

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Брянск 2012

Баширова Н.Ф., Талызина Т.Л. Методические указания к лабораторным работам по биологической химии. Брянск: БГСХА, 2012. 60 с.

Методические указания составлены в соответствии со стандартами 3-го поколения

Рецензенты:

Буренок А.С. – к. с/х. н., доцент кафедры ботаники, декан ЕГФ БГУ

Мартынова Е.В. – к.б.н., доцент кафедры химии БГСХА

© Баширова Н.Ф., 2012

© Талызина Т.Л., 2012

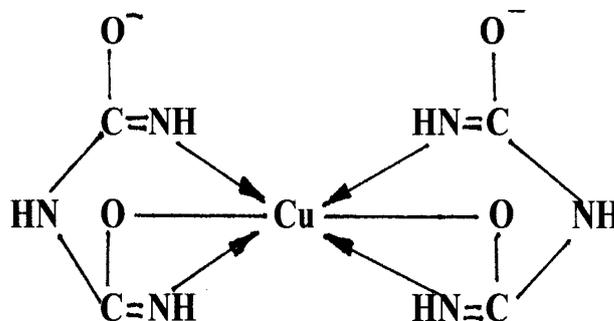
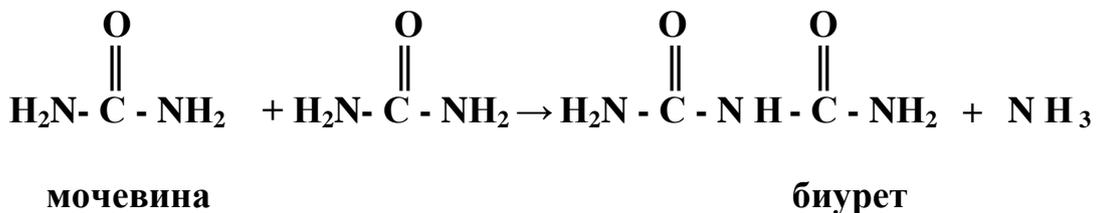
Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на белки и аминокислоты

Реактивы, оборудование: 10% и 20% растворы гидроксида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,5% водный раствор нингидрина, 1% раствор нингидрина в 95% растворе ацетона, конц. азотная и серная кислоты, реактив Миллона, реактив Фоля, 0,1% раствор фенола, ледяная уксусная кислота, 5% свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, 0,2% спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, крист. мочевины, 40% раствор мочевины, 0,01% раствор аргинина, 0,01% раствор тирозина, 0,005% раствор триптофана, раствор глиоксиловой кислоты, 1% раствор яичного белка, 1% раствор желатина, 10% раствор углекислого натрия, 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты (1:3), 5% раствор нитрита натрия; штативы с пробирками, держатели, спиртовки, стеклянные трубочки, пипетки.

Биуретовая реакция

Биурет – вещество, образующееся при нагревании мочевины и содержащее пептидные связи в молекулах. Если к раствору этого вещества добавить гидроксид натрия и несколько капель раствора медного купороса, то образуется продукт розового или сине-фиолетового цвета. Полученное окрашенное вещество называется биуретовым медным комплексом, а сама реакция получила название биуретовой.



Биуретовую реакцию могут давать все вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей. Раствор белка в щелочной среде при взаимодействии с ионами меди также приобретает сине-фиолетовый цвет, а продукты неполного гидролиза белков дают розовое окрашивание. И в этом случае происходит образование биуретового медного комплекса.

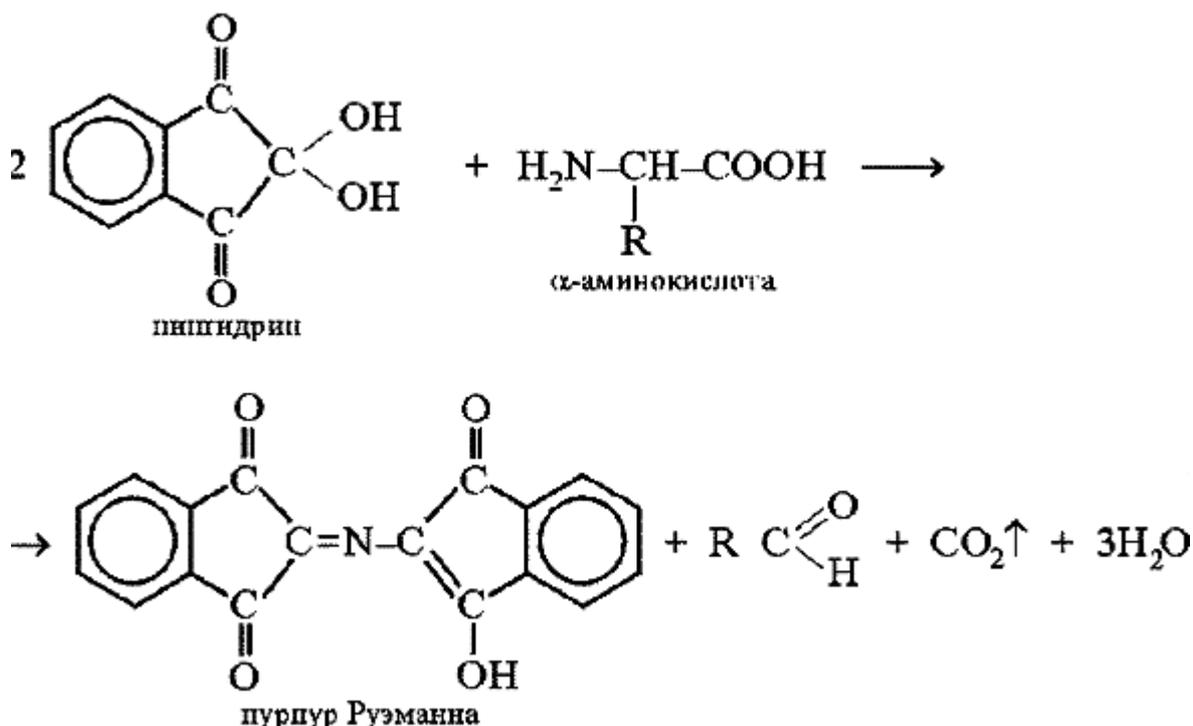
Интенсивность окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе, поэтому биуретовую реакцию можно использовать для определения концентрации белка в растворе.

Опыт 1. К 1 мл 1% раствора яичного белка прибавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, 2-3 капли 1% раствора медного купороса и все перемешивают. Раствор приобретает фиолетовую окраску.

Опыт 2. Небольшое количество кристаллической мочевины поместить в пробирку, расплавить над спиртовкой и продолжать нагревать в течение 1-2 минут. Пробирку охладить, добавить 1-2 мл дист. воды для растворения образовавшегося вещества и проделать с ним биуретовую реакцию. Раствор должен приобрести розовую окраску.

Нингидриновая реакция

Эту реакцию дают все аминокислоты, пептиды, белки, имеющие в α – положении аминогруппы. В результате взаимодействия α - аминокислоты с нингидрином образуется Шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и в присутствии воды расщепляется на альдегид и аминодигидринден.



Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образующееся соединение после енолизации переходит в окрашенную форму, получившую название «сине-фиолетовый комплекс Руэмана». Если реакция протекает в среде с органическими растворителями (спиртом или ацетоном), то продукт этой реакции содержит в своем составе радикал исходной аминокислоты, который и обуславливает различную окраску этого продукта: голубую, красную, синюю, фиолетовую, а в присутствии пролина – желтую.

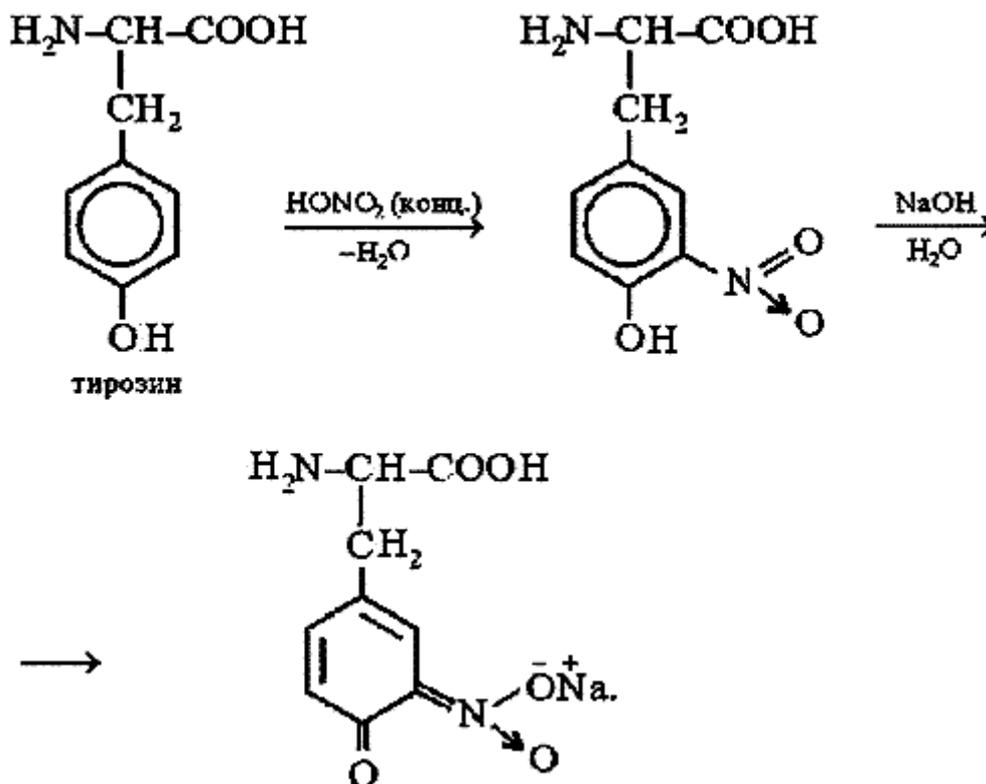
Эта реакция с раствором нингидрина в ацетоне или спирте используется для идентификации аминокислот после хроматографии, для открытия отдельных аминокислот и для определения их количества.

Опыт 3. К 2 мл раствора белка добавляют несколько капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 мин. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

Опыт 4. Аналогичную реакцию проделывают с раствором глицина и пролина, используя раствор нингидрина в ацетоне.

Ксантопротеиновая реакция

При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты появляется желтое окрашивание.



Если к полученному раствору добавить щелочь, то окраска переходит в оранжевую. Этой реакцией можно доказать присутствие в белке ароматических аминокислот: триптофана, тирозина, фенилаланина.

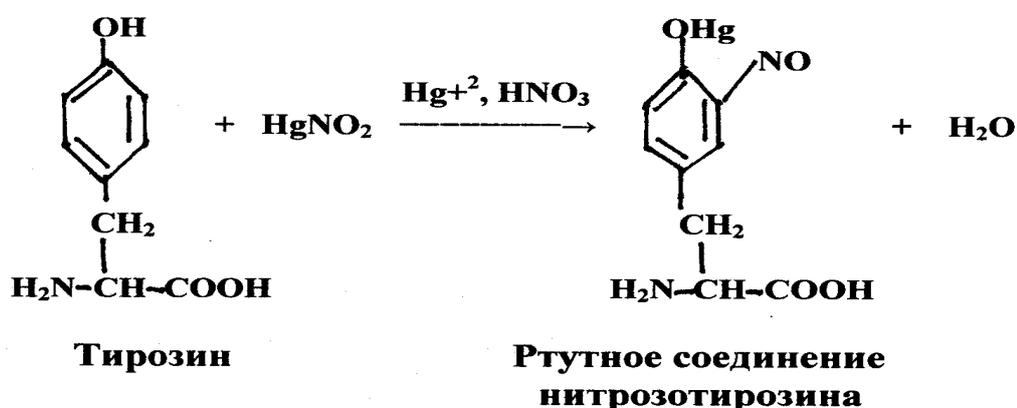
Ксантопротеиновая реакция не является строго специфичной. Так как она обусловлена нитрованием ароматического ядра, то ее дают многие ароматические соединения, не являющиеся аминокислотами, например, фенол.

В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Опыт 5. В одну пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка, а в другую – 2 мл раствора желатина. В обе пробирки добавляют по 1 мл конц. азотной кислоты и нагревают. В первой пробирке образуется желтый осадок, а во второй – очень слабое окрашивание, так как желатин почти не содержит ароматических аминокислот. После охлаждения в каждую пробирку добавляют 20% раствор гидроксида натрия или концентрированный раствор аммиака до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли нитротирозина.

Реакция Миллона

Аминокислота тирозин, а также белки, содержащие в своем составе эту аминокислоту, взаимодействуют с реактивом Миллона, (смесь нитратов и нитритов оксида ртути (I) и (II) в концентрированной азотной кислоте). При кипячении образуется кроваво-красный осадок ртутной соли динитротирозина. Белки, которые не содержат тирозина, такие как желатин, протамины, реакцию Миллона не дают.

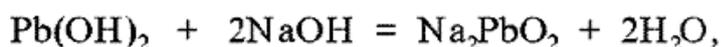
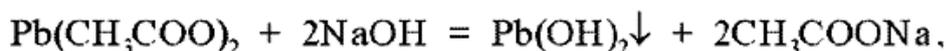
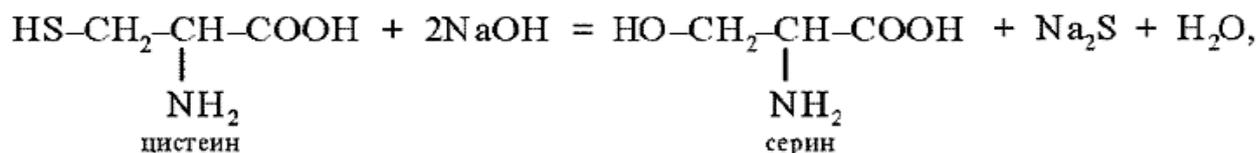


Опыт 6. Реакцию Миллона проделывают с тремя веществами: яичным белком, желатином и фенолом. В первую пробирку добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка, во вторую – 2 мл 0,1% раствора фенола, в третью – 2 мл 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора Миллона и осторожно нагревают. В пробирке с яичным белком появляется кроваво-красное окрашивание, в пробирке с фенолом – красное, а в пробирке с желатином жидкость бесцветна или слегка желтеет.

Реакция на слабосвязанную серу (реакция Фоля)

У белков, содержащих цистеин, при нагревании в щелочной среде происходит гидролиз сульфгидрильных групп с образованием сульфида натрия. Суль-

фид натрия с плюмбитом свинца дает черный или бурый нерастворимый осадок сульфида свинца. Реакция протекает по уравнению:



В аминокислоте метионин сера связана прочно, поэтому метионин в отличие от цистеина этой реакции не дает.

Опыт 7. В пробирку налить 2 мл раствора белка и 2 мл реактива Фоля (к 5% водному раствору ацетата свинца добавляют 30% раствор гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка). Полученный раствор прокипятить, через 1 – 2 минуты появляется черный или бурый осадок сульфида свинца.

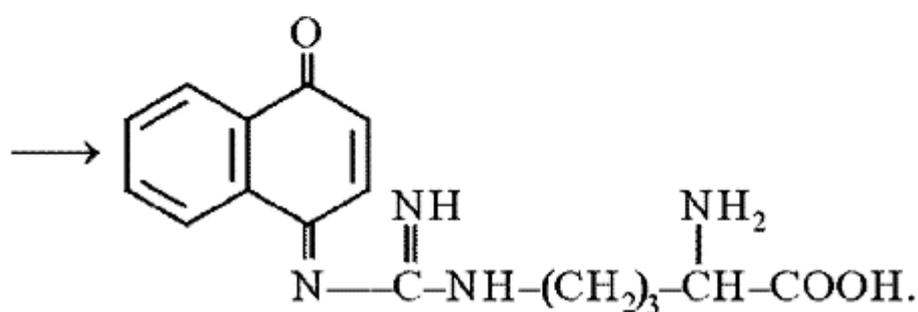
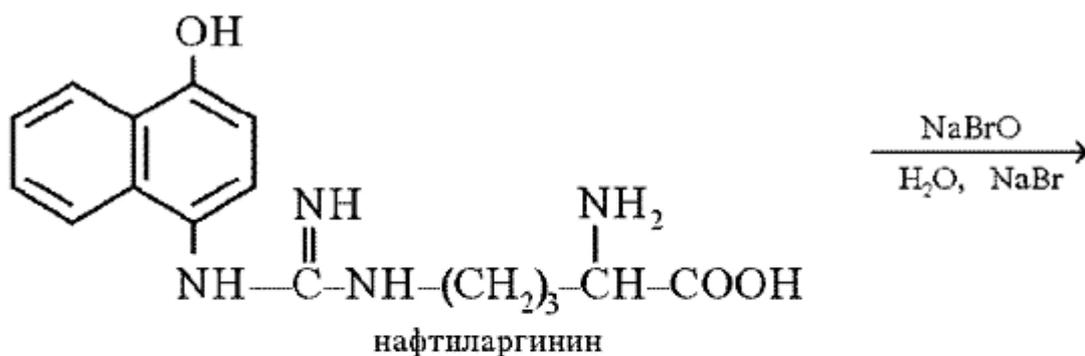
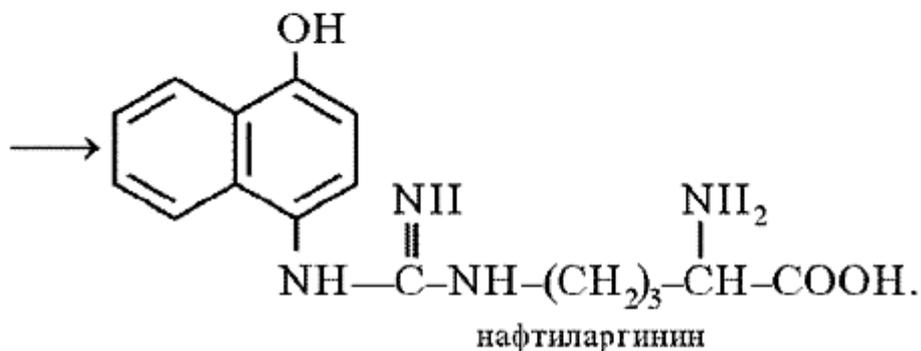
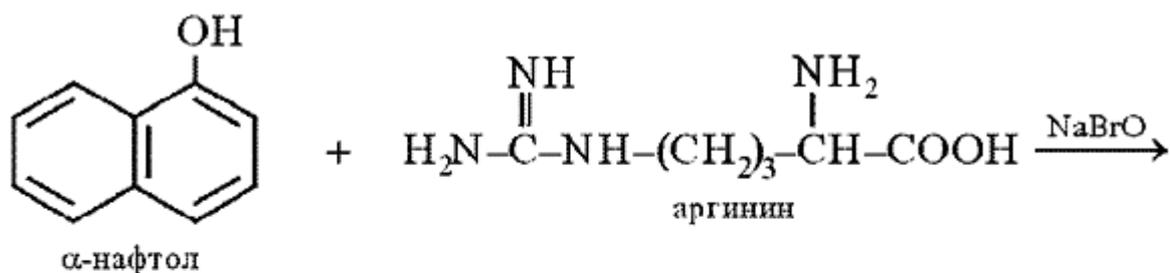
Реакция с нитропруссидом натрия

Эта реакция также позволяет определить наличие в белке цистеина, образующего в сильнощелочной среде при кипячении ион серы. Раствор белка, содержащего цистеин, дает с нитропруссидом натрия красно-фиолетовое окрашивание. Интенсивность окрашивания зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Опыт 8. К 2 мл 1% раствора яичного белка добавляют 2 мл 20% раствора щелочи, кипятят, а после охлаждения приливают 1 мл свежеприготовленного 5% раствора нитропруссиды натрия, после чего появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реакция Сакагучи

Эта реакция позволяет обнаруживать в белке аминокислоту аргинин. При взаимодействии аргинина с гипобромитом в щелочной среде в присутствии α -нафтола гуанидиновая группировка аргинина окисляется гипобромитом и образуется продукт конденсации розово-красного цвета.

