре.

5) После стояния в обе колбы для прекращения действия каталазы добавить по 3 мл 10 %-ной серной кислоты, содержимое колб перемешать и оттитровать 0,1 н. раствором перманганата калия до розового цвета.

б) Определить количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного пероксида водорода ферментом, по разности между опытным и контрольным титрованием.

Пример. Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 12,1 мл, опытной – 4,2 мл 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода каталазой составит $12,1 - 4,2 = 7,9$ мл, или $7,9 \cdot 1,7 = 13,43$ мг (1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия эквивалентен 1,7 мг пероксида водорода).

Следовательно, в 1 г сырого картофеля содержится такое количество каталазы, которое способно за 30 мин. разложить мг $\frac{(13,43 \cdot 100)}{20} = 67,1$ мг пероксида водорода.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Можно ли обнаружить исследуемый фермент в вареном картофеле?

Какая первая цифра стоит в коде фермента по международной классификации?

ГОРМОНЫ

Лабораторная работа № 27.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ

Цель: получение практических умений и навыков в обнаружении гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Гормоны – химические вещества, являющиеся стимуляторами, координаторами, регуляторами жизненных функций, выделяются эндокринными органами в кровь в следовых количествах. Концентрация гормонов в крови обычно ничтожна (около $1 \cdot 10^{-6}$ г на 100 мл крови). Гормоны весьма недолговечны (период полужизни молекул гормонов около одного часа), вырабатываются в одних клетках (эндокринная железа, эндокринная ткань), а действуют на другие (органы–мишени), не играют заметной пластической или энергетической роли. Согласно современным представлениям гормоны участвуют в нейрогуморальной регуляции жизненных

функций, влияя в первую очередь на ферменты или ферментные системы, а также на состояние биологических мембран.

Некоторые гормоны стимулируют одну функцию (гормоны–синергисты, например, адреналин и глюкагон, участвуют в углеводном обмене), другие – противоположно действующие гормоны (гормоны–антагонисты, например инсулин и глюкагон регулируют углеводный обмен). Обеспечивают единство процессов внутри организма и организма с внешней средой.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ИНСУЛИН

Качественные реакции на инсулин основаны на открытии его белковой природы: биуретовая реакция и реакция Милона.

Оборудование: штатив с микропробирками, водяная баня.

Материалы и 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).

Опыт 1.1. Проба на инсулин с биуретовым реактивом

Проба основана на том, что пептидные группы белков и полипептидов в щелочной среде образуют с медью комплексные соединения красно-фиолетового цвета.

В пробирку поместить 5 капель инсулина, прибавить двойной объем 30 %-ного раствора гидроксида натрия, хорошо перемешать. Затем добавить 2-3 капли 1 %-ного раствора сульфата меди и снова тщательно перемешать. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

При малом содержании инсулина чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор инсулина в щелочи 1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

Написать уравнение реакции, наблюдения выводы.

Опыт 1.2. Проба на инсулин с реактивом Милона

Проба основана на том, что свободные фенольные гидроксилы молекул тирозина, входящих в состав белков, при взаимодействии с солями ртути, образуют ртутное соединение цитрозотирина, которое окрашено в красно-коричневые цвета.

В пробирку поместить 5 капель инсулина, прибавить такой же объем азотно-ртутного реактива Милона. Инсулин коагулирует под воздействием солей ртути и азотной кислоты, входящих в реактив, образуя сгусток белого цвета. При нагревании пробирки сгусток окрашивается в кирпично-красный цвет.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы.

2. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФОЛЛИКУЛИН

Оборудование: штатив с микропробирками, мерные колбы на 100 и 500 мл; пипетка калиброванная на 1, 2 и 10 мл или цилиндр мерный на 10 мл; баня водяная, весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: спиртовой раствор фолликулина; серная кислота концентрированная; карбонат натрия, 10 %-ный раствор; диазореактив.

Приготовление диазореактива: раствор I (0,9 г сульфаниловой кислоты поместить в мерную колбу на 100 мл, добавить 9 мл концентрированной соляной кислоты, и содержимое колбы довести дистиллированной водой до метки); раствор II (5 %-ный раствор нитрата натрия).

Непосредственно перед работой смешать предварительно охлажденные на льду 1,5 мл раствора I и 1,5 мл раствора II в мерной колбе на 500 мл. Через 5 мин. в колбу при взбалтывании добавить ещё 6 мл раствора II и спустя 1 мин. содержимое колбы довести дистиллированной водой до метки. При хранении во льду раствор пригоден в течение суток.

Опыт 2.1. Проба на фолликулин с диазореактивом

В пробирку поместить 5 капель спиртового раствора фолликулина, добавить 3 капли раствора карбоната натрия и 5-10 капель диазореактива. Постепенно возникает бледно-желтое окрашивание.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы

Опыт 2.2. Проба на фолликулин с концентрированной серной кислотой

В пробирку налить 5 капель спиртового раствора фолликулина и поместить ее в водяную баню на 5-10 мин. для испарения спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавить 5 капель концентрированной

серной кислоты, и пробирку вновь поместить в кипящую водяную баню на 5-10 мин.

Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый и имеющий зеленую флюоресценцию.

Написать уравнение реакции, наблюдения выводы.

3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТИРОКСИН

Опыт 3.1. Проба на тироксин с йодатом калия

Проба на тироксин основана на переводе йодатом калия йодоводородной кислоты, отщепленной от тироксина с помощью кислотного гидролиза, в свободный йод, который, будучи извлечен хлороформом, придает последнему фиолетовую окраску.

Оборудование: штатив с микропробирками,

Материалы и реактивы: препарат тиреоидина (получают из обезжиренной и высушенной железы крупного рогатого скота); азотная кислота концентрированная, калий йодат, 1 %-ный раствор; хлороформ.

В пробирку вносят 1-2 микрошпателя препарата тиреоидина и 5 капель концентрированной азотной кислоты. Гидролиз осуществляют при осторожном (во избежании вспенивания) нагревании в течение 1-2 мин. Окончив гидролиз, в пробирку добавляют 10 капель 1 %-ного раствора йодата калия, перемешивают и охлаждают. Затем в пробирку добавить 1-2 мл хлороформа и хорошо встряхнуть.

После отстаивания слой хлороформа (нижний) окрашивается йодом в фиолетовый цвет.

Написать уравнение реакции, наблюдения и выводы

4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АДРЕНАЛИН

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня.

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

Опыт 4.1. Проба на адреналин с йодатом калия

Проба основана на наличии в молекуле адреналина пирокатехина, который окисляется йодатом калия в кислой среде в о-бензохинон – соединение красно-фиолетового цвета.

В пробирку поместить 3 капли раствора адреналина, прибавить 2-5 капель 1 %-ного раствора йодата калия и 2 капли 10 %-ного раствора

уксусной кислоты, затем смесь подогреть до температуры 60-65 °С. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

Опыт 4.2. Проба на адреналин с хлорным железом

Проба основана на наличии в молекуле адреналина ядра пирокатехина, продукт реакции которого с хлорным железом дает изумрудно-зеленое окрашивание.

В одну пробирку поместить 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.

Написать уравнения реакций, наблюдения выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Могут ли гормоны присутствовать в пищевых продуктах?

Может ли пищевой продукт являться «анаболиком»?

УГЛЕВОДЫ

Лабораторная работа № 28.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

Цель: получение практических умений и навыков в обнаружении углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводы – самые распространенные в природе соединения. К ним относятся моносахариды и их производные (фосфорные эфиры, аминсахара и др.), дисахариды и полисахариды. Углеводы – основная масса растений (около 75-85 % на сухое вещество) и главный источник энергии пищевого рациона человека, из 12300–14350 кДж, необходимых человеку в сутки, около 2/3 энергии обеспечивается углеводами.

В сухом веществе органов и тканей животных и человека содержится около 2 % углеводов, однако, несмотря на это, значение их как пластических и биологически активных веществ весьма велико. Так, пентозы (рибоза и дезоксирибоза) входят в состав нуклеиновых кислот (РНК и ДНК), в составе АТФ и ГТФ аккумулируется энергия обмена веществ и используется в организме для обеспечения разнообразных функций.

Многие белки плазмы крови, соединительной ткани, мышц, разных слизей, слюны, желудочного сока, суставов, межклеточных жидкостей

представляют собой комплекс с углеводами и их производными, т. е. являются гликопротеидами. Гликопротеидами являются и антитела, играющие важную роль в защите организма от инфекционных заболеваний (иммунитет), и ряд гормонов (например, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны гипофиза), токсинов и других биологически активных веществ.

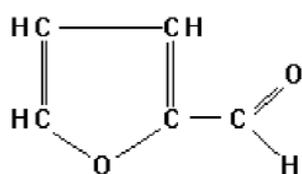
Углеводы дают ряд цветных реакций, с помощью которых осуществляют качественные и количественные определения сахаров в продуктах растительного и животного происхождения.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

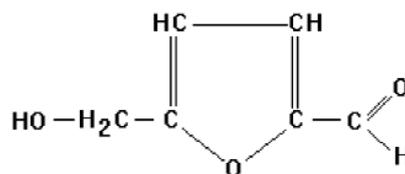
Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых, соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Опыт 1. Реакция Подобедова–Молиша с α -нафтолом

Реакция Подобедова–Молиша с α -нафтолом является общей для углеводов, ее используют для открытия моносахаридов (пентоз и гексоз) и дисахаридов в сырье и продуктах питания. Сущность реакции состоит в том, что при нагревании с концентрированной серной кислотой происходит отщепление воды, при этом из пентоз образуется фурфурол, из гексоз – 5-оксиметилфурфурол:



фурфурол



5 -оксиметилфурфурол

При взаимодействии фурфурола и 5-оксиметилфурфуrolа с α -нафтолом образуется соединение фиолетового цвета.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетка с одной меткой для прямого слива на 2 мл.

Материалы и реактивы: глюкоза, 1 %-ный раствор; сахароза, 1 %-ный раствор; α -нафтол, 0,2 %-ный раствор; серная кислота концентрированная.

В две пробирки налить по 10 капель раствора глюкозы и сахарозы. В обе пробирки добавить по 3-4 капли α -нафтола и осторожно по стенкам прилить по

1-2 мл концентрированной серной кислоты, не смешивая ее с водным слоем. На границе двух слоев появляется кольцо красно-фиолетового цвета.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Реакция с β -нафтолом

Сущность реакции состоит в том, что при нагревании под действием концентрированной серной кислоты происходит отщепление воды, из пентоз при этом образуется фурфурол, а из гексоз – 5-оксиметилфурфуrol.

При взаимодействии фурфурола с β -нафтолом возникает характерное темно-синее окрашивание, а 5-оксиметилфурфуrolа – желто-зеленое или коричневое.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: пентоза (арабиноза или ксилоза), 1 %-ный раствор; глюкоза, 1 %-ный раствор; фруктоза или сахароза, 1 %-ный раствор; β -нафтол, 0,3 %-ный раствор в концентрированной серной кислоте.

