

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

Кафедра микробиологии и биохимии

**Методические указания к выполнению
лабораторных работ**

Дисциплина: **Б1.В.03.05 «Химические основы биологических процессов»**

Направление подготовки /специальность: **04.03.01 «Химия»**

Направленность/специализация: **«Неорганическая химия и химия
координационных соединений»**

Мурманск
2019

Составитель – Мишанина Людмила Александровна, канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии и биохимии Естественно-технологического института Мурманского государственного технического университета

Методические рекомендации к написанию контрольных работ рассмотрены и одобрены на заседании кафедры микробиологии и биохимии 18.06.2019 г., протокол № 12.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
2. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН
3. СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
4. СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ТЕМ ДИСЦИПЛИНЫ

1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Данные методические указания составлены в соответствии с ФГОС ВО по направлению подготовки (специальности) 04.03.01 «Химия», профилю (специализации) «Неорганическая химия и химия координационных соединений» (уровень бакалавриата), утвержденным приказом Министерства образования и науки РФ № 671 от «17» июля 2017 г.

2. Цель и задачи учебной дисциплины «Химические основы биологических процессов».

2.1 Цель преподавания дисциплины

Подготовка обучающихся в соответствии с квалификационной характеристикой и учебным планом направления 04.03.01 «Химия», освоение теоретических знаний в области химии и формирование профессиональных компетенций согласно ФГОС ВО.

2.2. Задачи изучения дисциплины:

- получение необходимых знаний по химическим основам биологических процессов, позволяющих успешно работать в области химии;
- формирование способности самостоятельно осуществлять научно-исследовательскую и производственную деятельность в области химии;
- получение навыков эффективного использования биохимических методов анализа в химии.

Обучающийся должен:

знать:

- связь строения вещества и протекания химических процессов);
- роль химического анализа;
- принципы и области использования основных методов химического анализа (химических, физических);
- иметь представление об особенностях объектов анализа,
- понимать принципы и основы химии живой материи, быть знакомым с химическими основами биологических процессов и важнейшими принципами молекулярной логики живого, знать основы химических компонентов клетки, молекулярных основ биокатализа, метаболизма, наследственности, иммунитета, нейроэндокринной регуляции и фоторецепции.

владеть:

- методологией выбора методов анализа, иметь навыки их применения.

Учебным планом по дисциплине «Химические основы биологических процессов» предусмотрена 1 контрольная работа.

В настоящие методические указания включен тестовый контроль знаний студентов.

Учебным планом по дисциплине «Химические основы биологических процессов» предусмотрено 18 лабораторных работ.

2. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ п/п	Наименование работ	Количество часов по формам обучения		
		Очная	Очно-заочная	Заочная
1.	ЛР № 1. Универсальные и специфические качественные реакции на аминокислоты и белки.	2		
2.	ЛР № 2. Физико-химические свойства белков. Высаливание, денатурация, изоэлектрическое состояние.	2		
3.	ЛР № 3. Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим биуретовым макрометодом.	2		
4.	ЛР № 4. Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим биуретовым микрометодом.	2		
5.	ЛР № 5. Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим методом Лоури.	2		
6.	ЛР № 6. Количественное определение аминного азота фотоколориметрическим нингидриновым методом.	2		
7.	ЛР № 7. Количественное определение азота аминокислот методом формольного титрования.	2		
8.	ЛР № 8. Ферменты. Качественные реакции на отдельные ферменты.	2		
9.	ЛР № 9. Физико-химические свойства ферментов. Специфичность действия. Влияние pH, температуры на активность ферментов.	2		
10.	ЛР № 10. Количественное определение активности амилазы по методу Вольгемута.	2		
11.	ЛР № 11. Количественное определение активности пепсина по методу Пятницкого.	2		
12.	ЛР № 12. Количественное определение активности трипсина.	2		
13.	ЛР № 13. Липиды. Органолептические, физические и химические показатели качества жиров. Кислотное число, число омыления, эфирное число.	2		
14.	ЛР № 14. Липиды. Иодное число. Пероксидное число.	2		
15.	ЛР № 15. Углеводы. Качественные реакции на углеводы.	2		
16.	ЛР № 16. Жирорастворимые витамины (качественные реакции).	2		
17.	ЛР № 17. Водорастворимые витамины (качественные реакции).	2		
Всего:		34		

3. СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная литература

1. Мишанина, Л. А. Практикум по биохимии животных : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология» / Л. А. Мишанина. – Мурманск : Изд-во МГТУ, 2014. – 8 п.л. : ил. (Гриф Учебно-методического объединения по классическому университетскому образованию) – 30 экз.

2. Северин, Е.С., Биохимия [Электронный ресурс] : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 768 с. - ISBN 978-5-9704-3762-9 - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437629.html> - ЭБС «Консультант студента».

3. Димитриев, А.Д. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие / Димитриев А.Д. - Электрон. текстовые данные. - Саратов: Вузовское образование, 2018. - 111 с. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/74956.html>. - ЭБС «IPRbooks»

4. Емельянов, В.В. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Емельянов В.В., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н. - Электрон. текстовые данные. - Екатеринбург: Уральский федеральный университет, ЭБС АСВ, 2016. - 132 с. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/68228.html>. - ЭБС «IPRbooks»

Дополнительная литература

5. Тихонов, Г.П. Основы биохимии [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Тихонов Г.П., Юдина Т.А. - Электрон. текстовые данные. - М.: Московская государственная академия водного транспорта, 2014. - 179 с. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/46495.html>. - ЭБС «IPRbooks»

6. Пинчук, Л.Г. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие / Пинчук Л.Г., Зинкевич Е.П., Гридина С.Б. - Электрон. текстовые данные. - Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. - 364 с. - Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/14362.html>. - ЭБС «IPRbooks»

4. СОДЕРЖАНИЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ ТЕМ ДИСЦИПЛИНЫ

Лабораторная работа № 1

Универсальные и специфические качественные реакции на аминокислоты и белки

Цель работы: освоить методы идентификации отдельных аминокислот и белков.

Качественные цветные реакции на аминокислоты и белки позволяют обнаружить и идентифицировать аминокислоты и белки в биологическом материале. Цветные реакции подразделяются на универсальные и специфические. Универсальными цветными реакциями на белок являются биуретовая и нингидриновая. Специфические цветные реакции обусловлены наличием в белковой молекуле определенной аминокислоты. Характерный результат цветной реакции – окрашенный продукт. Основные цветные реакции приведены в табл.

Качественные реакции на аминокислоты и белки

<u>Реакция</u>	<u>Используемый реактив</u>	<u>Определяемый белок или аминокислота</u>	<u>Результат реакции</u>
<u>Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)</u>	<u>Биуретовый реактив</u> ($\text{CuSO}_4 + \text{NaOH} + \text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	<u>Белки, полипептиды, олигопептиды</u>	<u>Комплекс сине-фиолетового цвета</u>
<u>Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)</u>	<u>Концентрированная азотная кислота (HNO_3)</u>	<u>Циклические аминокислоты</u> <u>Белки, содержащие циклические аминокислоты</u>	<u>Лимонно-желтое окрашивание</u>
<u>Нингидриновая реакция</u>	<u>Нингидрин</u>	<u>α-Аминокислоты, белки, содержащие α-аминокислоты</u>	<u>Комплекс синего цвета (ДИДА, комплекс Руэмманна)</u>
<u>Реакция Миллона</u>	<u>Реактив Миллона</u> ($\text{HgNO}_3, \text{HNO}_3$)	<u>Тирозин</u> <u>Белки, содержащие тирозин</u>	<u>Осадок красного цвета – ртутная соль нитропроизводного</u>
<u>Реакция Адамкевича</u>	<u>Глиоксильная кислота</u> (CH_2O_4)	<u>Триптофан</u>	<u>Красно-фиолетовое окрашивание</u>
<u>Реакция</u>	<u>Используемый реактив</u>	<u>Определяемый белок или аминокислота</u>	<u>Результат реакции</u>
<u>Реакция Шульца –Распайля</u>	<u>Оксиметилфурфурол</u>	<u>Триптофан</u>	<u>Красно-фиолетовое окрашивание</u>
<u>Реакция Паули</u>	<u>Диазбензолсульфокислота</u>	<u>Тирозин, гистидин</u>	<u>Азокраситель красного цвета</u>
<u>Реакция Сакагучи</u>	<u>α-Нафтол</u>	<u>Аргинин</u>	<u>Красное окрашивание</u>
<u>Реакция Фоля</u>	<u>$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 + \text{NaOH}$</u>	<u>Серосодержащие аминокислоты (цистин, цистеин)</u>	<u>Черный осадок PbS</u>
<u>Нитропруссидная реакция (реакция Мак-Карти и Салливана)</u>	<u>Нитропруссид</u> $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$	<u>Серосодержащие аминокислоты</u>	<u>Красное окрашивание</u>
<u>Метод Лоури</u>	<u>Реактив Фолина</u>	<u>Белки</u>	<u>Зеленое окрашивание</u>
<u>Реакция Ван-Слейка</u>	<u>HNO_3</u>	<u>Аминокислоты</u>	<u>Газообразный N_2</u>

<u>Реакция Сэнгера</u>	<u>1-Фтор-2-4-динитробензол</u>	<u>Аминокислоты</u> <u>N-концевые</u> <u>в пептиде</u>	<u>Отщепление</u> <u>N-аминокислоты</u>
<u>Реакция Эдмана</u>	<u>Фенилизотиоцианит</u> <u>(ФИТЦ)</u>	<u>Аминокислоты</u> <u>N-концевые</u>	<u>Отщепление</u> <u>N-аминокислоты</u>
<u>Метод Акабори</u>	<u>Гидразин N₂H₂</u>	<u>C-концевые</u> <u>аминокислоты</u>	<u>Отщепление</u> <u>C-аминокислоты</u>
<u>Реакция Геллера</u>	<u>HNO₃</u>	<u>Белок</u>	<u>Белый осадок</u>

1. Биуретовая реакция

Биуретовая реакция – универсальная цветная реакция, показатель наличия пептидных связей в соединении. Биуретовую реакцию дают соединения, которые содержат не менее двух пептидных связей. Белки, полипептиды, олигопептиды, как и биурет, образуют солеобразные биуретовые комплексы красно-фиолетового и сине-фиолетового цвета с биуретовым реактивом, поэтому данная реакция на белки называется биуретовой реакцией. Она характеризует степень гидролиза белков, полный гидролиз белка до аминокислот фиксируется отсутствием биуретовой реакции.

Биуретовую реакцию могут давать небелковые вещества: оксамид (H₂N–CO–CO–NH₂), ряд аминокислот (гистидин, серин, треонин, аспарагин).

Оборудование, реактивы: пробирки; реактив биуретовый; белок яичный (1 %-й раствор); желатина (0,1 %-й раствор); биурет (1 %-й раствор); водная вытяжка из мышечной ткани.

Приготовление биуретового реактива: 1,5 г CuSO₄•5H₂O и 6 г NaKC₄H₄O₆•4H₂O (сегнетова соль, тартрат, или виннокислый натрий-калий) растворяют в 500 см³ воды, при энергичном перемешивании приливают 300 см³ 10 %-го NaOH (свободного от Na₂CO₃), добавляют 1 г KJ, доводят объем дистиллированной водой до 1 дм³.

Порядок выполнения работы

Берут четыре пробирки. В одну пробирку наливают 1 см³ 1 %-го раствора белка, во вторую – 1 см³ 0,1 %-го раствора желатины, в третью – 1 см³ водной вытяжки из мышечной ткани, в четвертую – 1 см³ раствора биурета. В каждую пробирку добавляют по 1 см³ свежеприготовленного биуретового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

Появление сине-фиолетового окрашивания свидетельствует об образовании биуретового комплекса и подтверждает наличие пептидных связей.

2. Нингидриновая реакция

Нингидриновая реакция характерна для аминогрупп, находящихся в α-положении и входящих в состав белков, полипептидов, олигопептидов, свободных аминокислот. При кипячении с разбавленным водным раствором нингидрина α-аминокислоты, полипептиды и белки дают синее и сине-фиолетовое окрашивание. Нингидрин (трикетогидринден) – производное гидриндена. Гидринден образуется при гидрировании индена, который является ароматическим углеводородом с конденсированными бензольным и пятичленным кольцами.

Известно несколько механизмов взаимодействия нингидрина с α-аминокислотами в водной среде. Первый механизм включает две стадии, которые проходят при pH 5–5,5. Первая стадия включает образование восстановленного нингидрина за счет окислительного дезаминирования аминокислоты с образованием аммиака, одновременно происходит ее декарбоксилирование с образованием диоксида углерода. Образование углекислого газа специфично для свободных аминокислот. Белки, полипептиды при взаимодействии с нингидрином не образуют диоксид углерода. Для второй стадии характерно взаимодействие аммиака с эквимольными количествами окисленного

и восстановленного нингидрина, в результате образуется сине-фиолетовый комплекс Руэманна (пурпур Руэманна, дикетогидриндендикетогидринамин ДИДА). Для ДИДА характерен максимум поглощения при длине волны 580 нм. Пролин и оксипролин дают производные желтого цвета (максимум поглощения при длине волны 440 нм) и не образуют аммиак.

В соответствии с другим механизмом, при взаимодействии α -аминокислоты с нингидрином образуется аналог Шиффова основания, которое перегруппировывается, декарбоксилируется, в итоге образуются аминодикетогидринден, альдегид и углекислый газ. Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образующееся соединение, енолизуясь, переходит в сине-фиолетовый комплекс Руэманна (продукт конденсации мурексидного строения). В присутствии органических растворителей (спирта, ацетона) Шиффова основание устойчиво, так как вода отсутствует, данное соединение конденсируется с нингидрином и содержит в своем составе радикал исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску – синюю, фиолетовую, голубую, а в присутствии пролина и оксипролина – желтую. Нингидриновая реакция со спиртовым или ацетоновым раствором нингидрина используется в хроматографии для определения количества аминокислот, их открытия и разделения.