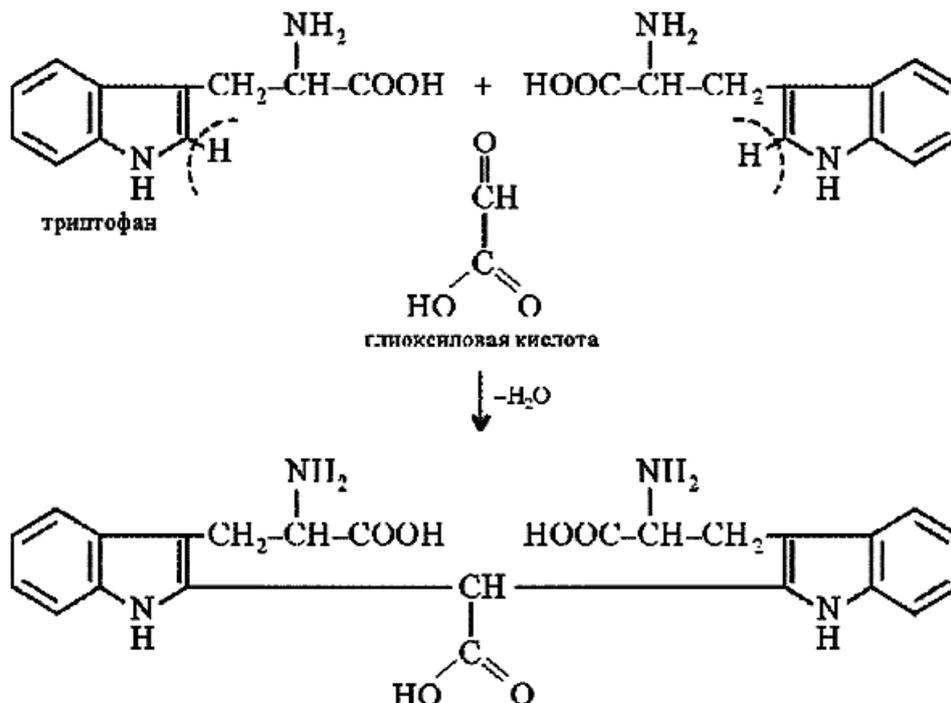


Образующийся нафтиларгинин может далее окисляться гипобромитом натрия с образованием соединения типа хинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH-групп гуанидинового остатка и бензольного ядра α -нафтола.

Опыт 9. Опыт проделывают с яичным белком и со свободным аргинином. В первую пробирку добавляют 2 мл 0,01% раствора аргинина, во вторую – 2 мл раствора яичного белка. В обе пробирки добавляют по 2 мл 10% раствора гидроксида натрия и по 2-3 капли 0,2% спиртового раствора α -нафтола, хорошо перемешивают и приливают в каждую пробирку по 2 мл гипобромита натрия. Для стабилизации быстроразвивающегося розово-красного окрашивания можно добавить 1 мл 40% раствора мочевины.

Реакция на триптофан

Триптофан, реагируя в кислой среде с альдегидами, образует окрашенные продукты конденсации. Например, с глиоксиловой кислотой (являющейся примесью к концентрированной уксусной кислоте) реакция протекает по уравнению:

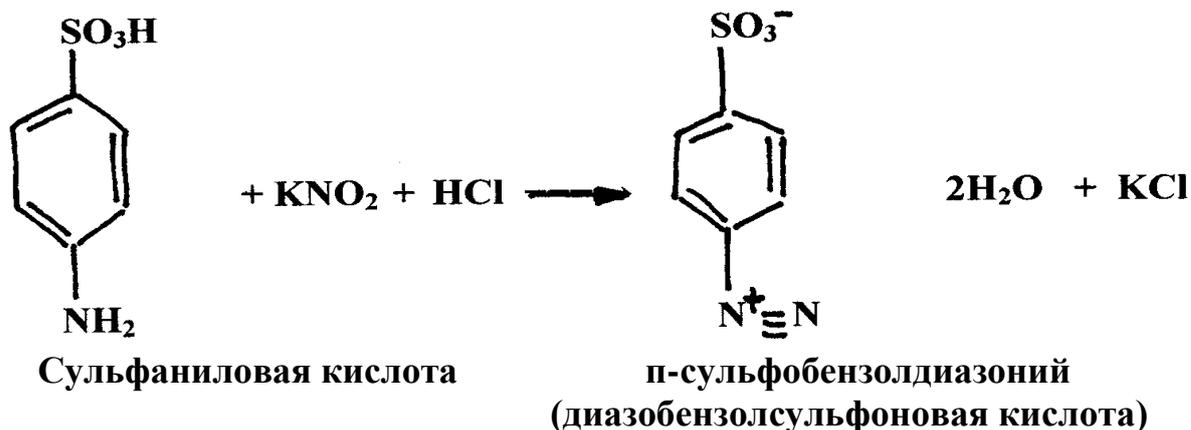


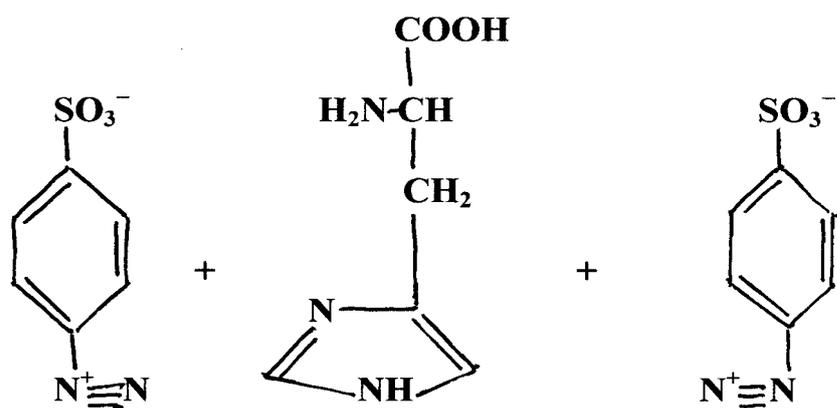
По аналогичной схеме протекает и реакция триптофана с формальдегидом.

Опыт 10. В пробирку наливают 2 мл 0,005% раствора триптофана, добавляют равный объем раствора глиоксиловой кислоты и 1 мл 0,04 М раствора сульфата меди. Осторожно по каплям прибавляют 2 – 3 мл конц. серной кислоты при охлаждении пробирки под струей водопроводной воды или во льду. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре и ставят на 5 мин в кипящую водяную баню. Развивается сине-фиолетовое окрашивание.

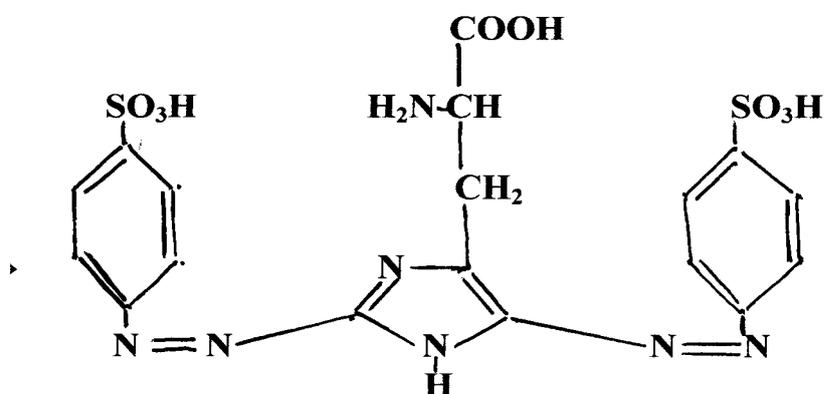
Реакция Паули

При обработке диазореактивом в щелочной среде гистидин и тирозин образуют окрашенное в оранжевый цвет соединение:





Гистидин



2,5 – бис-п-сульфобензолазогистидин

Опыт 11. В одну пробирку вносят 1 мл раствора тирозина, в другую – 1 мл раствора белка. В каждую добавляют по 2 мл диазореактива. (готовится перед опытом, смешиванием в отдельной пробирке 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты и 5% раствора нитрита натрия в соотношении 1:3). После этого в каждую пробирку добавляют 10% раствор углекислого натрия до появления желтой или оранжевой окраски, которая постепенно становится все более интенсивной.

Оформление работы

Оформить работу следует в виде таблицы, в которой привести название реакции, название определяемого вещества, уравнение реакции, условия, при которых следует проводить реакцию, наблюдения и выводы.

Лабораторная работа № 2

Реакции осаждения белков

Реактивы и оборудование: раствор яичного белка, кристаллический сульфат аммония, насыщенный раствор сульфата аммония, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, концентрированные растворы соляной, серной и азотной кислот, 5% раствор трихлоруксусной кислоты, 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 1% раствор медного купороса, 1% раствор ацетата свинца, насыщенный водный раствор фенола, раствор формалина, этиловый спирт, спиртовки пробирки, воронки, бумажные фильтры.

Высаливание белков сульфатом аммония

В водном растворе белков их частицы заряжены и гидратированы, что обуславливает устойчивость белковых растворов. Но при высокой концентрации солей, ионы которых тоже гидратируются, происходит разрушение водных оболочек белковых молекул, и снимается заряд с белковой молекулы адсорбирующимися на ней ионами солей. В результате этих двух процессов белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются друг с другом, укрупняются и выпадают в осадок.

Опыт 1. В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, встряхивают. Выпадает осадок глобулинов. Раствор фильтруют. Одну часть фильтрата нагревают до кипения и наблюдают свертывание альбуминов, находящихся в растворе. К другой части фильтрата добавляют кристаллический сульфат аммония до насыщения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок белков альбуминов. Если понизить концентрацию солей добавлением дистиллированной воды, то осадок альбуминов вновь растворится. Объясняется это тем, что осаждение белков определенными солями является обратимым процессом.

Из приведенного опыта следует, что для высаливания различных белков требуется разная концентрация одной и той же соли.

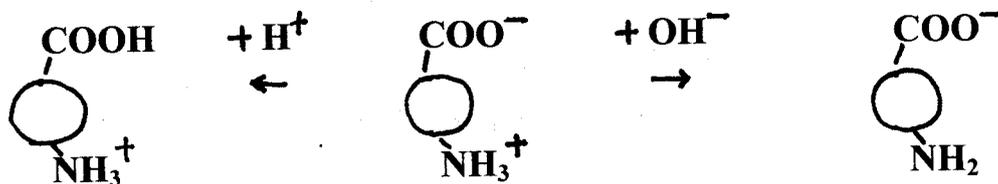
Свертывание белков при нагревании

Практически все белки при нагревании подвергаются денатурации. Но особенно быстро белки денатурируют вблизи их изоэлектрических точек (ИЭТ), то есть при том значении рН, когда суммарный заряд молекулы белка равен нулю. В этих условиях на молекулах белков имеется равное количество отрицательно и положительно заряженных групп. Благодаря этому белковые молекулы быстрее свертываются. ИЭТ яичных белков находится в слабо-кислой среде, поэтому добавление к раствору яичного белка небольшого

количества слабой уксусной кислоты ускоряет свертывание белка при нагревании. Добавление к раствору белка нейтральных солей в кислой среде

облегчает и ускоряет свертывание белков при кипячении благодаря дегидратации белковых молекул.

В кислой среде диссоциация белка по карбоксильным группам подавляется, молекулы заряжаются положительно, а в щелочной среде подавляется ионизация по аминогруппам, белки заряжаются отрицательно. И в том и в другом случае молекулы отталкиваются друг от друга, и осадок не образуется даже при кипячении.



Кислая среда

Нейтральная среда

Щелочная среда

Опыт 2. Наливают в 5 пробирок по 2 мл раствора яичного белка. Раствор в первой пробирке нагревают. Осадок образуется до того, как раствор закипит. Произошла денатурация белка.

Опыт 3. Во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок белка образуется быстрее, так как pH раствора близок его ИЭТ.

Опыт 4. В третью пробирку добавляют 1-2 капли 1% раствора уксусной кислоты и несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Осадок белка образуется быстро. В изоэлектрической точке и в присутствии соли денатурация происходит быстрее, чем в опыте 3.

Опыт 5. В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты и нагревают. В кислой среде все белковые молекулы заряжаются положительно, и осадок белка не образуется даже при кипячении.

Опыт 6. В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия и нагревают. В щелочной среде все белковые молекулы заряжаются отрицательно, и осадок белка не образуется даже при кипячении.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Белки при взаимодействии с концентрированными минеральными кислотами подвергаются необратимой денатурации и выпадают в осадок. В избытке серной и соляной кислот происходит постепенное растворение первоначально выпавших осадков. Избыток азотной кислоты практически не растворяет осадка белка, поэтому для обнаружения белка в исследуемом растворе пользуются азотной кислотой.

Опыт 7. В три пробирки наливают по 2 мл концентрированной азотной, серной и соляной кислот. Затем осторожно по стенке добавляют в каждую пробирку по 1-2 мл раствора яичного белка. Наблюдают образование осадков белков на границе двух жидкостей. При перемешивании осадки, образующиеся при действии соляной и серной кислот, растворяются, а в растворе азотной кислоты осадка образуется еще больше.

Осаждение белков органическими кислотами

Для осаждения белков часто используют органические кислоты, такие как сульфосалициловая и трихлоруксусная. Трихлоруксусная кислота осаждает только белки и не осаждает продукты распада белков и свободные аминокислоты, поэтому ею часто пользуются для полного удаления белков из биологических жидкостей.

Опыт 8. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую несколько капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – несколько капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты. В обеих пробирках наблюдается образование осадков белка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов вызывают необратимую денатурацию белков, образуя с ними нерастворимые в воде соединения. Но при избытке некоторых солей происходит растворение осадка за счет адсорбции ионов солей белковыми частицами. В результате белковые частицы приобретают заряд и вновь растворяются. Растворение осадков денатурированных белков в избытке солей тяжелых металлов называется адсорбционной пептизацией.

Способность белков образовывать с солями тяжелых металлов нерастворимые соединения используется при отравлениях этими солями, когда в качестве противоядия применяют молоко или яичный белок.

Опыт 9. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка. В одну добавляют несколько капель 10% раствора медного купороса, в другую – несколько капель 5% раствора ацетата свинца. В обеих пробирках белки денатурируют. При добавлении в пробирки избытка солей наблюдается растворение образующихся осадков.

Осаждение белков фенолом и формалином.

Опыт 10. Фенол и формалин вызывают необратимую денатурацию белков. В две пробирки наливают по 1 мл раствора белка. В первую добавляют 1 мл насыщенного раствора фенола, а во вторую добавляют 1 мл раствора формалина. В пробирке, куда добавлен фенол, осадок образуется быстрее.

Осаждение белков спиртом

Опыт 11. Спирт вызывает дегидратацию молекул белка, вследствие чего происходит снижение устойчивости белковых молекул и денатурация белка. В пробирку наливают 2 мл раствора белка и осторожно по стенке пробирки наливают этиловый спирт так, чтобы он наслоился на белковый раствор. На границе двух жидкостей можно наблюдать белое кольцо денатурированного белка.

Оформление работы

Опыты с 1 по 6 приводят полностью с объяснениями, а результаты опытов с 7 по 11 можно оформить в виде таблицы, в которой в первой колонке указывают белок, который используется в опыте, во второй колонке указывается вещество, которое используется для осаждения, в третьей колонке описываются наблюдаемые изменения, в четвертой – дополнительные замечания.

Лабораторная работа № 3

Разделение белков мышечной ткани методом диализа и высаливания

Реактивы и оборудование: мышечная ткань, 10% раствор хлорида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, кристаллический хлорид натрия, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, центрифуга, ступки, фильтры бумажные, пробирки, воронки, стаканчики или колбочки на 50 или 100 мл, стеклянные палочки и трубочки, цилиндры, марля, целлофановые мешочки, нитки, стаканы для диализа.

Высаливание – обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью больших концентрация нейтральных солей: хлорида натрия, сульфата аммония, сульфата магния. При действии солей белковые частицы дегидратируются и быстрее выпадают в осадок. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд молекулы, в связи с чем для высаливания разных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей.

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природных объектах белками. Обычно они встречаются вместе, и отделение их друг от друга основано на различной их растворимости в воде и в различных по концентрации растворах минеральных солей.

Альбумины растворимы в воде и в крепких растворах солей (осаждаются лишь при более чем 50%-ом насыщении раствора солью), глобулины растворимы лишь в растворах солей средней концентрации (8–15%). В растворах с более высокой и более низкой концентрацией соли растворимость глобулинов уменьшается.

В мышечной ткани помимо альбуминов (растворимых в воде) и глобулинов (растворимых в солях средней концентрации) можно выделить белок миозин (основной сократительный фибриллярный белок мышечных волокон), актин – глобулярный белок. Эти два белка, а также еще тропонин и тропомиозин непосредственно участвуют в акте сокращения мышц. В мышечной ткани еще выделяют нерастворимые в воде и солях белки стромы – коллаген, эластин и другие.

Очень часто при очистке белков возникает необходимость в удалении из растворов белков низкомолекулярных примесей. Удалить такие примеси можно с помощью диализа. Этот метод основан на неспособности крупных частиц белка проникать через поры полупроницаемых мембран искусственного или естественного происхождения. Напротив, мелкие молекулы или ионы свободно проходят через них.