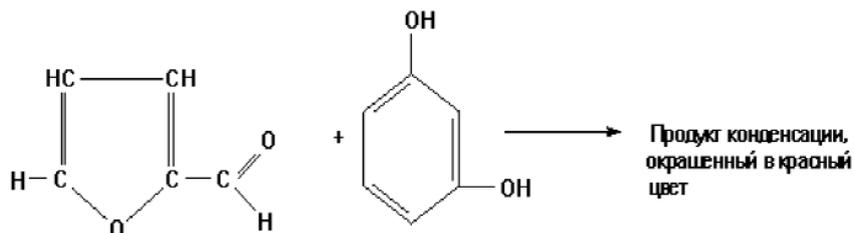
В три пробирки налить по 20 капель раствора β -нафтола в серной кислоте и прилить осторожно по стенке пробирки так, чтобы слои не смешивались, по 10 капель в одну раствора пентозы, в другую – глюкозы и в третью – фруктозы.

На границе растворов в пробирке с пентозой появляется кольцо темно-синего цвета, с гексозой – желто-зеленое или коричневое.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 3. Реакция на фруктозу

Реакцию Селиванова применяют для обнаружения фруктозы и других кетоз. Сущность реакции состоит в том, что при нагревании с соляной кислотой происходит отщепление воды от фруктозы и образуется оксиметилфурфуrol, который с резорцином дает соединение красного цвета.



Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: фруктоза, 1 %-ный раствор; реактив Селиванова (0,05 г резорцина растворить в 100 мл 20 %-ного раствора соляной кислоты).

В пробирку налить 1-2 мл реактива Селиванова, добавить 2-3 капли раствора фруктозы и поместить в кипящую водяную баню на 2 мин. до окрашивания раствора в красный цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 4. Реакция на сахарозу

Сущность реакции состоит в том, что сахароза с сульфатом кобальта в щелочной среде дает комплекс, окрашенный в фиолетовый цвет.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: сахароза, 1 %-ный раствор; сульфат кобальта, 10 %-ный раствор.

В пробирку налить 10 капель 1 %-ного раствора сахарозы, прилить несколько капель раствора сульфата кобальта, добавить избыток раствора гидроксида натрия (1мл), жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 5. Реакция на лактозу

Лактоза (подобно мальтозе и глюкозе) в щелочной среде восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I).

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки; водяная баня.

Материалы и реактивы: лактоза, 1 %-ный раствор; жидкость Фелинга.

В пробирку налить 10 капель раствора лактозы, прилить равный объем жидкости Фелинга, поставить в кипящую водяную баню до выпадения осадка.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 6. Реакция на крахмал и гликоген

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: крахмал, 1 %-ный раствор; гликоген. 1%-ный раствор; раствор Люголя.

В пробирку налить 10 капель 1 %-ного раствора крахмала, в другую – 10 капель 1%-ного раствора гликогена. В обе пробирки добавить по 1-2 капле раствора Люголя и перемешать.

Жидкость в первой пробирке окрасится в синий цвет, во второй – в красно-бурый.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Какие особенности химического строения позволяют обнаружить углеводы?

Какие классы углеводов обнаруживаются в пищевых продуктах?

Лабораторная работа № 29.
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Цель: получение практических умений и навыков в определении количества углеводов.

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ПО МЕТОДУ НЕЛЬСОНА

Метод основан на способности глюкозы восстанавливать медь $Cu^{2+} \xrightarrow{+e} Cu^+$ в медноартроновом реактиве. При добавлении арсеномолибдатного реактива происходит восстановление арсеномолибдата аммония и образуется молибденовая синь: $MoO_3 \cdot 7Mo_2O_5 \cdot xH_2O$ или $Mo_3O_8 \cdot xH_2O$.

Количество молибденовой сини определяется колориметрически.

Приборы: 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.

Материалы и реактивы: арсеномолибдатный реактив; медноартроновый реактив.

1. Приготовление медноартронового реактива. Реактив I: 25 г безводного углекислого натрия, 25 г сегнетовой соли, 20 г двууглекислого натрия и 200 г безводного сернистокислого натрия поместить в мерную колбу на 1000 мл, прилить 800 мл дистиллированной воды, тщательно перемешать до растворения всех солей и довести объем раствора дистиллированной водой до метки (выпавший при низкой температуре осадок можно отфильтровать). Реактив II: сульфат меди ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$), 15 %-ный раствор, подкисленный 1-2 каплями концентрированной серной кислоты на 100 мл раствора.

В день определения реактивы I и II смешать в пропорции 25:1.

2. Приготовление арсеномолибдатного реактива. Раствор I: 25 г молибдата аммония ($(NH_4)_2MoO_4$) поместить в колбу на 1000 мл, прилить 450 мл дистиллированной воды и осторожно по стенке – 21 мл концентрированной серной кислоты. Раствор II: 3 г арсената натрия ($Na_2HAsO_4 \cdot 7 H_2O$) или 4 г ($Na_3AsO_4 \cdot 12H_2O$) поместить в колбу на 100 мл,

прилить 25 мл дистиллированной воды. Каждый раствор тщательно перемешать и слить вместе. Затем колбу поместить в водяную баню при 55 °С на 25 мин., периодически перемешивая содержимое. Хранить в темной посуде.

1) В одну пробирку или мерную колбу на 25 мл внести 1 мл раствора глюкозы (опыт), в другую – 1 мл дистиллированной воды (контроль), в обе колбы добавить по 1 мл меднотартронового реактива, перемешать, затем колбы поместить в кипящую водяную баню на 20 мин., часто взбалтывать.

2) После нагревания колбы охлаждать 10 мин., прибавить по 1 мл арсеномолибдатного реактива и взбалтывать 15-20 мин., затем объем смеси в колбах довести дистиллированной водой до метки (опыт).

3) Оптическую плотность исследуемого раствора измерить напротив контрольного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 500-520 нм.

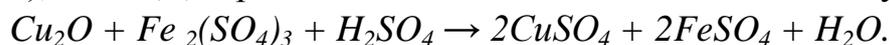
4) Количество глюкозы определить по стандартной кривой.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ ПО БЕРТРАНУ

Метод основан на способности сахаров восстанавливать гидроксиды меди (II) в виде фелинговой жидкости до закисей меди (I):



Образовавшаяся закись меди (I) окисляется соединениями трехвалентного железа (применяют сульфат железа (III) или железоаммиачные квасцы), меди (II), при этом железо восстанавливается до двухвалентного:



В данной реакции валентность железа и меди изменяется на единицу, следовательно, граммэквивалент меди соответствует ее атомному весу, а отсюда 1 л децинормального раствора соответствует 6,36 г меди, а 1 мл – 6,36 мг меди.

Количество восстановленного железа определяется посредством титрования марганцовокислым калием:



По количеству затраченного при титровании перманганата можно вычислить количество восстановленной меди, однако по этим данным нельзя путем вычисления найти количество сахара, потому что при реакции с жидкостью Фелинга получают различные продукты окисления сахара. Для определения содержания различных сахаров по количеству восстановленной меди составлены специальные таблицы на основании экспериментальных данных.

Оборудование: конические колбы на 150–200 мл; промывалки; пипетки с одной меткой для прямого слива на 20 мл; цилиндры мерные на 20 мл;

стеклянные палочки с мягкими наконечниками; стеклянные воронки для фильтрования; бумажные фильтры ("синяя лента").

Материалы и реактивы: растворы Фелинга № I и 2; сульфат железа (раствор в серной кислоте); перманганат калия, 0,1 н. раствор; универсальная индикаторная бумага.

1) В коническую колбу на 150-200 мл отмерить пипеткой 20 мл исследуемого раствора, прилить по 20 мл двух растворов Фелинга, тщательно перемешать.

2) Колбу поставить на асбестовую сетку, быстро нагреть до кипения и кипятить на слабом огне ровно 3 мин. Моментом начала кипения считать появление первых пузырьков.

3) Колбу снять с асбестовой сетки, дать осесть закиси меди, и отстоявшуюся надосадочную жидкость отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр, стараясь переносить жидкость на фильтр по палочке без осадка. Переход части осадка на фильтр не ведет к ошибкам. Жидкость должна иметь чисто синюю окраску.

4) Оставшийся в колбе осадок закиси меди промыть горячей дистиллированной водой из промывалки, для этого в колбу по стенкам, стараясь смыть с них осадок, налить столько горячей воды, чтобы она могла поместиться в стеклянной воронке. Дать осесть закиси меди, и отстоявшуюся надосадочную жидкость отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный фильтр, стараясь не переносить на фильтр осадка. Промывание осадка горячей водой повторить до исчезновения щелочной реакции в промывной воде по универсальной индикаторной бумаге (промывать в воронке, перемешивая воду стеклянной палочкой, затем ею прикоснуться к индикаторной бумаге для определения pH среды).

5) В колбу осторожно по стенкам, растворяя приставшие к ней частицы закиси меди, прилить 10 мл раствора сульфата железа (или железоаммиачных квасцов) и растворить в нем осадок закиси меди.

6) Вылить раствор из колбы в стеклянную воронку на фильтр, дать раствориться осадку, осторожно «растирая» его на фильтре стеклянной палочкой.

7) После растворения осадка (закиси меди) фильтр и колбу промыть несколько раз холодной дистиллированной водой, наливая ее в колбу, затем сливая на фильтр. Промывание продолжать до исчезновения в промывной воде кислой реакции по индикаторной бумажке.

8) Окончив промывание, вынуть воронку для фильтрования, а жидкость в колбе оттитровать раствором 0,1 н. перманганата калия.

Концом титрования считать появление розовой окраски, не исчезающей 1-2 мин.

Таблица 9 – Определение глюкозы по Бертрану, мг

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
10	20,4	33	64,4	56	105,8	79	144,5
11	22,4	34	65,5	57	107,6	80	146,1
12	24,3	35	68,3	58	109,3	81	147,7
13	26,3	36	70,1	59	111,1	82	149,3
14	28,3	37	72,0	60	112,8	83	150,9
15	30,2	38	73,8	61	114,5	84	152,5
16	32,2	39	75,7	62	116,1	85	154,0
17	34,2	40	77,5	63	117,9	86	155,6
18	36,2	41	79,3	64	119,6	87	157,2
19	38,1	42	81,1	65	121,3	88	158,8
20	40,1	43	82,9	66	123,0	89	160,4
21	42,0	44	84,7	67	124,7	90	162,0
22	43,9	45	86,4	68	126,4	91	163,6
23	45,8	46	88,2	69	128,1	92	165,2
24	47,7	47	90,0	70	128,8	93	166,7
25	49,6	48	91,8	71	131,4	94	168,3
26	51,5	49	93,6	72	133,1	95	169,9
27	53,4	50	95,4	73	134,7	96	171,5
28	55,3	51	97,1	74	136,3	97	173,1
29	57,2	52	98,9	75	137,9	98	174,6
30	60,1	53	100,8	76	139,6	99	176,2
31	60,9	54	102,3	77	141,2	10	177,8
32	62,8	55	104,1	78	142,8	-??	

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Чем углеводы отличаются от углеводов?

Зачем определяют количество углеводов?

Лабораторная работа № 30.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Цель: получение практических умений и навыков выделения и идентификации полисахаридов.

Пектиновые вещества – высокомолекулярные соединения, широко распространенные в растениях. Главная составная часть пектиновых веществ – полигалактуроновая, или пектовая, кислота (метилованная по карбоксильной группе). Относительная молекулярная масса пектиновых веществ колеблется от 50000 до 300000. Они являются цементирующими соединениями, своего рода клеем, скрепляющим растительные клетки; благодаря своим гидрофильным свойствам, предохраняют растения от высыхания, обеспечивают тургор, положительно влияют на засухоустойчивость.