Оборудование, реактивы: пробирки; баня водяная; нингидрин (0,5 %-й раствор в органическом растворителе – ацетоне или спирте); белок яичный (1 %-й раствор); водная вытяжка из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В первую пробирку вносят 1 см³ раствора белка, во вторую – 1 см³ раствора желатин, в третью – 1 см³ водной вытяжки из мышечной ткани, в каждую добавляют по 0,5 см³ раствора нингидрина. Пробирки нагревают до кипения на водяной бане. Через 2–3 мин во всех пробирках появляется сине-фиолетовое окрашивание.

3. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция (греч. *xanthos* – желтый) – реакция на циклические аминокислоты. При нагревании раствора белка с концентрированной азотной кислотой жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, переходящий при добавлении щелочи в оранжевый. Реакция обусловлена наличием в белке циклических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина), которые при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные желтого цвета (реакция нитрования). Нитропроизводные при добавлении щелочи превращаются в соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет. Белки и полипептиды, в состав которых не входят циклические аминокислоты, не дают ксантопротеиновой реакции. Ксантопротеиновую реакцию (появление желтой окраски) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти при попадании концентрированной азотной кислоты.

Оборудование, реактивы: пробирки; баня водяная; кислота азотная (конц.); гидроксид натрия (30 %-й водный раствор); белок яичный (1 %-й раствор); желатина (1 %-й раствор); тирозин (1 %-й раствор); водная вытяжка из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В первую пробирку наливают 1 см³ 1 %-го раствора яичного белка, во вторую – 1 см³ 1 %-го раствора желатин, в третью – 1 см³ водной вытяжки из мышечной ткани, в четвертую – 1 см³ раствора тирозина. Во все пробирки добавляют по 0,5 см³ концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. В пробирках с белком, содержащим циклические аминокислоты, и тирозином появляется лимонно-желтое окрашивание. В пробирке с желатиной появляется едва заметное бледно-желтое окрашивание из-за примесей других белков.

Пробирки охлаждают, затем осторожно добавляют в каждую по 1,5 см³ 30 %-го раствора NaOH. В пробирках с циклической аминокислотой и белком, содержащим циклические аминокислоты, наблюдается переход желтой окраски в оранжевую.

4. Реакция на тирозин (реакция Миллона)

Реакция Миллона является качественной реакцией на ароматическую аминокислоту тирозин. При нагревании растворов белков, в состав которых входит тирозин, с реактивом Миллона образуется осадок белка, окрашенный в кроваво-красный цвет. Реактив Миллона – смесь азотнокислой и азотистокислой солей одновалентной ртути (HgNO_3 и HgNO_2), растворенных в концентрированной азотной кислоте.

Белки и полипептиды, которые не содержат тирозина, не дают реакции Миллона (например, желатина, клупеин, сальмин). При взаимодействии реактива Миллона с раствором тирозина осадок не образуется, лишь раствор за счет ртутной соли нитропроизводного приобретает красный цвет.

Реакцию Миллона дают фенолы, полифенолы, алкалоиды, содержащие фенольную группировку. К раствору белка не следует добавлять избыток реактива Миллона, так как он содержит HNO_3 , которая при взаимодействии с белком может дать ксантопротеиновую реакцию (желтая окраска), маскирующую реакцию Миллона.

Оборудование, реактивы: пробирки; реактив Миллона; тирозин; (1 %-й раствор); белок яичный (1 %-й раствор); желатина (0,1 %-й раствор); водная вытяжка из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В одну пробирку наливают $0,5 \text{ см}^3$ 1 %-го раствора яичного белка, во вторую – $0,5 \text{ см}^3$ 0,1 %-го раствора желатины, в третью – $0,5 \text{ см}^3$ водной вытяжки из мышечной ткани. Во все пробирки добавляют по 5 капель реактива Миллона и осторожно нагревают. В пробирках с белком, содержащим тирозин, осадок белка приобретает красное окрашивание. В пробирке с желатиной осадок растворяется, и жидкость остается бесцветной.

5. Реакция на триптофан (реакция Адамкевича)

Триптофан является гетероциклической α -аминокислотой. В кислой среде он реагирует с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под воздействием концентрированной H_2SO_4 , образуя продукты конденсации красно-фиолетовой окраски. Глиоксиловая кислота является альдегидокислотой. Она всегда присутствует в виде примеси в ледяной уксусной кислоте, поэтому уксусную кислоту используют в реакции Адамкевича как источник глиоксиловой кислоты. Растворы белков, содержащих триптофан, при взаимодействии с глиоксиловой кислотой в присутствии концентрированной H_2SO_4 также приобретают красно-фиолетовую окраску.

Оборудование, реактивы: пробирки; баня водяная; белок яичный (1 %-й раствор); желатина (1 %-й раствор); кислота серная (конц.); кислота уксусная, содержащая глиоксиловую кислоту (конц.); водная вытяжка из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В одну пробирку наливают $0,5 \text{ см}^3$ 1 %-го раствора белка, в другую – $0,5 \text{ см}^3$ 1 %-го раствора желатины, в третью – $0,5 \text{ см}^3$ водной вытяжки из мышечной ткани. В каждую пробирку добавляют по $0,5 \text{ см}^3$ концентрированной уксусной кислоты, содержащей глиоксиловую кислоту. Пробирки слегка нагревают на водяной бане, охлаждают. Наслаивают в каждую пробирку по стенкам по 1 см^3 концентрированной серной кислоты.

В пробирках с белком, содержащим триптофан, на границе двух слоев жидкости наблюдается образование красно-фиолетового кольца. В пробирке с желатиной изменения окраски не происходит, так как желатина не содержит триптофана.

6. Реакция на триптофан (реакция Шульца – Распайля)

Триптофан и белки, содержащие триптофан, реагируют с альдегидами, образуя продукты конденсации красно-фиолетового цвета. Если к раствору белка добавить сахар, затем осторожно по стенке пробирки спускать из пипетки концентрированную серную кислоту, то на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Это

объясняется взаимодействием триптофана с оксиметилфурфуролом, образующимся из фруктозы. Сахароза является дисахаридом; при расщеплении одной молекулы сахарозы образуются молекулы фруктозы и глюкозы.

Оборудование, реактивы: пробирки; кислота серная (конц.); белок яичный (1 %-й раствор); раствор сахарозы.

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 см³ 1 %-го раствора белка, добавляют 1 см³ раствора сахарозы, далее осторожно, по стенке пробирки, наслаивают 0,5 см³ концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей появляется красно-фиолетовое кольцо.

7. Реакция на гистидин (реакция Паули)

Реакция Паули – диазореакция на гистидин и тирозин. При добавлении диазореактива к щелочному раствору белка появляется оранжево-красное окрашивание. Гистидин и тирозин при взаимодействии с диазобензолсульфокислотой образуют азокраситель красного цвета.

Реакцию Паули дают также вещества, имеющие фенольное, имидазольное, пиррольное или тиазоловое кольцо (адреналин, тиамин, карнозин, желчные пигменты, гистамин).

Диазобензолсульфокислота – неустойчивое соединение, при хранении разрушается. Подготовку диазореактива следует проводить перед началом опыта.

Оборудование, реактивы: пробирки; кислота сульфаниловая (1 %-й раствор в 5 %-м растворе соляной кислоты); нитрит калия (0,5 %-й раствор); карбонат натрия (10 %-й раствор); гистидин (1 %-й раствор); желатина (1 %-й раствор); белок яичный (1 %-й раствор); водная вытяжка из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В первую пробирку наливают 1 см³ 1 %-го раствора гистидина, во вторую – 1 см³ 1 %-го раствора яичного альбумина, в третью – 1 см³ 1 %-го раствора желатины, в четвертую – 1 см³ водной вытяжки из мышечной ткани. Во все пробирки добавляют по 3 см³ свежеприготовленного диазореактива (1 см³ 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты смешивают с 2 см³ 0,5 %-го раствора нитрита калия), сильно встряхивают и приливают по 6 см³ 20 %-го раствора карбоната натрия. В пробирках, где присутствует гистидин, развивается интенсивная вишнево-красная окраска.

8. Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фоля)

При добавлении к раствору белка реактива Фоля, состоящего из ацетата свинца и гидроксида натрия, и последующем кипячении раствор темнеет, наблюдается выпадение черного осадка. Это объясняется тем, что в состав белка входят аминокислоты, содержащие слабо связанную серу (цистеин, цистин). Эти аминокислоты при нагревании в присутствии щелочи разрушаются, образуя сульфид натрия. Ацетат свинца реагирует со щелочью с образованием плюмбита натрия. Далее сульфид натрия реагирует с плюмбитом натрия с образованием черного осадка сульфида свинца. Метионин этой реакции не дает, так как сера в этой аминокислоте прочно связана.

Оборудование, реактивы: пробирки; баня водяная; белок яичный (1 %-й раствор); желатина (1 %-й раствор); волос; реактив Фоля. Для приготовления реактива Фоля следует смешать равные объемы 5 %-го раствора $Pb(CH_3COO)_2$ и 30 %-го раствора NaOH.

Порядок выполнения работы

Берут три пробирки. В первую наливают 0,5 см³ раствора белка, во вторую – 0,5 см³ желатины, в третью добавляют волос. Далее в каждую пробирку наливают 0,5 см³ свежеприготовленного реактива Фоля. Пробирки помещают на кипящую баню на 2 мин. При кипячении жидкость в пробирке с яичным белком темнеет, так как в результате реакции Фоля образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирке с желатиной реакция Фоля не идет, черный осадок не образуется, так как желатина почти не содержит серосодержащих аминокислот. Волос состоит из белков кератинов,

содержащих аминокислоты со слабо связанной серой, поэтому в третьей пробирке волос при кипячении утолщается и покрывается черным налетом PbS; при стоянии волос растворяется, на дне пробирки образуется черный осадок PbS.

9. Нитропруссидная реакция на серосодержащие аминокислоты

Если раствор белка прокипятить со щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$, жидкость окрасится в красный цвет. Реакция обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина), которые при кипячении со щелочью разрушаются с образованием сернистого натрия. Нитропруссид натрия при взаимодействии с Na_2S дает продукт красного цвета.

Оборудование, реактивы: пробирки; гидроксид натрия (20 %-й раствор); нитропруссид натрия (5 %-й раствор); белок яичный (1 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают $0,5 \text{ см}^3$ 1 %-го раствора белка, добавляют $0,5 \text{ см}^3$ 20 %-го раствора NaOH, интенсивно кипятят на водяной бане 5 мин. После охлаждения приливают $0,25 \text{ см}^3$ свежеприготовленного 5 %-го раствора нитропруссид натрия. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Оформление работы. Наблюдения по каждой реакции записывают в тетрадь, делают выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ. ВЫСАЛИВАНИЕ. ДЕНАТУРАЦИЯ. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ

Цели работы:

1. Изучить процесс обратимого осаждения (высаливания) белков.
2. Изучить денатурацию белков, влияние физических и химических денатурирующих факторов на денатурацию белков.
3. Изучить изоэлектрическое состояние белков, определить изоэлектрическую точку.

1. Высаливание белков.

Высаливание – процесс обратный солевому растворению. Солевое растворение – возрастание растворимости белков в воде при добавлении небольших концентраций нейтральных солей ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , Mg SO_4 и др.). Нейтральные соли в малых концентрациях увеличивают степень диссоциации ионизированных групп белка, экранируют заряженные группы белковых молекул, увеличивают диэлектрическую постоянную воды, в результате вода усиливает диссоциацию белка.

Высаливание - осаждение белков из водных растворов под действием высококонцентрированных нейтральных солей (солей щелочных и щелочноземельных металлов). Высаливание – обратимое осаждение при определенных условиях. При высаливании происходит разрушение гидратных оболочек. Относительная эффективность высаливающего действия различных ионов зависит от их размера, величины заряда, способности к гидрации. При больших концентрациях ионов в растворе они оттягивают к себе от заряженных групп белка поляризованные молекулы воды и нарушают гидратную оболочку белка, которая предотвращает его осаждение.

По способности к высаливанию белков из водного раствора анионы и катионы

Для анионов в более щелочной среде по сравнению с ИЭТ белка лиотропный выглядит следующим образом:

$\text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > [\text{Цитрат}]^{2-} > [\text{Тартрат}]^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{CNS}^-$
(роданид).

Лиотропный ряд для катионов: $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cs}^+ > \text{Pb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$
Практически для высаливания часто используют NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Mg SO₄.

Хлорид натрия осаждает белки слабее, чем сульфат аммония, так как обладает меньшей дегидратирующей способностью в соответствии с положением ионов в ряду Гофмейстера.

1.1. Высаливание белков

Оборудование, реактивы:

Пробирки; альбумин яичный (1%-й раствор); сульфат аммония (крист.).

Порядок выполнения работы:

В пробирку наливают 1 мл раствора белка, постепенно добавляют порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения раствора, так как альбумины хорошо растворяются в воде и осаждаются при 100%-м насыщении раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

полное насыщение реализуется, когда очередная порция $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не растворится. Через несколько минут в пробирке наблюдается осаждение белка. По указанию преподавателя проводят эксперимент с NaCl.

1.2. Определение границ высаливания альбуминов.

Нижняя граница высаливания - минимальная концентрация соли, при которой белок начинает высаливаться.