Приборы, служащие для диализа, называются диализаторами. Простейшим диализатором может служить мешочек из целлофана или коллодия, помещенный в стакан с дистиллированной водой. Для более полного и быстрого осуществления диализа необходимо, чтобы вода в стакане была проточной или периодически заменяться свежей. Ускоряет диализ применение магнитной мешалки для перемешивания воды в стакане, а также электродиализ.

Опыт 1. В ступке хорошо растирают 5 г мышечной ткани до образования однородной кашицы. Кашицу переносят в стаканчик или колбу и наливают 20 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают. При этом в раствор переходят альбумины, так как они в воде хорошо растворимы. С помощью марли отфильтровывают кашицу, и фильтрат дополнительно центрифугируют для удаления всех нерастворимых частиц мышечной ткани и белков. Осадок белков сохраняют для последующих опытов, а к центрифугату добавляют кристаллический хлорид натрия до насыщения, альбумины при этом выпадают в осадок. Раствор с осадком альбуминов подвергают диализу.

Для диализа используют целлофановый мешочек длиной 10 см. Смачивают его водой, нижний конец завязывают ниткой. Через верхний конец мешочка вносят раствор с осадком альбуминов, стараясь не переносить в мешочек осадка хлорида натрия. В верхний конец вставляют стеклянную трубочку длиной 10-15 см, так, чтобы нижний конец трубочки был погружен в мешочек на 5-6 см. Мешочек прочно привязывают к стеклянной трубке.

К полученному диализатору привязывают в том же месте, но горизонтально другую стеклянную трубочку длиной 10-15 см, и в таком виде диализатор опускают в стакан с дистиллированной водой. Уровень воды в стакане не должен доходить до верхнего края мешочка. Мешочек не должен касаться стенок и дна стакана. Стакан с мешочком помещают на магнитную мешалку без нагревания и ведут диализ, периодически сменяя воду и проводя пробы на хлорид-ионы с помощью нитрата серебра.

Диализ будет завершен, когда проба на хлорид-ион станет отрицательной. Поскольку высаливание белков нейтральными солями процесс обратимый, то при диализе альбумины должны вновь перейти в раствор, так как в воде они хорошо растворимы. По окончании диализа раствор из мешочка переносят в пробирку и с раствором альбуминов прodelывают биуретовую реакцию.

Опыт 2. К оставшейся кашице из опыта 1 добавляют 20 мл 10% раствора хлорида натрия и хорошо перемешивают. При этом происходит экстракция глобулинов. Раствор с кашицей отфильтровывают через марлю. В фильтрате будут находиться глобулины, а в осадке на марле – белки стромы. С осадком белков стромы и с небольшой частью фильтрата прodelывают биуретовую реакцию. Оставшийся фильтрат делят на две пробирки.

К одной части фильтрата добавляют равный объем насыщенного раствора хлорида натрия, получается полунасыщенный раствор, в котором выпадает осадок глобулинов. К другой части центрифугата добавляют порошок хлорида натрия до полного насыщения, при этом образуется осадок миозина.

Оформление работы

Составляют схему выделения всех белков мышечной ткани, а также таблицу, в которой указывают условия, при которых тот или иной белок находится в растворе или в осадке.

Для оформления опыта по диализу приводят рисунок диализатора.

Лабораторная работа № 4

Определение изоэлектрической точки казеина и желатина

Реактивы и оборудование: 0,1 М, 0,2 М и 1 М растворы уксусной кислоты, 0,4 % раствор казеина в 0,2 М растворе ацетата натрия, 0,1 М раствор ацетата натрия, 1% раствор желатина, 96% этанол или ацетон, штативы, пробирки, фотоэлектроколориметр, кюветы, пипетки на 5 и 10 мл.

Изоэлектрической точкой белка называется величина рН среды, при которой суммарный электрический заряд белка равен нулю. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы, нейтральные молекулы белка легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами.

Опыт 1. Для определения изоэлектрической точки казеина в 7 сухих пробирок наливают последовательно реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 1.

Таблица 1

№ пробирок	Уксусная кислота, 0,2 М р-р, мл	Вода, мл	0,4% р-р казеина в 0,2 М р-ре ацетата натрия, мл	рН смеси
1	4,8	1,2	0,6	3,8
2	2,4	3,6	0,6	4,1
3	1,2	4,8	0,6	4,4
4	0,6	5,4	0,6	4,7
5	0,3	5,70	0,6	5,0
6	0,18	5,82	0,6	5,3
7	0,09	5,91	0,6	5,6

Растворы тщательно перемешивают. Казеин – гидрофобный белок, не имеет водной оболочки, менее устойчив и поэтому через 5-10 минут наблюдается помутнение растворов. Наибольшее помутнение наблюдается в той пробирке, где рН соответствует изоэлектрической точке казеина.

Если визуально определить пробирку с максимальным помутнением не удастся, следует использовать фотоэлектроколориметр. С помощью фотоэлектроколориметра нужно провести определение процента пропускания света (Т%) приготовленными растворами, мутность которых объясняется образованием осадков белков в виде стабильной суспензии.

Для этого за 15-20 мин до работы включают прибор, в дальнее кюветное отделение ставят кювету с дистиллированной водой, а в ближнее отделение ставят кювету с анализируемым раствором. Сначала свет пропускают через воду, стрелку прибора с помощью грубой и тонкой регулировки ставят на 100% пропускания света. Потом против пучка света ставят кювету с анализируемым раствором, определяют и записывают показания стрелки прибора (процент пропускания света).

Аналогичным образом определяют % пропускания света во всех пробирках. Пробирка, в которой пропускание света будет минимальным, соответствует изоэлектрической точке белка.

Опыт 2. Для определения изоэлектрической точки желатина в 6 сухих пробирок последовательно наливают реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 2.

Содержимое каждой пробирки перемешивают и затем во все пробирки медленно по стенке добавляют по 2 мл 96% этанола (или ацетона). Желатин – белок гидрофильный, обладающий двумя факторами устойчивости: зарядом и водной оболочкой. Спирт понижает устойчивость белка.

Таблица 2

№ пробирки	Вода, мл	Уксусная кислота, 0,1 М р-р мл	Уксусная кислота, 1М р-р, мл	Ацетат натрия, 0,1 М р-р, мл	Желатин, 1% р-р, мл	рН среды
1	3,8	0,8	-	2,0	2,0	5,6
2	3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3	3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
4	2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
5	-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
6	3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

Через 30 минут определяют изоэлектрическую точку желатина. Она будет соответствовать рН пробирки с максимальной степенью помутнения. В случае, если визуально определить пробирку с максимальной степенью помутнения не удастся, можно использовать фотоэлектроколориметр для определения процента пропускания света.

Оформление работы

Результаты опытов представляют на графиках, на которых по оси абсцисс откладывают значения рН, а по оси ординат откладывают обратные проценту пропускания света значения ($1/T$). Максимум на графиках будет соответствовать изоэлектрической точке казеина и, соответственно, изоэлектрической точке желатина.

Лабораторная работа № 5

Разделение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Реактивы и оборудование: Бутанол, ледяная уксусная кислота, стандартная смесь растворов аминокислот-свидетелей лизина, глицина, фенилаланина, 0,1 М растворы фенилаланина, глицина, лизина, 1% раствор нингидрина в ацетоне или в 96% этиловом спирте, хроматографические камеры, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, микропипетки, делительные воронки, колбы или стаканы на 50 мл, цилиндры мерные, линейки, ножницы, простые карандаши, иголки швейные, нитки, пластилин, стеклянные пластинки, сушильный шкаф или электрические плитки, пульверизатор или чашки Петри для проявления хроматограмм, таблицы со значениями R_f .

Изучение аминокислотного состава различных биологических тканей представляет собой важную задачу. В настоящее время для анализа амино-

кислот с успехом применяются различные виды хроматографии, в том числе и распределительной.

Метод распределительной хроматографии на бумаге используется для разделения смесей разнообразных органических веществ, и основан он на различной растворимости веществ в разных несмешивающихся растворителях.

Если какое-нибудь растворенное вещество распределено между равными объемами двух несмешивающихся жидкостей, то отношение его концентраций в этих двух фазах в состоянии равновесия при данной температуре называют коэффициентом распределения.

$$\frac{\text{Концентрация вещества в растворителе 1}}{\text{Концентрация вещества в растворителе 2}} = \text{const (при данной } t)$$

Разделение веществ происходит вследствие различия в распределении их между двумя жидкими фазами, одна из которых подвижна, а другая – нет. Хроматографическая бумага обладает свойством поглощать воду из воздуха и задерживать ее между своими целлюлозными волокнами. Эту воду можно рассматривать как один из растворителей: она представляет собой неподвижную фазу. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движется неводный растворитель (подвижная фаза), молекулы вещества, нанесенного на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по бумаге с растворителем и наоборот.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу соединением в направлении движения растворителя, характеризуется величиной R_f (коэффициент подвижности) и определяется следующим отношением:

$$\frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным соединением}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}} = R_f$$

В стандартных экспериментальных условиях эта величина является для данного соединения постоянной и соответствует его коэффициенту распределения. Чем больше различие в величинах R_f разделяемых веществ, тем лучше их разделение.

Хроматографирование на бумаге можно проводить восходящим и нисходящим способом. В первом случае разделение веществ происходит по мере движения растворителя под действием капиллярных сил вверх, во втором – под действием капиллярных сил и силы тяжести. Первый вид хроматографии из-за простоты используется чаще, однако скорость движения при нисходящей хроматографии значительно выше.

Для определения расположения аминокислот после хроматографии бумагу высушивают, просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают раствором нингидрина и нагревают.

Все операции с бумагой проделывают тщательно вымытыми руками или в перчатках. В противном случае после проявления на бумаге выступает много пятен, не относящихся к аминокислотам, выделенным из биологического материала.

Подготовка растворителя и хроматографической камеры

Для хроматографии используется специальная или приспособленная стеклянная камера с плоским ровным дном. На дно камеры наливается бутаноловый растворитель в таком количестве, чтобы на дне камеры образовался слой высотой 7 – 10 мл. Он готовится смешиванием бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5. Жидкости помещают в делительную воронку, осторожно встряхивают и дают отстояться образовавшейся эмульсии. Нижний слой сливают через кран делительной воронки, а верхний слой используют для дальнейшей работы.

Разметка бумаги и нанесение на нее растворов

Берут лист хроматографической бумаги, соответствующий размерам хроматографической камеры. По высоте он должен быть на 1 см ниже верхнего края камеры, а по ширине – не касаться стенок камеры. На расстоянии 2 см от одного из узких концов листа бумаги простым карандашом проводят линию старта и на ней карандашом отмечают места нанесения аминокислот – свидетелей и идентифицируемых аминокислот. На другом конце бумаги в центре иголкой прокалывают отверстие и пропускают через него нитку, с помощью которой лист бумаги будет закрепляться в хроматографической камере. На этом же конце бумаги карандашом пишется фамилия студента.

В качестве аминокислот – свидетелей берут смесь растворов аминокислот, например, лизина, глицина и фенилаланина. Для идентификации берут растворы тех же аминокислот, но приготовленных по отдельности и не подписанных (готовятся перед опытом лаборантом или преподавателем). Микропипеткой в одно отмеченное место наносят каплю смеси растворов аминокислот – свидетелей, а в другое – каплю идентифицируемой аминокислоты. Диаметр пятна не должен превышать 1 см. Бумагу держат на воздухе до полного высыхания пятен. В место, куда наносят идентифицируемую аминокислоту, можно нанести каплю раствора другой аминокислоты, но только после полного высыхания первой.

Хроматографическую камеру ставят в отведенное место. Листок бумаги с нанесенными аминокислотами осторожно опускают в камеру с растворителем почти до дна и закрепляют листок в подвешенном состоянии с помощью нитки,

концы которой можно закрепить кусочками пластилина. Растворителя в камере должно быть столько, чтобы он не касался нижнего края пятен нанесенных растворов. Необходимо проследить, чтобы бумага нигде не касалась стенок камеры. Камеру сверху накрывают стеклом. Хроматографирование проводят в течение нескольких часов до достижения фронтом растворителя верхнего края бумаги. После этого бумагу вынимают, карандашом отмечают фронт растворителя и оставляют сушить на воздухе.

Проявление хроматограммы и идентификация аминокислот

Высушенную хроматограмму проявляют под тягой раствором нингидрина, равномерно смачивая этим раствором ее поверхность. Для этого используют кисточку из ваты или пульверизатор. При проявлении нельзя класть хроматограмму на стол, она должна находиться «на весу». Нельзя брать за смоченную поверхность руками, остаются отпечатки пальцев. Пропитанную хроматограмму помещают в сушильный шкаф на 15 мин при 70° С или держат ее над горячей плиткой до полного проявления.

Аминокислоты обнаруживаются в виде сине-фиолетовых пятен. Идентификацию аминокислот проводят по совпадению на хроматограмме положения анализируемых аминокислот и аминокислот-свидетелей.

Аминокислоты – свидетели будут располагаться в следующем порядке: нижнее пятно соответствует лизину, среднее – глицину, верхнее – фенилаланину. Аминокислоты, располагающиеся на одном уровне, являются идентичными. Определение аминокислот можно осуществить и по значению R_f . Для этого измеряют расстояние от линии старта до линии фронта растворителя (В) и расстояние от старта до центра пятна идентифицируемой аминокислоты (А). Отношение A/B дает значение R_f для данной аминокислоты в данном растворителе.

В справочной литературе содержатся сведения по коэффициентам R_f для многих веществ, разделяемых в различных системах растворителей (Справочник биохимика, с. 912).

Оформление работы

Записывают в тетради порядок выполнения работы с краткими пояснениями, рассчитывают значения R_f для каждой аминокислоты, указывают, какая аминокислота находилась в анализируемом растворе, хроматограмму приклеивают в тетрадь.

Лабораторная работа № 6

Определение концентрации белка колориметрическим методом по биуретовой реакции

Реактивы и оборудование: кристаллический яичный альбумин, куриные и перепелиные яйца, 0,2% раствор гидроксида натрия, биуретовый реактив (1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 6 г сегнетовой соли $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 300 мл воды, затем при помешивании добавляют 300 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 г йодида калия для предотвращения самопроизвольного восстановления, объем доводят водой до 1 л. Раствор не подлежит длительному хранению), штативы с пробирками, пипетки, мерные цилиндры, мерные колбы на 100 мл, фотоэлектроколориметр КФК-2, воронки, фильтры бумажные

Колориметрический метод исследования широко применяется в лабораторной практике для количественного определения веществ в биологических объектах. В основе колориметрического метода лежит закон Ламберта – Меера - Бера, согласно которому существует прямая пропорциональная зависимость между концентрацией вещества в окрашенном растворе и степенью поглощения лучей света данным раствором.

Интенсивность поглощения света зависит не только от количества и природы растворенного вещества, но и от толщины слоя раствора, длины волны падающего света, температуры раствора.

Степень поглощения света окрашенным раствором выражается оптической плотностью (экстинкцией), под которой понимают отношение интенсивности света, падающего на раствор, к интенсивности света, прошедшего через раствор.

Величина оптической плотности обозначается буквой E или D . Чем больше оптическая плотность, тем меньше света пропускает раствор, то есть между оптической плотностью и светопропусканием существует обратная пропорциональная зависимость.

Для определения плотности или светопропускания используют спектрофотометры и фотоэлектрические концентрационные колориметры.

Определение концентрации вещества в растворе по оптической плотности

Для определения концентрации вещества в окрашенном растворе необходимо построить калибровочную кривую. С этой целью готовят ряд растворов исследуемого вещества с известными концентрациями (стандартные растворы) и измеряют на ФЭКе их оптическую плотность. Полученные результаты отражают графически: откладывают по оси абсцисс концентрации, а по оси ординат соответствующую им оптическую плотность.

Измерив оптическую плотность исследуемого раствора, нетрудно найти концентрацию вещества по калибровочной кривой.

Опыт 1. Построение калибровочной кривой

Белки в щелочной среде реагируют с сульфатом меди с образованием комплексных соединений, окрашенных в сине-фиолетовый или красно-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе.

Заранее готовят стандартный раствор белка, растворяя 400 мг растертого в порошок яичного альбумина в 100 мл 0,2% раствора гидроксида натрия. Для построения калибровочной кривой в семь пробирок вносят стандартный раствор белка и дистиллированную воду в указанном в таблице объемном соотношении, в результате чего получают серию растворов с увеличивающейся концентрацией белка.

Во все пробирки, включая контроль, добавляют по 2,5 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут для развития окраски.

Окрашенные стандартные растворы фильтруют для удаления осадка гидроксида меди и колориметрируют на ФЭКе против контроля в кюветах (1 см) на 5 мл с зеленым светофильтром (длина волны 540 нм, светофильтр № 6) или на спектрофотометре..

Полученные значения оптической плотности записывают в таблицу и используют для построения калибровочной кривой.

Таблица 1

№ проб	Стандартный раствор белка, мл	H ₂ O, мл	Биуретовый реактив, мл	Содержание белка в пробе, мг	Д
1	0,25	1,75	2,5	1,0	
2	0,50	1,50	2,5	2,0	
3	0,75	1,25	2,5	3,0	
4	1,00	1,00	2,5	4,0	
5	1,25	0,75	2,5	5,0	
6	1,50	0,50	2,5	6,0	
7	1,75	0,25	2,5	7,0	
Контроль	-	2,00	2,5	-	-

Опыт 2. Количественное определение белка в куриных и перепелиных яйцах.

Белок отделяют от желтка, помещают в мерный цилиндр, измеряют объем белка и разводят дистиллированной водой в 10 раз. Полученный раствор используют для приготовления опытных растворов.

Поскольку концентрация белка в полученном растворе неизвестна, необходимо приготовить серию пробирок с растворами белка с различным разведением. Если раствор белка будет слишком концентрированным или, наоборот,

слишком разбавленным, оптическая плотность такого раствора с биуретовым реактивом, будет либо очень большой, либо очень маленькой, то есть будет иметь те значения, где нарушается закон пропорциональности оптической плотности и концентрации поглощающего вещества.

Приготовление опытных растворов проводят, как указано в таблице 3. Растворы перемешивают, оставляют на 30 минут, после чего фильтруют через влажный бумажный фильтр и колориметрируют так же, как и при построении калибровочной кривой.