В разных видах сырья и готовой продукции количество остатков галактуроновой кислоты в полимерной цепи пектина и число метилированных

карбоксильных групп – основных факторов желеобразующих свойств пектина – отличается. У яблок, например, содержание протопектина в среднем около 40 % общего его количества, у айвы несколько больше.

Значительное содержание (% сухой массы) пектина у айвы (5,3-9,6) и довольно высокое у яблок (4,4-7,5), персиков (5,0-8,9), смородины черной (5,9–9,6), смородины красной (5,5-19,6), моркови (6,0-8,0), тыквы (2,6–9,3), более низкое в сливах и грушах (3,5-5,6) и томатах (2,0–4,1). Пектин груш и винограда желирующими свойствами не обладает.

Характерным свойством пектина является его способность давать студни в присутствии кислоты и сахара. Это свойство широко используется в кондитерской промышленности. Нерастворимый протопектин при нагревании в кислой среде превращается в растворимый пектин. Однако чрезмерный нагрев приводит к дальнейшему гидролизу, укорочению цепи полигалактуроновой кислоты и отщеплению метилового спирта. При этом образуется нежелирующая пектиновая кислота. Такой процесс имеет место, например, в производстве различных видов варенья.

В производстве безалкогольных фруктовых напитков, натуральных осветленных соков (например, виноградного из ягод) наличие пектина, образующего стойкое помутнение, нежелательно.

1. ВЕСОВОЙ КАЛЬЦИЕВО-ПЕКТАТНЫЙ МЕТОД

Метод основан на гидролизе пектиновых веществ до полигалактуроновой (пектиновой) кислоты, ее осаждении в форме кальциевой соли, высушивании и взвешивании. Протопектин гидролизуют разбавленными кислотами, чаще соляной. Нерастворимые кальциевые и магниевые соли переводят в раствор цитратом аммония или натрия.

Весовой кальциево-пектатный метод чаще всего используется для определения пектина в сырье и консервированных продуктах.

Оборудование: коническая колба на 500 мл; колбы мерные на 250 и 500 мл; колба коническая на 500 мл с обратным холодильником; стакан для взвешивания (бюкс); пипетка с одной меткой для прямого слива на 25 мл; цилиндр мерный на 100 мл; ступка фарфоровая с пестиком; шкаф сушильный; центрифуга; баня водяная; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: свежие яблоки; сахарная свекла; уксусная кислота, 1 н. раствор; гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; хлорид кальция, 2 н. раствор; нитрат серебра, 1 %-ный раствор; песок кварцевый или стекло битое.

1) Взвесить 25 г свежего материала с записью до второго знака, навеску поместить в ступку и тщательно растереть с битым стеклом до однородной массы.

2) Содержимое ступки количественно перенести в коническую колбу на 500 мл, снабженную обратным холодильником, прилить 100 мл дистиллированной воды, нагретой до 450 °С (не выше); колбу соединить с холодильником и поставить в водяную баню при 450 °С (не более) на 30 мин. (периодически взбалтывать).

3) Колбу отсоединить от холодильника, плотно закрыть каучуковой пробкой и энергично взбалтывать 15-20 мин.

4) Содержимое колбы перелить в центрифужные пробирки и центрифугировать 10-15 мин. при 3000 об./мин.

5) После центрифугирования из всех пробирок надосадочную жидкость (прозрачный раствор пектина) перелить в мерную колбу на 250 мл. Для обеспечения полноты извлечения растворимого пектина в пробирки к осадку прилить 75 мл дистиллированной воды (не выше 450 °С) и повторно центрифугировать (получить второй экстракт); в третий раз к осадку в пробирках прилить 50-60 мл воды, затем центрифугировать (получить третий экстракт); каждый раз сливать надосадочный экстракт в одну и ту же мерную колбу на 250 мл. Общий объем объединенного экстракта пектина довести дистиллированной водой до метки (V).

6) В коническую колбу на 500 мл отмерить пипеткой 25 мл объединенного экстракта пектина, прилить 100 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия и оставить на 30 мин. для омыления растворимого пектина, который переходит в натриевую соль пектиновой кислоты.

7) После стояния в колбу добавить 50 мл 1 н. раствора уксусной кислоты и оставить на 5 мин., образуется свободная пектиновая (полигалактуроновая) кислота.

8) В колбу к пектиновой кислоте прибавить 50 мл 2 н. раствора хлорида кальция и оставить стоять на 1 ч. За это время выпадает осадок пектата кальция.

9) Осадок пектата кальция отфильтровать на стеклянной воронке через взвешенный бумажный фильтр (фильтр предварительно многократно промыть дистиллированной водой и высушить до постоянной массы (m_1) в сушильном шкафу при 100 °С), затем осадок на фильтре промыть несколько раз горячей водой до отрицательной реакции промывной воды на хлорид-ион с 1 %-ным раствором нитрата серебра.

10) Осадок вместе с фильтром поместить в бюкс (предварительно доведенный до постоянной массы) и довести до постоянной массы в сушильном шкафу при 100 °С. Определить массу фильтра с пектатом кальция (m_2).

11) Рассчитать содержание пектата кальция в 25 мл экстракта пектата по разнице между массой фильтра с пектатом кальция (m_2) и первоначальной массой фильтра (m_1).

12) Содержание пектиновой кислоты вычислить по формуле:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot 92}{a \cdot V_1},$$

где X – содержание пектиновой кислоты в %; m – количество ($m_2 - m_1 = m$) пектата кальция в 25 мл раствора пектина в г; V_1 – объем фильтрата (25 мл), взятого для омыления и осаждения в нем пектата кальция, в мл; V – общий объем объединенного раствора экстракта пектина в мл; 92 – коэффициент пересчета в %, вычисленный исходя из того, что пектат кальция содержит 8 % кальция.

2. ОБЪЕМНЫЙ МЕДЬ-ПЕКТАТНЫЙ МЕТОД (МЕТОД РАЙК)

Метод основан на осаждении пектиновой кислоты сульфатом меди и последующим объемным йодометрическим определением связанной меди.

Оборудование: конические колбы на 150-200 мл; колба на 100-150 мл с обратным холодильником; мерная колба на 250 мл; цилиндр градуированный на 50 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 50 мл или мерные цилиндры на 50 мл (5 шт.); микробюретка; воронка стеклянная для фильтрования; бумажные беззольные фильтры с белой или красной лентой; ступка с пестиком; баня водяная, весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: исследуемый продукт (яблоки, персики, черная или красная смородина и др.); соляная кислота, 0,3 М раствор; гидроксид натрия, 0,4 и 10 %-ный растворы; цитрат аммония, 1 %-ный раствор; уксусная кислота 1 м раствор; хлорид кальция 2 М раствор; сульфат меди, 5 %-ный раствор; аммиак, концентрированный раствор; серная кислота, 1 м раствор; йодид калия (KI), кристаллический; тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,01 М раствор; крахмал, 1 %-ный раствор свежеприготовленный; битое стекло.

1) Взвесить навеску исследуемого вещества, масса которой зависит от предполагаемого количества пектина. Хорошую степень точности можно ожидать, когда масса полученного осадка пектата кальция находится в пределах 0,01-0,02 г.

2) Навеску поместить в ступку и растереть с небольшим количеством битого стекла до однородной смеси.

3) Содержимое ступки количественно перенести в колбу на 100-150 мл, снабженную обратным холодильником, прилить 50 мл 0,3 М соляной кислоты, подсоединить к холодильнику, поместить в кипящую водяную баню на 30 мин.

4) После нагревания холодильник отсоединить, содержимое колбы отфильтровать на стеклянной воронке через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу на 250 мл.

5) Осадок с фильтром вернуть в колбу, снабженную обратным холодильником, прилить 50 мл 1 %-ного раствора цитрата аммония, подсоединить холодильник и вновь поместить на кипящую водяную баню на 30 мин.

6) После нагревания холодильник отсоединить, содержимое колбы отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр в ту же мерную колбу на 250 мл.

7) После охлаждения содержимое колбы нейтрализовать 10 %-ным раствором гидроксида натрия (по универсальной индикаторной бумажке), объем раствора довести дистиллированной водой до метки (V_1).

Пектиновые вещества, включая протопектин, находятся в форме пектиновой кислоты.

8) Отобрать пипеткой из мерной колбы 50 мл фильтрата (V_2), поместить в коническую колбу на 250 мл, добавить такой же объем 0,4 %-ного раствора гидроксида натрия и оставить при комнатной температуре на ночь для омыления метоксильных групп.

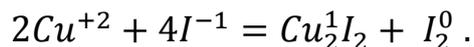
9). На следующий день в колбу добавить 50 мл 1 М раствора уксусной кислоты, через несколько минут прилить 50 мл 5 %-ного раствора сульфата меди и оставить на 30-40 мин.

10) После стояния содержимое колбы отфильтровать на стеклянной воронке через беззольный фильтр с белой или красной лентой.

11) Осадок на фильтре (медная соль полигалактуроновой кислоты) многократно промыть дистиллированной водой, так как избыток ионов меди приводит к искажению результатов анализа.

12) Осадок вместе с фильтром перенести в коническую колбу, прилить 30-40 мл горячей воды и для растворения осадка внести несколько капель аммиака. В колбе образуется комплексное ($\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$) соединение меди (II) синего цвета.

13) В колбу к осадку добавить 8-10 мл 1 М раствора серной кислоты и 5 г йодида калия. Проходит окислительно-восстановительная реакция:



14) В колбу добавить 0,5 мл раствора крахмала и выделившийся йод оттитровать из микробюретки 0,01 М раствором тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

15) Содержание меди вычислить по формуле:

$$X_{\text{Cu}} = \frac{100\text{VCMV}_1}{100\text{mV}_2} ,$$

где X_{Cu} – содержание меди в исследуемом веществе в %; V – объем пошедшего на титрование тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3$), в мл; C – молярная концентрация в моль/л; M – молекулярная эквивалентная масса меди в г/моль; V_1 – общий объем фильтрата в мл; m – масса навески в г; V_2 – объем фильтрата, взятый для анализа, в мл.

16) Содержание пектина в исследуемом веществе вычислить по формуле:

$$X_{\text{пект}} = X_{Cu} \cdot 6,5 \cdot 6,5 \cdot 0,9235,$$

где $X_{\text{пект}}$ – содержание пектина в исследуемом веществе в %; X_{Cu} – содержание меди в исследуемом веществе в %; $6,5 \cdot 0,9235$ – средний коэффициент перевода меди на пектин.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Назовите источники неусвояемых углеводов.

Неусвояемые углеводы – это хорошо или плохо для организма человека?

Лабораторная работа № 31.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ДРОЖЖАХ

Цель: получение практических умений и навыков выделения и идентификации полисахаридов.

Гликоген служит резервным углеводом не только животных, но и многих других организмов, в частности дрожжей, где он накапливается до 30 % в сухом веществе, если дрожжи растут на крепком растворе сахара.

Полагают, что в организме гликоген существует в двух формах: 1) прочно связанной с белками и трудноизвлекаемой из ткани, 2) менее прочно связанной с белками и легкоэкстрагируемой горячей водой и разбавленными растворами трихлоруксусной кислоты.