Верхняя граница высаливания – концентрация соли, при которой растворенный белок выпадает в осадок полностью, то есть дальнейшее увеличение концентрации соли не меняет массу осадка белка.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; пипетки; воронки; белок яичный (1%-й раствор); сульфат аммония (насыщ. раствор); сульфат аммония (крист.).

Порядок выполнения работы:

Берут девять пробирок. В каждую из девяти пробирок вносят раствор белка, насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и воду в количествах, указанных в табл. 1.

Таблица 1

Номер пробирки	Объем, мл				Полнота насыщения %
	Раствора альбумина	Насыщен. р-ра сульфата аммония	Воды	Общий	
1	1,0	2,0	7,0	10	20
2	1,0	3,0	6,0	10	30
3	1,0	4,0	5,0	10	40
4	1,0	5,0	4,0	10	50

5	1,0	6,0	3,0	10	60
6	1,0	7,0	2,0	10	70
7	1,0	8,0	1,0	10	80
8	1,0	9,0	0	10	0
9	1,0	9,0 +твердая соль	0	10	100

Содержимое пробирок перемешивают. Нижнюю границу высаливания (минимальную концентрацию соли, при которой происходит высаливание), определяют для пробирки, в которой образуется самое заметное помутнение по сравнению с другими пробирками.

Для определения верхней границы выпавшие в других пробирках осадки белка отфильтровывают, к фильтратам добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

до насыщения раствора. Верхнюю границу высаливания определяют в пробирке, в которой не выпал осадок белка при добавлении твердого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения.

2. Денатурация белков

Денатурация белка – нарушение нативной (природной) пространственной структуры белковой молекулы, приводящее к

уменьшению или полной потере ее растворимости, изменению физико-химических свойств белка, утрате биологической активности. Денатурация - необратимое осаждение белков. При денатурации происходит разрушение четвертичной, третичной и вторичной структур (происходит расщепление дисульфидных, гидрофобных, ионных, водородных связей). Первичная структура не разрушается, денатурация не сопровождается разрывом ковалентных связей в составе полипептидной цепи.

Денатурирующие факторы подразделяются на физические и химические.

К химическим факторам относятся:

- концентрированные минеральные кислоты (H_2SO_4 , HCl ; HNO_3);
- катионы тяжелых металлов и анионы иода, тиоцианата;
- органические растворители (низшие спирты, этиленгликоль, диоксан, диметилсульфоксид);
- трихлоруксусная кислота;
- сульфосалициловая кислота;
- таннин;
- мочевины и другие амиды (формамида, гуанидинхлорид).

Максимальное денатурирующее влияние мочевины и другие амиды проявляют для высоких концентраций (6M – 10M).

К физическим факторам денатурации относятся:

- высокая температура;
- высокое давление (5000 – 10 000 атм);
- энергичное встряхивание;
- облучение звуковыми волнами высокой частоты;
- ультрафиолетовый свет;
- ионизирующее излучение.

При денатурации белков пептидные связи становятся более доступными для действия протеолитических ферментов, протеолиз денатурированных белков протекает с

большой скоростью, чем нативных. Полная денатурация в большинстве случаев необратима, однако иногда удается ренатурировать белки (ферменты).

Способность к ренатурации после нагревания характерна для фермента трипсина. Необходимым условием его ренатурации является медленное охлаждение белка до комнатной температуры ("отжиг"), при этом восстанавливается нативная конформация и биологическая функция трипсина.

2.1. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов (Hg, Cu, Zn, Pb и др.) образуют связи с полярными группами белков, разрывают водородные, ионные связи, нарушают четвертичную, третичную и вторичную структуры белковых молекул.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; белок яичный (1%-й раствор); сульфат меди CuSO_4 (1%-й раствор); ацетат свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (5%-й раствор).

Порядок выполнения работы:

В четыре пробирки наливают по 0,5 мл раствора белка. В первую пробирку вносят четыре капли раствора CuSO_4 , во вторую – 1 мл раствора CuSO_4 . В третью и четвертую пробирки вносят соответственно 4 капли и 1 мл 5%-го раствора ацетата свинца.

При небольшой концентрации солей тяжелых металлов (пробирки 1 и 3) наблюдается образование осадка, который растворяется в избытке осадителя (явление адсорбционной пептизации).

При более высоких концентрациях солей наблюдается необратимое осаждение белков (пробирки 2 и 4).

2.2. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (азотная, соляная, серная) вызывают денатурацию белка, образуют комплексные соли белка с кислотами, происходит выделение осадка белка. Ортофосфорная кислота осадка не дает.

В избытке всех минеральных кислот, за исключением HNO_3 , осадок растворяется. Качественная реакция с HNO_3 лежит в основе количественного определения белка по методу Робертса-Стольников-Бредберга.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; белок яичный (1%-й раствор); кислота серная (конц.); кислота азотная (конц.) или реактив Ларионовой.

Для приготовления реактива Ларионовой 20-30 г хлорида натрия растворяют при нагревании в 100 мл H_2O , к 99 мл фильтрата прибавляют 1 мл концентрированной HNO_3 .

2.2.1. Осаждение белка азотной кислоты (проба Геллера)

В пробирку наливают 0,5 мл азотной кислоты или реактива Ларионовой.

Осторожно, по стенке пробирки, наклоненной под углом 45° , накладывают 0,5 мл раствора белка. На границе двух жидкостей образуется осадок белка в виде белого колечка, толщина и быстрота появления которого зависят от количества белка. Осадок не растворяется в избытке азотной кислоты.

2.2.2. Осаждение белка концентрированной серной кислотой

В пробирку наливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Наклонив пробирку под углом 45° , осторожно, по стенке пробирки, приливают 0,5 мл белка.

На границе двух слоев жидкости образуется белый осадок белка. При добавлении избытка серной кислоты осадок растворяется.

2.3. Осаждение белков трихлоруксусной кислотой

Трихлоруксусная кислота (Cl_3CCOOH , ТХУ) используется в лабораторной практике для осаждения белков, поскольку ТХУ, как и минеральные кислоты, вызывает денатурацию белков.

Для трихлоруксусной кислоты характерен сложный механизм денатурации, включающий как непосредственное взаимодействие на водородные связи, так и блокирование полярных группировок.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; белок яичный (1%-й раствор); ТХУ (10%-й раствор).

Порядок выполнения работы:

В пробирку наливают 0,5 мл раствора белка, добавляют 0,5 мл раствора ТХУ. После перемешивания в пробирке наблюдается выпадение в осадок белка.

2.4. Осаждение белка сульфосалициловой кислотой.

Сульфосалициловая кислота вызывает денатурацию белка.

Данная проба является высокочувствительной, используется в медицине для анализа биологических белоксодержащих жидкостей.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; белок яичный (1%-й раствор); кислота сульфосалициловая (20%-й раствор).

Порядок выполнения работы:

Наливают в пробирку 1 мл раствора белка, добавляют три капли 20%-й сульфосалициловой кислоты (свежеприготовленной). Образуется белый осадок белка.

2.5. Осаждение белка при высоких температурах.

Тепловая денатурация – денатурация белков при высоких температурах.

Белки термолабильны, денатурация в основном происходит при температуре выше 70°C . Усиление теплового движения полипептидных цепей приводит к разрыву водородных связей и нарушению гидрофобных взаимодействий. Скорость тепловой денатурации зависит от активной реакции среды, присутствия солей, их концентрации. Тепловая денатурация сопровождается агрегацией белков, выпадением их в осадок.

Оборудование, реактивы:

Баня водяная; пробирки; белок яичный (1%-й раствор); кислота уксусная (10%-й раствор); натрий хлористый (насыщ.); гидроксид натрия (10%-й раствор).

Порядок выполнения работы:

В пять пробирок наливают по 1 мл 1%-го раствора яичного белка. В первой пробирке нейтральный раствор белка нагревают до кипения, при этом белок сворачивается.

Во второй пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 5 капель 10%-го раствора уксусной кислоты. При стоянии выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд, так как приближаются к изоэлектрическому состоянию.

В третью пробирку добавляют 1 мл 10%-го раствора уксусной кислоты для получения силькислой реакции. При кипячении жидкости осадок не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В четвертую пробирку наливают 1 мл 10%-го раствора уксусной кислоты, 5 капель насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами хлористого натрия.

В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10%-го раствора едкого натрия для создания щелочной среды. При кипячении жидкости осадок не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

3. Изoeлектрическое состояние белков.

Белки – амфотерные полиэлектролиты, содержат –COOH- и –NH₂- группы.

Кислотно-основные свойства белков определяются диссоциацией диаминомонокислотных аминокислот.

При изменении pH среды происходит подавление диссоциации карбоксильных или аминогрупп, общий заряд белковой молекулы изменяется.

Изoeлектрическое состояние белков – электронейтральное состояние, когда суммарный заряд белка равен нулю для конкретного значения реакции среды.

Изoeлектрическая точка (pI, ИЭТ) – значение pH среды, при котором достигается электронейтральное состояние молекулы белка (табл. 2).

Таблица 2

Белок	pI (ИЭТ)
Пепсин	1,0
Уреаза	5,1
Каталаза	5,6
Рибонуклеаза	7,8
Лизоцим	11,0
Протамины	12,0
Гистоны	12,0

В ИЭТ белок является наименее устойчивым. Электронейтральные молекулы легко сбли

Значение pH, отвечающее ИЭТ белка, определяется числом ионогенных групп. Если белок содержит больше основных аминокислот, ИЭТ выше 7, при преимущественном содержании кислых аминокислот (моноаминодикарбоновых) ниже 7.

Для большинства глобулярных белков pI соответствует pH 4,5-6,5.

Для протаминов, гистонов (белков с щелочными свойствами) ИЭТ наступает при pH 10-12 (pH > 7), для белков с кислотными свойствами ИЭТ – при pH < 7.

Изoeлектрическую точку следует отличать от изоионной точки. Изоионной точкой называют такое значение pH, при котором число протонов, связанных с основными группами, равно числу протонов, отданных диссоциированными кислотными группами в белковой молекуле.

Изоионной точке соответствует такое значение pH, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен нулю в условиях полного отсутствия электролитов в растворе.

Изоэлектрическая и изоионная точки совпадают, когда раствор белка не содержит никаких других ионов, кроме ионизированных остатков аминокислот белковой молекулы и ионов, образующихся при диссоциации воды.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; пипетки; рН-метр; бумага индикаторная; раствор казеина (молоко); кислота уксусная CH_3COOH (0,1 н и 0,01 н растворы).

Порядок выполнения работы:

Берут восемь пробирок, в каждую из них вносят молоко (раствор казеина), раствор CH_3COOH и H_2O в соотношениях, указанных в табл. 3 (объем жидкости в одной пробирке должен быть равен 10 мл). После перемешивания определяют с помощью рН-метра или универсальной индикаторной бумаги рН раствора в каждой пробирке.

Отмечают, в каких пробирках наблюдается помутнение и образование осадка. ИЭТ является рН той пробы, где наибольшее количество осадка.

Таблица 3

Номер пробирки	Объем, мл				рН	Степень помутнения
	CH_3COOH (0,01 н)	CH_3COOH (0,1 н)	H_2O	казеина		
1	0,6	-	8,4	1,0	5,9	
2	1,25	-	7,75	1,0	5,6	
3	-	0,25	8,75	1,0	5,3	
4	-	0,5	9,5	1,0	5,0	
5	-	1,0	8,0	1,0	4,7	
6	-	2,0	7,0	1,0	4,4	
7	-	4,0	5,0	1,0	4,1	
8	-	8,0	1,0	1,0	3,8	

4. Гидролиз белков (протеолиз)

Гидролиз белков – характерное свойство белковых молекул. Конечными продуктами гидролиза являются аминокислоты.

Гидролиз подразделяется на:

- кислотный;
- щелочной;
- ферментативный.

Ферментативный гидролиз белков протекает с участием протеолитических ферментов. Для оценки скорости ферментативного гидролиза белков используют метод формольного титрования, позволяющий одновременно оценить и активность ферментов (см. лабораторную

Лабораторная работа № 3

Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим биуретовым макрометодом

Цель работы: определить содержание водорастворимых белков, полипептидов, олигопептидов в растворе или вытяжке из тканей различных животных и растительных организмов.

Метод основан на биуретовой реакции, которая является показателем наличия пептидных связей в соединении. Фотоколориметрирование проводится при длине волны 540 нм и рабочей длине кюветы 1 см.

Диапазон определяемых концентраций белка 0,2–1,0 %. Для концентрации белка меньше 0,2 % применяется фотоколориметрический биуретовый микрометод, где используется модифицированный биуретовый реактив Бенедикта.

Оборудование, реактивы: фотоэлектроколориметр (ФЭК); кюветы; раствор белка сывороточного альбумина стандартный (1 %-й); реактив биуретовый; водные вытяжки из мышечной ткани.

Порядок выполнения работы

В чистую пробирку помещают 1 см³ раствора водорастворимого белка неизвестной концентрации или вытяжки из ткани, добавляют 4 см³ биуретового реактива. Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, образуется сине-фиолетовый комплекс.

Фотоколориметрирование комплекса проводится при длине волны 540 нм и рабочей длине кюветы 1 см. Сравнивая значения оптической плотности неизвестного раствора белка с калибровочным графиком, определяют неизвестную концентрацию раствора белка, делают выводы.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 4

Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим биуретовым микрометодом

Цель работы: количественно определить водорастворимый белок в растворе или водной вытяжке из мышечной ткани.

Фотоколориметрический биуретовый микрометод позволяет определить содержание белка от 0,1 до 2 г/дм³ (0,01–0,2 %). Для определения применяется модифицированный биуретовый реактив Бенедикта. Фотоколориметрирование проводят при длине волны 315 нм и рабочей длине кюветы 1 см.