Полученные значения оптической плотности записывают в таблицу. Найденное значение оптической плотности исследуемого раствора отмечают на оси ординат, проводят прямую линию до пересечения с калибровочной кривой и опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения укажет значение концентрации белка в исследуемом растворе. Данные записывают в таблицу. На основе полученных данных определяют содержание белка в куриных и перепелиных яйцах с учетом разведения. Известно, что содержание белка в целых куриных яйцах составляет 12,7%.

Таблица 2

№ проб	Раствор куриного или перепелиного белка, разведенного в 10 раз, мл	H ₂ O, мл	Биуретовый реактив, мл	Д	Содержание белка в пробе, мг
1	2,0	-	2,5		
2	1,0	1,0	2,5		
3	0,5	1,5	2,5		
4	0,25	1,75	2,5		
5	-	2,0	2,5		

Оформление работы

В тетрадь записывают:

1. Основы метода определения концентрации белка.
2. Порядок выполнения опыта по построению калибровочной кривой.
3. Результаты определения оптической плотности стандартных растворов и построенную на основе этих данных калибровочную кривую.
4. Результаты определения концентрации белка в опытных растворах по калибровочной кривой.
5. Данные по содержанию белка в куриных и перепелиных яйцах, рассчитанные на основе полученных результатов и с учетом разведения растворов.

Лабораторная работа № 7

Качественные реакции на витамины

Реактивы и оборудование: Витамины: ретинол, эргокальциферол, токоферол, тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота; ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II), концентрированная серная, соляная и азотная кислоты, раствор анилина в концентрированной соляной кислоте, бром в хлороформе (1:60), раствор хлорида железа (III), раствор красной кровяной соли, изобутиловый спирт, раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, металлический цинк, раствор метиленовой сини, 10% раствор соляной кислоты, штативы, пробирки, водяная баня, спиртовки, держатели для пробирок, флюороскоп.

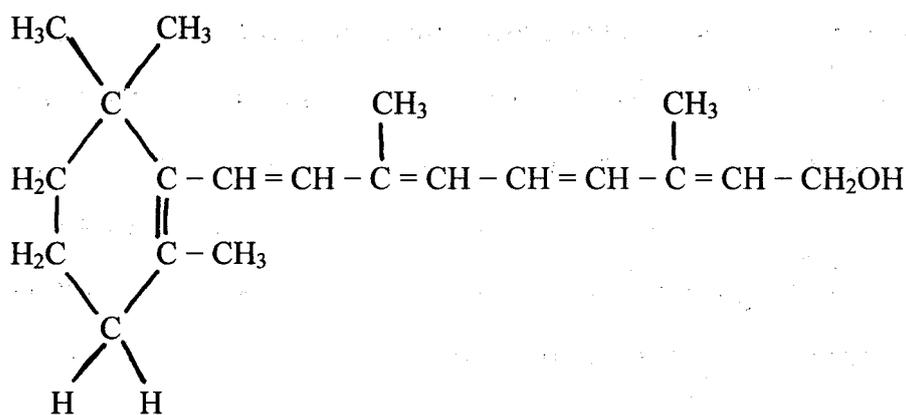
В 1880 году русский ученый Н.И.Луниин установил, что для нормальной жизнедеятельности организма необходимы небольшие количества каких-то важных веществ, которые впоследствии польским ученым К. Функом были названы витаминами. Многие витамины входят в состав биологических катализаторов – ферментов, некоторые витамины действуют самостоятельно, другие выступают как активаторы ферментов. Был сделан вывод, что недостаток или отсутствие того или иного витамина приводит к нарушению обмена веществ в организме.

В настоящее время известно более 30 витаминов. Все они имеют различный состав и строение, обладают разнообразными физико-химическими свойствами. Все витамины делят на жирорастворимые и водорастворимые, что объясняется наличием в их составе неполярных и полярных группировок. Витамины вступают в разнообразные химические реакции, с помощью которых можно проводить их качественное и количественное определение.

Суточная потребность в витаминах мала: от десятых и сотых долей мг до нескольких мг. И только потребность в витамине С составляет около 1 мг на каждый кг массы тела.

Ретинол - витамин А.

Этот витамин относится к жирорастворимым витаминам и состоит из нескольких витамеров. Все витамеры являются производными каротинов и образуются только в организме животных. Каротины содержатся в овощах (перец, томаты, морковь, листовая зелень), витамин А - в сливочном масле, яичном желтке, печени, рыбьем жире. Недостаток витамина А вызывает нарушение роста, ослабление зрения (куриная слепота), поражение эпителиальных тканей (сухость, ксерофтальмия). Витамин А легко разрушается, особенно при нагревании. Суточная потребность человека в витамине А составляет 2,5 мг.



Ретинол – витамин А₁

Опыт 1. Реакция с сульфатом железа (II).

2-3 капли раствора витамина А помещают в сухую пробирку, добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), и несколько капель концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, быстро переходящее в красное.

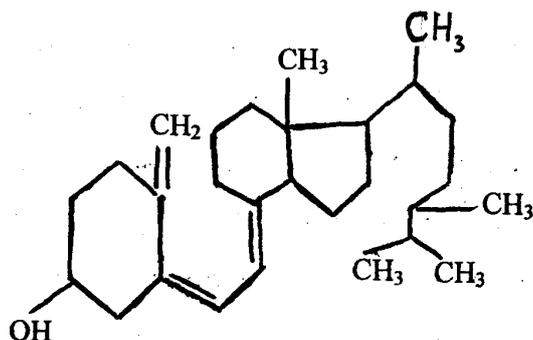
Опыт 2. Реакция Друммонда. 2-3 капли раствора витамина А помещают в пробирку, быстро добавляют 1 мл хлороформа и 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Появляется красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Кальциферол - витамин Д.

Витамин Д относится к стероидам и является производным циклопентано-пергидрофенантрена. Витамины группы Д существуют в виде нескольких витаминеров. Наиболее распространенными являются витамин Д₂ – эргокальциферол и витамин Д₃ – холекальциферол.

Отсутствие этого витамина в пище приводит к возникновению рахита, что связано с нарушением нормального отложения фосфорнокислого кальция в костной ткани. Витамин Д₃ образуется в коже в организме человека из провитамина 7-дегидрохолестерола под действием ультрафиолетового излучения. Недостаток витамина Д проявляется у детей в виде поражения костной, мышечной и нервной систем (искривление костей нижних конечностей, деформация грудной клетки – «птичья грудь»), а у взрослых – в виде остеомаляции и остеопороза, возникающих вследствие вымывания из костей солей кальция и фосфора.

Витамин Д содержится в рыбьем жире, сливочном масле, желтке яйца, печени животных, молоке. Суточная потребность человека в витамине Д составляет 0,0025 мг.



Витамин D₂ – эргокальциферол

Опыт 3. Бромхлороформная проба

В сухую пробирку вносят 2-3 капли витамина Д и 1 мл раствора брома в хлороформе (1:60). В присутствии витамина Д постепенно появляется зелено-вато-голубое окрашивание.

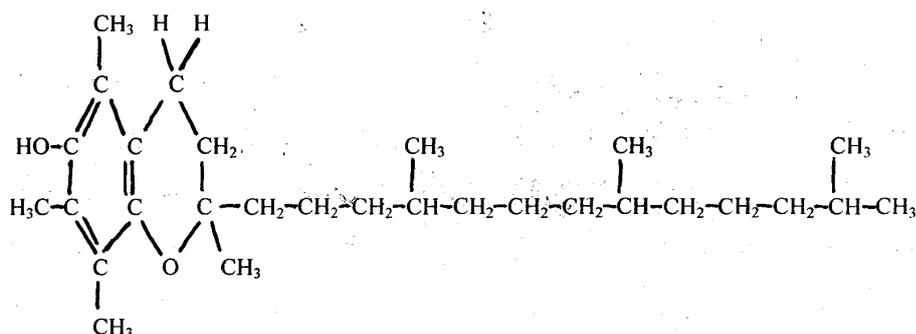
Опыт 4. Реакция с анилином

В сухую пробирку вносят 2-3 капли витамина Д, 1 мл хлороформа, а затем осторожно при помешивании 0,5 мл анилинового реактива. Осторожно кипятят. При наличии витамина Д желтая эмульсия приобретает сначала зеленый, а затем красный цвет.

Токоферол - витамин Е.

Витамин Е представлен несколькими витамерами, получившими название α -, β - и γ - токоферолов. Он устойчив к нагреванию и действию кислот, разрушается под действием ультрафиолетовых лучей. Необходим для нормального развития эмбриона в организме матери, регулирует нормальное функционирование и структуру многих тканей, является самым сильным природным антиоксидантом, прежде всего липидов. При Е – авитаминозе развивается мышечная дистрофия, дегенерация спинного мозга, паралич конечностей, нарушается эмбриогенез.

Источники витамина Е – растительные масла, зародыши злаков, зеленые листья растений. Суточная потребность в витамине Е у человека составляет 15 мг.



Витамин Е – α-токоферол

Опыт 5. Реакция с концентрированной азотной кислотой.

В пробирку помещают 4-5 капель витамина Е, добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и перемешивают. Образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается: маслянистый верхний слой приобретает красную окраску. Окрашивание обусловлено окислением α – токоферола в токоферилхинон. Если окраска не появляется, необходимо осторожно нагреть пробирку.

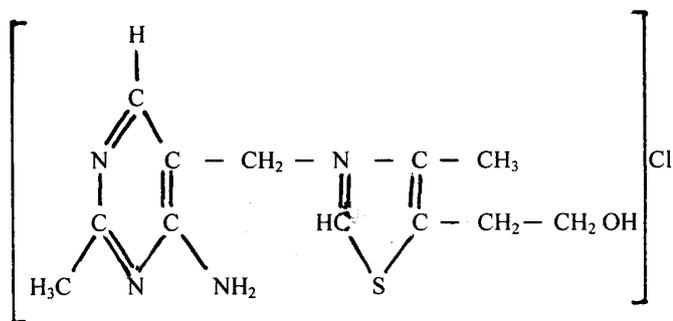
Опыт 6. Реакция с хлоридом железа (III).

В сухую пробирку помещают 3-4 капли витамина Е, добавляют 0,5 мл хлорида железа (III), перемешивают. Раствор окрашивается в красный цвет вследствие окисления токоферола в токоферилхинон. Если окраска не образуется, осторожно нагревают пробирку.

Тиамин - витамин В₁

Этот витамин относится к водорастворимым витаминам, представляет собой мелкие бесцветные кристаллы горького вкуса. Устойчив при нагревании в кислой среде, но легко разрушается в щелочной среде. Этот витамин входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы, катализирующего декарбоксилирование пировиноградной кислоты. При недостатке этого витамина происходит накопление в организме пировиноградной кислоты, являющейся сильным ядом для нервной системы. Развивающееся при этом заболевание получило название «бери-бери», или полиневрит, которое проявляется в прогрессирующей дегенерации нервных окончаний и проводящих пучков. Это приводит к потере кожной чувствительности нарушению моторики желудочно-кишечного тракта, сердечным болям и, в конечном итоге, к параличу и смерти.

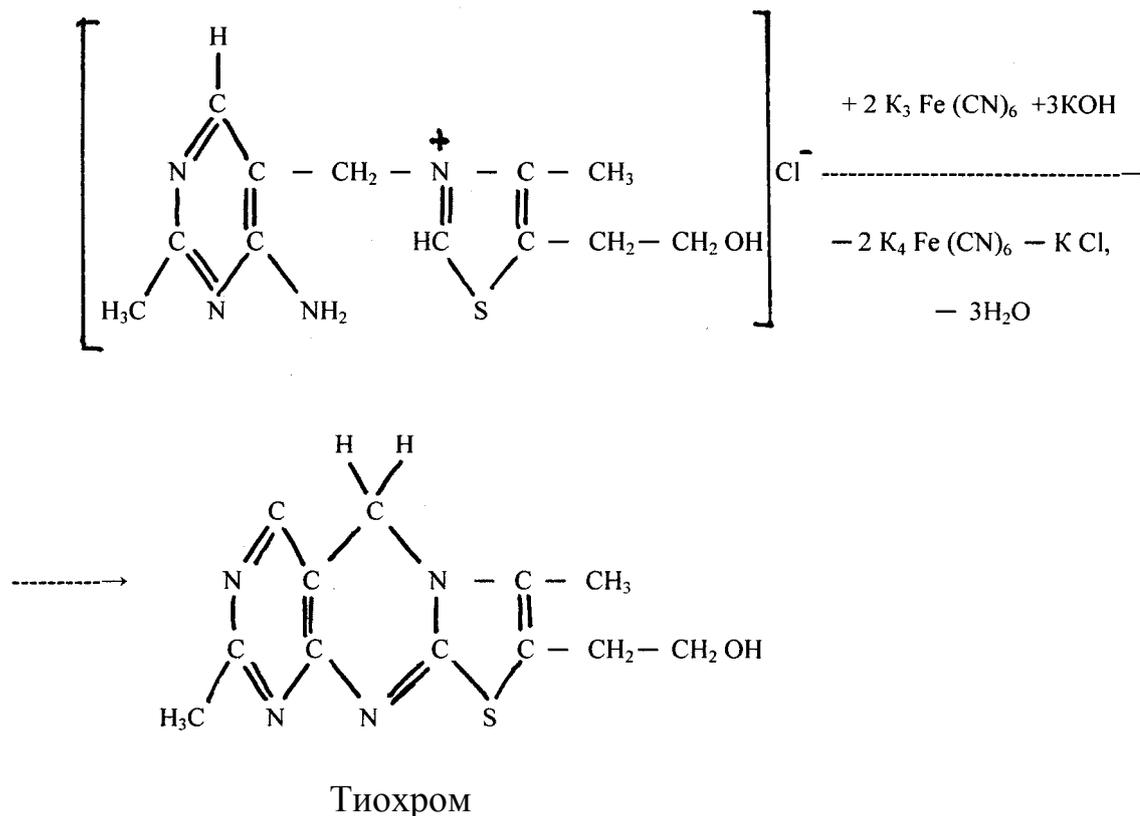
Источником этого витамина для человека являются хлеб, особенно черный, крупы, внутренние органы животных, дрожжи. Суточная потребность в этом витамине у человека составляет 2 мг.



Витамин В₁ - тиамин

Опыт 7. Реакция окисления тиамин в тиохром

В пробирку помещают несколько кристаллов тиамин, добавляют 1-2 мл раствора красной кровяной соли, перемешивают и нагревают в течение нескольких минут. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамин в тиохром. При наличии флюороскопа в пробирку вносят 1 мл изобутилового спирта, содержимое взбалтывают в течение 1 мин, верхний спиртовой слой переносят в другую пробирку и наблюдают голубую флюоресценцию этого раствора в УФ - лучах.



Опыт 8. Взаимодействие с диазореактивом

В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета. В пробирку помещают несколько кристаллов тиамин, добавляют 2 мл диазореактива, состоящего из 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл 5% нитрита натрия, а затем постепенно приливают 10% раствор карбоната натрия. В ходе реакции развивается интенсивная оранжевая окраска.

Рибофлавин – витамин В₂

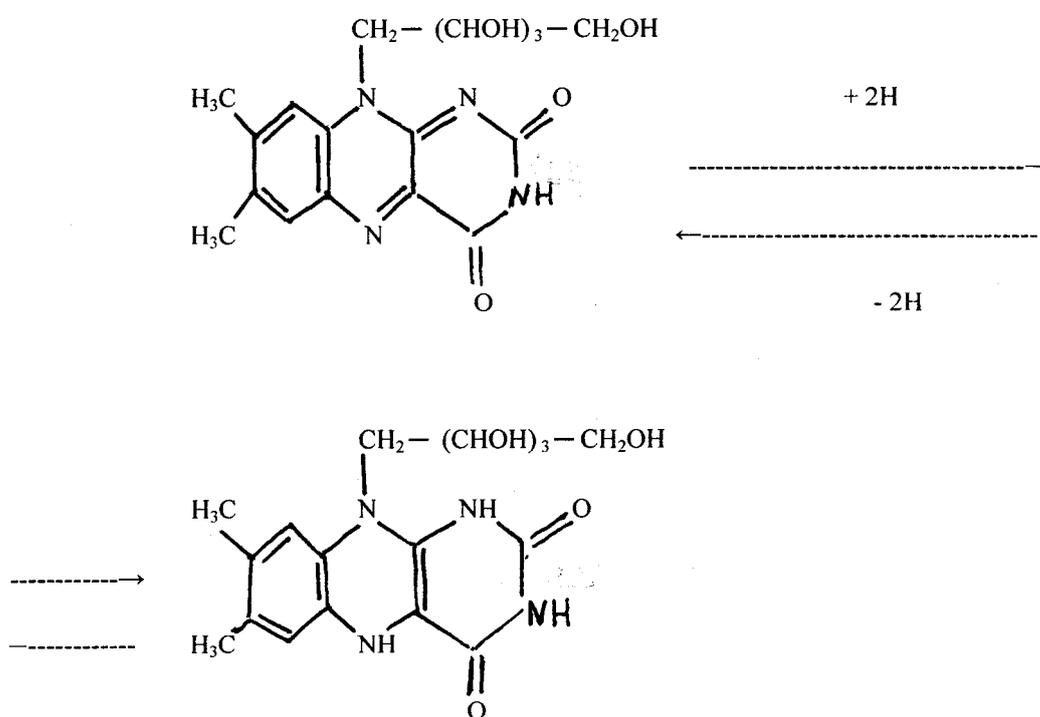
Кристаллы рибофлавина имеют желто-оранжевый цвет, хорошо растворяются в воде, легко разрушаются при кипячении и на свету. Витамин рибофлавин способен легко окисляться и восстанавливаться, что лежит в основе биологиче-

ского действия этого витамина. Он входит в состав коферментов (ФАД, ФМН) оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

Недостаток витамина проявляется в остановке роста, поражении слизистых оболочек (особенно в уголках рта), понижении работоспособности, нарушении нормального синтеза гемоглобина. Источником витамина является молоко, зеленые овощи, внутренние органы животных, дрожжи. Суточная потребность человека в этом витамине составляет 2 мг.

Опыт 9. Восстановление рибофлавина.

В пробирку помещают несколько кристаллов витамина, добавляют 2 мл дистиллированной воды для растворения витамина, добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты и 2 – 3 кусочка цинка. Жидкость постепенно окрашивается в розовый, затем красный цвет. При отсутствии контакта с воздухом раствор постепенно обесцветится. Это обусловлено восстановлением рибофлавина выделяющимся водородом до бесцветного лейкофлавина. Если бесцветный раствор перелить в другую пробирку (удалить цинк), то вновь произойдет окисление восстановленной формы витамина до желтой, окисленной.