Существуют два метода выделения гликогена. Один из них заключается в том, что исследуемую ткань обрабатывают 30 %-ным раствором гидроксида калия на кипящей водяной бане. При такой жесткой обработке ткани распадаются, большинство веществ гидролизуются, но гликоген не изменяется и при добавлении спирта выпадает в осадок, однако относительная молекулярная масса гликогена при такой обработке значительно уменьшается.

Другой метод сводится к извлечению гликогена 5 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Такая обработка меньше отражается на его относительной молекулярной массе, но в этом случае трудно извлечь полностью гликоген, связанный с белком.

Для получения нативного гликогена предпочтительнее второй метод.

Оборудование: колбы конические на 100, 250 и 300 мл; центрифужные пробирки; цилиндр градуированный с носиком на 50 мл; бюксы для взвешивания; воронка Бюхнера; воронка стеклянная для фильтрования; бумажные фильтры; ступка фарфоровая с пестиком; палочка стеклянная; термостат; центрифуга; шкаф сушильный; холодильник; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: дрожжи пивные; сахароза, 20 %-ный раствор; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 5- и 10 %-ные растворы; этиловый спирт, 96- и 65 %-ные растворы; диэтиловый эфир; песок кварцевый.

1) 10 г пивных дрожжей (m) взвесить с записью до второго знака, поместить в коническую колбу на 100 мл, добавить 50 мл дистиллированной воды, перемешать и отфильтровать на воронке Бюхнера через бумажный фильтр, затем два раза промыть (отмыть от сусла) на бумажном фильтре 20-40 мл дистиллированной воды и отфильтровать до плотного состояния.

2) Плотный осадок перенести в колбу на 300 мл, добавить 200 мл 20 %-ного раствора сахарозы, размешать и поставить в термостат при 25 °С на 3 ч. Начинается интенсивное брожение, в процессе которого в дрожжевых клетках накапливается гликоген.

3) Колбу достать из термостата и процесс брожения прервать.

4) Содержимое колбы быстро перелить в центрифужные пробирки и центрифугировать 5-10 мин. при 3000 об./мин.

5) Надосадочную жидкость из пробирок слить, а осадок дрожжей перенести в предварительно охлажденную ступку, добавить 15 мл 10 %-ной ТХУ, охлажденной до 0 °С, и осадок растереть 10 мин. с добавлением небольшого количества кварцевого песка.

6) В центрифужные пробирки быстро перенести содержимое ступки и центрифугировать 5 мин. при 3000 об./мин.

7) Надосадочную жидкость (кислый экстракт) из центрифужных пробирок слить в коническую колбу на 200 мл и хранить в холодильнике при 0-4 °С.

8) Осадок из пробирок перенести в ступку и снова повторить экстрагирование 10 мл охлажденной 5 %-ной ТХУ, затем – повторить трижды экстрагирование и центрифугирование. Все экстракты собрать в одну и ту же коническую колбу на 200 мл.

Вместо центрифугирования остаток дрожжей можно отделить на воронке Бюхнера.

9) Если объединенный экстракт содержит твердые частицы, отфильтровать его на стеклянной воронке через складчатый бумажный фильтр, фильтр промыть двумя порциями по 3 мл 5 %-ной ТХУ. При высоком содержании гликогена экстракт опалесцирует.

10) В колбу к экстракту прибавить двойной объем этилового спирта, перемешать и оставить при 0 °С на 30 мин.

11) После отстаивания осадок (гликоген) отделить центрифугированием при 3000 об./мин. (5-10 мин.), надосадочную жидкость слить.

12) Для очистки осадка (гликогена) в центрифужные пробирки прилить 3 объема подогретой дистиллированной воды, размешивая его стеклянной палочкой, растворить.

13) В пробирки прилить двойной объем (по отношению к взятой воде) этилового спирта, поставить на 30 мин. в холодильник.

14) Пробирки достать из холодильника, осадок отделить центрифугированием при 3000 об./мин. (5-10 мин.), надосадочную жидкость слить.

15) Осадок гликогена в пробирках дважды промыть 5 мл 65 %-ного раствора спирта, хорошо перемешивая, осадок отделить центрифугированием, надосадочную жидкость слить.

16) Осадок гликогена в пробирках промыть 5 мл 96 %-ного спирта, затем – 10 мл эфира.

17) Гликоген количественно перенести в предварительно взвешенный бюкс, высушить в сушильном шкафу при 80 °С до постоянного веса и взвесить.

18) Содержание гликогена в дрожжах рассчитать по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 100}{m_1},$$

где X – содержание гликогена в %; m – навеска исследуемого вещества в г; m₁ – навеска гликогена в г.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Сколько углеводов должно содержаться в пищевых продуктах, съедаемых человеком в день?

В чем разница усвояемых и неусвояемых углеводов?

ЛИПИДЫ

Лабораторная работа № 32.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА ЛЕЦИТИНА КУРИНОГО ЖЕЛТКА

Цель: получение практических умений и навыков выделения и идентификации липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

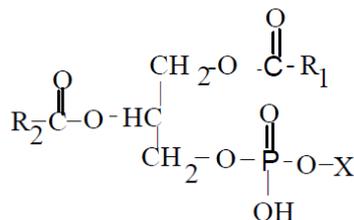
Липиды (греческое *lipos* – жир) – это обширная группа соединений (триацилглицерины, фосфолипиды, гликолипиды, стероиды, воски), существенно различающихся по своей химической структуре и выполняемым функциям, но обладающих некоторыми общими свойствами (нерастворимостью в воде; способностью растворяться в неполярных растворителях, таких как эфир, хлороформ или бензол, и т. д.). В животных организмах липиды представляют собой структурные компоненты протоплазмы клеток или откладываются в жировой ткани (депо) – запасные липиды.

Биологическая роль липидов очень многообразна. Триацилглицерины – основной энергетический материал организма. Фосфолипиды являются важнейшими структурно-функциональными соединениями, так как их молекулы обладают своеобразными физико-химическими свойствами, которые делают их универсальным материалом для образования различных клеточных и субклеточных мембран. От структуры и ориентации липидных молекул в мембранах во многом зависят свойства и функции последних. Поскольку все клеточные процессы протекают с участием мембран, то и функции липидов, как мембранных компонентов, значительны в метаболизме.

ФОСФОЛИПИДЫ

По химической структуре фосфолипиды – это сложные эфиры многоатомных спиртов глицерина (фосфотидилглицерины) или сфингозина (сфинго-миелины), или инозита (фосфотидилинозиты) с высшими жирными кислотами и фосфорной кислотой. В их состав также входят азотсодержащие соединения: холин, этаноламин или серин. Наиболее распространены в тканях животных и рыб глицерофосфолипиды (фосфатиды), составляющие 90 % всех липидов митохондрий.

В зависимости от азотистого основания, присоединенного к фосфатидной кислоте, фосфотидилглицерины подразделяются на фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтанолламины (кефалины) и фосфатидилсерины:



Фосфолипид,

где X – холин, или этаноламин, или серин

В молекуле любого фосфолипида можно выделить полярную “головку”, образованную фосфорной кислотой и азотистым основанием и несущую электрические заряды, и жирнокислотные “хвосты“, не несущие заряда. Благодаря этому у фосфолипидов, в отличие от триацилглицеринов, появляется сродство к воде, хотя в целом гидрофобные свойства преобладают над гидрофильными.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: штатив с пробирками; стакан на 50 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 3 мл; воронка стеклянная для фильтрации диаметром 3-5 см, фарфоровая ступка с пестиком; фильтры бумажные; водяная баня.

Материалы и реактивы: вареный желток куриного яйца; этиловый спирт; ацетон; гидроксид натрия, 10 %-ный раствор; уксусная кислота; соль Рейнке; молибденовый реактив (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте), универсальная индикаторная бумажка.

Опыт 1. Выделение фосфолипидов

В ступку поместить 1/5 часть куриного желтка, растереть и при перемешивании добавить 15 мл горячего спирта. Смесь отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр в сухую пробирку. Фильтрацию повторить до получения прозрачного фильтрата. Далее работу вести с полученным фильтратом.

Опыт 2. Обнаружение лецитинов

В сухую пробирку налить 2-3 мл ацетона и по каплям добавить фильтрат до появления мути. Объяснить результат опыта.

Опыт 3. Гидролиз лецитинов

В широкую пробирку на 10 мл налить 3 мл фильтрата, добавить 3 мл гидроксида натрия, поставить в кипящую баню на 5 мин., у отверстия пробирки подержать влажную индикаторную бумажку до появления синего окрашивания. После кипячения гидролизат слабо подкислить уксусной кислотой (по индикаторной бумаге).

Опыт 4. Проба на холин

2-3 мл фильтрата гидролизата поместить в пробирку, добавить 1-2 мл 2 %-ного раствора соли Рейнеке. Выпадают розовые кристаллы рейнеката холина.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 5. Проба на фосфорную кислоту

2-3 мл фильтрата налить в пробирку, добавить 1-2 мл молибденового реактива и нагреть на водяной бане до 50 – 60 °С. Выпадает желтый осадок.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 5. Открытие глицерина

В пробирку налить 1-2 мл фильтрата, добавить по каплям 10 %-ный раствор гидроксида натрия до нейтральной среды (по индикаторной бумажке), поставить в кипящую водяную баню, раствор выпарить досуха. К сухому остатку прибавить несколько капель воды и пятикратное количество безводного гидросульфата калия. Нагреть пробирку осторожно, но сильно (*в вытяжном шкафу*) до появления белых густых паров. Отметить (*осторожно!*) резкий раздражающий запах акролеина. У отверстия пробирки поместить фильтровальную бумагу, смоченную раствором фуксинсернистой кислоты. Появляется ярко-розовое пятно.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Почему фосфолипиды относят к сложным и к тому же полярным липидам?

Приведите пищевые источники фосфолипидов.

Лабораторная работа № 33. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ОМЫЛЕНИЯ

Цель: получение практических умений и навыков в определении характеристик пищевых жиров.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

При биохимических и технологических исследованиях определяют состав жира животного или растительного масла и их качество, например, устанавливают примеси малоценного жира. Для решения этих вопросов разработан ряд показателей, характеризующих качество и состав жира, так называемые константы жира.

Число омыления измеряется количеством мг гидроксида калия, которое требуется для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме глицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла (жира). Число омыления – один из показателей состава жира и зависит от молекулярного веса кислот, входящих в его состав. Жиры с низкомолекулярными кислотами имеют более высокое число омыления, чем жиры, в состав которых входят только высокомолекулярные кислоты. Высоким числом омыления характеризуются жиры молока, пальмовое масло и некоторые другие.

Принцип определения числа омыления состоит в том, что навеску жира кипятят с определенным количеством спиртового раствора гидроксида калия, взятого в избытке, по сравнению с тем, что требуется для нейтрализации кислот. Остаток щелочи оттитровывают кислотой и по разности между взятым количеством и остатком находят, сколько щелочи пошло на нейтрализацию кислот.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: колбы конические на 250-300 мл с обратным холодильником (2 шт.); пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 мл; бюретки на 25 и 50 мл (2 шт.); весы лабораторные электронные; баня водяная.

Материалы и реактивы: масло растительное или животный жир; соляная кислота 0,5 н. титрованный раствор; фенолфталеин, 1 %-ный раствор; гидроксид калия, 0,5 н. раствор в 96 %-ном спирте (20-30 г гранулированного гидроксида калия поместить в мерную колбу на 1000 мл, при тщательном перемешивании добавить 25-30 мл воды и несколько миллилитров 40 %-ного хлорида бария для осаждения карбонатов, затем объем раствора довести 96 %-ным спиртом до метки; хранить раствор в темной склянке, хорошо закрытой пробкой, снабженной хлоркальциевой трубкой с натронной известью).