Оборудование, реактивы: ФЭК; кюветы; раствор белка (сывороточный альбумина) стандартный (2 г/дм³); гидроксид натрия (6 %-й раствор); реактив Бенедикта.

Приготовление реактива Бенедикта: для получения раствора 1 в небольшом количестве воды растворяют при нагревании 17,3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия; для получения раствора 2 растворяют в 10 см³ воды 1,73 г медного купороса. Раствор 2 добавляют в раствор 1 и доводят теплой водой до 100 см³.

Порядок выполнения работы

Помещают в пробирку 2 см³ раствора исследуемого белка, добавляют 2 см³ 6 %-го раствора NaOH и 0,2 см³ реактива Бенедикта. Смесь перемешивают и оставляют на 15 мин. Фотоколориметрирование пробы проводят при длине волны 315 нм и рабочей длине

кюветы 1 см. По калибровочному графику определяют содержание белка в исследуемом растворе.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 5

Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим методом Лоури

Цель работы: определить содержание водорастворимого белка фотоколориметрическим методом Лоури.

Метод основан на биуретовой реакции и на цветной реакции тирозиновых остатков белковой молекулы с реактивом Фолина (окисление тирозина фосфорномолибденовольфрамвокислым натрием). Фотоколориметрирование синезеленых комплексов проводят при длине волны 750 нм, рабочей длине кюветы 0,5 см. Углеводы, фенолы также взаимодействуют с реактивом Фолина.

Метод Лоури применяют для определения водо-, соле- и щелочерастворимых белков при фракционировании мышечных белков. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10–100 мкг белка в пробе).

Оборудование, реактивы: ФЭК; кюветы; пробирки; пипетки; реактив А; реактив В; реактив С; реактив Фолина – Чокальтеу.

Реактив А: 2 %-й раствор карбоната натрия в 0,1 н растворе NaOH.

Реактив В: 0,5 %-й раствор CuSO_4 в 1 %-м растворе виннокислого натрия $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ или калия $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$. Для этого 250 мг сульфата меди растворяют в 25 см³ воды и 500 мг виннокислого натрия или калия также растворяют в 25 см³ воды. Растворы смешивают.

Реактив С: перед анализом смешивают 49 см³ реактива А и 1 см³ реактива В. Реактив годен в течение 1 дня.

Порядок выполнения работы

Помещают в пробирку 0,4 см³ раствора белка, добавляют 2 см³ реактива С. Через 10 мин добавляют 0,2 см³ реактива Фолина – Чокальтеу. Смесь тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин. Параллельно готовят контрольную пробу для сравнения. Фотоколориметрирование проводят при длине волны 750 нм. По калибровочному графику определяют содержание белка.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 6

Количественное определение аминного азота фотоколориметрическим нингидриновым методом

Цель работы: количественно определить аминный азот в растворах белков, полипептидов, олигопептидов, аминокислот фотоколориметрическим нингидриновым методом.

Метод основан на взаимодействии нингидрина с аминокислотами в слабокислой среде при pH 5,0–5,5 с образованием окрашенного в сине-фиолетовый цвет комплекса Руэманна (пурпур Руэманна, дикетогидриндендикетогидринамин, ДИДА). Фотоколориметрирование комплекса Руэманна проводят при длине волны 540 нм.

Оборудование, реактивы: ФЭК; кюветы с рабочей длиной 1 см; баня водяная; пробирки; пипетки; колбы мерные на 100 см³; раствор аминокислот или белковый ацетатный буфер (pH 5,3–5,4); нингидрин (1 %-й водный или спиртовой раствор); этиловый спирт (90 %-й раствор); кислота соляная (0,1 н раствор); раствор аминокислоты стандартный ($2,5 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³).

Для приготовления ацетатного буфера (рН 5,5) смешивают 86 см³ 0,2 М ацетата натрия и 14 см³ 0,2 М раствора уксусной кислоты.

Порядок выполнения работы

К 1 см³ раствора белка или аминокислоты прибавляют 2 см³ ацетатного буфера (рН 5,5), 0,5 см³ 1 %-го водного раствора нингидрина. Пробирки накрывают фольгой и нагревают на водяной бане в течение 20 мин. Охлаждают до комнатной температуры, добавляют 3,5 см³ этанола, наблюдается фиолетовая окраска. Через 5 мин проводят фотоколориметрирование пробы при длине волны 540 нм, рабочей длине кюветы 1 см. По калибровочной кривой определяют содержание аминного азота.

Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика готовят стандартный раствор лейцина концентрации $0,5 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³, что соответствует 7 мг аминного азота в 1 дм³. Для этого 65,6 мг лейцина помещают в мерную колбу на 100 см³ и доводят до метки водой. В шесть пробирок вносят стандартный раствор лейцина и воду в соотношениях, указанных в табл.

Таблица

Номер пробы	Объем, см ³		Содержание аминного азота (мг/дм ³)	Оптическая плотность
	Вода	Раствор лейцина		
1	1,0	0	–	0
2	0,9	0,1	0,007	0,10
3	0,8	0,2	0,014	0,32
4	0,7	0,3	0,020	0,50
5	0,6	0,4	0,028	0,70
6	0,5	0,5	0,035	0,97

В каждую пробирку с раствором лейцина добавляют по 2 см³ ацетатного буфера (рН 5,5), 0,5 см³ раствора нингидрина. Содержимое пробирок перемешивают, пробирки нагревают на водяной бане в течение 20 мин, охлаждают, добавляют по 3,5 см³ этанола в каждую – наблюдается появление фиолетовой окраски. Фотоколориметрирование проводят при длине волны 540 нм.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 7

Определение азота аминокислот

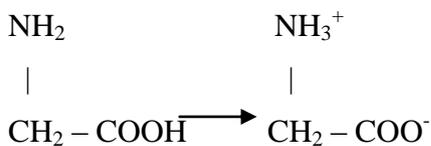
методом формольного (формолового)

титрования по Серенсену

Ц е л ь р а б о т ы - определить количественно азот аминокислот в продукте методом формольного титрования.

Аминокислоты - амфотерные электролиты, содержат одновременно карбоксильные и аминогруппы.

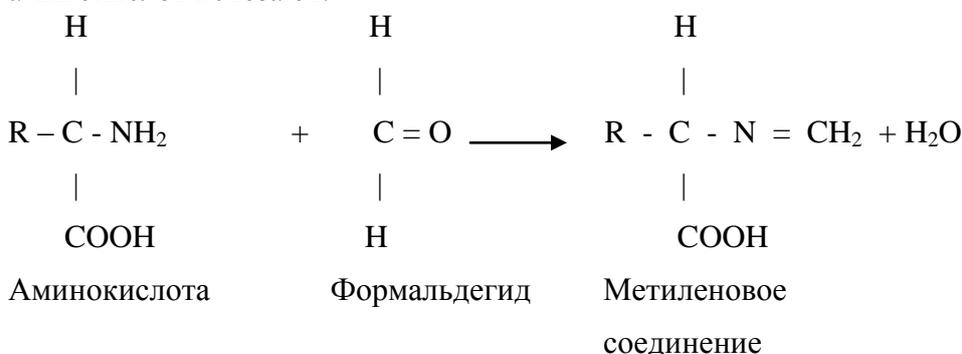
В водных растворах аминокислоты за счет амфотерности образуют внутримолекулярные соли:



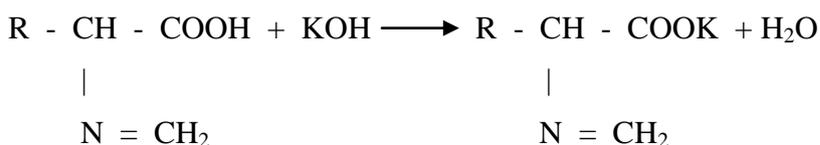
Глицин Внутримолекулярная соль

Без предварительного блокирования аминогрупп непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот невозможно. Для блокировки

α -аминогрупп используется формалин (раствор формальдегида). Формальдегид блокирует α -аминогруппы с образованием метиленовых соединений; основные свойства аминокислот исчезают:



Карбоксильные группы легко оттитровываются щелочью:



Определяя количество карбоксильных групп титрованием, косвенно можно судить и о содержании аминных групп, так как количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминных групп.

Метод формольного титрования позволяет контролировать гидролиз белков рыбы, а также активность протеолитических ферментов рыбного сырья. Для формольного титрования используют нейтрализованный по фенолфталеину формалин (формол). Формалин – 20%-й раствор формальдегида (муравьиного альдегида). Формальдегид всегда содержит примесь муравьиной кислоты, которая образуется при стоянии в результате окисления O_2 , поэтому раствор формалина необходимо нейтрализовать. Для этого 10 мл раствора формалина оттитровывают 0,05 н раствором щелочи с 2 каплями раствора фенолфталеина до слабо-розовой окраски.

Оборудование, реактивы:

Ступка; пестик; марля; мешалка; пипетки; колбы; фильтры бумажные; бюретки; ткань рыбы мышечная; ТХУ (20%-й раствор); NaOH (0,1 н раствор); HCl (0,5 н раствор); формалин нейтральный (35-40%-й раствор); фенолфталеин (1%-й раствор); BaCl₂ (крист.); индикатор - розовая кислота (интервал перехода 6,2-8,0).

Порядок выполнения работы:

В ступке растирают 50 г фарша с 100-150 мл воды; переносят в мерную колбу на 250 мл, доводят объем смеси до 2/3 объема колбы. Смесь взбалтывают в течение 60 мин для интенсивного гидролиза. Объем смеси доводят до метки водой.

Полученную смесь фильтруют через один слой марли, затем через четыре слоя марли.

Отбирают 100 мл фильтрата и помещают в колбу емкостью 200-300 мл. Для осаждения белков в колбу добавляют постепенно небольшими порциями при взбалтывании 25 мл 20%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Через 30 мин жидкость фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Отбирают 100 мл фильтрата, прибавляют несколько капель 0,1 н раствора NaOH до резко щелочной реакции (по изменению индикаторной бумажки) и 2 г BaCl₂ для осаждения фосфатов, фильтруют через бумажный фильтр.

Отбирают по 25 мл фильтрата в три колбы. В первую колбу добавляют 10 капель розоловой кислоты (индикатора). Проводят нейтрализацию фильтрата 0,5 н раствором HCl до желтой окраски, фиксируют объем HCl, далее 0,1 н раствором NaOH - до появления слабо-розовой окраски; отмечают объем NaOH.

Две другие колбы используют для титрования. В эти колбы вносят фиксированные объемы 0,5 н раствора HCl и 0,1 н раствор NaOH, прибавляют по 25 мл нейтрализованного формалина и 1 мл

раствора фенолфталеина, титруют 0,1 н раствором NaOH до розовой окраски.

Расчетная формула:

$$\chi(N) = \frac{1,4 \cdot b \cdot v_1 \cdot v_2}{m \cdot v_3 \cdot v_4} \cdot 100,$$

где $\chi(N)$ - содержание азота аминного, мг%; $m = 50$ - навеса рыбы, г; $v_1 = 250$ - объем разведения, мл; $v_2 = 125$ - объем фильтрата с добавлением ТХУ, мл; $v_3 = 25$ - объем фильтрата, взятый для титрования, мл; $v_4 = 100$ - объем первого фильтрата,

взятый для осаждения ТХУ, мл; b - объем 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование 25 мл фильтрата, мл; 1,4 - коэффициент пересчета на азот, соответствующий 1 мл 0,1 н раствора NaOH.

$$\chi(N) = \frac{1,4 \cdot b \cdot 250 \cdot 125}{25 \cdot 50 \cdot 100} \cdot 100 = 1,4 \cdot b \cdot 25 = 35 \cdot b.$$

Лабораторная работа № 8

Ферменты. Качественные реакции на отдельные ферменты

Цель работы: изучить действие отдельных ферментов на субстрат.

1. Обнаружение действия пепсина

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; пробирки; сок желудочный (или раствор пепсина); молоко; карбонат кальция (CaCO₃).

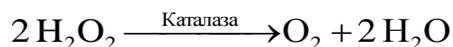
Порядок выполнения работы

В три пробирки наливают по 1 см³ свежего молока. В первую пробирку добавляют 2–3 капли желудочного сока (активного фермента), во вторую – 2–3 капли прокипяченного желудочного сока, в третью – 2–3 капли желудочного сока, нейтрализованного CaCO₃ по лакмусу.

Пробирки помещают в термостат и 20 мин выдерживают при температуре 37 °С. Отмечают пробирки, в которых наблюдалось створаживание молока, делают выводы об активности фермента, а также влиянии ряда факторов (рН, t) на активность пепсина.

2. Открытие действия каталазы

Каталаза – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. Является металлопротеидом, содержащим железо. Биологическая роль каталазы состоит в том, что она разлагает избыток пероксида водорода, который образуется в клетках в результате окислительно-восстановительных реакций. Температурный оптимум действия каталазы 0 °С. За одну минуту одна молекула каталазы расщепляет 5×10⁶ молекул H₂O₂.



Оборудование, реактивы, материалы: пробирки; пероксид водорода (1 %-й раствор, свежеприготовленный); раствор каталазы.

Порядок выполнения работы

В две пробирки наливают по 1 см³ 1 %-го раствора пероксида водорода. В первую пробирку добавляют 2–3 капли раствора каталазы, во вторую – 2–3 капли прокипяченного раствора каталазы (при высокой температуре фермент инактивируется). В пробирке с активным ферментом наблюдается выделение кислорода, во второй пробирке с инактивированным энзимом изменений нет.