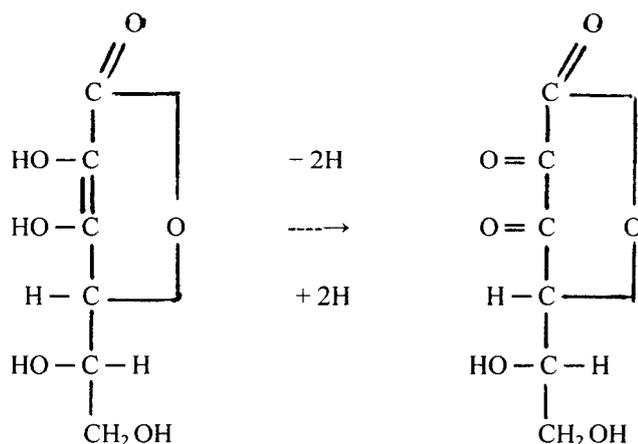
Витамин В₂ –рибофлавин
(вверху окисленная, внизу восстановленная формы)

Аскорбиновая кислота – витамин С.

Витамин С представляет собой бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде и спирте. Они имеют кислый вкус. Аскорбиновая кислота легко разрушается в присутствии кислорода воздуха, в щелочных растворах, под действием ионов железа и меди. Витамин С участвует в окислительно-восстановительных процессах в организме, поскольку способен легко отдавать и присоединять два атома водорода.

При недостатке витамина С у человека, обезьян и морских свинок развивается заболевание – цинга, которое проявляется в повышенной проницаемости и хрупкости кровеносных сосудов, спонтанных кровоизлияниях, а в конечном итоге, в разрушении зубов и десен. Это связано с его участием в синтезе белка соединительной ткани коллагена.

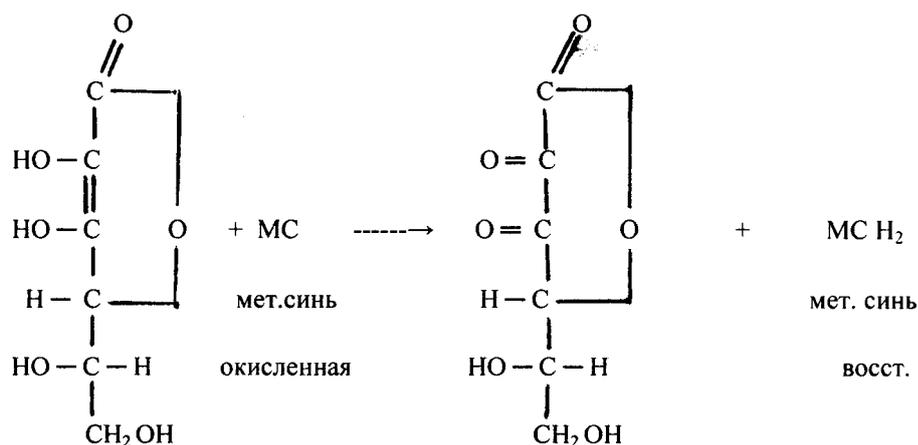
Аскорбиновую кислоту содержат самые разнообразные продукты растительного происхождения, но особенно много ее в плодах шиповника, черной смородине, облепихе, рябине, красном перце, лимонах, капусте. Суточная потребность человека в этом витамине составляет 75 – 100 мг.



Витамин С – аскорбиновая кислота (слева – восстановленная, справа - окисленная формы)

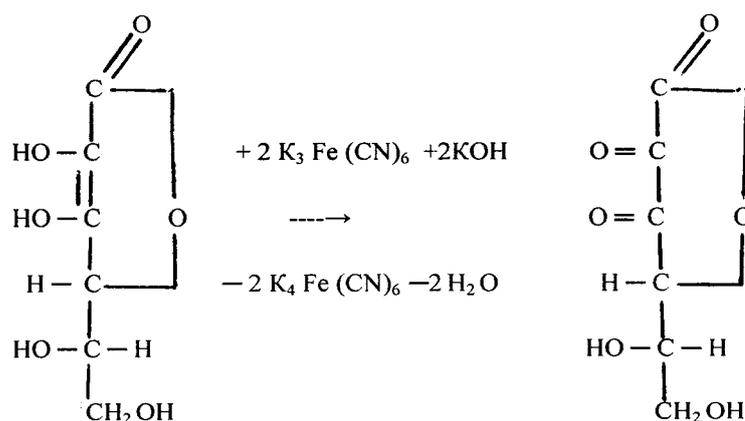
Опыт 10. Взаимодействие с метиленовой синью.

Помещают в пробирку несколько кристаллов витамина С, растворяют в 2 мл дистиллированной воды, приливают 1 мл раствора метиленовой сини, перемешивают и ставят пробирку в стакан с водой (40°C). Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини в бесцветную лейкоформу, а аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты. Если бесцветный раствор энергично встряхнуть для контакта с кислородом, то он вновь приобретет синий цвет.



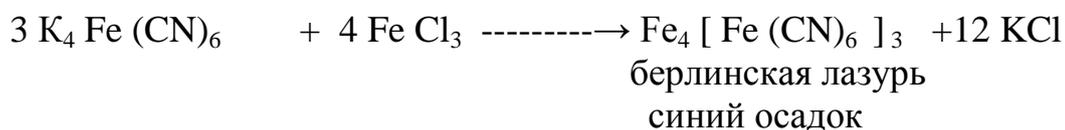
Опыт 11. Реакция с красной кровяной солью

Помещают в пробирку несколько кристаллов витамина С, растворяют в 2 мл дистиллированной воды, приливают 2 мл раствора КОН, 0,5 мл раствора красной кровяной соли и энергично встряхивают. Затем добавляют в пробирку 0,5 мл 10% раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Выпадает синий осадок берлинской лазури.



Витамин С – аскорбиновая кислота
(восстановленная форма)

L – дегидроаскорбиновая кислота
(окисленная форма)



Оформление работы

Оформление работы рекомендуется сделать в форме таблицы, в колонках которой привести данные:

1. Название витамина, его химическая формула, название реакции;
2. Реактивы, условия проведения реакции, уравнение реакции;
3. Наблюдения и выводы.

Лабораторная работа № 8

Качественные пробы на присутствие ферментов

Реактивы и оборудование: 3% раствор пероксида водорода, кристаллический гидрохинон, насыщенный раствор тирозина, 5% раствор мочевины, 1% раствор сахарозы, фенолфталеин, красная лакмусовая бумага, сырой картофель, морковь, капуста, мясо, соевая мука, дрожжи, реактив Фелинга, центрифуга, ступки, песок, марля, воронки, пипетки, водяная баня, лучинки, плитка,

Опыт 1. Обнаружение каталазы в мышечной кашице.

Перекись водорода может образовываться в организмах как конечный продукт дыхания, но поскольку в больших концентрациях перекись водорода является ядом для живых клеток, существуют ферменты, способные ее обезвреживать. К таким ферментам относится каталаза. Она расщепляет пероксид до воды и кислорода. Каталаза вызывает бурное выделение пузырьков кислорода при промывании ран пероксидом водорода. Содержится каталаза и в растительных объектах, например, в картофеле, моркови.

каталаза



В пробирку помещают 0,5 – 1 г мышечной кашицы, добавляют 2 мл дистиллированной воды и 1 мл 3% раствора пероксида водорода. Встряхивают пробирку и наблюдают выделение пузырьков газа. Используя тлеющую лучинку, можно доказать, что выделяющийся газ – кислород.

Опыт 2. Обнаружение пероксидазы в растительных тканях

Некоторые ферменты выделяющийся в ходе разложения пероксида водорода кислород используют для окисления органических соединений. К таким ферментам относят пероксидазу. С помощью пероксидазы, содержащейся в больших количествах в растительных клетках, происходит окисление дифенолов в хиноны, в результате чего темнеет лежащий на воздухе очищенный картофель и другие растительные продукты.

В две пробирки наливают по 3 мл 3% раствора пероксида водорода. В одну из них помещают 2-3 кусочка свеженарезанного картофеля. В обе пробирки добавляют одинаковое количество кристаллического гидрохинона. Содержимое пробирок встряхивают. Через некоторое время наблюдают образование розово-красной окраски в пробирке с картофелем вследствие окисления гидрохинона в хинон перекисью водорода под действием пероксидазы. Много пероксидазы содержится в хрене, поэтому вместо картофеля можно использовать это растение.



Опыт 3. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Тирозиназа катализирует окисление фенолов и родственных по строению соединений. Она является металлопротеином, содержащим медь, которая служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится в растениях, грибах, в отдельных органах и тканях животных.

Несколько кусочков свежего картофеля растирают в ступке с чистым песком, добавляют в ступку 10 – 15 мл дистиллированной воды и фильтруют через двойной слой марли. Экстракт делят на две равные части. Одну часть в пробирке или колбочке кипятят для денатурации фермента.

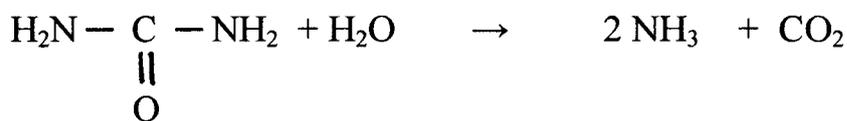
В две пробирки наливают по 1 мл раствора аминокислоты тирозина. В одну пробирку добавляют первую часть некипяченого экстракта картофеля. Во вторую пробирку наливают охлажденный кипяченый экстракт. Обе пробирки ставят в водяную баню (40°C). Время от времени пробирки встряхивают. Через некоторое время наблюдают, что в первой пробирке раствор постепенно становится розово-красным, потом бурым и, в конце концов, черным. В пробирке с кипяченым экстрактом фермент не активен из-за денатурации и поэтому окисление тирозина происходит значительно медленнее.



Опыт 4. Обнаружение уреазы в соевой муке.

Уреаза гидролитически расщепляет мочевины на аммиак и углекислый газ. Реакция высокоспецифична. Фермент в значительных количествах содержится в сое.

уреаза



В пробирку наливают 3 мл 5% раствора мочевины, добавляют 20 – 30 мг соевой муки и 2 капли фенолфталеина. Пробирку оставляют при комнатной температуре и наблюдают за появлением розовой окраски, что происходит вследствие смещения рН раствора в щелочную сторону за счет образования аммиака.

За образованием аммиака также можно наблюдать по изменению окраски влажной красной лакмусовой бумажки, помещенной в отверстие пробирки. Через некоторое время бумажка синееет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху.

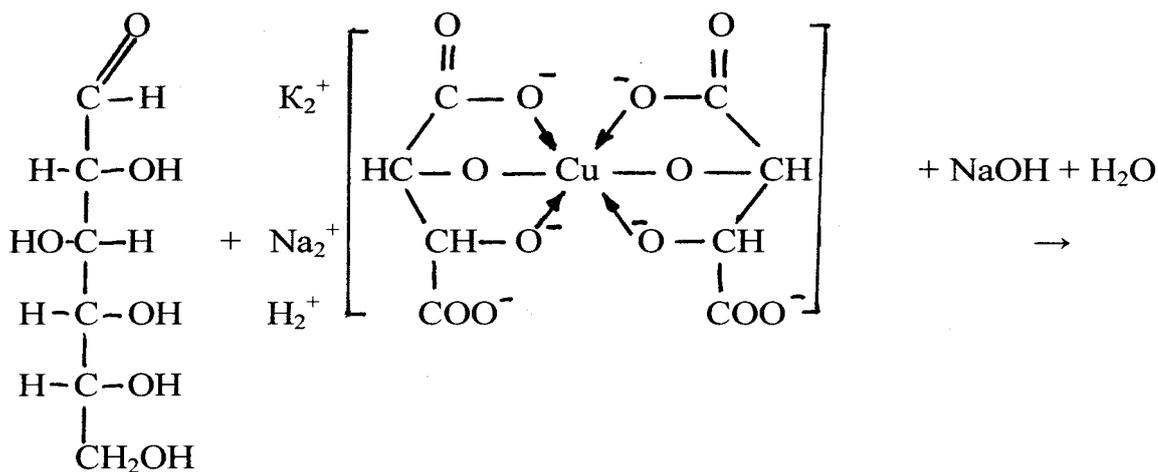
Опыт 5. Обнаружение сахаразы в дрожжах.

Фермент сахараза катализирует реакцию гидролиза сахарозы до глюкозы и фруктозы. Большое количество этого фермента содержится в дрожжах.

2 – 3 г дрожжей растирают в ступке с чистым песком, добавляют 15 мл дистиллированной воды, настаивают при перемешивании 10 мин, сначала фильтруют через марлю, а потом центрифугируют 5 мин (3 тыс. об/мин). Полученный центрифугат используют для проведения опыта.

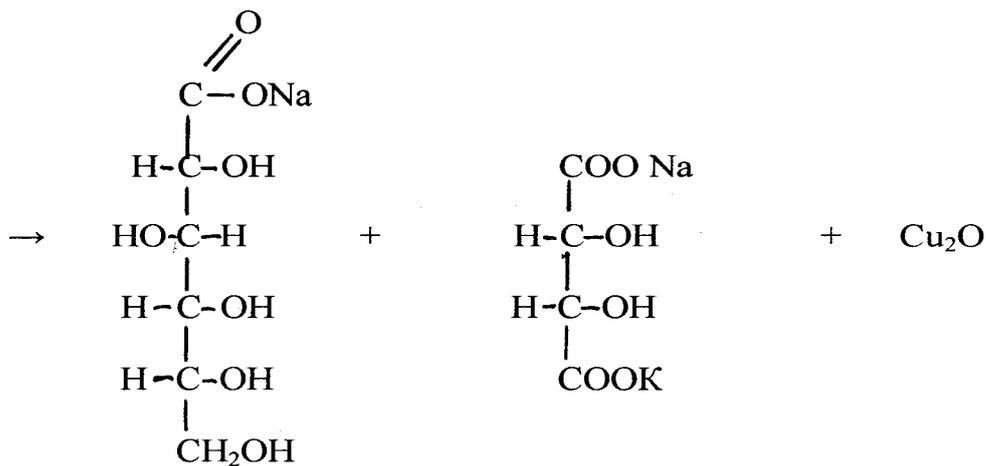
В две пробирки наливают по 3 мл раствора сахаразы – экстракта из дрожжей. Одну пробирку, контрольную, кипятят для разрушения фермента и охлаждают. В обе пробирки наливают по 3 мл раствора сахарозы и ставят в водяную баню (40°C) на 10 – 15 минут.

По истечении времени в пробирки добавляют по 2 мл раствора Фелинга, нагревают. В пробирке с активным ферментом образуется красный осадок закиси меди, поскольку в ходе гидролиза образовалась глюкоза, которая восстановила медь из Cu^{+2} до Cu^{+1} . В контрольной пробирке образование оксида не наблюдается.



Д - глюкоза

Na, K-тарtrat – комплексное
соединение меди синего цвета



Д-глюконат натрия

Na, K - тарtrat

Оксид меди (I)

Оформление работы

По каждому опыту описывается порядок его выполнения, условия проведения опыта, приводятся уравнения реакции и записываются наблюдения.

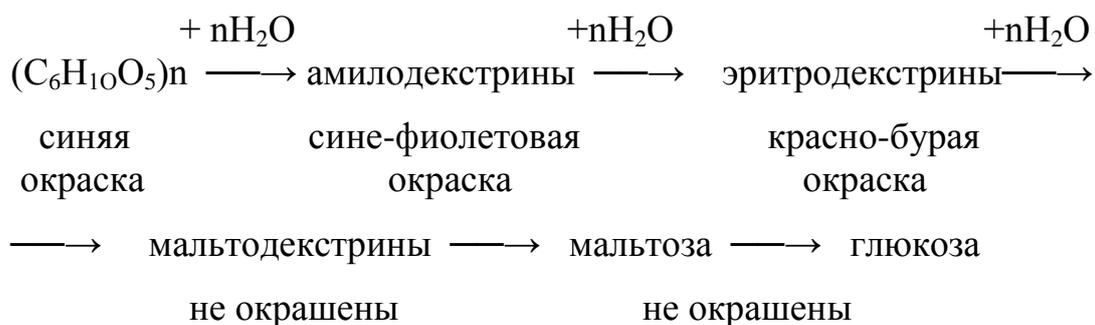
Лабораторная работа № 9

Изучение свойств фермента амилазы слюны

Реактивы и оборудование: раствор I_2 в KI, 1%-ный раствор крахмала, раствор Фелинга, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,1 М растворы гидрофосфата и дигидрофосфата калия, 1% раствор сахарозы, 10% раствор гидроксида натрия, пробирки, пипетки, бюретки, индикаторная бумага, прибор Алямовского, рН-метр, стеклянные трубочки, мерные цилиндры, пластинки с ячейками, стаканчики на 50 - 100 мл, воронки, водяные бани, стаканы, марля, лед, электроплитки, термометры, спиртовки, штативы.

Ферменты амилазы катализируют реакции гидролиза крахмала, относятся к классу гидролаз. Различают несколько типов амилаз: α -, β - амилазы, глюкоамилазы, амило-1,6 – глюкозидазы. Они катализируют гидролиз α -1,4 и α -1,6 связей в полисахаридах и олигосахаридах с образованием в качестве конечных продуктов мальтозы и глюкозы.

В процессе постепенного гидролиза крахмала под действием амилаз происходит образование промежуточных продуктов – декстринов разной степени сложности. За ходом гидролиза можно наблюдать по изменению окраски с йодом. Крахмал дает синее окрашивание, растворимый крахмал – сине-фиолетовое, амилодекстрины (молекулярная масса ≈ 10000) – фиолетовое, эритродекстрины (молекулярная масса 4000-6000) – от красно- бурого до красного, мальтодекстрины (молекулярная масса около 1000) не дают окрашивания с йодом точно так же, как глюкоза и мальтоза.



Приготовление разбавленной слюны

Ополаскивают рот водой 2-3 раза, и в чистый стаканчик собирают слюны столько, чтобы при ее разведении дистиллированной водой в 3 раза получилось 30 мл раствора. Полученный препарат амилазы фильтруют через марлю и используют для опытов.

Опыт 1.Обнаружение амилазы в слюне

Перед тем как изучать свойства фермента амилазы, необходимо убедиться в

наличии в слюне этого фермента. С этой целью в одну пробирку наливают 5 мл раствора крахмала и 1 мл препарата амилазы. В контрольную пробирку помещают 5 мл раствора крахмала и 1 мл дистиллированной воды.