1) 1-2 г исследуемого жира с записью до второго знака взвесить в конической колбе на 250-300 мл, прилить из бюретки 25 мл 0,5 н. спиртового раствора гидроксида калия.

2) Колбу соединить с обратным воздушным холодильником, поставить в кипящую водяную баню на 30 мин.

3) По окончании нагревания колбу достать из бани, через 1-2 мин. отсоединить холодильник, прибавить в колбу 5 капель раствора фенолфталеина и оттитровать избыток гидроксида калия 0,5 н. соляной кислотой до исчезновения красного окрашивания (до перехода красного окрашивания в желтое) (опыт).

4) Ввиду того, что концентрация спиртового раствора щелочи быстро меняется, необходимо параллельно опыту провести контрольное определение (без жира), т. е. в колбу отмерить 25 мл спиртового раствора гидроксида калия, соединить с холодильником, поставить в кипящую баню на 30 мин., достать из бани, через 1-2 мин. отсоединить холодильник, прибавить в колбу 5 капель раствора фенолфталеина и оттитровать избыток гидроксида калия 0,5 н. раствором соляной кислоты (контроль).

5) Число омыления исследуемого жира определить по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot k \cdot 28}{m},$$

где X – число омыления в мг гидроксида калия на 1 г жира; a – количество 0,5 н. раствора соляной кислоты, пошедшей на титрование контрольного раствора (без жира), в мл; b – количество 0,5 н. раствора соляной кислоты, пошедшее на титрование исследуемого раствора (с жиром), в мл; m – навеска жира в г; 28 – количество гидроксида калия, соответствующее 1 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты в мг; K – поправка на титр кислоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что характеризует исследуемый показатель?

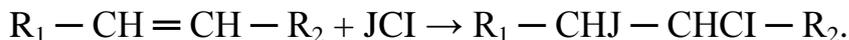
Лабораторная работа № 34. ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА

Цель: получение практических умений и навыков выделения и идентификации липидов.

Йодное число измеряется количеством граммов йода, присоединяемого к 100 г жира по месту разрыва кратных связей в непредельных жирных кислотах. Йодное число характеризует степень непредельности масла (жира) или жирных кислот и позволяет судить о склонности его к «высыханию», прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических масел.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЖИРА С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЛОРИДА ЙОДА

Метод определения йодного числа основан на применении водного солянокислого раствора хлорида йода, который присоединяется к маслу (жиру) по месту разрыва кратных связей в жирных кислотах по уравнению:



Определение йодного числа основано на следующем принципе: на жир, растворенный в индифферентном растворителе, действуют избытком раствора хлористого йода при определенных условиях, а затем оттитровывают оставшийся не связанный йод гипосульфитом и устанавливают количество йода, связанного с маслом (жиром).

Оборудование: конические колбы на 250 мл с притертыми стеклянными пробками; бюретка на 25 мл; цилиндр мерный на 100 мл; пипетка градуированная на 10 мл; весы лабораторные электронные.

Материалы и реактивы: растительное масло или животный жир; диэтиловый эфир (свободный от перекисей); гипосульфит натрия, 0,1 н. раствор; крахмал, 0,5 %-ный раствор; хлорид йода солянокислый, 0,2 н. раствор; йодид калия, 10 %-ный раствор.

1) Взвесить около 0,08-0,12 г исследуемого жира или масла с записью до второго знака в сухой конической колбе на 200-300 мл с хорошо притертой стеклянной пробкой, твердый жир расплавить на водяной бане.

2) Для растворения жира в колбу прилить 3 мл диэтилового эфира, добавить из бюретки 25 мл 0,2 н. солянокислого раствора хлористого йода, содержимое колбы тщательно перемешать и оставить на 5-15 мин.

3). После стояния в колбу внести 10 мл 10 %-ного раствора йодида калия, добавить 50 мл воды и оттитровать выделившийся йод 0,1 н. раствором гипосульфита натрия до желто-светлой окраски ($JCl + KJ \rightarrow J_2 + KCl$).

4) Прибавить 1 мл свежеприготовленного 1 %-ного раствора крахмала и 2-3 мл хлороформа и продолжить титрование жидкости до полного исчезновения синего окрашивания. Прибавление хлороформа ускоряет титрование, высвобождая йод, адсорбированный йодированным жиром (опыт).

5) Одновременно с исследуемым раствором провести титрование контрольного раствора (без жира), т. е. в коническую колбу на 200-300 мл с хорошо притертой стеклянной пробкой влить 3 мл диэтилового эфира, добавить из бюретки 25 мл 0,2 н. солянокислого раствора хлористого йода, содержимое колбы тщательно перемешать и оставить на 5-15 мин. Затем в колбу внести 10 мл 10 %-ного раствора йодида калия, добавить 50 мл воды и оттитровать выделившийся йод 0,1 н. раствором гипосульфита натрия до желто-светлой окраски.

Прибавить 1 мл свежеприготовленного 1 %-ного раствора крахмала и 2-3 мл хлороформа и продолжить титрование жидкости до полного исчезновения синего окрашивания (контроль).

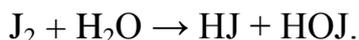
б) Йодное число исследуемого жира определить по формуле:

$$X = \frac{(a - б) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{m},$$

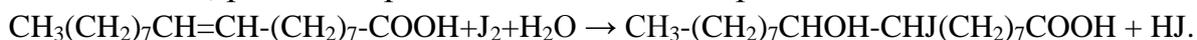
где X – йодное число в г на 100 г жира; a – количество 0,1 н. раствора гипосульфита натрия, израсходованного на контрольный раствор (без жира), в мл; б – количество 0,1 н. раствора гипосульфита, израсходованного на исследуемый раствор (с жиром), в мл; 0,01269 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора гипосульфита натрия, в г; m – навеска жира в г; K – поправочный коэффициент на раствор гипосульфита.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА С ПРИМЕНЕНИЕМ СПИРТОВОГО РАСТВОРА ЙОДА

Метод определения йодного числа основан на реакции спиртового раствора йода в присутствии воды:



В обычных условиях эта реакция почти не идет, но когда образующаяся йодноватистая кислота HOI расходуется на присоединение по месту разрыва двойных связей, реакция протекает легко и быстро:



Обычно прибавляемый избыток йода оттитровывают раствором гипосульфита натрия.

Материалы и реактивы. Жир животный или масло растительное; спирт, 96 %-ный; йод, 0,2 н. спиртовой раствор (приготовленный из фиксанала или кристаллического свежезвогнанного йода); гипосульфит натрия ($Na_2S_2O_3$), 0,1 н. раствор; крахмала, 1 %-ный раствор.

Оборудование: коническая колба на 500 мл; пипетка для прямого слива с одной меткой на 25 мл; цилиндр мерный на 100-200 мл.

1) Взвесить 0,1-0,2 г жира (лучше по методу отвешивания по разности) с записью до второго знака в конической колбе на 500 мл, прилить 40 мл этилового спирта и провести при перемешивании растворение жира на водяной бане с температурой 40-50 °С (колбу пробкой не закрывать!).

2). После растворения жира колбу достать из бани, охладить, прилить пипеткой 25 мл 0,2 н. спиртового раствора йода, содержимое колбы хорошо взболтать и добавить 200 мл дистиллированной воды.

3) Колбу закрыть плотно пробкой, раствор сильно взболтать и оставить ровно на 5 мин., после чего избыток йода оттитровать 0,1 н. раствором гипосульфита натрия. Для связывания избытка йода титрование необходимо

вести быстро, для чего сначала раствор гипосульфита натрия прилить струей до появления желтого окрашивания, затем, прибавив 0,5 мл раствора крахмала, титровать по каплям до обесцвечивания раствора (опыт).

4) Провести контрольное титрование пробы без жира, т. е. в коническую колбу отмерить 25 мл спиртового раствора йода, 40 мл спирта, 200 мл воды и через 5 мин. оттитровать раствором гипосульфита натрия.

5). Йодное число жира вычислить по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 0,0127 \cdot 100}{m},$$

где X – йодное число в г на 100 г жира; a – количество 0,1 н. раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы, в мл; б – количество 0,1 н. раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование опытной пробы с жиром, в мл; m – навеска жира в г; 0,0127 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора гипосульфита натрия, в г.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что характеризует исследуемый показатель?

Лабораторная работа № 35.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

Цель: получение практических умений и навыков определения физико-химических характеристик липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Температура плавления жира – переход жира из твердого состояния в жидкое.

Натуральные жиры представляют собой смеси различных триацилглицеринов, имеющих различные температуры плавления. Поэтому переход в капельножидкое состояние для них совершается не мгновенно, а в пределах некоторого интервала температур, в котором плавятся триацилглицерины различного жирнокислотного состава.

Специфические особенности самих триацилглицеринов и их жирнокислотный состав отражаются на температурах плавления того или иного жира. У насыщенных жирных кислот температуры плавления возрастают с увеличением молекулярной массы. У ненасыщенных жирных кислот на температуру плавления влияют не столько двойные связи, сколько их положение в цепи и пространственное расположение отдельных частей молекулы.

Показателем температура плавления пользуются для контроля процесса гидрогенизации жиров, контроля качества полуфабрикатов и готовой продукции при производстве маргарина.

Методы определения температуры плавления заключаются в постепенном нагревании твердого в определенных условиях жира до момента расплавления, который характеризуют по прозрачности, подвижности, осветленности и т. п. В масложировой промышленности температуру плавления на практике устанавливают по температуре, при которой жир становится подвижным.

В отечественной масложировой промышленности приняты два метода определения температуры плавления: по сползанию капли жира в капилляре с расширением и по поднятию жира в открытом капилляре.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ В КАПИЛЛЯРЕ С РАСШИРЕНИЕМ

Метод основан на фиксировании температуры плавления жира по стеканию его капли из расширенной капиллярной трубочки в узкую часть.

Оборудование: стакан на 500 мл; фарфоровая чашка; пипетка; капилляр с расширением; термометр (цена делений шкалы $0,1^{\circ}\text{C}$); штатив с кольцом; мешалка электрическая; электрическая плитка или газовая горелка.

Материалы и реактивы: животный жир; лёд.

1) Исследуемый образец жира нагреть на водяной бане в фарфоровой чашке до полного расплавления и отфильтровать.

2) В чистый сухой капилляр с расширением поместить пипеткой 1-2 капли полностью расплавленного жира.

3) Капилляр выдержать на льду в течение 10 мин. или оставить на 24 ч при комнатной температуре.

4) Капилляр с застывшим жиром прикрепить к термометру резиновым кольцом таким образом, чтобы проба жира была на одном уровне с ртутным шариком термометра. Термометр прикрепить к кольцу на штативе и поместить в стакан с водой, верхний конец трубочки остается выше уровня воды.

5) Стакан установить на электрической плитке. Температура воды в стакане должна быть 15-18 °С. При непрерывном перемешивании электромешалкой постепенно нагреть воду в стакане со скоростью вначале около 2 °С в мин, а с приближением к ожидаемой температуре плавления – 1 °С в мин.