3. Качественная реакция на фенолоксидазу (фенолазу)

Фенолоксидазы – ферменты, катализирующие окисление фенолов и полифенолов с участием кислорода как акцептора водорода. Фенолаза – хромопротеид, содержащий медь. Является ферментом растительных тканей, особенно много его в картофеле. При действии фенолоксидазы на пирокатехин (полифенол) образуется ортобензохинон – продукт окисления синего цвета.

Оборудование, реактивы, материалы: пирокатехин; смола, содержащая пирокатехин; картофель.

Порядок выполнения работы

На разрез сырого или вареного картофеля нанести 1–2 капли раствора пирокатехина или гваяковой смолы, содержащей пирокатехин. Наблюдается появление синей окраски.

4. Обнаружение цитохромоксидазы в мышечной ткани

Цитохромоксидаза (аа₃) – компонент дыхательной цепи. Является геминным дыхательным ферментом. Белковый компонент цитохромоксидазы содержит медь.

Для обнаружения цитохромоксидазы используют реакцию окисления аминов и фенолов (парафенилендиамина, гидрохинона, диметилпарафенилендиамина) кислородом в присутствии данного фермента с использованием реактива НАДИ.

Реактив НАДИ – смесь 1 %-го раствора α-нафтола и 1 %-го раствора парафенилендиамина. Название реактива образовано из первых двух букв – "нафтол" и "диамин".

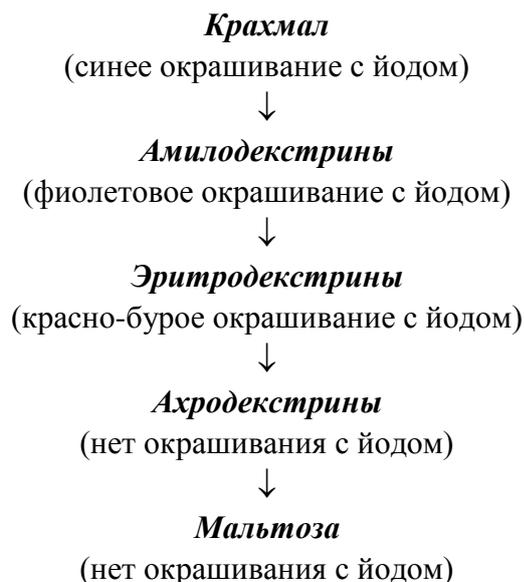
Оборудование, реактивы, материалы: пипетки; колбы; воронки; марля; фильтры бумажные; пробирки; реактив НАДИ, мышечная ткань.

Порядок выполнения работы

На фильтровальную бумагу помещают 50 г измельченной мышечной ткани и добавляют 1–2 капли реактива НАДИ. Через 3–5 мин в результате образования индофенолового голубого появляется синее или зеленовато-синее окрашивание.

5. Открытие амилазы в слюне

Фермент амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала с образованием мальтозы. Промежуточными продуктами могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекул окрашиваются йодом в разные цвета (фиолетовый, красно-бурый), а конечные продукты (мальтоза или глюкоза) с йодом окраски не дают. Наличие слабого желтого окрашивания при этом обусловлено цветом добавляемого раствора йода.



Оборудование, реактивы, материалы: термостат; пробирки; амилаза; раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия); крахмал.

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 5–10 см³ 1 %-го раствора крахмала и 2 см³ разбавленной в 10 раз слюны. Содержимое пробирки перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–40 °С.

Затем через 10 мин стеклянной палочкой добавляют в пробирку раствор Люголя. Отмечают окрашивание жидкости и судят о глубине гидролиза крахмала.

6. Открытие пероксидазы в картофеле

Пероксидаза широко распространена в природе. В больших количествах этот фермент содержится в растительных клетках. В животных организмах он находится преимущественно в крови, мышцах, молоке (реакцией на пероксидазу в молочной промышленности контролируют эффективность пастеризации молока). Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов в присутствии пероксидов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и др.). При окислении гваякола пероксидазой картофеля образуется продукт коричневого цвета.

Оборудование, реактивы, материалы: пероксид водорода (1 %-й раствор, свежеприготовленный); гваякол; картофель.

Порядок выполнения работы

На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят 1–2 капли спиртового раствора гваякола и 1–2 капли 1 %-го раствора пероксида водорода.

На сыром картофеле сразу же образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется.

7. Открытие уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент, катализирующий гидролиз мочевины на углекислый газ и аммиак. Уреаза содержится в соевых бобах, плесневых грибах и некоторых бактериях.

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; мочевины (2 %-й раствор); мука.

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 5 см³ 2 %-го раствора мочевины и добавляют около 1 г соевой муки. Пробирку выдерживают 5–10 мин в термостате с температурой 37–40 °С. Выделившийся аммиак определяют по запаху или посинению лакмусовой бумажки, предварительно смоченной дистиллированной водой.

8. Открытие ксантиноксидазы в сыром молоке

Ксантиноксидаза относится к группе ферментов, называемых дегидрогеназами. Дегидрогеназы окисляют многие органические вещества путем отнятия водорода и перенесения его на другие соединения. Все живые клетки и биологические жидкости (кровь, молоко и др.) содержат различные дегидрогеназы. Относящаяся к дегидрогеназам ксантиноксидаза свежего молока окисляет альдегиды до соответствующих карбоновых кислот, например, формальдегид до муравьиной кислоты.

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; формальдегид (1,5 %-й раствор); метиленовая синь; молоко.

Порядок выполнения работы

Наливают в пробирку 5 см³ свежего молока, 1 см³ 1,5 %-го раствора формальдегида, 4 капли 0,02 %-го раствора метиленовой сини. Смесь взбалтывают и ставят в термостат при температуре 37–40 °С. Через некоторое время наблюдается ослабление окрашивания смеси вследствие переноса водорода ферментом дегидрогеназой от формальдегида на метиленовую синь (образуется неокрашенная восстановленная форма метиленовой сини). Формальдегид при этом окисляется в муравьиную кислоту. Пробирку вынимают из термостата и сильно взбалтывают, появляется вновь синее окрашивание. Последнее объясняется передачей водорода от метиленовой сини к кислороду воздуха.

В пробе с кипяченым молоком обесцвечивания метиленовой сини не происходит.

Оформление работы: запишите свои наблюдения по каждому опыту, сделайте выводы.

Лабораторная работа № 9

Физико-химические свойства ферментов. Специфичность действия.

Влияние pH, температуры на активность ферментов

Цель работы: изучить общие свойства ферментов.

1. Влияние pH и температуры на активность ферментов

Для ферментов характерен температурный оптимум 20–40 °С. В интервале от 0 до 40–50 °С скорость ферментативных реакций при повышении температуры на 10 °С возрастает в 2 раза в соответствии с правилом Вант-Гоффа. При температуре свыше 60 °С скорость ферментативной реакции снижается. При 80–100 °С фермент инактивируется, теряет биологическую активность.

Термолабильность ферментов объясняется тем, что ферменты являются белками. При температуре свыше 80 °С происходит тепловая необратимая денатурация фермента. Есть и исключения: фермент каталаза проявляет максимальную активность при 0 °С, фермент мышц миокиназа – при 100 °С.

Для ферментов характерен физиологический оптимум pH (табл. 1).

Таблица 1

Фермент	Оптимум pH	Субстрат
---------	------------	----------

Пепсин	1,5–2,5	Белки
Трипсин	7,8	Белки
Уреаза	6,4–6,9	Мочевина
α -Амилаза слюны	6,9	Крахмал
Аргиназа	9,5–9,9	Аргинин
Липаза (панкреатическая)	7,0–8,5	Жиры
Мальтаза (кишечная)	6,1	Мальтоза
Сахараза (кишечная)	6,2	Сахароза
α -Амилаза (панкреатическая)	7,8–8,2	Крахмал

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; пробирки; крахмал (1 %-й раствор); кислота соляная (0,1 н раствор); раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия).

Порядок выполнения работы

В три пробирки наливают по 5 см³ свежеприготовленного 1 %-го раствора крахмала. В первую и вторую пробирки добавляют по 1 см³ воды, в третью – 1 см³ 0,1 н раствора соляной кислоты (происходит сдвиг рН в кислую область). В первую и третью пробирки добавляют по 1 см³ разбавленной слюны (активной амилазы), во вторую – 1 см³ прокипяченной слюны. Содержимое пробирок перемешивают, ставят пробирки в термостат при температуре 37 °С на 10 мин. Пробирки охлаждают и добавляют в каждую по две капли раствора Люголя.

Делают выводы о зависимости активности амилазы от рН и температуры (по глубине гидролиза крахмала, окраске продуктов гидролиза).

2. Специфичность (избирательность) действия ферментов

Специфичность действия ферментов по отношению к субстрату определяется стереометрическим соответствием субстрата и активного центра фермента.

Специфичность (избирательность) может быть относительной и абсолютной. Абсолютная специфичность проявляется в том, что фермент реагирует с одним конкретным субстратом. Пример относительной избирательности – фермент катализирует превращение субстратов с определенным типом связи.

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; пробирки; крахмал (1 %-й раствор); пепсин; раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия); молоко.

Порядок выполнения работы

Берут четыре пробирки. В первую и вторую пробирки наливают по 5 см³ 1 %-го раствора крахмала, в третью и четвертую пробирки – по 5 см³ молока.

В первую и третью пробирки вносят по 1 см³ разбавленной слюны, содержащей активный фермент амилазу, во вторую и четвертую пробирки – по 1 см³ пепсина (табл. 2). Все пробирки ставят в термостат при температуре 37–40 °С на 15 мин.

В первую и вторую пробирки добавляют по две капли раствора йода в йодиде калия. В первой пробирке происходит гидролиз крахмала под действием амилазы, образуются декстрины. В четвертой пробирке белок свертывается под воздействием пепсина. Во второй и третьей пробирках изменений нет (гидролиз крахмала не идет под действием пепсина, амилаза не гидролизует белок).

Таблица 2

Номер пробирки	Субстрат	Фермент	Вывод
1	Крахмал	Амилаза	Буро-красное окрашивание
2	Крахмал	Пепсин	Синее окрашивание
3	Белок	Амилаза	Нет изменений
4	Белок	Пепсин	Белок свертывается

3. Активация и ингибирование ферментов

Активацией ферментов называется повышение их активности. Активаторы – вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции (табл. 3). Понижение активности ферментов называется ингибированием. Ингибиторы – это соединения, инактивирующие энзимы. К активаторам относятся ионы натрия, калия, магния; к ингибиторам – ионы тяжелых металлов (меди, ртути, свинца и др.). Самоактивация – превращение профермента в активный фермент.

Таблица 3

Фермент	Активатор
Амилаза	Cl ⁻
Пепсин	H ⁺
Гастрин	H ⁺
Трипсин	Энтерокиназа, трипсин
Химотрипсин	Трипсин

Оборудование, реактивы, материалы: пробирки; пипетки; крахмал (1 %-й); хлорид натрия (1 %-й раствор); сульфат меди (1 %-й раствор); раствор Люголя; слюна, разведенная 1 : 5.

Порядок выполнения работы

Для изучения процессов активации и ингибирования ферментов используют хлорид натрия и сульфат меди, NaCl является активатором α-амилазы слюны, CuSO₄ – ингибитором.

Берут три пробирки. Наливают в пробирки реактивы в соотношениях, указанных в табл. 4, перемешивают и оставляют на 5 мин.

Таблица 4

Номер пробирки	Объем, см ³				
	Вода	NaCl	CuSO ₄	Слюна	Крахмал
1	1	0	–	1	0,5
2	0,8	0,2	–	1	0,5
3	0,8	–	0,2	1	0,5

В каждую пробирку добавляют по две капли раствора Люголя. Наблюдается изменение окраски (табл. 5). Опыт повторяют еще два раза – продолжительность действия α-амилазы 10 мин, 15 мин.

Таблица 5

Опыт	Время действия α-амилазы, мин	Результат (окраска)		
		NaCl	H ₂ O	CuSO ₄
1	5	Желтая или красная	Красная	Синяя
2	10	Желтая или красная	Красная	Синяя
3	15	Желтая	Красная	Синяя

Оформление работы: запишите свои наблюдения по каждому опыту, сделайте выводы .

Лабораторная работа № 10

Количественное определение активности амилазы по методу Вольгемута

Цель работы: количественно определить активность амилазы слюны.

Метод определения амилазной активности по Вольгемуту является "пороговым". Основан на определении минимального "порогового" количества фермента, способного расщепить 1 см³ 0,1 %-го раствора крахмала за 30 мин при температуре 38 °С. Данное минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности.

Амилазная активность слюны (амилокластическая сила слюны – А) выражается количеством см³ 0,1 %-го раствора крахмала, которое расщепляется 1 см³ неразведенной слюны при температуре 38 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны составляет 160–320.

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; раствор крахмала (0,1 %-й); слюна (1 %-й раствор); вода дистиллированная; хлорид натрия (0,1 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

Готовят два набора по шесть пробирок. В каждую пробирку одного набора вносят по 1 см³ слюны (разведение 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 и т. д.). Таким образом, в каждом наборе получают аналогичное разведение фермента амилазы слюны.

Во все пробирки первого набора добавляют по 1 см³ воды, во все пробирки второго набора – по 1 см³ 0,1 %-го раствора NaCl (NaCl – активатор амилазы). Во все пробирки добавляют по 2 см³ 0,1 %-го раствора крахмала. Содержимое перемешивают и пробирки помещают в термостат на 30 мин при температуре 38 °С. Через 30 мин в пробирки добавляют по 1 капле 1 %-го раствора йода. Результаты работы по определению амилазной активности фиксируют в форме табл. Синяя окраска свидетельствует о том, что расщепления крахмала нет, желтая – о максимальной активности амилазы.