Обе пробирки помещают в водяную баню при 40°C и сразу начинают проводить качественные пробы с раствором йода. Для этого на пластинку в ячейки помещают капельки раствора йода и с помощью стеклянной трубочки или пипетки вносят в них из опытных пробирок по капельке раствора. Взятие проб повторяют через 30 секунд. Наблюдают за изменением окраски. Окраска растворов в пробах из опытной пробирки постепенно должна меняться: сначала синяя, потом фиолетовая, далее красно-бурая, потом желтая.

Скорость реакции гидролиза крахмала зависит от концентрации крахмала и фермента. В случае если гидролиз идет медленно (все время образуется синяя окраска), или, наоборот, очень быстро (окраска сразу становится желтой), необходимо опыт поставить еще раз, изменив объемное соотношение взятых для опыта препарата амилазы и раствора крахмала. В этом опыте важно установить, каким должно быть это соотношение, чтобы в течение не более 5 минут можно было наблюдать окраску всех промежуточных продуктов реакции. Наблюдать за опытом удобно, когда он идет не слишком быстро и не слишком медленно.

В контрольной пробирке, где нет амилазы, окраска раствора все время должна оставаться синей.

Опыт 2. Влияние температуры на активность амилазы слюны.

При низкой температуре ферментативные реакции идут медленно. По мере повышения температуры скорость ферментативных реакций возрастает, причем с каждым повышением на 10 градусов скорость реакции возрастает в 2 – 3 раза (у небиологических катализаторов в 2 – 4 раза). При достижении некоторого оптимума дальнейшее повышение температуры ведет к падению активности фермента и вследствие этого к снижению скорости ферментативных реакций. Объясняется это денатурацией ферментов, имеющих белковую природу. У большинства ферментов температурный оптимум лежит в пределах 40 - 60°C.

Сухие препараты некоторых ферментов способны выдерживать значительно более высокое нагревание без заметной потери своей активности. В растворе же эти ферменты при кипячении целиком теряют свою каталитическую активность. Низкая температура не инактивирует ферменты. В этих условиях они лишь замедляют или останавливают свое действие.

В 4 пробирки наливают по 2 мл раствора препарата фермента. Одну пробирку помещают в стакан со льдом, другую – в кипящую водяную баню, третью оставляют при комнатной температуре в штативе, а четвертую помещают в водяную баню при 40°C. Пробирки при указанных температурах необходимо выдержать не менее 5 минут. После этого во все пробирки (не меняя темпера-

турных условий!), очень быстро добавляют по 6 мл раствора крахмала и хорошо перемешивают. Соотношение объема раствора крахмала и препарата фермента может быть тем, которое установлено в опыте 1.

Сразу же начинают проделывать йодную пробу с раствором из каждой пробирки через каждые 0,5 – 1 минуту и записывают наблюдения. По изменению окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза крахмала в каждой пробирке. Результаты наблюдений анализируют и делают выводы.

Оформление результатов опыта

Результаты проведения опыта рекомендуется представить в форме таблицы:

Таблица 1

Номер пробирки	Температура, °С	Реакция с йодом по истечении времени, мин					
1	0						
2	20						
3	40						
4	100						

Опыт 3. Влияние рН на активность амилазы слюны

Известно, что ферменты проявляют свою максимальную активность при определенных значениях рН (оптимум рН), и очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента, что объясняется действием ионов водорода на ионизацию белковой молекулы, а, следовательно, на пространственную структуру фермента.

Готовят серию буферных растворов с рН 4,49; 5,59; 6,98; 7,38; 8,04, используя растворы гидрофосфата и дигидрофосфата калия и бюретки.

Приготовление фосфатных буферных смесей

Таблица 2

Номер пробирки	K_2HPO_4 , мл	KH_2PO_4 , мл	рН
1	0,00	10,00	4,49
2	0,50	9,50	5,59
3	6,00	4,00	6,98
4	8,00	2,00	7,38
5	9,50	0,50	8,04

Определение рН буферных смесей проводят с помощью рН-метра. Для приблизительной оценки рН растворов можно воспользоваться индикаторной бумагой или прибором Алямовского. Необходимо сразу приготовить большое количество буферных растворов с таким расчетом, чтобы каждому выполняющему опыт досталось по 5 мл каждой буферной смеси.

В пять пробирок наливают по 5 мл каждой из приготовленных буферных смесей, добавляют по 2 мл препарата фермента амилазы и по 5 мл раствора крахмала, тщательно перемешивают.

После этого все пробирки помещают в водяную баню при 40°C. Наблюдения за ходом гидролиза начинают сразу, проводя йодную пробу на пластинках с растворами из пробирок. Отмечают, в какой пробирке гидролиз крахмала идет быстрее всего. На основании полученных результатов делают вывод об оптимальных условиях гидролиза крахмала по величине рН.

Оформление результатов опыта

Результаты проведения опыта рекомендуется представить в форме таблицы:

Таблица 3

Номер пробирки	рН	Реакция с йодом по истечении времени, мин					
1	4,49						
2	5,59						
3	6,98						
4	7,38						
5	8,04						

Опыт 4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.

На активность ферментов оказывают воздействие активаторы и ингибиторы. Активаторы – это вещества, которые усиливают действие ферментов, а ингибиторы, наоборот, подавляют действие ферментов. В данном опыте предлагается экспериментально определить, какое из двух веществ – хлорид натрия или медный купорос является активатором, а какое – ингибитором фермента амилазы.

В три пробирки наливают по 1 мл препарата фермента амилазы. В первую пробирку добавляют 0,5 мл 1% раствора хлорида натрия, во вторую – 0,5 мл 1% раствора медного купороса, в третью – 0,5 мл дистиллированной воды. Во все пробирки добавляют по 3 мл раствора крахмала, перемешивают и ставят пробирки на водяную баню. Контроль ведут по реакции с йодом на пластинках сразу после начала опыта через каждые 0,5 – 1 минуту. Полученные результаты и наблюдения записывают в тетрадь, делают соответствующие выводы.

Оформление результатов опыта

Результаты проведения опыта рекомендуется представить в форме таблицы:

Таблица 4

№ пробирки	Реактивы, мл					Реакция с йодом по истечении времени, мин				
	Крахмал	Амилаза	NaCl	CuSO ₄	вода					
1	3	1	0,5	-	-					
2	3	1	-	0,5	-					
3	3	1	-	-	0,5					

Опыт 5. Исследование специфичности амилазы.

Специфичность ферментов проявляется в том, что они катализируют преобразование только своего субстрата и не действуют на другие вещества.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора амилазы, добавляют в первую пробирку 3 мл раствора крахмала, а во вторую – 3 мл раствора сахарозы. Пробирки перемешивают и ставят на водяную баню на 15 минут. Наблюдения за ходом опыта ведут по реакции растворов в пробирках с йодом на пластинках. Записывают цвет раствора в пробирках в течение опыта. Делают выводы.

По окончании опыта с растворами в обеих пробирках проделывают реакцию Троммера. В пробирки добавляют по 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, несколько капель 1% раствора медного купороса, перемешивают и нагревают до кипения. Выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I) вследствие окисления глюкозы и восстановления гидроксида меди (II). Наблюдают, в какой из пробирок проба Троммера будет отрицательной, а в какой положительной и делают необходимые выводы.

Оформление результатов опыта

Результаты проведения опыта рекомендуется представить в форме таблицы:

Таблица 5

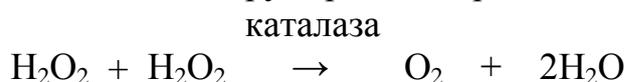
№ пробы	Амилаза слюны, мл	Раствор крахмала, мл	Раствор сахарозы, мл	Проба Троммера (+ или –)	Реакция с раствором йода (+ или –)
1	1	3	–		
2	1	–	3		

Лабораторная работа № 10

Определение активности фермента каталазы

Реактивы и оборудование: растительные объекты для исследования – свежие капуста, картофель, морковь, перец, лук, чеснок и др., 0,1 н раствор пероксида водорода, 0,1 н раствор перманганата калия, 10% раствор серной кислоты, порошок карбоната кальция, песок, ступки, марля, воронки, центрифуга, колбы или стаканчики, плитка, пипетки, бюретки для титрования, цилиндры, весы технические.

Фермент каталаза катализирует реакцию разложения пероксида водорода:



Каталаза относится к одному из самых активных ферментов. 1 моль фермента способен катализировать превращение 10^7 моль субстрата в минуту.

Каталаза найдена во всех типах клеток с аэробным типом обмена. Считают, что функция каталазы заключается в разрушении пероксида водорода, ядовитого для организма.

Определение активности фермента можно проводить газометрическим методом, определяя объем кислорода, выделившегося при разложении каталазой пероксида водорода. В перманганатометрическом методе расчет активности фермента основан на определении количества оставшегося после действия каталазы пероксида водорода, который определяется титрованием раствором перманганата калия.

Для предотвращения инактивации фермента субстратом реакцию ведут при низких концентрациях пероксида водорода. Оптимум pH каталазы – 7,6.

Опыт 1. Получение препарата фермента каталазы и определение его активности перманганатометрическим методом.

Взвешивают на весах 4-5 г свежего растительного материала (картофель, морковь, перец и др.), растирают в ступке с чистым песком, добавляя 4-5 мл дистиллированной воды. Поскольку каталаза более активна при pH 7,6, для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике шпателя порошок карбоната кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа.

Полученную массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Для экстракции препарата фермента колбу оставляют на 10 минут, периодически помешивая, после чего вытяжку сначала фильтруют через двойной слой марли, а потом центрифугируют 5 мин при 3 тыс. об/мин. Осадок отбрасывают, а центрифугат используют в опыте.

Приготавливают две колбы или стаканчика на 100 – 200 мл. В обе колбы добавляют по 20 мл препарата фермента, одну из них (контроль) ставят на плитку и нагревают до кипения для инактивации фермента, после чего охлаждают.

После этого в обе колбы быстро добавляют по 25 мл 0,1 н раствора пероксида водорода. С этого момента замечают время и оставляют колбы на столе на 30 минут. По окончании этого времени действие фермента прекращают добавлением 5 мл 10% раствора серной кислоты.

Растворы в обеих колбах титруют 0,1 н раствором перманганата калия до образования устойчивой в течение примерно 30 сек розовой окраски. Отмечают количество мл затраченного на титрование не разложившегося пероксида водорода, как в опытной, так и в контрольной пробе.

По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода.

Расчет количества пероксида водорода, разложенного ферментом, ведут в соответствии с уравнением реакции:



согласно которому 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

Пример расчета: для опыта взяли 1,25 г моркови, из которой приготовили 100 мл вытяжки. На титрование опытной пробы затратили 15,5 мл, а контрольной 24,2 мл 0,1 н раствора перманганата калия. Количество разложенного пероксида водорода в пробе эквивалентно $24,2 - 15,5 = 8,7$ (мл) 0,1 н раствора перманганата калия и, следовательно, равно $8,7 \cdot 1,7 = 14,8$ (мг).

В 1 г сырой моркови содержится количество каталазы, способное за 30 минут разложить

$$\frac{14,8 \cdot 100}{20 \cdot 1,25} = 59,16 \text{ (мг) H}_2\text{O}_2, \text{ а за 1 минуту} - 59,16/30 = 1,97 \text{ (мг)}$$

Так как 1 мкмоль пероксида водорода составляет 0,034 мг, то активность каталазы, выраженная в мкмоль H_2O_2 /мин · г сырого веса моркови, составляет $1,97 : 0,034 = 58,0$ единиц.

Таким образом, для расчета активности каталазы можно составить формулу:

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot n \cdot C}{m \cdot C_1 \cdot t \cdot 0,034}$$

где A — активность каталазы (мкмоль H_2O_2 /мин · г сырого веса моркови);

V_2 — количество перманганата калия, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл;

V_1 — количество перманганата калия, пошедшее на титрование опытной пробы, мл;

n — количество пероксида водорода, эквивалентное 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия, мг;

• m — навеска растительного материала, г;

- C — объем приготовленной вытяжки, мл;
- C_1 — объем смеси, взятой для опыта, мл;
- t — время опыта, мин,
- 0,034 — количество пероксида водорода, соответствующее его 1 мкмоль, мг.

Оформление работы

1. В тетради записывают порядок приготовления вытяжки фермента
2. Приводят уравнение катализируемой реакции и уравнение реакции взаимодействия пероксида водорода с перманганатом калия в кислой среде.
3. Записывают все данные, необходимые для расчета активности фермента, и приводят расчет активности каталазы.
4. Сравнивают активность каталазы в разных объектах и делают соответствующие выводы.

Лабораторная работа № 11

Ферменты биологического окисления

Реактивы и оборудование: концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,5 М раствор аскорбиновой кислоты ($\approx 9\%$), цитохром с, 0,01% раствор метиленовой сини, свежая мышечная ткань, витамин рибофлавин в таблетках, нейтральный раствор 3% янтарной кислоты, подсолнечное масло, водяная баня, термометры, пробирки, колбочки на 50 – 100 мл, фарфоровые ступки, марля, воронки, пипетки, пробирки с газоотводной трубкой, спектрофотометр.

Биологическое окисление представляет собой процесс окисления различных веществ, идущий в клетке при участии различных ферментов. Выделяют свободное окисление, не связанное с синтезом АТФ, основное назначение этого процесса – обезвреживание продуктов жизнедеятельности, токсичных веществ, синтез некоторых соединений. Выделяющаяся при этом энергия не трансформируется в АТФ, и в основном выделяется в форме тепла.

Другой тип биологического окисления – окисление, сопряженное с синтезом АТФ, происходит при катаболизме питательных веществ с образованием конечных продуктов – углекислого газа и воды. Энергия, выделяющаяся в этом процессе, способна в значительной мере трансформироваться в АТФ. Так, полный распад 1 моль глюкозы сопровождается высвобождением 2872 кДж, из которых около половины превращается в АТФ.

Процессы аэробного окисления до конечных продуктов протекают в митохондриях клеток, где сосредоточены ферменты и переносчики дыхательной цепи.

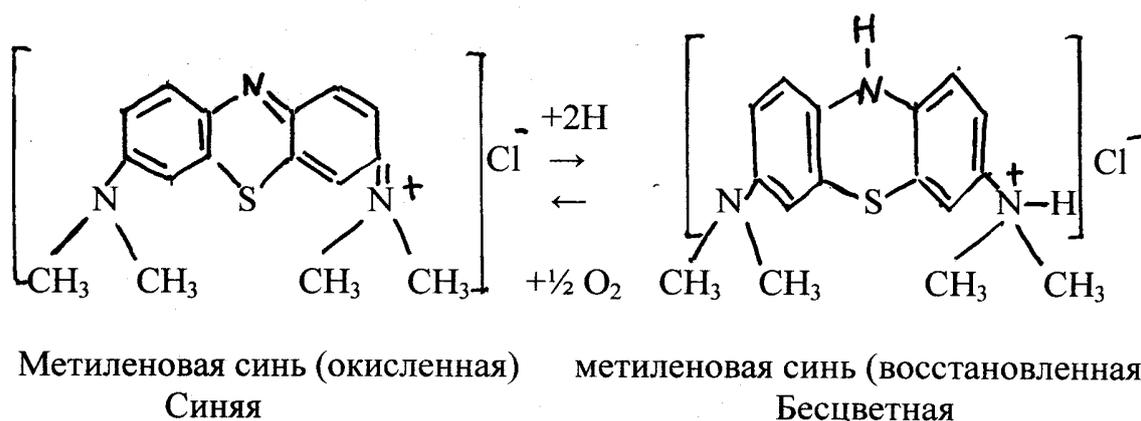
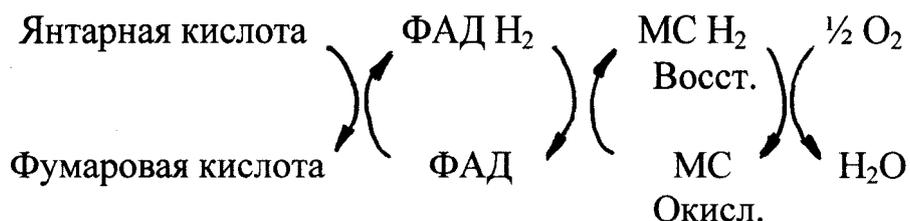
Как уже отмечалось выше, окисление субстратов осуществляется при участии оксидоредуктаз, которые и являются ферментами биологического окисления. К ним относится ряд ферментов цикла Кребса, процесса β -окисления высших жирных кислот, переносчики дыхательной цепи митохондрий и многие другие.

Опыт 1. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в мышцах.

Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию окисления янтарной кислоты в фумаровую в цикле Кребса. Снятые с янтарной кислоты атомы водорода далее поступают в дыхательную цепь митохондрий через убихинон.

В условиях опыта роль промежуточного переносчика атомов водорода может играть метиленовая синь, которая далее отдает водород кислороду воздуха.

По химической природе сукцинатдегидрогеназа – флавопротеин, содержит ФАД в качестве простетической группы. В состав ФАД входит витамин рибофлавин, через который и осуществляется перенос атомов водорода:



Свежую мышечную ткань (5 г) измельчают, заливают 4-кратным объемом дистиллированной воды и тщательно растирают в ступке. Полученную мышечную кашичу фильтруют через двойной слой марли и многократно промывают дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды не станут бесцветными. Отмытая кашича содержит цитохромоксидазу, комплекс цитохромов и некоторые дегидрогеназы, в частности, сукцинатдегидрогеназу.

В пробирку помещают мышечную кашичу, добавляют 1 мл янтарной кислоты, 2-3 капли раствора метиленовой сини до слабо-голубого окрашивания, перемешивают, сверху наливают несколько капель подсолнечного масла и помещают пробирку в водяную баню при температуре 40°C.

Через 10-15 минут голубая окраска бледнеет, пока совсем не обесцветится. Если бесцветный раствор сильно встряхнуть, то вновь появится голубое окрашивание вследствие окисления кислородом воздуха восстановленной метиленовой сини. Метиленовая синь в данном опыте является промежуточным акцептором водорода.

Опыт 2. Восстановление цитохрома с.

Цитохром с входит в число переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий и относится к классу оксидоредуктаз. Перенос электронов цитохром осуществляет за счет наличия в его составе гем-группы с ионом железа в центре, которое способно переходить из окисленного состояния в восстановленное и обратно. Цитохром с – сложный белок, хорошо растворимый в воде. Раствор окисленного цитохрома имеет красный цвет, который заметно бледнеет при восстановлении. Для восстановления цитохрома в лабораторных условиях можно использовать соляную кислоту и металлический цинк.

В одну пробирку с газоотводной трубкой помещают кусочек цинка и наливают 2 мл концентрированной соляной кислоты, в другую наливают 1-2 мл раствора цитохрома с. Закрывают пробирку пробкой, а газоотводную трубку опускают в раствор цитохрома с и наблюдают за изменением окраски. После восстановления цитохрома газоотводную трубку вынимают и наблюдают, как при стоянии на воздухе цитохром с постепенно окисляется и вновь приобретает прежнюю окраску.