6) За температуру плавления принимают ту, при которой жир начинает стекать в нижнюю часть капилляра, а за результат – среднее арифметическое из двух определений, различающихся не более чем на 0,5 °С.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ В КАПИЛЛЯРЕ, ОТКРЫТОМ С ДВУХ КОНЦОВ

Метод основан на фиксировании температуры плавления по поднятию столбика жира в капилляре, открытом с двух концов.

Оборудование: чашка фарфоровая; капилляр, открытый с двух концов (открытая с двух концов капиллярная трубочка из тонкого стекла с внутренним диаметром 1-1,2 мм, длина капилляра 50-60 мм, толщина 0,2-0,3 мм); термометр; штатив с кольцом; стакан на 500 мл; мешалка электрическая.

Материалы и реактивы: животный жир; лёд.

1) Исследуемый образец жира нагреть на водяной бане в фарфоровой чашке до полного расплавления и отфильтровать.

2) Чистый сухой капилляр погрузить одним концом в расплавленный жир так, чтобы высота его в капилляре была равна 10 мм.

3) Капилляр с жиром выдерживать на льду в течение 10 мин. или оставить на 24 ч при комнатной температуре (рисунок 3).

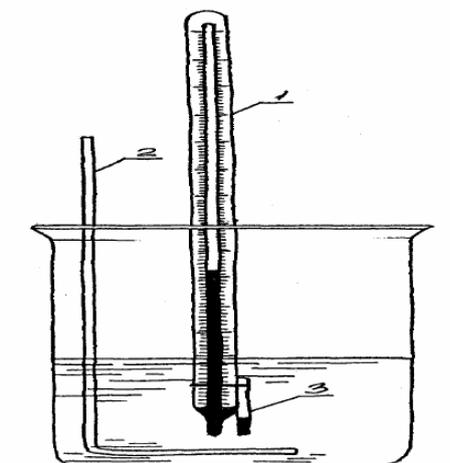


Рисунок 3 – Прибор для определения температуры плавления в капилляре:

1 – термометр; 2 – мешалка

4) После этого капилляр прикрепить к термометру (цена делений шкалы $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) тонким резиновым кольцом так, чтобы столбик жира находился на одном уровне с ртутным шариком термометра.

5) Затем термометр с капилляром опустить в стакан с водой на такую глубину, чтобы он был погружен в воду на 3-4 см. Температура воды в стакане составляет $15-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Следить, чтобы в незаполненный конец капилляра не попала вода. При непрерывном перемешивании мешалкой (механической или магнитной) воду в стакане нагревают вначале со скоростью приблизительно на $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту, а по мере приближения к ожидаемой температуре плавления – не более чем на $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту.

6) Температурой плавления считают ту, при которой жир в капилляре начинает подниматься.

7) Определение произвести два раза, за результат принять среднее арифметическое из двух параллельных опытов, которые должны различаться не более чем на $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

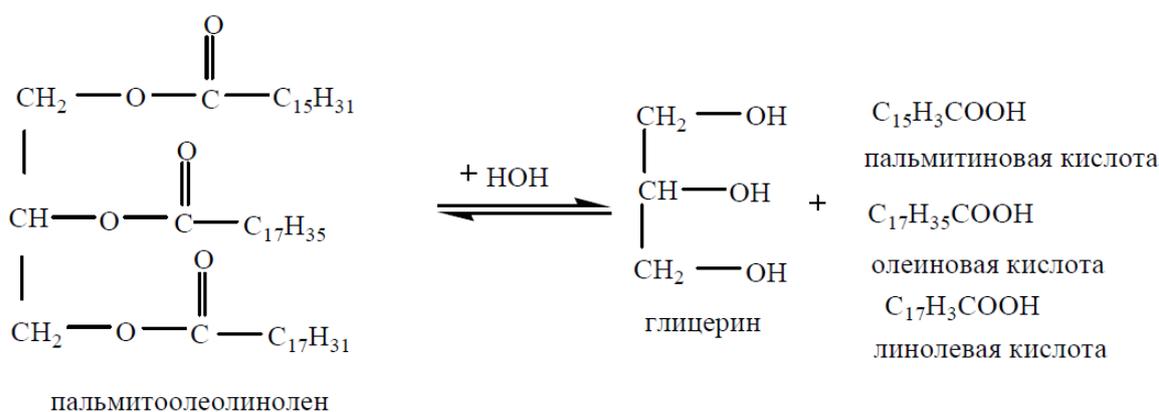
Что характеризует исследуемый показатель с точки зрения химического состава пищевого жира?

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ

В приведенных ниже лабораторных работах оценивается динамика биохимических процессов путем определения количества веществ, являющихся промежуточными или конечными продуктами гликолиза (в случае определения пировиноградной или молочной кислот), автолиза белков (в случае определения аминокислот).

С жирами также происходят биохимические процессы, вызывающие их прогоркание – одновременное протекание гидролиза и окисления.

1. Гидролиз жиров – это гидролитическое расщепление жира под действием воды на жирные кислоты и глицерин:

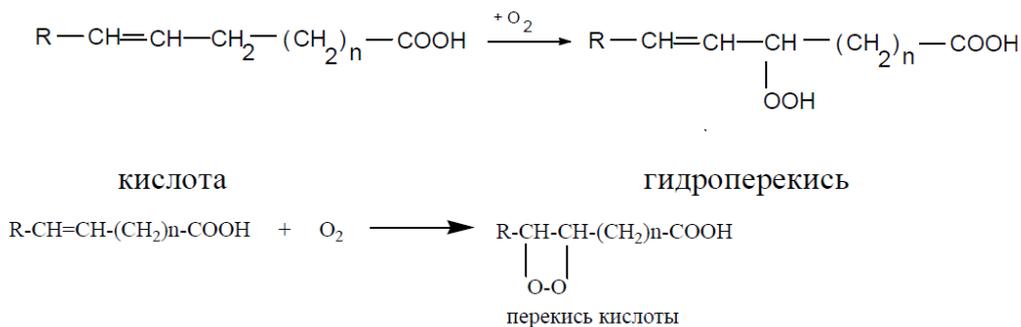


2. Более глубокие изменения претерпевают жиры при окислении, в большинстве случаев являющиеся причиной их пищевой порчи. При этом вкус и запах жиров приобретает неприятные специфические свойства, оцениваемые как прогоркание. Такие жиры непригодны к употреблению.

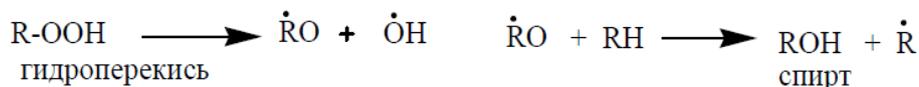
В основе окисления жиров лежит взаимодействие их с кислородом воздуха. Устойчивость к окислению определяется прежде всего их жирнокислотным составом. Глицериды ненасыщенных жиров окисляются быстрее, чем насыщенные. Свободные жирные кислоты окисляются легче глицеридов.

Современные 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.

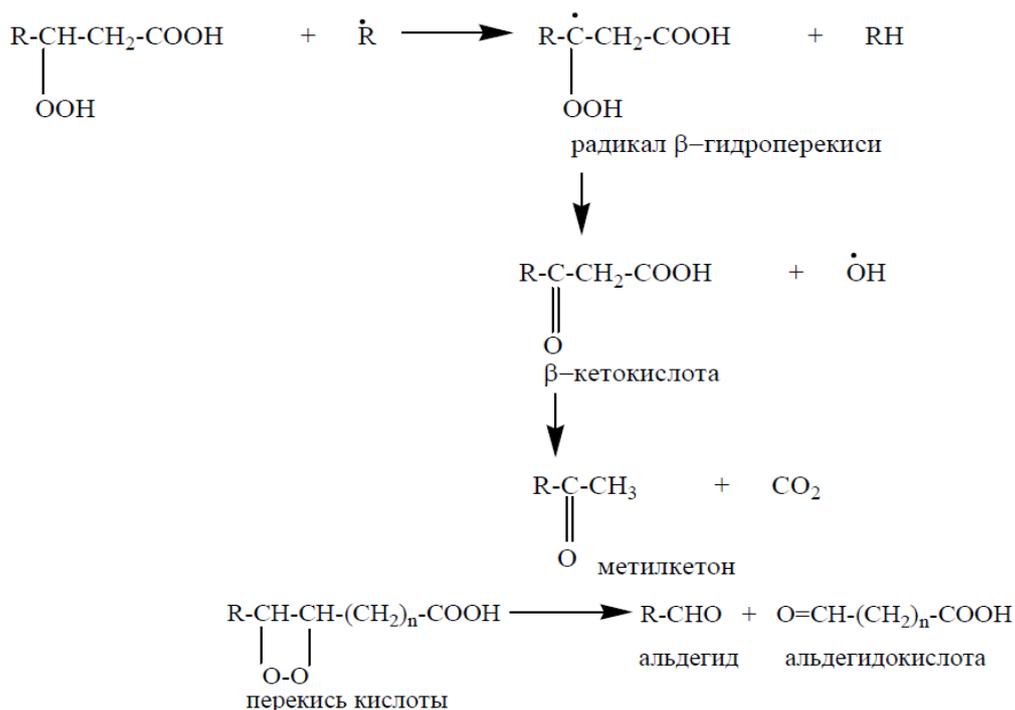
Согласно теории Баха-Энглера окисление жиров начинается с замещения атома водорода у углерода в α-положении по отношению к двойной связи или α- и β-положении по отношению к карбоксильной группе кислородом воздуха с образованием гидроперекисей, когда кислород воздуха присоединяется по месту разрыва двойной связи – циклических перекисей:



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.

Лабораторная работа № 36.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОАЗОТА ФОРМОЛЬНЫМ ТИТРОВАНИЕМ

Цель: получение практических умений и навыков определения водорастворимых продуктов распада белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Аминным азотом называется азот свободных аминогрупп аминокислот (пептидов). В молекуле белка аминокислоты соединены друг с другом пептидными связями, образуя полипептидные цепочки. В нерасщепленном белке количество свободных карбоксильных групп и аминогрупп очень мало. При гидролизе происходит разрыв пептидных связей с освобождением карбоксильных и аминогрупп, и чем глубже расщеплен белок, тем больше этих групп освобождается.

Степень расщепления белка можно оценить посредством определения количества свободных карбоксильных или аминных групп. Однако определить их простым титрованием не удастся, потому что они в растворе существуют в виде равновесной смеси биполярного иона.

Аминный азот определяют методом формольного титрования. Перед титрованием к исследуемому раствору приливается формалин, формальдегид вступает в реакцию с аминогруппами аминокислот (блокирует их), в результате чего карбоксильные группы освобождаются, и их оттитровывают гидроксидом натрия.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

Оборудование: мерная колба на 100 мл; бюретка (две); конические колбы на 100-150 мл (две); коническая колба на 200 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл (две); мерный цилиндр на 10-20 мл; стеклянная воронка для фильтрования; бумажные фильтры; гомогенизатор или мясорубка; весы лабораторные электронные.

Материал и реактивы: мышечная ткань; гидроксид натрия, 0,1 или 0,2 н. раствор; свежая формольная смесь (к 15 мл 40 %-ного раствора формальдегида прибавить 1 мл 1%-ного раствора фенолфталеина и 0,1 или 0,2 н. раствор гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания); фенолфталеин, 1 %-ный спиртовой раствор; свежeproкипяченая дистиллированная вода; соляная кислота или серная, 0,2 или 0,1 н. раствор.