Таблица

Показатель	Номер пробирки						Амилазная активность
	1	2	3	4	5	6	
Разведение слюны, Р	10	20	40	80	160	320	
Окраска при добавлении йода, ряд без добавления NaCl							
Окраска при добавлении йода, ряд с добавлением NaCl							

Расчетная формула:

$$A = V \times P,$$

где А – амилазная активность исследуемой слюны; V – объем 1 %-го раствора крахмала; Р – максимальное разведение слюны, при котором начинается гидролиз.

Оформление работы: запишите принцип метода, полученное значение амилазной активности сравните с амилазной активностью в норме, сделайте выводы.

Лабораторная работа № 11

Количественное определение активности пепсина

по методу Пятницкого

Цель работы: количественно определить активность пепсина.

Метод Пятницкого – экспресс-метод, в основе которого лежит способность пепсина створаживать белок молока казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси пепсином при рН 4,9 и температуре 25 °С происходит пропорционально его способности переваривать белок. За единицу активности пепсина принимают количество пепсина (мг), которое при рН 4,9–5,0 и температуре 25 °С створаживает 5 см³ молочно-ацетатной смеси (данная единица соответствует 0,010 мг кристаллического пепсина).

Желудочный сок человека в норме содержит в 1 см³ 40–60 единиц пепсина, то есть в 1 см³ желудочного сока содержится 0,4–0,6 мг пепсина.

Оборудование, реактивы, материалы: термостат; пробирки; секундомер; смесь молочно-ацетатная; сок желудочный; препарат пепсина.

Приготовление молочно-ацетатной смеси: свежее цельное молоко (относительная плотность 1,030) смешивают пополам с ацетатным буфером при pH 4,9. В закрытом виде на холоде эта смесь хранится в течение двух недель. Если оставить стоять смесь в делительной воронке, жир легко отделяется и смесь получается удобной для работы. При использовании сухого молока берут ½ столовой ложки его на один стакан теплой воды, кипятят и смешивают пополам с ацетатным буфером при pH 4,9.

Приготовление ацетатного буфера: готовят два раствора – ацетат натрия (0,2 н) и уксусную кислоту (0,2 н). Смешивают 480 см³ 0,2 н раствора CH₃COONa и 520 см³ 0,2 н раствора CH₃COOH, проверяют pH буфера (pH 4,8–4,9).

Порядок выполнения работы

В одну пробирку помещают 0,1 см³ желудочного сока, в другую – 5 см³ молочно-ацетатной смеси. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 25 °С, на 5 мин. Быстро переливают молочно-ацетатную смесь в пробирку с желудочным соком. Одновременно включают секундомер. Пробирку встряхивают, оставляют в водяной бане, наклоняют ее и следят за появлением на ее стенках первых хлопьев казеина. В момент их появления секундомер останавливают и записывают время створаживания смеси в секундах.

Расчетные формулы:

$$K = \frac{60 \times 10}{t},$$

где K – число единиц активности пепсина в 1 см³ желудочного сока; t – время створаживания, с.

$$m = K \times 0,01,$$

где m – количество пепсина, соответствующее K единицам активности, мг в 1 см³ сока; 0,01 – масса пепсина, соответствующая 1 единице активности пепсина, мг.

Оформление работы: запишите принцип метода, определите активность пепсина, сделайте выводы.

Лабораторная работа № 12

Фотоколориметрический метод определения

активности трипсина

Цель работы: определить активность трипсина фотоколориметрическим методом.

Трипсин – пищеварительный протеолитический фермент, гидролаза, компонент панкреатического сока. Активаторами трипсина являются трипсин и энтерокиназа. Оптимум pH 7,8–8,2. Профермент трипсина – трипсиноген.

Определение протеолитической активности трипсина основано на количественном определении тирозина, образующегося при гидролизе казеина (белок молока). При взаимодействии тирозина с фенольным реактивом образуется комплекс синего цвета, содержание которого определяется фотоколориметрически при длине волны 630–690 нм, рабочей длине кюветы 0,5 см.

Оборудование, реактивы, материалы: ФЭК; термостат; пробирки; фильтры; воронки; пипетки; казеин; буфер фосфатный (0,1 %-й раствор, pH 8,0); ТХУ (10 %-й раствор); реактив фенольный; гидроксид натрия

(0,5 моль/дм³ раствора); трипсин (5×10^{-4} %-й раствор в 0,005 моль/дм³ раствора соляной кислоты).

Порядок выполнения работы

1. Постановка ферментативной реакции

В двух пробирках готовят инкубационные смеси согласно табл.

Таблица

Проба	Раствор казеина, см ³	Фосфатный буфер, см ³	Раствор ТХУ, см ³	Раствор трипсина, см ³
Опытная	1	1,5	–	0,5
Контрольная	1	1,5	3	0,5

Пробы тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при 37 °С в течение 20 мин. По окончании инкубации в опытную пробу для прекращения реакции добавляют 3 см³ 10 %-го раствора ТХУ, перемешивают. Через 5–10 мин обе пробы фильтруют через бумажный фильтр.

2. Определение содержания тирозина

В две пробирки наливают по 5 см³ 0,5 моль/дм³ раствора NaOH, затем в одну наливают 2,5 см³ полученного фильтрата контрольной пробы, в другую – 2,5 см³ фильтрата опытной пробы, в обе пробирки добавляют 0,5 см³ фенольного реактива. Смесь тщательно перемешивают до появления синей окраски. Через 20 мин определяют на ФЭКе оптическую плотность (длина волны 630–690 нм). Находят разность между оптической плотностью опытной и контрольной проб. По калибровочному графику определяют содержание тирозина в растворе в результате ферментативного гидролиза казеина.

3. Расчет активности трипсина

Рассчитывают активность трипсина в единицах на 1 см³ раствора фермента, удельную активность (в расчете на 1 мг белка).

Оформление работы: запишите принцип метода, результаты, сделайте выводы.

Лабораторная работа № 13

Липиды. Органолептические, физические и химические показатели качества жиров. Кислотное число, число омыления, эфирное число

Цель работы: освоить методы анализа органолептических, физических и химических показателей качества пищевых жиров.

1. Определение органолептических показателей качества пищевых жиров

1.1. Вкус и запах жира

Вкус и запах пищевого и медицинского жира определяют одновременно. Запах жира определяют сразу же после его поступления.

В коническую колбу вместимостью 250 см³ с притертой пробкой наливают 100 см³ жира, несколько раз перемешивают содержимое колбы вращательными движениями и затем, открыв колбу, определяют характер и интенсивность запаха.

Если при комнатной температуре посторонний запах в жире не ощущается, колбу с жиром закрывают часовым стеклом и подогревают на водяной бане до температуры 60 °С. Затем несколько раз перемешивают содержимое колбы, как указано выше, и, сдвинув в сторону часовое стекло, быстро определяют характер и интенсивность запаха.

1.2. Визуальное определение цвета жира

Метод основан на визуальном определении цвета жира в проходящем свете.

Оборудование, материалы: стакан химический из бесцветного стекла; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до 200 °С.

Порядок выполнения работы

Часть профильтрованной средней пробы или жидкого витаминного препарата наливают в стакан диаметром 50–100 мм из бесцветного стекла (слабоокрашенный жир или препарат наливают в стакан диаметром 100 мм).

Жир или жидкий витаминный препарат нагревают до температуры, при которой проводится определение прозрачности, и рассматривают в проходящем дневном свете, определяя цвет и оттенок.

1.3. Определение прозрачности жира

Метод основан на визуальном определении прозрачности жира, нагретого до требуемой температуры, в проходящем и отраженном свете.

Оборудование: баня водяная; цилиндр мерный; стакан химический; термостат; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до 200 °С; палочка стеклянная.

Порядок выполнения работы

Перед анализом жир, помещенный в химический стакан, осторожно нагревают на водяной бане до температуры 60–70 °С. В цилиндр переносят 100 см³ жира, медленно охлаждают при непрерывном перемешивании стеклянной палочкой до температуры, предусмотренной для определения прозрачности, и выдерживают в течение 3 ч при установленной температуре, периодически (через каждые 15 мин) помешивая. По истечении указанного времени жир рассматривают в проходящем и отраженном свете на белом фоне.

Жир считается прозрачным, если в нем нет мути или взвешенных частиц.

2. Определение физических показателей качества пищевых жиров

2.1. Определение цвета жира фотоколориметрическим методом (кроме жира лососевых и окуневых рыб)

Оборудование, реактивы, материалы: фотоэлектроколориметр; спирт этиловый; эфир медицинский; бумага фильтровальная; колбы; воронки; жир пищевой.

Порядок выполнения работы

Пробу анализируемого жира нагревают до температуры, при которой проводят определение прозрачности жира, и фильтруют через бумажный фильтр. Если после фильтрации жир окажется непрозрачным, его нагревают до 40 °С. Жир наливают в кювету с рабочей длиной 3–10 мм (в зависимости от цвета жира) и определяют оптическую плотность при длине волны 440 нм по сравнению с пустой кюветой. Оптическую плотность D_1 (в относительных единицах), характеризующую цвет жира, определяют по формуле:

$$D_1 = \frac{D}{n},$$

где D – оптическая плотность исследуемого жира;

n – рабочая длина кюветы, см.

Цвет жира определяют по табл.

Таблица

<u>Цвет жира</u>	<u>Относительная оптическая плотность, D_1</u>
<u>Светло-желтый</u>	<u>До 0,6</u>
<u>Желтый</u>	<u>0,6–0,8</u>
<u>Темно-желтый (светло-коричневый)</u>	<u>≥ 0,8</u>
<u>Коричневый</u>	<u>≥ 2,0</u>
<u>Темно-коричневый</u>	<u>≥ 3,0</u>

2.2. Определение плотности жира

Метод основан на определении отношения массы жира к массе воды при установленных для них температурах.

Оборудование, реактивы: пикнометры стеклянные; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до 200 °С; весы аналитические; баня водяная; пипетки; бумага фильтровальная; вода дистиллированная; жир.

2.2.1. Определение относительной плотности жира пикнометром

Порядок выполнения работы

Пикнометр тщательно промывают хромовой смесью, водой, спиртом, просушивают и взвешивают на аналитических весах.

Для определения массы воды (водного числа) взвешенный пикнометр наполняют выше метки дистиллированной водой. Температуру воды доводят до 20 °С погружением пикнометра в водяную баню с такой же температурой на 20–30 мин, после чего доводят уровень воды в пикнометре до метки удалением излишка ее с помощью полосок фильтровальной бумаги.

Пикнометр вынимают из бани, тщательно вытирают снаружи и взвешивают.

После удаления воды пикнометр высушивают, вновь взвешивают, наполняют профильтрованным жиром (с некоторым избытком), доводят до температуры 20 °С (или указанной на стандарте на данный вид жира) погружением в водяную баню, имеющую ту же температуру, и выдерживают в ней пикнометр до тех пор, пока уровень мениска не перестанет изменяться. Избыток жира отбирают фильтровальной бумагой, свернутой в тонкую трубочку. После этого пикнометр с жиром тщательно вытирают и взвешивают.

Относительную плотность жира определяют по формуле:

$$\rho_{20}^{20} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m},$$

где m – масса пустого пикнометра, г;

m_1 – масса пикнометра с водой, г;

m_2 – масса пикнометра с жиром, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,001 усл. е.

2.2.2. Определение плотности жира методом взвешивания

Сухой чистый цилиндр емкостью 5–10 см³ взвешивают на аналитических весах с погрешностью 0,0002 г. Цилиндр с помощью трубки заполняют профильтрованным жиром, стараясь не задевать стенок цилиндра, до метки (точно). После этого цилиндр с жиром взвешивают на тех же аналитических весах с погрешностью 0,0002 г.

Плотность (ρ) определяют по формуле:

$$\rho = \frac{m_2 - m_1}{V},$$

где m_2 – масса цилиндра с жиром, г;

m_1 – масса пустого цилиндра, г;

V – объем жира, см³.

Записывают температуру помещения, в котором проводились измерения.

2.3. Определение примесей нежирового характера (отстоя) объемным методом в жире полуфабриката

Метод основан на осаждении из жира в период отстаивания веществ нежирового характера, имеющих большую плотность, и определении их количества измерением объема.

Оборудование: цилиндр стеклянный.

Порядок выполнения работы

После тщательного перемешивания пробы отбирают 100 см³ жира, вносят его в стеклянный мерный цилиндр вместимостью 100 см³ и оставляют на 24 ч, после чего измеряют объем, занимаемый отстоем. Определение проводят при

температуре, установленной стандартом на исследуемый жир. Количество отстоя выражают в объемных единицах.

2.4. Определение коэффициента преломления (рефракции)

Под показателем преломления (n) понимают отношение синусов углов, образованных падающим и преломленным лучом с перпендикуляром к поверхности, разделяющей на две разные среды.

Метод основан на определении коэффициента преломления на рефрактометре.

Порядок выполнения работы

Каплю профильтрованного жира наносят на нижнюю призму рефрактометра и измеряют показатель преломления. Если показатель преломления измерен не при 20 °С, следует ввести поправку: при увеличении температуры на 1 °С показатель преломления уменьшается на 0,00037.

После каждого определения осторожно и тщательно вытирают призмы рефрактометра ватой, смоченной диэтиловым эфиром.

3. Определение химических показателей качества пищевых жиров

3.1. Определение кислотного числа жиров

Характерным свойством жиров является их способность к гидролизу. Продуктами гидролиза являются свободные жирные кислоты, глицерин, моноацилглицериды и диацилглицериды.