Опыт по восстановлению цитохрома с повторяют, используя в качестве восстановителя 0,5 М раствор аскорбиновой кислоты. В пробирку с раствором цитохрома с добавляют 2-3 мл раствора аскорбиновой кислоты и наблюдают за изменением окраски.

Цитохром с, как и другие цитохромы, способен поглощать свет в видимой области. Для восстановленной формы цитохрома с характерны две полосы поглощения с максимумом при 550 нм в желто-зеленой части спектра и при 520 нм – в зеленой. В спектре окисленной формы цитохрома с этих полос нет. Для получения спектральной характеристики цитохрома с записывают спектр поглощения как окисленной, так и восстановленной форм цитохрома с в видимой области на спектрофотометре.

Опыт 3. Сопоставление окислительно-восстановительных потенциалов рибофлавина и индикатора метиленовой сини.

Атомы водорода, снятые с субстратов, передаются в дыхательной цепи митохондрий через систему переносчиков, расположенных в соответствии со значениями их окислительно-восстановительных потенциалов. Вещество с меньшим окислительно-восстановительным потенциалом способно передавать свои протоны и электроны веществу с большим потенциалом.

Окислительно-восстановительный потенциал вещества в растворе зависит от рН, температуры и от соотношения концентраций восстановленной и окисленной форм вещества.

Величина стандартного окислительно-восстановительного потенциала E_0 равна э.д.с. в вольтах (В), возникающей в полуэлементе, в котором донор электронов и сопряженный с ним акцептор электронов, присутствующие в концентрациях 1,0 М при 25°C и рН=0 находятся в равновесии с электродом, способным принимать электроны от донора и передавать их акцептору.

Для того чтобы измерить величину э.д.с., возникающую в таком полуэлементе, его присоединяют к стандартному полуэлементу, э.д.с. которого известна. В качестве стандартного полуэлемента в настоящее время принят водородный электрод, э.д.с. которого при давлении газообразного водорода 1 атм, концентрации ионов H^+ 1,0 М (что соответствует рН =0) и температуре 25 °С условно считают равной 0.

Скорректированный для рН = 7, то есть для значения рН, принятого в качестве стандарта при биохимических расчетах, стандартный потенциал водородного электрода равен $-0,41В$ и обозначается как E^1_0 .

Для исследования окислительно-восстановительных потенциалов различных веществ применяют окислительно-восстановительные индикаторы, меняющие свой цвет при определенном значении окислительно-восстановительного потенциала.

Метиленовая синь (синяя окисленная)→	
метиленовая синь (бесцв. восст)	+0,11 В
2,6-дихлорфенолиндофенол (синий или красный окисл.)→	
2,6-дихлорфенолиндофенол (бесцв. восст.)	+0,22 В
Рибофлавин (желтый окисл.→	
Рибофлавин (бесцветный восст.)	−0,20 В

Если окисленные формы таких индикаторов поместить в среду с окислительно-восстановительным потенциалом более низким, чем у них, то они обесцвечиваются, а в среде с более высоким потенциалом восстановленные формы легко окисляются. Из сопоставления стандартных потенциалов индикаторов и биологических переносчиков протонов и электронов видно, что указанные индикаторы можно применять для обнаружения восстановленных НАДН+ H^+ и восстановленных флавиновых ферментов.

В пробирку наливают 2 мл дистиллированной воды, вносят небольшое количество порошка витамина рибофлавина и по каплям наливают раствор метиленовой сини до зеленого окрашивания раствора. В эту же пробирку наливают 3-4 мл концентрированной соляной кислоты и осторожно помещают 2-3 кусочка металлического цинка. Начинается выделение водорода.

По мере насыщения раствора водородом окислительно-восстановительный потенциал смеси постепенно снижается и происходит восстановление рибофлавина и метиленовой сини, причем раньше полностью восстанавливается метиленовая синь и только потом весь рибофлавин. По этой причине окраска раствора меняется от зеленой до желто-зеленой, желтой, красной, ярко-красной, и потом постепенно окраска бледнеет и исчезает полностью.

Раствор без цинка переливают в колбочку с широким дном, колбочку встряхивают для большего контакта с воздухом и наблюдают дальше. Водород в жидкость больше не поступает, кислород воздуха, имея высокий потенциал, постепенно создает среду с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. В этой среде быстрее будет окисляться рибофлавин. Окраска раствора постепенно желтеет. Окисление метиленовой сини постепенно приведет к тому, что раствор приобретает первоначальную зеленую окраску.

Оформление работы

1. Записывают порядок выполнения каждого опыта.
2. Приводят уравнения наблюдаемых реакций.
3. Записывают наблюдаемые изменения и делают выводы.

По опытам 1 и 3 дополнительно:

1. Проводят сравнение процессов передачи атомов водорода и электронов в проделанном опыте и в дыхательной цепи митохондрий.
2. Самостоятельно составляют схемы передачи атомов водорода с учетом окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков.

Лабораторная работа № 12

Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз

Реактивы и оборудование: дрожжи, эфир, 10%, 20% и 0,1н раствор гидроксида натрия, 3% раствор уксусной кислоты, 10% раствор серной кислоты, концентрированная серная кислота, 1% и 5 % раствор медного купороса, спиртовой раствор α -нафтола, 2% раствор азотнокислого серебра, концентрированный раствор аммиака, молибденовый реактив, 1% раствор дифениламина, песок, ступки, колбочки с обратным воздушным холодильником на 50 мл, воронки, стеклянные палочки и трубочки, пипетки, стаканы, пробирки, штативы, плитки или песчаная баня, марля, центрифуга, бумажные фильтры, спиртовки, лакмусовая бумага.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные органические вещества, структурным звеном которых является нуклеотид. Нуклеотид в свою очередь состоит из азотистого основания, рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты в организмах, как правило, образуют комплексы с белками, которые называются нуклеопротеинами.

В живых организмах гидролиз нуклеопротеинов осуществляется при действии ферментов. В лабораторных условиях гидролиз нуклеопротеинов можно осуществить при нагревании в 10% растворе серной кислоты.

Опыт 1. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз.

Дрожжи помимо нуклеиновых кислот содержат свободные углеводы, белки, фосфаты и другие соединения, которые предварительно необходимо удалить. 10 г сухих дрожжей помещают в ступку и растирают с песком до порошкообразного состояния. Далее в ступку добавляют около 5 мл эфира, предварительно убедившись в отсутствии работающих горелок и включенных электроплиток! Растирание проводят под тягой до полного испарения эфира. Эфир разрушает клеточные оболочки, после чего нуклеопротеины можно извлечь раствором едкого натрия.

В ступку добавляют 20 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, стеклянной

палочкой тщательно гомогенизируют смесь, оставляют на 5 минут, фильтруют через марлю для удаления крупных неразрушенных частиц и удаления песка. После этого центрифугируют 5 минут при 3 тыс. об/мин.

После центрифугирования осадок отбрасывают, а к раствору, содержащему нуклеопротеины, добавляют двойной объем 3% уксусной кислоты. В этих условиях нуклеопротеины выпадают в осадок. Вновь центрифугируют при тех же условиях. Центрифугат сливают, а осадок из центрифужных пробирок переносят в колбу на 50 мл. Для этого в центрифужную пробирку с осадком добавляют 2-3 мл дистиллированной воды, тщательно соскабливают осадок со стенок и дна пробирки стеклянной палочкой и переносят в колбу.

В колбу добавляют 30 мл 10% раствора серной кислоты, закрывают пробкой с обратным воздушным холодильником и осторожно кипятят на плитке в течение 30 минут. По окончании гидролиза колбу охлаждают, раствор фильтруют через бумажный фильтр и проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

1. Биуретовая реакция.

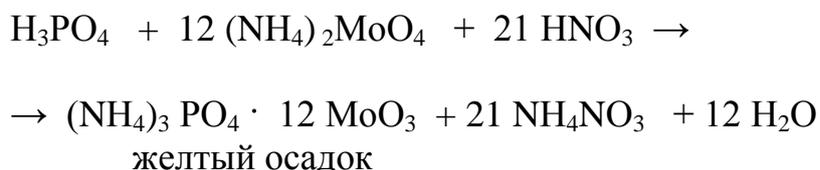
К 2 мл гидролизата приливают 3 мл 10% раствора гидроксида натрия до щелочной реакции по лакмусовой бумажке, затем добавляют несколько капель 1% раствора медного купороса. Появляется розовая или розово-фиолетовая окраска.

2. Реакция на дезоксирибозу и рибозу с дифениламином.

Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с раствором рибозы – зеленое. К 2 мл гидролизата добавляют 4 мл 1% раствора дифениламина и кипятят в водяной бане в течение 15 минут; при этом образуется сине-зеленое окрашивание.

3. Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

К 3 мл гидролизата приливают 4 мл молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают под холодной водой. На дне пробирки образуется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденового окислого аммония:



4. Качественная реакция на углеводы с α - нафтолом.

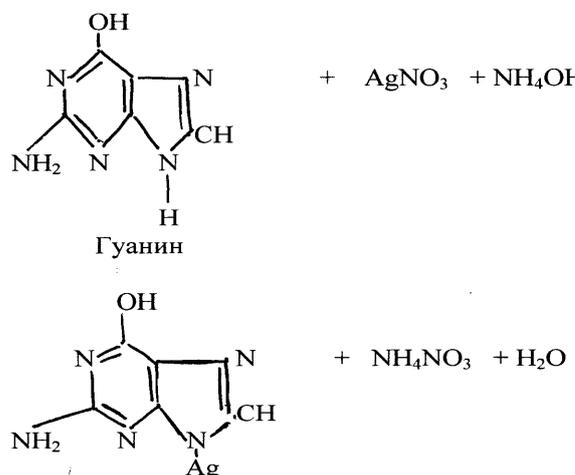
К 2 мл гидролизата приливают несколько капель спиртового раствора α -нафтола и осторожно по стенке приливают 2 мл концентрированной серной кислоты, чтобы она образовала внизу слой. Содержимое пробирки не перемешивают. Наблюдают образование фиолетового кольца на границе двух жидко-

стей.

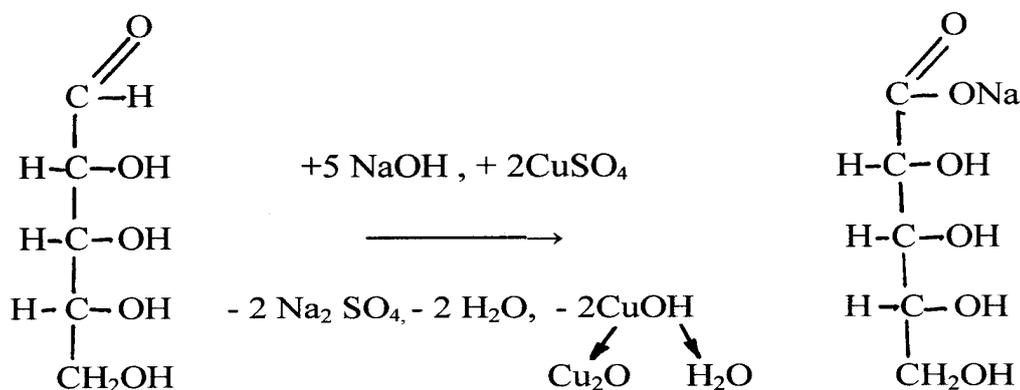
5. Серебряная проба на пуриновые основания.

2 мл гидролизата добавляют крепкий раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу, затем добавляют 1 мл 2% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 минут образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований.

Реакция протекает по следующему уравнению:



5. Реакция Троммера на рибозу и дезоксирибозу.



Д - рибоза

К 2 мл гидролизата добавляют 4 мл 20% раствора гидроксида натрия и 1-3 капли 5% раствора медного купороса до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Раствор в пробирке перемешивают. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I).

Оформление работы

В тетради записывают порядок выполнения работы. Результаты опытов по качественным реакциям на продукты гидролиза можно представить в виде таблицы, в которой указать:

1. Название реакции.
2. Реактивы и условия выполнения опытов.
3. Уравнения реакций.

4. Наблюдения и выводы.

Лабораторная работа № 13

Качественные пробы на липиды и продукты их обмена

Реактивы и оборудование: говяжий жир, желчь, раствор яичного белка, растительное масло, 1% раствор мыла, 1% раствор сахарозы, концентрированная серная кислота, 10% раствор гидроксида натрия, 10% раствор нитропрусида натрия (свежеприготовленный), ледяная уксусная кислота, раствор йода в йодиде калия, концентрированный и разбавленный раствор аммиака, безводный гидросульфат калия, бромная вода, 1% раствор азотнокислого серебра, глицерин, 2% раствор медного купороса, насыщенный раствор хлорида натрия, штативы, пробирки, колбочки на 50 мл с обратным воздушным холодильником, воронки, фильтры, пипетки, плитки.

К липидам относят вещества, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. В составе липидов обнаружены разнообразные спирты, остатки высших жирных кислот, фосфорная кислота, азотистые основания, углеводы и другие соединения. В зависимости от состава, строения и роли в организме липиды классифицируют на следующие группы.

К простым относят нейтральные жиры (глицериды) – сложные эфиры высших жирных кислот и трехатомного спирта глицерина; воски – сложные эфиры высших жирных кислот и высших спиртов; стериды – сложные эфиры высших жирных кислот и полициклических спиртов – стеролов.

К сложным относят фосфолипиды, состоящие из жирных кислот, спиртов, фосфорной кислоты и азотистых оснований; гликолипиды, состоящие из спиртов, жирных кислот и углеводов; к сложным относят диольные липиды и орнитинолипиды, в составе которых имеются как простые, так и сложные липиды.

Простые и сложные липиды подвергаются омылению, так как содержат сложные эфирные связи.

Среди липидов обнаружены и такие, которые, как и все липиды, нерастворимы в воде, но являются неомыляемой фракцией. Это свободные жирные кислоты, разнообразные спирты, жирорастворимые витамины и другие.

Функции липидов разнообразны. Наиболее важными являются энергетическая функция (при распаде 1 г жира освобождается 38,9 кДж), а также структурная – липиды являются основой любой биологической мембраны. Участвуют липиды и в регуляции клеточного метаболизма, выполняют защитные функции и другие.

У животных и человека переваривание липидов происходит в основном в кишечнике под влиянием панкреатической липазы. Чтобы подвергнуться действию липаз, липиды должны быть эмульгированы. Основным эмульгатором являются желчные кислоты, к которым относятся холевые кислоты. Желчные кислоты также активируют ферменты, участвующие в переваривании липидов и белков.

Опыт 1. Омыление жиров.

Жиры, как и все сложные эфиры, подвергаются гидролизу. Гидролиз жиров, сам по себе медленный, катализируется кислотами, щелочами, ферментами. Ферментативный гидролиз жиров происходит в кишечнике под действием ферментов – липаз.

При гидролизе жира в нейтральной или кислой среде получают глицерин и жирные кислоты. В щелочной среде вместо свободных кислот образуются мыла – натриевые и калиевые соли высших жирных кислот. Именно поэтому гидролиз жиров в присутствии щелочей получил название омыления. Натриевые мыла – твердые, а калиевые – жидкие.

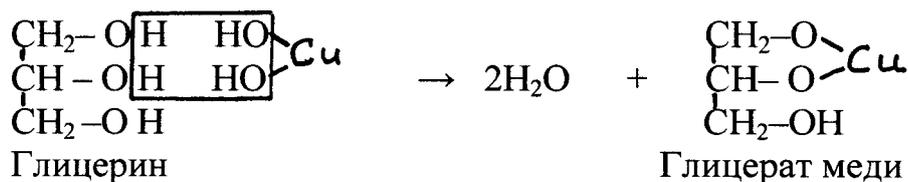


Взвешивают на весах 2-3 г говяжьего жира, помещают в колбочку на 50 мл с обратным воздушным холодильником (длина трубки 60-70 см), добавляют 10-15 мл 15% спиртового раствора гидроксида натрия и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут.

По окончании нагревания раствор из колбочки выливают в фарфоровую чашку и добавляют горячий насыщенный раствор поваренной соли. Не дожидаясь охлаждения раствора, его быстро фильтруют через бумажный фильтр. Мыло высаливается, твердая масса приобретает форму воронки, а в фильтрате остается глицерин. Глицерин в растворе можно определить по реакции образования глицерата меди.

Опыт 2. Качественная проба на глицерин.

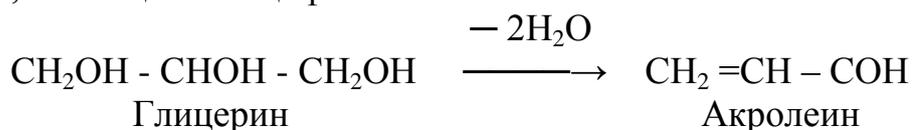
В пробирку наливают 3-4 капли 2% раствора медного купороса, добавляют 3-4 мл 10% раствора гидроксида натрия. Образуется голубой осадок гидроксида меди. В пробирку с этим осадком добавляют 2-3 мл раствора, получившегося после омыления жира. Голубой осадок растворяется с образованием ярко-синего раствора глицерата меди за счет взаимодействия с глицерином, образовавшимся в результате омыления жира. Опыт повторяют с готовым глицерином.



Опыт 3. Акролеиновая проба на глицерин.

Реакция основана на отщеплении от глицерина под влиянием водоотнима-

ющих веществ двух молекул воды с образованием непредельного альдегида акролеина, имеющего специфический запах:



В пробирку наливают 0,5 мл масла, прибавляют избыток безводного KHSO_4 и осторожно нагревают на пламени горелки до появления белых густых паров и специфического запаха акролеина. Гидросульфат калия при сильном нагревании образует пироксернистый калий $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$, который проявляет сильные водоотнимающие свойства.

В пары акролеина вносят кусочек фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором оксида серебра. Бумага чернеет вследствие выделения металлического серебра.

Опыт 4. Определение непредельности жира.

В свободных и связанных с глицерином жирных кислотах некоторых жиров, в особенности растительных масел, имеются ненасыщенные связи, благодаря которым жиры способны присоединять галогены.

В пробирку наливают 2 мл масла, приливают 2 мл бромной воды и тщательно взбалтывают. Происходит обесцвечивание бромной воды.

Опыт 5. Эмульгирование жира.