1) Мышечную ткань измельчить в гомогенизаторе, отвесить 10 г с записью до второго знака в мерной колбе на 100 мл, налить на 2/3 дистиллированной воды и настаивать 20 мин.

2) После настаивания колбу поместить в кипящую водяную баню на 15 мин., после чего колбу охладить и довести объем раствора дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешать и отфильтровать на стеклянной воронке через бумажный складчатый фильтр в коническую колбу на 200 мл.

3) В коническую колбу на 150 мл (№ 1) отмерить пипеткой 10 мл фильтрата (опыт), в такую же колбу (№ 2) – 10 мл свежeproкипяченной и охлажденной дистиллированной воды (контроль). В обе колбы прибавить по 3 капли фенолфталеина и посредством добавления по каплям кислоты или щелочи довести содержимое колб до нейтральной реакции (слабо-розовая окраска). Таким способом нейтрализуют избыточную кислоту или щелочь, присутствующую в растворе. Количество растворов, затраченных на нейтрализацию, не учитывается.

4) В каждую колбу прибавить по 10 мл формольной смеси, причем исследуемый раствор (колба № 1), если он содержит свободные аминокетты, делается кислым. Контрольный раствор (колба № 2) дотитровать гидроксидом натрия до ясно-розовой окраски. Количество гидроксида натрия, пошедшего на титрование, записать. До такой же окраски дотитровать и раствор колбы № 1

(количество гидроксида натрия, пошедшего на титрование, опять записать). Если при этом объем раствора колбы № 1 сильно увеличился, то к раствору колбы № 2 добавить воды, чтобы объем в обеих колбах был приблизительно одинаковым.

5) В колбу № 2 еще добавить две капли гидроксида натрия из бюретки, отчего раствор окрасится в интенсивно красный цвет, и записать количество. До такого же цвета дотитровать гидроксидом натрия раствор в колбе № 1, т. е. цвет в обеих колбах должен быть приблизительно одинаковым. Количество затраченного гидроксида натрия щелочи записать. Запись удобно располагать следующим образом:

Колба № 1 (опыт)	Колба № 2 (контроль)
Пошло гидроксида натрия – а, мл	Пошло гидроксида натрия – с, мл
Добавлено гидроксида натрия – в, мл	Добавлено гидроксида натрия – d, мл

Титрованием контрольного раствора определяется кислотность формальдегида, следовательно, только часть гидроксида натрия, затраченного на титрование испытуемого раствора, пошла на нейтрализацию освободившихся карбоксильных групп, а другая часть пошла на нейтрализацию формальдегида. Чтобы узнать первую часть, надо из гидроксида натрия, пошедшего на титрование опытного раствора, вычесть количество гидроксида натрия, затраченного на контрольный раствор.

Количество аминокислоты в исследуемой мышечной ткани вычислить по следующей формуле:

$$\text{ФТА} = \frac{1,4 \cdot X \cdot V_1 \cdot 100}{K \cdot m \cdot V},$$

где $X = (a+v) - (c+d)$, в мл; V_1 – общий объем экстракта из мышечной ткани, в мл; V – объем фильтрата, взятого на определение, в мл; m – масса навески мышечной ткани, в г; 1,4 – количество мг азота, соответствующее 1 мл 0,1 н. гидроксида натрия.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что такое белковый гидролизат?

Почему белковый гидролизат может стать лекарством для больных фенилкетонурией?

Лабораторная работа № 37.
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ МОЛОЧНОЙ
КИСЛОТЫ

Цель: получение практических умений и навыков в изучении процессов распада углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В процессе брожения оценивают динамику накопления молочной кислоты в образцах. Для этого определяют концентрацию молочной кислоты колориметрическим методом в пробе сразу и через определенные отрезки времени согласно цели эксперимента.

Колориметрический метод основан на том, что молочная кислота с хлоридом железа образует соединение желтого цвета, интенсивность окраски которого зависит от содержания молочной кислоты в растворе.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

1. КОСВЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Оборудование: конические колбы на 150 мл; мерная колба на 100 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 10 мл; бюретка.

Материалы и реактивы: молочная сыворотка; сыворотка крови; рассол квашеной капусты (огурцов); гидроксид натрия, 0,1 н. раствор; фенолфталеин, 0,1 %-ный раствор в 96 %-ном спиртовом растворе.

10 мл исследуемого раствора поместить в колбу на 150 мл, добавить 2-3 капли фенолфталеина и оттитровать 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания.

Содержание молочной кислоты в исследуемом материале рассчитать по формуле:

$$X = 10 \cdot V \cdot T \%,$$

где X – содержание молочной кислоты, в %; 10 – объем исследуемого раствора, в мл; V – объем гидроксида натрия, пошедшего на титрование, в мл; T – эквивалентен 0,009 % молочной кислоты.

2. ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ПО ПИККЕРИНГУ И КЛЕГГУ

Оборудование: конические колбы на 250-300 мл; мерные колбы на 100 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 0,5, 1, 2 и 10 мл; воронка стеклянная для фильтрования; фильтры бумажные; фотоэлектроколориметр.

Материалы и реактивы: молочная сыворотка; сыворотка крови; рассол квашеной капусты (огурцов); хлорид бария, 10 %-ный раствор; гидроксид натрия, 0,66 н. раствор; сульфат цинка, 22 %-ный раствор; хлорид железа, 1 %-ный раствор.

1) В колбу на 250-300 мл внести 10 мл образца, прилить 25 мл дистиллированной воды и из бюретки – по 5 мл хлорида бария, гидроксида натрия и сульфата цинка. Реактивы вводят очень быстро, обязательно перемешивая после добавления каждого из них не менее 30 с (опыт) (V).

2) В контрольную колбу на 250-300 мл внести 25 мл воды и из бюретки – по 5 мл хлорида бария, гидроксида натрия и сульфата цинка. Реактивы вводят очень быстро, обязательно перемешивая после добавления каждого из них не менее 30 с (контроль).

3) Контрольный и опытный образцы отфильтровать на стеклянной воронке через двойной бумажный складчатый фильтр.

4) В одну мерную колбу на 100 мл внести 1 мл фильтрата (б), добавить 0,5 мл 1 %-ного раствора хлорида железа, и объем содержимого колбы довести дистиллированной водой до метки (опыт).

5) В другую мерную колбу внести по 0,5 мл 1 %-ного раствора хлорида железа, объем содержимого колбы довести дистиллированной водой до метки (контроль).

6) Интенсивность окраски опытного раствора измерить на фотоколориметре при 465 нм (синий светофильтр) против контрольной пробы в кюветах на 10 мл.

7) Содержание молочной кислоты вычислить (пользуясь готовым калибровочным графиком) по формуле:

$$X = \frac{V \cdot a \cdot 100}{b \cdot 10 \cdot 100} \text{ мг\%},$$

где X – содержание молочной кислоты в мг%; a – количество молочной кислоты, найденное по калибровочному графику, в мг; б – количество исследуемой сыворотки (рассол) в фильтрате в мл; V – общий объем, в мл, в данном эксперименте объем приготовленного экстракта равен 50 мл (10 мл образца + 25 мл дистиллированной воды + 15 мл), (растворы хлорида бария, гидроксида натрия и сульфата цинка, опытный образец разбавлен в 5 раз); 5 и 100 (под чертой) – разбавление исследуемого образца; 100 (над чертой) –

перевод в мг%; 10 – объем разведенного фильтрата, взятый для титрования, в мл.

Определение содержания молочной кислоты в исследуемом образце проводится согласно эксперименту, результаты вносят в таблицу.

Построение калибровочного графика: в шесть пронумерованных пробирок налить растворы кислоты, содержащие 1, 10, 20, 30, 40, 50 мг в 10 мл дистиллированной воды. Все остальные операции со стандартными растворами проводятся в том же порядке, как описано выше в п. п. 1-5. Все определения должны быть выполнены в двух или трех параллелях. Фотометрировать подвергнутые осаждению и неосажденные растворы на фэке при 465 нм (синий светофильтр) против контрольной пробы в кювете на 10 мл.

При построении стандартной кривой по оси ординат отложить найденную величину оптической плотности E (среднее арифметическое из двух или трех параллельных определений), а по оси абсцисс – соответствующее ей содержание молочной кислоты.

Поправочный коэффициент, учитывающий потери молочной кислоты с осадком, составляет +0,11 по оптической плотности, или +0,007 в пересчете на молочную кислоту.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что характеризует исследуемый показатель?

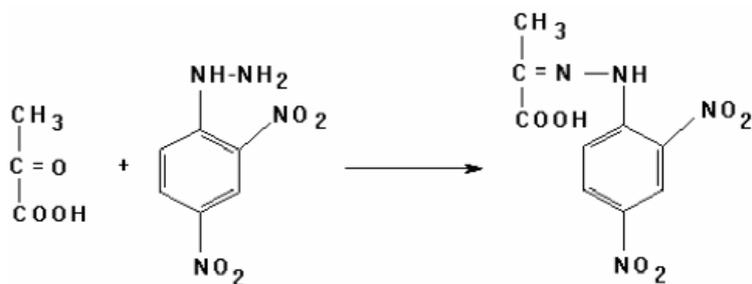
Какие пищевые продукты образуются в результате гликолиза?

Лабораторная работа № 38.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

Цель: получение практических умений и навыков в изучении процессов распада углеводов.

Метод основан на способности пировиноградной кислоты (ПВК) взаимодействовать с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде с образованием 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты – соединения, окрашенного в желто-оранжевый цвет, интенсивность окраски которого зависит от содержания пировиноградной кислоты в растворе.



2,4-динитрофенилгидразин 2,4-динитрофенилгидразон ПВК

Оборудование: пробирки; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 мл; фотоэлектроколориметр.

Материалы и реактивы: молочная сыворотка или сыворотка крови; калий гидроксид, 2,5 %-ный спиртовой раствор; 2,4-динитрофенилгидразин, 0,1 %-ный раствор; стандартный раствор пировиноградной кислоты (50 мкг в 1 мл).

1) В одну пробирку налить 1 мл сыворотки молока (опыт), в другую – 1 мл дистиллированной воды (контроль), в обе прилить по 1 мл спиртового раствора гидроксида калия и перемешивать точно 1 мин.

2) После перемешивания в пробирки прилить по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешать и оставить на 15 мин. при комнатной температуре.

3) Измерить интенсивность окраски исследуемого раствора на фотоколориметре при 465 нм (синий светофильтр) против контрольного раствора.

4) Содержание пировиноградной кислоты в сыворотке вычислить (пользуясь готовым калибровочным графиком) по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 100}{1 \cdot 1000} \text{ мг\%,}$$

где X – содержание пировиноградной кислоты, в мг %; а – количество пировиноградной кислоты, найденное по калибровочному графику, в мкг; 1000 – коэффициент перевода мкг в мг.

Построение калибровочного графика: налить в пять пронумерованных пробирок последовательно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; и 1 мл стандартного раствора пировиноградной кислоты. В каждую пробирку, за исключением последней, прилить соответственно 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 мл дистиллированной воды. Все остальные операции со стандартными растворами проводятся в том же порядке, как описано выше в п. п. 1-4. Все определения должны быть выполнены в двух или трех параллелях.