Ферментативный гидролиз жиров протекает с участием липазы. Процесс гидролиза обратим. Для оценки степени гидролиза и количества свободных жирных кислот определяют кислотное число.

Кислотное число – это количество миллиграммов КОН, идущее на нейтрализацию всех свободных жирных кислот, которые содержатся в 1 г жира. Чем больше кислотное число, тем выше содержание свободных жирных кислот и тем интенсивнее идет процесс гидролиза. Кислотное число возрастает при хранении жира, т. е. является показателем гидролитической порчи.

Кислотное число медицинского жира должно быть не более 2,2, а витаминизированного жира, предназначенного для ветеринарных целей, – не более 3.

Сущность метода заключается в титровании 0,1 н раствором гидроксида калия жира, растворенного в нейтрализованной смеси спирта и эфира (1 : 2):



Объем смеси прибавляется с таким расчетом, чтобы раствор к концу титрования содержал не менее 40 % спирта, так как при недостатке спирта идет обратный процесс – гидролиз мыла с образованием щелочи:



Для коровьего масла и маргарина обычно определяют кислотность, которую выражают в градусах Кеттсторфера (°К).

Градус Кеттсторфера – это количество кубических сантиметров 0,1 н раствора NaOH, необходимое для нейтрализации 5 г масла или маргарина и умноженное на 2.

Определяют кислотность титрованием навески масла, растворенного в спиртоэфирной смеси, 0,1 н раствором NaOH или КОН с индикатором фенолфталеином.

Предельно допустимые нормы кислотности для маргарина (°К): маргарин молочный, сливочный – 2,5, безмолочный – 2,0.

Оборудование, реактивы, материалы: баня водяная; холодильник обратный; жир пищевой; бюретки; спирт этиловый; эфир медицинский; гидроксид калия (0,1 н раствор); фенолфталеин (1 %-й раствор); тимолфталеин (1 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

В коническую колбу емкостью 250 см³ помещают 2–10 г пищевого жира, добавляют 30–50 см³ смеси спирта и эфира (1 : 2), предварительно нейтрализованной по тому индикатору, который используют для титрования. Содержимое колбы для более полного растворения жира

слегка нагревают на водяной бане с обратным холодильником, затем охлаждают до комнатной температуры. В полученный раствор приливают 1 см³ 1 %-го спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором гидроксида калия до появления слабо-розового окрашивания.

Кислотное число жира (X) в мг КОН на 1 г жира рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{5,61 \times K \times V}{m},$$

где V – объем 0,1 н раствора гидроксида калия, израсходованного на титрование, см³;

K – коэффициент пересчета на точный 0,1 н раствор гидроксида калия;

m – масса исследуемого жира, г;

5,61 – количество гидроксида калия, соответствующее 1 см³ 0,1 н раствора гидроксида калия, мг.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

При исследовании темно-окрашенных жиров в качестве индикатора используют 1 % раствор тимолфталеина, который в щелочной среде приобретает ярко-голубую окраску.

3.2.. Определение числа омыления

Число омыления – это количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации всех свободных и связанных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Число омыления характеризует природу жира: чем меньше молярная масса жирных кислот, входящих в состав ТАГ, тем больше число омыления. Число омыления липидов рыб 180–195 мг КОН на 1 г жира.

Оборудование, реактивы: весы аналитические; баня водяная; колбы конические; холодильник обратный; бюретка; цилиндры; кислота соляная (0,5 н раствор); фенолфталеин (1 %-й раствор); спирт этиловый; гидроксид калия (0,5 н раствор); жир пищевой.

Порядок выполнения работы

В колбу для омыления помещают 1,5–2,0 г профильтрованного жира и приливают из бюретки 25 см³ 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия.

Колбу соединяют с обратным холодильником, помещают в кипящую водяную баню, кипятят в течение часа до полного омыления жира, периодически взбалтывая смесь.

Окончание омыления фиксируется отсутствием помутнения пробы при добавлении нескольких капель воды. К полученному горячему прозрачному раствору приливают 0,5 см³ 1 %-го раствора фенолфталеина (при анализе темно-окрашенных жиров 0,5 см³ 2 %-го раствора алкалиблау) и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до нейтральной реакции.

Параллельно проводят контрольный анализ без навески жира.

Число омыления исследуемого жира (X) в мг КОН на 1 г жира рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{28,055 \times K \times (V - V_1)}{m},$$

где V – объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование раствора в контрольном анализе, см³;

V_1 – объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование раствора в рабочем анализе, см³;

K – коэффициент пересчета на точный 0,5 н раствор соляной кислоты;

m – навеска жира, г;

28,055 – количество гидроксида калия, соответствующее 1 см³ 0,5 н раствора соляной кислоты, мг.

3.3. Определение альдегидного числа

Альдегидное число определяется фотоколориметрическим методом, основанном на взаимодействии карбонильных соединений с бензидином; определение оптической плотности проводится при длине волны 360 нм. Для построения калибровочной кривой используется коричневый альдегид (β -фенилакролеин $C_6H_5CH=CHCHO$). Альдегидное число выражается в миллиграммах коричневого альдегида на 100 г жира (или в % коричневого альдегида). Альдегидное число характеризует окислительную порчу жиров.

Оборудование, реактивы: ФЭК; кюветы; весы аналитические; колбы мерные емкостью 25 см³; пипетки; спирт этиловый; хлороформ; бензидин; кислота уксусная ледяная.

Порядок выполнения работы

Навеску жира 0,8–1,2 г помещают в мерную колбу с притертой пробкой емкостью 25 см³, растворяют в смеси этилового спирта и хлороформа (1 : 1), доводят объем раствора той же смесью до метки. Измеряют оптическую плотность этого раствора (D_1) при длине волны 360 нм. Раствором сравнения является смесь 95 %-го этилового спирта и хлороформа (1 : 1).

Затем в колбу емкостью 25 см³ помещают 10 см³ спиртохлороформного раствора препарата, прибавляют 1 см³ 0,5 %-го свежеприготовленного раствора бензидина в смеси 95 %-го спирта и ледяной уксусной кислоты (1 : 1), тщательно перемешивают и выдерживают 15 мин.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора (D_2) при длине волны 360 нм. Параллельно проводят контрольный опыт. Оптическая плотность (D_3), обусловленная окраской, которая развивается в результате взаимодействия альдегидов с бензидином, равна:

$$D_3 = 1,1 \times D_2 - D_1,$$

где D_1 – оптическая плотность контрольной пробы;

D_2 – оптическая плотность опытной пробы;

1,1 – поправка на изменение объема при добавлении к 10 см³ испытуемого раствора 1 мл 0,5 %-го раствора бензидина.

Содержание альдегидов в 1 см³ испытуемого раствора определяют по калибровочному графику.

Содержание альдегидов в препарате (X) в мг/100 г в пересчете на коричневый альдегид определяют по формуле:

$$X = \frac{C \times V \times 100}{m \times h},$$

где C – содержание коричневого альдегида в 1 см³ испытуемого образца, мг;

V – объем спиртохлороформного раствора жира, взятого для анализа;

m – навеска, г;

h – толщина рабочего слоя кюветы, см.

3.4. Расчет эфирного числа

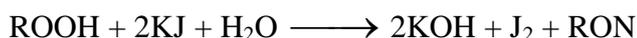
Эфирное число – это количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот (связанных жирных кислот) в 1 г жира. Эфирное число определяют по разности числа омыления и кислотного числа. Эфирное число характеризует природу жира.

Лабораторная работа № 14 **Липиды. Иодное число. Пероксидное число**

1. Определение пероксидного числа жиров

Пероксидное число характеризует процесс окислительной порчи жиров, в результате которой образуются пероксиды.

Пероксидное число определяется количеством граммов йода, выделенным из йодида калия пероксидами в присутствии ледяной уксусной кислоты. Образование свободного йода фиксируется с помощью крахмального клейстера.



Для повышения чувствительности исследования определение пероксидного числа проводят в кислой среде, действуя на пероксиды не йодистым калием, а йодистоводородной кислотой, образующейся из йодида калия при воздействии кислоты:



Выделившийся йод немедленно оттитровывают раствором тиосульфата натрия.

Оборудование, реактивы, материалы: колбы конические емкостью 250 см³; жир; хлороформ; кислота уксусная ледяная; йодид калия (насыщ. раствор); крахмал (1 %-й раствор); тиосульфат натрия (0,01 н раствор).

Порядок выполнения работы

В коническую колбу с притертой пробкой помещают 1 г жира, добавляют 30 см³ смеси (12 см³ хлороформа и 18 см³ уксусной кислоты), смесь перемешивают. Затем приливают 1 см³ насыщенного на холоде раствора йодида калия и взбалтывают содержимое колбы точно 2 мин. По окончании перемешивания наливают в колбу 100 см³ свежепрокипяченной охлажденной дистиллированной воды и 1 см³ 1 %-го раствора крахмала. Выделившийся йод титруют 0,01 н раствором тиосульфата натрия до исчезновения синего окрашивания. Параллельно проводят контрольный анализ без навески жира.

Пероксидное число жира (X) в мг КОН на 1 г жира рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \times K \times 0,001269 \times 100}{m},$$

где V – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование в опыте с навеской жира, см³;

V_1 – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование в контрольной пробе, см³;

0,001269 – масса йода, соответствующая 1 см³ 0,01 н раствора тиосульфата натрия, г;

m – масса навески жира, г;

K – коэффициент пересчета на точный 0,01 н раствор тиосульфата натрия..2.

2.Определение йодного числа

Йодное число является показателем числа двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах, образующих жиры.

Йодное число – это количество граммов йода, которое связывается 100 г жира по местоположению двойных связей. Йодное число жиров рыб – 103–176. Чем больше содержится ненасыщенных жирных кислот и чем больше двойных связей, тем выше йодное число (табл.).

Таблица

Рыба	Йодное число
Тощая сельдь (2,0–2,5 % липидов)	113–117
Более упитанная (6,8–7,2 % липидов)	127–147
Вполне упитанная сельдь (12–13 %)	148–154
Неполовозрелая сельдь	140–142
Половозрелая сельдь	130–132

Изменение йодного числа свидетельствует о том, что в период интенсивного нагула в организме рыб откладываются липиды, содержащие наибольшее количество ненасыщенных жирных кислот.

При одинаковой упитанности липиды рыб младшего возраста содержат большее количество ненасыщенных жирных кислот, чем липиды рыб старшего возраста. Жиры с высоким йодным числом быстро окисляются. Еще одним показателем степени ненасыщенности жирных кислот является водородное число – количество кубических сантиметров водорода, необходимое для насыщения 100 г исследуемого жира.

Определение йодного числа жиров основано на взаимодействии хлористого йода с жиром. Избыток хлористого йода далее реагирует с йодидом калия, в результате выделяется свободный йод.

Методом обратного титрования выделившегося йода раствором тиосульфата натрия устанавливают содержание йода, вступившего в реакцию с жиром.

Оборудование, реактивы: установки для титрования; колбы емкостью 200 см³; эфир серный; йодид калия (10 %-й раствор); тиосульфат натрия (0,1 н раствор); крахмал (1 %-й раствор); йод хлористый (0,2 н раствор в HCl); хлороформ.

Порядок выполнения работы

В колбу емкостью 200 см³ помещают 0,12 г пищевого жира. Для растворения жира в колбу добавляют 3 см³ этилового эфира, свободного от перекисей, и 25 см³ 0,2 н солянокислого раствора хлористого йода. После перемешивания в колбу помещают на 10–15 мин в темное место. Затем приливают 10 см³ 10 %-го раствора йодида калия, 50 см³ воды. Выделившийся йод оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия до светло-желтой окраски. Прибавляют в колбу 1 см³ 1 %-го свежеприготовленного раствора крахмала, 2–3 см³ хлороформа, свободного от перекисей, и продолжают титрование до полного исчезновения синего окрашивания. Параллельно с рабочим опытом проводят контрольный опыт без навески жира.

Йодное число жира (X) в г на 100 г жира рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \times K \times 0,01269 \times 100}{m},$$

где V – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного в контрольном опыте, см³;

V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного в рабочем опыте, см³;

0,01269 – масса йода, соответствующая 1 см³ 0,1 н раствора тиосульфата натрия, г;

m – масса навески жира, г;

K – коэффициент пересчета на точный 0,1 н раствор тиосульфата натрия.

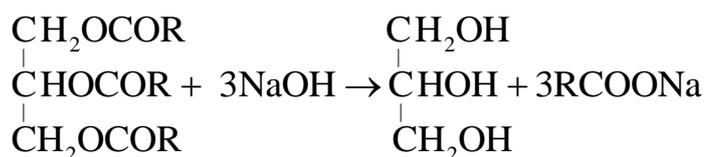
3. Определение чисел Рейхерта – Мейссля и Поленске

Числа Рейхерта – Мейссля и Поленске показывают содержание в жире летучих растворимых и нерастворимых в воде жирных кислот. К числу летучих кислот относятся масляная, капроновая, каприловая и каприновая кислоты. Из них растворимы в воде масляная и капроновая, нерастворимы – каприловая и каприновая.

Числом Рейхерта – Мейссля называют количество см³ 0,1 н раствора щелочи, пошедшее на нейтрализацию летучих растворимых в воде жирных кислот, выделенных из 5 г жира после его омыления.

Число Поленске показывает количество см³ 0,1 н раствора щелочи, которое требуется для нейтрализации летучих нерастворимых в воде жирных кислот, выделенных из 5 г жира.