Берут четыре пробирки. В первую наливают 2 мл дистиллированной воды, во вторую – 2 мл желчи, в третью – раствор яичного белка, в четвертую – раствор мыла. В каждую пробирку добавляют по 2-3 капли растительного масла, и все пробирки одновременно сильно встряхивают в течение 30 секунд. Отмечают, в какой пробирке быстрее происходит расслаивание содержимого. Пробирки оставляют в штативе и наблюдают, при действии какого эмульгатора стойкость эмульсии сохраняется дольше всего. Наблюдения записывают.

Опыт 6. Качественная реакция на желчные кислоты.

Желчные кислоты (холевая, дезоксихолевая и др.) при взаимодействии с фурфуролом образуют окрашенные соединения. В качестве источника фурфуrolа при реакции на желчные кислоты берется сахароза, превращающаяся под действием серной кислоты в оксиметилфурфурол.

В пробирку вносят 2 мл желчи, добавляют 1-2 капли 1% раствора сахарозы и встряхивают. Осторожно по стенке приливают 1-2 мл концентрированной серной кислоты, она опускается на дно, а на границе соприкосновения слоев кислоты и желчи возникает красно-фиолетовое кольцо. Необходимо избегать избытка сахарозы и саморазогревания свыше 70°C , что может привести к обугливанию сахара и затемнению окраски.

Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту.

К кетонным телам относятся ацетон, β – оксимасляная кислота и ацетоук-

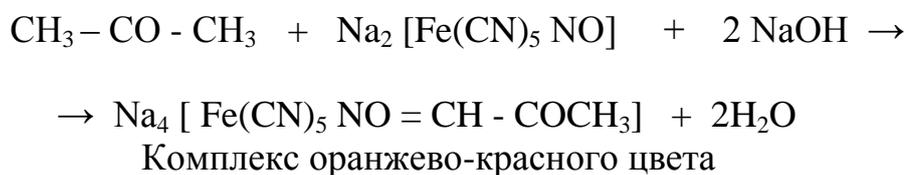
сусная кислота:



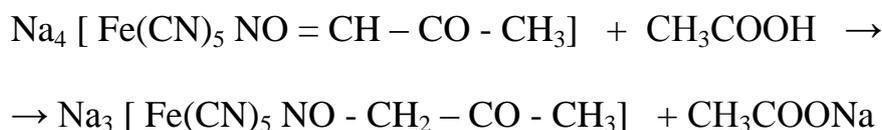
У здорового человека в крови и в моче содержание кетоновых тел невелико, и обычными реакциями эти вещества не выявляются. Их повышенное количество обнаруживается при нарушениях углеводного и липидного обмена, например, при диабете, голодании.

Опыт 7.

Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание



После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета:



В пробирку наливают 1 мл ацетона, 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 мл нитропрусида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 3 мл ледяной уксусной кислоты, после чего появляется вишнево-красное окрашивание.

Опыт 8.

Наливают в пробирку 2 мл ацетона, добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и несколько капель раствора йода в йодистом калии. В щелочной среде при взаимодействии ацетона с йодом образуется йодоформ, выпадающий в виде характерного осадка и обладающий специфическим запахом.



Оформление работы

В тетради записывают порядок выполнения опытов, приводят уравнения наблюдаемых реакций, записывают происходящие изменения и делают соответствующие выводы.

Лабораторная работа № 14

Определение констант жиров

Реактивы и оборудование: растительное масло, сливочное масло, маргарин и др., 0,1 н и 1 н спиртовые растворы гидроксида калия, 1 н раствор соляной кислоты, нейтральная смесь спирта с эфиром (1:1), 0,1 н раствор тиосульфата натрия ($24,82 \text{ г Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ в 1 л), 0,2 н спиртовой раствор йода (25,38 г/л), 1% раствор крахмала, фенолфталеин, этиловый спирт, колбы на 100 мл с пробками, колбочки на 50 мл с обратным воздушным холодильником (стеклянные трубки до 70 см), конические колбы на 100 мл, пипетки, бюретки, водяная баня, плитка.

Для характеристики химического состава жиров и масел определяют их специальные константы, которые получили название: кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное число и другие.

Опыт 1. Определение числа омыления жиров.

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных в форме триглицеридов жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Взвешивают на весах около 3 г жира. Массу жидкого масла определяют по разности массы колбы пустой и с жиром. Колбы берут объемом 50 -100 мл. Одновременно ставят контрольный опыт. Для этого в другую колбу добавляют 3 г дистиллированной воды, в обе колбы добавляют по 15 мл 1 н спиртового раствора гидроксида калия. Колбы закрывают пробками с обратным воздушным холодильником и ставят в кипящую водяную баню или на плитку с сеткой. Периодически колбы встряхивают. Следят, чтобы жидкость в колбе кипела слабо и чтобы верхняя часть трубки не нагревалась.

По окончании омыления колбы охлаждают, в каждую добавляют по 20 мл воды, 3-4 капли фенолфталеина и титруют 1 н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания (определяют количество не связавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 1 н раствора КОН соответствует 56 мг его, расчет числа омыления ведут по формуле:

$$\text{Число омыления (мг)} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 56}{a}, \text{ где}$$

V_1 - количество мл 1 н раствора соляной кислоты, затраченное на титрование контроля (колба с водой);

V_2 - количество мл 1 н раствора соляной кислоты, затраченное на титрование опытной колбы (колба с жиром);

a - навеска жира, г.

Опыт 2. Определение кислотного числа.

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется количеством мг гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число, наряду с другими физико-химическими показателями, характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же из незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла наблюдается гидролиз триглицеридов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, то есть к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Взвешивают 2-3 г масла (в этом опыте берут то же масло, что и для определения числа омыления), помещают в коническую колбу на 50 или 100 мл и растворяют в 10-15 мл нейтральной смеси спирта с эфиром. Смесь готовят перед опытом, смешивая спирт с эфиром в соотношении 1:1. В нее добавляют 3-4 капли фенолфталеина, а затем 0,1 н спиртовой раствор гидроксида калия по каплям до появления слабого розового окрашивания.

После растворения жира вносят 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания, стабильного в течение 30 секунд.

Кислотное число вычисляют по формуле:

$$\text{Кислотное число (мг)} = \frac{V \cdot T}{a}, \text{ где}$$

V— количество мл 0,1н раствора КОН, затраченное на титрование взятой навески жира;

T— титр 0,1 н раствора гидроксида калия (мг);

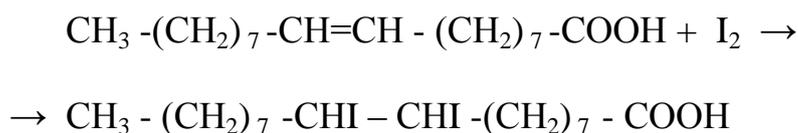
a – навеска жира, г.

Опыт 3. Определение эфирного числа.

Эфирное число характеризует содержание связанных в виде эфиров жирных кислот, поэтому его определяют как количество мг гидроксида калия, необходимое для нейтрализации связанных жирных кислот, освобождающихся при омылении 1 г жира. Поскольку кислотное число характеризует количество свободных жирных кислот, а число омыления характеризует количество и свободных и связанных жирных кислот, то эфирное число может быть определено теоретически путем вычитания из числа омыления величины кислотного числа.

Опыт 4. Определение йодного числа.

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот, которые легко могут присоединять по два атома галогена по месту каждой двойной связи. Например, олеиновая кислота вступает в реакцию с йодом по следующему уравнению:



Для характеристики ненасыщенности жира используют йодное число. Йодное число измеряется количеством г йода, которое присоединяется к 100 г жира. Йодное число является очень важной характеристикой жиров, поскольку позволяет судить о склонности жира к прогорканию, «высыханию» и другим процессам, которые происходят при хранении и переработке пищевых и технических масел.

В сухую коническую колбу емкостью 100 мл помещают исследуемое масло. Навеску берут на аналитических весах. Для этого взвешивают склянку из-под пенициллина с маслом и пипеткой в пробке, отмеривают из нее пипеткой в колбу 5 капель масла и снова взвешивают склянку. По разности масс определяют величину навески масла. В колбу добавляют 10 мл спирта для растворения навески. Если масло плохо растворяется, колбу подогревают на водяной бане. Во второй колбе ставят контрольный опыт. В нее также добавляют 10 мл спирта.

В обе колбы прибавляют по 12,5 мл 0,2 н спиртового раствора йода (из бюретки), перемешивают, приливают по 50 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают, закрыв пробкой. Через 5 минут не вошедший в реакцию йод оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата сначала до появления слабо-желтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

Разность между количеством мл 0,1 н раствора тиосульфата, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества йода, связанного навеской масла. Йодное число вычисляют по формуле:

$$\text{Йодное число (г)} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100}{a}, \text{ где}$$

V_1 – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование контроля, мл;

V_2 – количество 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедшее на титрование в опыте, мл;

0,0127 – титр тиосульфата натрия по йоду;

a – навеска жира, г.

Оформление работы

1. В тетрадь записывают определение всех констант жиров.
2. Записывают порядок выполнения всех опытов и расчетные формулы, по которым вычисляют константы исследуемых жиров.
3. На основании полученных результатов делают необходимые выводы.

Содержание

1.	Лаб. работа № 1.	Качественные реакции на белки и аминокислоты	3
2.	Лаб. работа № 2.	Реакции осаждения белков.....	11
3.	Лаб. работа № 3 .	Разделение белков мышечной ткани методом диализа и высаливания.....	14
4.	Лаб. работа № 4.	Определение изоэлектрической точки казеина и желатина...16	
5.	Лаб. работа № 5.	Разделение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге	18
6.	Лаб. работа № 6.	Определение концентрации белка колориметрическим методом по биуретовой реакции.....	22
7.	Лаб. работа № 7.	Качественные реакции на витамины.....	25
8.	Лаб. работа № 8.	Качественные пробы на присутствие ферментов.....	33
9.	Лаб. работа № 9	Изучение свойств фермента амилазы слюны.....	37
10.	Лаб. работа № 10.	Определение активности фермента каталазы.....	42
11.	Лаб. работа № 11.	Ферменты биологического окисления.....	44
12.	Лаб. работа № 12.	Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз.....	48
13.	Лаб. работа № 13.	Качественные пробы на липиды и продукты их обмена.....	51
14.	Лаб. работа № 14.	Определение констант жиров.....	55

*Нина Федоровна Баширова
Татьяна Леонидовна Талызина*

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**
У

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на белки и аминокислоты

Реактивы, оборудование: 10% и 20% растворы гидроксида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,5% водный раствор нингидрина, 1% раствор нингидрина в 95% растворе ацетона, конц. азотная и серная кислоты, реактив Миллона, реактив Фоля, 0,1% раствор фенола, ледяная уксусная кислота, 5% свежеприготовленный раствор нитропрусида натрия, 0,2% спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, крист. мочевины, 40% раствор мочевины, 0,01% раствор аргинина, 0,01% раствор тирозина, 0,005% раствор триптофана, раствор глиоксиловой кислоты, 1% раствор яичного белка, 1% раствор желатина, 10% раствор углекислого натрия, 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты (1:3), 5% раствор нитрита натрия;

штативы с пробирками, держатели, спиртовки, стеклянные трубочки, пипетки.

Лабораторная работа № 2

Реакции осаждения белков

Реактивы и оборудование: раствор яичного белка, кристаллический сульфат аммония, насыщенный раствор сульфата аммония, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, концентрированные растворы соляной, серной и азотной кислот, 5% раствор трихлоруксусной кислоты, 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 1% раствор медного купороса, 1% раствор ацетата свинца, насыщенный водный раствор фенола, раствор формалина, этиловый спирт,

спиртовки пробирки, воронки, бумажные фильтры.

Лабораторная работа № 3

Разделение белков мышечной ткани методом диализа и высаливания

Реактивы и оборудование: мышечная ткань, 10% раствор хлорида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, кристаллический хлорид натрия, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, центрифуга, ступки, фильтры бумажные, пробирки, воронки, стаканчики или колбочки на 50 или 100 мл, стеклянные палочки и трубочки, цилиндры, марля, целлофановые мешочки, нитки, стаканы для диализа.

Лабораторная работа № 4

Определение изоэлектрической точки казеина и желатина

Реактивы и оборудование: 0,1 М, 0,2 М и 1 М растворы уксусной кислоты, 0,4 % раствор казеина в 0,2 М растворе ацетата натрия, 0,1 М раствор ацетата натрия, 1% раствор желатина, 96% этанол или ацетон, штативы, пробирки, фотоэлектроколориметр, кюветы, пипетки на 5 и 10 мл.

Лабораторная работа № 5

Разделение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Реактивы и оборудование: Бутанол, ледяная уксусная кислота, стандартная смесь растворов аминокислот-свидетелей лизина, глицина, фенилаланина, 0,1 М растворы фенилаланина, глицина, лизина, 1% раствор нингидрина в ацетоне или в 96% этиловом спирте,

хроматографические камеры, хроматографическая бумага, фильтровальная бумага, микропипетки, делительные воронки, колбы или стаканы на 50 мл, цилиндры мерные, линейки, ножницы, простые карандаши, иголки швейные, нитки, пластилин, стеклянные пластинки, сушильный шкаф или электрические плитки, пульверизатор или чашки Петри для проявления хроматограмм, таблицы со значениями Rf.

Лабораторная работа № 6

Определение концентрации белка колориметрическим методом по биуретовой реакции

Реактивы и оборудование: кристаллический яичный альбумин, куриные и перепелиные яйца, 0,2% раствор гидроксида натрия, биуретовый реактив (1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 6 г сегнетовой соли $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 300 мл воды, затем при помешивании добавляют 300 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 г йодида калия для предотвращения самопроизвольного восстановления, объем доводят водой до 1 л. Раствор не подлежит длительному хранению),

штативы с пробирками, пипетки, мерные цилиндры, мерные колбы на 100 мл, фотозлектроколориметр КФК-2, воронки, фильтры бумажные

Лабораторная работа № 7

Качественные реакции на витамины

Реактивы и оборудование: Витамины: ретинол, эргокальциферол, токоферол, тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота; ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II), концентрированная серная, соляная и азотная кислоты, раствор анилина в концентрированной соляной кислоте, бром в хлороформе (1:60), раствор хлорида железа (III), раствор красной кровяной соли, изобутиловый спирт, раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, металлический цинк, раствор метиленовой сини, 10% раствор соляной кислоты,

штативы, пробирки, водяная баня, спиртовки, держатели для пробирок, флюороскоп.

Лабораторная работа № 8

Качественные пробы на присутствие ферментов

Реактивы и оборудование: 3% раствор пероксида водорода, кристаллический гидрохинон, насыщенный раствор тирозина, 5% раствор мочевины, 1% раствор сахарозы, фенолфталеин, красная лакмусовая бумага, сырой картофель, морковь, капуста, мясо, соевая мука, дрожжи, реактив Фелинга, центрифуга, ступки, песок, марля, воронки, пипетки, водяная баня, лучинки, плитка,

Лабораторная работа № 9

Изучение свойств фермента амилазы слюны

Реактивы и оборудование: раствор I_2 в KI, 1%-ный раствор крахмала, раствор Фелинга, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор медного купороса, 0,1 М растворы гидрофосфата и дигидрофосфата калия, 1% раствор сахарозы, 10% раствор гидроксида натрия,

пробирки, пипетки, бюретки, индикаторная бумага, прибор Алямовского, рН-метр, стеклянные трубочки, мерные цилиндры, пластинки с ячейками, стаканчики на 50 - 100 мл, воронки, водяные бани, стаканы, марля, лед, электроплитки, термометры, спиртовки, штативы.

Лабораторная работа № 10

Определение активности фермента каталазы

Реактивы и оборудование: растительные объекты для исследования – свежие капуста, картофель, морковь, перец, лук, чеснок и др., 0,1 н раствор пероксида водорода, 0,1 н раствор перманганата калия, 10% раствор серной кислоты, порошок карбоната кальция, песок, ступки,

марля, воронки, центрифуга, колбы или стаканчики, плитка, пипетки, бюретки для титрования, цилиндры, весы технические.

Лабораторная работа № 11

Ферменты биологического окисления

Реактивы и оборудование: концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,5 М раствор аскорбиновой кислоты ($\approx 9\%$), цитохром с, 0,01% раствор метиленовой сини, свежая мышечная ткань, витамин рибофлавин в таблетках, нейтральный раствор 3% янтарной кислоты, подсолнечное масло,

водяная баня, термометры, пробирки, колбочки на 50 – 100 мл, фарфоровые ступки, марля, воронки, пипетки, пробирки с газоотводной трубкой, спектрофотометр.

Лабораторная работа № 12

Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз

Реактивы и оборудование: дрожжи, эфир, 10%, 20% и 0,1н раствор гидроксида натрия, 3% раствор уксусной кислоты, 10% раствор серной кислоты, концентрированная серная кислота, 1% и 5 % раствор медного купороса, спиртовой раствор α -нафтола, 2% раствор азотнокислого серебра, концентрированный раствор аммиака, молибденовый реактив, 1% раствор дифениламина, песок,

ступки, колбочки с обратным воздушным холодильником на 50 мл, воронки, стеклянные палочки и трубочки, пипетки, стаканы, пробирки, штативы, плитки или песчаная баня, марля, центрифуга, бумажные фильтры, спиртовки, лакмусовая бумага.

Лабораторная работа № 13

Качественные пробы на липиды и продукты их обмена

Реактивы и оборудование: говяжий жир, желчь, раствор яичного белка, растительное масло, 1% раствор мыла, 1% раствор сахарозы, концентрированная серная кислота, 10% раствор гидроксида натрия, 10% раствор нитропруссиды натрия (свежеприготовленный), ледяная уксусная кислота, раствор йода в йодиде калия, концентрированный и разбавленный раствор аммиака, безводный гидросульфат калия, бромная вода, 1% раствор азотнокислого серебра, глицерин, 2% раствор медного купороса, насыщенный раствор хлорида натрия,

штативы, пробирки, колбочки на 50 мл с обратным воздушным холодильником, воронки, фильтры, пипетки, плитки.

Лабораторная работа № 14

Определение констант жиров

Реактивы и оборудование: растительное масло, сливочное масло, маргарин и др., 0,1 н и 1 н спиртовые растворы гидроксида калия, 1 н раствор соляной кислоты, нейтральная смесь спирта с эфиром (1:1), 0,1 н раствор тиосульфата натрия (24,82 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л), 0,2 н спиртовой раствор йода (25,38 г/л), 1% раствор крахмала, фенолфталеин, этиловый спирт,

колбы на 100 мл с пробками, колбочки на 50 мл с обратным воздушным холодильником (стеклянные трубки до 70 см), конические колбы на 100 мл, пипетки, бюретки, водяная баня, плитка.