При построении стандартной кривой по оси ординат отложить найденную величину оптической плотности E (среднее арифметическое из двух или трех параллельных определений), а по оси абсцисс – соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

В каких условиях проходят процессы распада углеводов при получении кефира?

Назовите углеводы животного и растительного происхождения.

Лабораторная работа № 39. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА

Цель: получение практических умений и навыков в обнаружении некачественного пищевого продукта.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Кислотное число жира измеряется количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира (масла). Свободные кислоты образуются в результате гидролиза жира под действием ферментов при хранении плохо очищенного жира или под действием микробов при неправильном хранении. Кислотное число может служить показателем качества жира или масла.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в жире или масле, оттитровывают 0,1 н. раствором гидроксида калия. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками с продуктами биохимических процессов, и формулируется вывод.

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

Материалы и 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.

1) 3-5 г исследуемого жира с записью до второго знака взвесить в конической колбе на 200 мл, твердый жир расплавить на водяной бане.

2) В колбу к жиру прилить 50 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1) и добиться растворения жира.

3) К раствору жира добавить 1 мл фенолфталеина и оттитровать 0,1 н. раствором гидроксида калия до появления розовой окраски, не исчезающей 1 мин.

4) Кислотное число исследуемого жира определить по формуле:

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

где X – кислотное число жира или масла в мг 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.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что характеризует исследуемый показатель?

Источники информации о нормальных величинах константы.

Лабораторная работа № 40. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ЧИСЛА

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

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.

Материалы и 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.

1) Взвесить около 0,8 г жира с записью до второго знака в конической колбе с притертой пробкой на 200 мл, твердый жир расплавить на водяной бане.

2) По стенке колбы, смывая следы жира, влить из цилиндра 10 мл хлороформа, затем из другого цилиндра – 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем быстро влить 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора йодида калия, закрыть колбу пробкой, перемешать содержимое вращательным движением колбы и поставить в темное место на 3 мин.

3) Достать колбу из темного места, добавить 100 мл дистиллированной воды, в которую заранее был добавлен 1 мл 1 %-ного раствора крахмала.

4) Содержимое колбы оттитровать 0,01 н. раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски.

5) Параллельно, для проверки чистоты реактивов, в коническую колбу с притертой пробкой на 200 мл влить из цилиндра 10 мл хлороформа, затем из другого цилиндра – 10 мл ледяной уксусной кислоты. Затем быстро влить 0,5 мл насыщенного свежеприготовленного раствора йодида калия, закрыть колбу пробкой, перемешать содержимое вращательным движением колбы и поставить в темное место на 3 мин. Достать колбу из темного места, добавить 100 мл дистиллированной воды, в которую заранее был добавлен 1 мл 1 %-ного раствора крахмала. Содержимое колбы оттитровать 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.

б) Перекисное число исследуемого жира определить по формуле:

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

где X – перекисное число в % йода; V – объем 0,01 н. раствора гипосульфита натрия, израсходованный на титрование исследуемого раствора (с жиром), в мл; V_1 – объем 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.

Степень окисления (порчи жира) в зависимости от перекисного числа определяется по таблице 9.

Таблица 9 – Степень окисления жира в зависимости от перекисного числа

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что характеризует исследуемый показатель?

Источники информации о нормальных величинах константы.

Лабораторная работа № 41.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬДЕГИДНОГО ЧИСЛА БЕНЗИДИНОВЫМ МЕТОДОМ

Цель: получение практических умений и навыков в определении степени прогоркания липидов.

Метод основан на взаимодействии карбонильных соединений, содержащихся в липидах (главным образом, ненасыщенных альдегидов) с бензидином. Альдегидное число определяют по изменению оптической плотности при 430 нм раствора жира в хлороформе, обработанного бензидином при 60 °С.

Оборудование: пробирки, градуированные с притертыми пробками или колбы мерные на 25 мл; колбы с притертыми пробками на 100 мл; пипетки с одной меткой для прямого слива на 5, 10, 20 мл; цилиндр мерный на 50 и 100 мл; спектрофотометр; контактный термометр; электроплитка бытовая; баня водяная.

Материалы и реактивы: бензидин (4,4-диаминобофенил), 0,5 %-ный раствор в ледяной уксусной кислоте (0,5 г бензидина (ч. д. а.), перенести в коническую колбу со шлифом, залить 100 мл ледяной уксусной кислоты, содержимое слегка нагреть на водяной бане и взболтать, после растворения бензидина колбу охладить до 20 ± 20 °С); уксусная кислота ледяная; хлороформ, х. ч.

1) В мерную колбу со шлифом (или градуированную пробирку со шлифом) на 25 мл внести пипеткой 5 мл мисцеллы, содержащей 0,02-0,2 г липидов, с точностью до 0,05 мл добавить 5 мл ледяной уксусной кислоты, объем раствора довести хлороформом до метки, плотно закрыть пробкой и аккуратно перевернуть несколько раз до достижения равномерного перемешивания.

2) Определить оптическую плотность раствора липидов на спектрофотометре при 430 нм в кювете шириной на 1 см относительно растворителя (20 мл хлороформа + 5 мл уксусной кислоты). Значение оптической плотности (C_0) характеризует собственную окраску липидов.

3) В три мерные колбы со шлифами на 25 мл внести по 5 мл 0,5 %-ного раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте, в две из них добавить такое же количество мисцеллы, как и при определении C_0 , объемы растворов в колбах довести хлороформом до метки.

4) Колбы поставить в термостат при 60 °С на 40 мин.

5) После термостатирования колбы быстро охладить до комнатной температуры (20±20 °С) и измерить оптическую плотность растворов относительно контрольного раствора на спектрофотометре при 430 нм в кювете на 1 см. Полученная оптическая плотность включает суммарное значение для самих липидов и содержащихся в них комплексов альдегидов с бензидином.

Альдегидное число исследуемого жира определить по формуле:

$$X = \frac{(C - C_0) \cdot 25}{0,5mN - 100},$$

где X – альдегидное число в 1 г – 100 см³; C – оптическая плотность раствора липидов с бензидином; C_0 – оптическая плотность, характеризующая собственную окраску липидов; 25 – объем колбы, в мл; m – масса липидов, извлекаемых хлороформом; N – ширина кюветы, в см; 0,5 – коэффициент, показывающий, что для анализа взяли 5 мл мисцеллы.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Что такое прогорклый жир?

Какие факторы при приготовлении пищевых продуктов могут не допустить увеличения альдегидного, перекисного и кислотного числа?

Лабораторная работа № 42.

ОБНАРУЖЕНИЕ БИООРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА

Цель: получение практических умений и навыков в идентификации пищевых продуктов.

ЗАДАНИЯ И МЕТОДИКИ ОПЫТОВ

Задание: Студент выдается некий пищевой продукт. Задача студентов открыть состав этого продукта самостоятельно, используя оборудование и реактивы, по приведенным прописям опытов осуществляет реакции и

фиксирует в качестве наблюдений результат. До окончания занятия совместно с преподавателем происходит обсуждение (уточнение) результатов, подтверждаемых соответствующими опыту пробирками, и формулируется вывод.

Перед началом работы студенты должны записать в тетрадь внешние характеристики выданного продукта (форма, толщина, цвет, поверхность и др.)

Для подготовки продукта к исследованию необходимо получить его экстракт. Для этого 5 г продукта растирают в ступке, переносят в колбу на 100 мл, доводят дистиллированной водой до метки, выдерживают 30 минут и фильтруют через двойной слой марли.

При наличии масляного слоя на поверхности раствора можно сделать вывод о наличии липидов в составе пищевого продукта.

БЕЛКИ

Опыт 1. Биуретовая реакция на пептидную связь

Реактивы: полученный раствор исследуемого продукта, гидроксид натрия, 10 %-ный раствор, сульфат меди, 1 %-ный раствор.

Оборудование: штатив с пробирками.

В пробирку налить 5 капель исследуемого раствора, добавить 3 капли щелочи и 1 каплю сульфата меди. Перемешать.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Нингидриновая реакция на свободные α -аминокислоты

Реактивы: полученный раствор исследуемого продукта, нингидрин, 0,1% раствор

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня.

В пробирку налить 5 капель исследуемого раствора, добавить 5 капель раствора нингидрина. Нагреть на водяной бане.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

УГЛЕВОДЫ

Опыт 1. Обнаружение редуцирующих сахаров в составе пищевого продукта

Реактивы: полученный раствор исследуемого продукта, реактив Фелинга.

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня.

В пробирку налить 5 капель исследуемого раствора, добавить 3 капли реактива Фелинга. Нагревать на водяной бане в течение 3 мин.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 2. Обнаружение фруктозы в составе пищевого продукта

Реактивы: полученный раствор исследуемого продукта, реактив Селиванова.

Оборудование: штатив с пробирками, водяная баня.

В пробирку налить 5 капель исследуемого раствора, добавить 3 капли реактива Селиванова. Нагреть на водяной бане в течение 5 мин.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

Опыт 3. Обнаружение крахмала в составе пищевого продукта

Реактивы: полученный раствор исследуемого продукта, реактив Люголя.

Оборудование: штатив с пробирками.

В пробирку налить 5 капель исследуемого раствора, добавить 1 каплю реактива Люголя.

Написать уравнения реакций, наблюдения и выводы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Какие биополимеры определяют структуру исследованного пищевого продукта?

Какие обнаруженные Вами в составе пищевого продукта молекулы определяют его вкус?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тихонов, Г. П. Основы биохимии: учеб. пособие / Г. П. Тихонов, Т. А. Юдина. – Москва: Альтаир: МГАВТ, 2014. – 184 с.
2. Пинчук, Л. Г. Биохимия: учеб. пособие / Л. Г. Пинчук, Е. П. Зинкевич, С. Б. Гридина. – Кемерово: Кемеровский технол. ин-т пищ. пром-сти, 2011. – 364 с.
3. Гидранович, В. И. Биохимия: учеб. пособие / В. И. Гидранович, А. В. Гидранович. – 3-е изд. – Минск: ТетраСистемс, 2014. – 528 с.
4. Комов, В. П. Биохимия: учеб. / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – 2-е изд., испр. - Москва: Дрофа, 2006. – 639 с.
5. Сергеева, Н. Т. Биологически активные вещества: учеб. пособие / Н. Т. Сергеева. – Калининград: Изд-во КГТУ, 2005. – 306 с.
6. Сергеева, Н. Т. Практикум по биологически активным веществам: учеб. пособие/ Н. Т.Сергеева, Г. Е.Степанцова, Н. В. Ломако. – Калининград: Изд-во ФГОУ ВПО «КГТУ», 2007. – 193 с.
7. Филиппович, Ю. Б. Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович, Т. А.Еторова, Г. А. Севастьянова. – Москва: Просвещение, 1982. – 311 с.
8. Чупахина, Г. Н. Методы анализа витаминов: практикум / Г. Н. Чупахина, П. В.Масленников. – Калининград: Изд-во КГУ, 2004. – 36 с.

Учебное издание

Борис Юрьевич Воротников
Ольга Анатольевна Лизоркина
Людмила Владимировна Толстикова

БИОХИМИЯ

Редактор Э. С. Круглова

Подписано в печать.25.05.2023 г. Формат 60 × 90 1/16.
Уч.-изд. л. 10,1. Печ. л. 9,1. Тираж 27 экз. Заказ № 30

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1