Метод основан на омылении жира и перегонке освободившихся летучих растворимых и нерастворимых в воде жирных кислот. Для этого жир омыляют щелочью:



Полученное мыло разлагают серной кислотой и летучие кислоты перегоняют с водяным паром:



Таким образом, определение чисел Рейхерта – Мейссля и Поленске ведут одновременно.

В колбу на 300 см³ отвешивают 5 г профильтрованного жира, прибавляют 2 см³ 50 %-го раствора NaOH и 20 г глицерина. Смесь омыляют нагреванием на газовой горелке до тех пор, пока она из мутной не станет прозрачной. Затем жидкость охлаждают до 80–90 °С, приливают 90 см³ дистиллированной воды, нагретой до 90 °С. Жидкость в колбе после прибавления воды должна быть прозрачной.

В колбу опускают несколько кусочков пемзы, приливают 50 см³ раствора H₂SO₄ (25 см³ концентрированной H₂SO₄ разводят водой до 1 дм³), быстро соединяют колбу с холодильником, подставив для собирания дистиллята мерную колбу емкостью 110 см³. Перегонку ведут, регулируя пламя горелки так, чтобы 110 см³ получить за 18–20 мин. После перегонки мерную колбу с дистиллятом охлаждают в холодной воде до 20 °С, затем раствор фильтруют через гладкий бумажный фильтр в мерную колбу на 100 см³. Фильтрат содержит летучие растворимые в воде жирные кислоты. Воронку с фильтром и колбу на 110 см³ оставляют для определения числа Поленске.

Фильтрат переливают в коническую колбу (мерную колбу ополаскивают 2–3 раза дистиллированной водой, сливая в ту же коническую колбу) и титруют 0,1 н раствором NaOH с 3–4 каплями раствора фенолфталеина до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 2 мин. Количество см³ щелочи, пошедшее на титрование, умножают на 1,1 (так как для титрования было взято 100 см³ фильтрата вместо отогнанных 110 см³) и получают количество летучих растворимых в воде жирных кислот в 5 г жира – число Рейхерта – Мейссля.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 15

Качественные реакции на углеводы

Цель работы: провести качественный анализ углеводов.

1. Проба Троммера – Фелинга

Проба Троммера – Фелинга является качественной реакцией на глюкозу и представляет собой восстановление Cu(OH)₂ глюкозой в присутствии щелочи до красного осадка Cu₂O. Для получения лучших результатов используют реактив Фелинга – раствор гидроксида меди (II) в сегнетовой соли.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; жидкость Фелинга; глюкоза (1 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

К 2 см³ исследуемого раствора глюкозы добавляют 2 см³ реактива Фелинга. Нагревают смесь до кипения. Образуется красный осадок Cu₂O.

2. Реакция Подобедова – Молиша

Углеводы под воздействием концентрированной серной кислоты образуют фурфурол. Фурфурол при взаимодействии с α-нафтолом образует соединение фиолетового цвета.

Оборудование, реактивы: пробирки; кислота серная (конц.); α-нафтол; раствор углеводов.

Порядок выполнения работы

В пробирку помещают 1 см³ исследуемого раствора глюкозы, прибавляют 2 капли α-нафтола. По стенке пробирки приливают 1 см³ концентрированной H₂SO₄. На границе двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета.

3. Качественная реакция на пентозы – образование фурфурола и конденсация его с анилином

Оборудование, реактивы: пробирки; баня водяная; опилки; кислота соляная (конц.); анилин; кислота уксусная (2 н раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку насыпают слой опилок высотой 15–20 см, смачивают их приготовленной отдельно смесью концентрированной HCl и воды (1 : 1) и кипятят. Смачивают узкую полоску фильтровальной бумаги смесью 2 капель анилина и 4 капель 2 н CH₃COOH. Опускают в пробирку с кипящей смесью. Фильтровальная бумага окрашивается в красный цвет.

4. Качественная реакция на гликоген

Гликоген (животный крахмал) – главный запасной полисахарид организма. Относится к гомополисахаридам, состоит из 30 000 остатков глюкозы. Гликоген в основном накапливается в печени и мышечной ткани. Для посмертных изменений водного сырья характерен распад гликогена в мышечной ткани в ходе хранения с образованием молочной кислоты (гликогенолиз).

Оборудование, реактивы: рыба; раствор Люголя.

Порядок выполнения работы

Делают срез мышечной ткани рыбы. Наносят на поверхность свежего среза каплю раствора Люголя. Поверхность окрасится в синий цвет.

Оформление работы. Наблюдения по каждой реакции записывают в тетрадь, делают выводы.

Лабораторная работа № 16

Жирорастворимые витамины (качественные реакции)

Цель работы – изучить качественные реакции на жирорастворимые витамины.

Качественные реакции на витамин А

1. Реакция с треххлорной сурьмой

Оборудование, реактивы: жир рыбий; хлороформ; хлорид сурьмы (насыщ.).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 см³ 20 %-го раствора витаминизированного рыбьего жира в хлороформе, прибавляют 1 см³ насыщенного раствора хлорида сурьмы. Появляется синее окрашивание, постепенно бледнеющее.

2. Взаимодействие витамина А с сульфатом железа

Оборудование, реактивы: жир рыбий; сульфат железа в уксусной кислоте.

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 0,5 см³ рыбьего жира, добавляют 2,5 см³ насыщенной сульфатом железа ледяной уксусной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

3. Реакция с серной кислотой

Оборудование, реактивы: жир рыбий; кислота серная (конц.).

Порядок выполнения работы

Одну каплю рыбьего жира растворяют в 4–5 каплях хлороформа и прибавляют 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, быстро переходящее в красное.

Качественные реакции на витамин D

1. Реакция витамина D с бромом

Раствор витамина D (или рыбий жир, содержащий витамин D) при добавлении раствора брома в хлороформе окрашивается в зеленовато-голубой цвет.

Оборудование, реактивы: пробирки; жир рыбий; витамин D; раствор брома в хлороформе.

2. Анилиновая проба на витамин D

При нагревании раствора витамина D (или рыбьего жира, содержащего витамин D) со смесью анилина и концентрированной соляной кислоты раствор приобретает красную окраску.

Оборудование, реактивы: пробирки; раствор витамина D (или рыбий жир); анилин; хлороформ; кислота соляная (конц.).

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку вносят 1 каплю раствора витамина D (или 1 каплю рыбьего жира) и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю анилинового реактива (анилин : HCl = 15 : 1). При нагревании желтая эмульсия приобретает красную окраску.

Качественные реакции на витамин E (токоферол)

1. Реакция с азотной кислотой

Спиртовой раствор токоферола при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой окрашивается в красный цвет в результате окисления токоферола до окрашенного продукта, имеющего хиноидную структуру.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; токоферол (0,1 %-й спиртовой раствор); кислота азотная (конц.).

Порядок выполнения работы

В пробирку помещают 0,5 см³ спиртового раствора токоферола, прибавляют 1 см³ концентрированной азотной кислоты, пробирку встряхивают. Образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается; верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

2. Реакция с хлоридом железа (III)

При окислении α -токоферола хлоридом железа происходит образование токоферилхинона, раствор приобретает красную окраску.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; железо хлорное (насыщ.); α -токоферол (0,1 %-й спиртовой).

Порядок выполнения работы

В пробирку помещают 4–5 капель спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 см³ насыщенного раствора хлорного железа, перемешивают содержимое пробирки. В результате образования ферилхинона раствор окрашивается в красный цвет.

Качественные реакции на витамин K

1. Реакция с анилином

Витамин K восстанавливается анилином, раствор окрашивается в красный цвет:

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; анилин; метинон (0,25 %-й спиртовой раствор); викасол (0,05 %-й спиртовой раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 см³ спиртового раствора викасола или метинона, добавляют 0,5 см³ анилина. Пробирку встряхивают. Жидкость приобретает красный цвет.

2. Реакция с щелочным раствором цистеина

Оборудование, реактивы: пробирки; викасол (0,1 %-й раствор); метинон (0,2 %-й спиртовой раствор); цистеин (0,025 %-й раствор); гидроксид натрия (10 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 см³ 0,1 %-го спиртового раствора викасола (или 0,2 %-го спиртового раствора метинона). Затем прибавляют 2 капли 0,025 %-го раствора цистеина и 2 капли 10 %-го раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.

Лабораторная работа № 17

Водорастворимые витамины (качественные реакции)

Цель работы – изучить качественные реакции на отдельные витамины.

Качественные реакции на витамин В₁

1. Диазореакция на тиамин

Качественной реакцией на витамин В₁ является диазореакция. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета (азокраситель).

Оборудование, реактивы: пробирки; тиамин (5 %-й раствор); кислота сульфаниловая (1 %-й раствор); нитрит натрия (5 %-й раствор); бикарбонат натрия (10 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

Для приготовления свежеприготовленного диазореактива в пробирку вносят 1 см³ 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты в 2 %-м растворе HCl и 1 см³ 5 %-го раствора нитрита натрия.

Затем добавляют 1 см³ 5 %-го раствора тиамина. По стенке, наклонив пробирку, осторожно наслаивают 2 см³ 10 %-го раствора бикарбоната натрия NaHCO₃. На границе двух жидкостей появляется кольцо красного или оранжевого цвета, которое через 2–3 мин становится ярко выраженным.

2. Реакция окисления тиамина феррицианидом калия до тиохрома

Качественной реакцией на тиамин является реакция окисления феррицианидом калия. В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия K₃[Fe(CN)₆]. Тиохром является желтым пигментом, обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

Оборудование, реактивы: флюороскоп; гидроксид натрия (10 %-й раствор); феррицианид калия (5 %-й раствор); тиамин (5 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

К одной капле 5 %-го раствора тиамина прибавляют 5–10 капель 10 %-го раствора гидроксида натрия, 1–2 капли 5 %-го раствора феррицианида калия и взбалтывают – наблюдается желтое окрашивание. Прогрев флюороскоп, в течение 10 мин наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

Качественные реакции на витамин В₂ (рибофлавин)

1. Восстановление рибофлавина

Рибофлавин легко окисляется и восстанавливается, отдавая или присоединяя водород к атомам азота изоаллоксазиновой группы в 1-м и 10-м положениях.

При взаимодействии раствора рибофлавина с металлическим цинком и концентрированной соляной кислотой образуется восстановленная форма – лейкофлавин.

Оборудование, реактив: пробирки; пипетки; рибофлавин; кислота соляная (конц.); цинк (металлический).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1,5 см³ 0,025 %-го раствора рибофлавина и 1 см³ концентрированной соляной кислоты, а затем опускают кусочек металлического цинка. Наблюдается бурное выделение пузырьков водорода и постепенное окрашивание раствора в розовый цвет, далее жидкость обесцвечивается. Если красное окрашивание не исчезает, необходимо добавить зернышко металлического цинка.

2. Реакция с нитратом серебра $AgNO_3$

Нейтральный или слабокислый растворы рибофлавина (рН 6,5–7,2), реагируя с азотнокислым серебром, образуют промежуточный продукт восстановления розового или красного цвета – родофлавин.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; рибофлавин (0,015 %-й раствор); серебро азотнокислое (0,6 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

К 1 см³ раствора рибофлавина добавляют 0,5 см³ раствора нитрата серебра. В результате образования родофлавина появляется розовое или красное окрашивание.

Качественная реакция на витамин РР (ниацин, никотиновая кислота, никотинамид)

При нагревании никотиновой кислоты с растворами уксусной кислоты и ацетата меди образуется синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; витамин РР; кислота уксусная (10 %-й раствор); ацетат меди (5 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку помещают 5–10 г витамина РР, добавляют 1,5 см³ 10 %-го раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения. Далее к горячему раствору добавляют 1,5 см³ 5 %-го раствора ацетата меди. Раствор приобретает голубую окраску, мутнеет; при стоянии наблюдается выпадение синего осадка.

Качественная реакция на витамин В₆

При добавлении к раствору пиридоксина раствора хлорного железа образуется комплексное соединение типа фенолята железа, придающее раствору красное окрашивание.

Оборудование, реактивы: пробирки; пипетки; пиридоксин (5 %-й раствор); железо хлорное (5 %-й раствор).

Порядок выполнения работы

В чистую пробирку наливают 2,5 см³ 5 %-го раствора пиридоксина, добавляют 0,5 см³ 5 %-го раствора хлорида железа (III). Пробирку встряхивают. Жидкость приобретает красный цвет.

Качественные реакции на витамин С

1. Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Оборудование, реактивы, материалы: пробирки; витамин С; сок капусты или картофеля; кислота соляная (2 %-й раствор); 2,6-дихлор-фенолиндофенол (натриевая соль 0,001 н).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 см³ раствора витамина С (или 1 см³ сока капусты или картофеля), приливают 3–4 капли 2 %-го раствора HCl и осторожно, по каплям, 0,001 н раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Реактив будет обесцвечиваться до тех пор, пока полностью не пройдет окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую. После этого первая капля добавленного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола окрасит жидкость в розовый цвет, так как образование лейкоформы уже не происходит.

2. Взаимодействие с метиленовой синью

Оборудование, реактивы: термостат; пробирки; синь метиленовая (0,01 %-й раствор); сок капусты или картофеля; витамин С.

Порядок выполнения работы

К 1 см³ раствора витамина С (или 1 см³ сока капусты или картофеля) добавляют 1 см³ 0,01 %-го раствора метиленовой сини, перемешивают. Закрывают пробирку пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом. Пробирку помещают в термостат при температуре 37–40 °С.

Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается в результате превращения аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту и метиленовой сини в бесцветную лейкоформу.

Если полученный бесцветный раствор энергично встряхнуть, он вновь приобретает синюю окраску.

Оформление работы. Записывают принцип метода, результаты и выводы.