

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

Кафедра микробиологии и биохимии

**Методические указания к выполнению  
лабораторных работ**

Дисциплина: Биохимия

Направление подготовки /специальность: 06.03.01 «Биология»,  
19.03.01 «Биотехнология»,  
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»,  
19.03.04 «Технология продукции и организация общественного  
питания»

Мурманск  
2020

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

Методические рекомендации к выполнению лабораторных работ рассмотрены и одобрены на заседании кафедры микробиологии и биохимии 02.06.2019 г., протокол № 7.

## **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**

Лабораторные работы по дисциплине «Биохимия» выполняются в соответствии с учебным планом по направлениям 06.03.01 «Биология», 19.03.01 «Биотехнология», 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения», 19.03.04 «Технология продукции и организация общественного питания».

Учебная дисциплина «Биохимия» дает представление о химическом составе живых организмов, биохимии тканей и биологических жидкостей, обмене веществ и энергии в живом организме.

В методических указаниях к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» изложены основные теоретические положения с конкретными практическими работами с целью овладения студентами современных методов экспериментальных исследований. Во время проведения лабораторных работ студенты закрепляют теоретические знания, полученные на лекциях, анализируют результаты. В каждой лабораторной работе излагаются принципы метода, ход эксперимента, советы по оформлению результатов

После изучения дисциплины студент должен знать химический состав живых организмов, строение, классификацию и биологическую роль белков, ферментов, липидов, углеводов, водорастворимых и жирорастворимых витаминов, нуклеиновых кислот, химическую природу и механизм действия гормонов, общую характеристику обменных процессов в организме, обмен углеводов, липидов, белков, биохимию различных тканей и биожидкостей организма.

Уметь грамотно применять основные современные лабораторные методы качественного и количественного анализа биоорганических соединений,

Обладать навыками анализа имеющейся информации и подбора методов биохимических исследований объектов.

Изучать материал дисциплины «Биохимия» следует в соответствии с тематическим планом.

## **2. ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН**

## Перечень лабораторных работ

**Таблица – Перечень лабораторных работ**

№ п/п	Наименование работ
1.	Универсальные и специфические качественные реакции на аминокислоты и белки.
2.	Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим биуретовым макро- и микрометодом.
3.	Количественное определение водорастворимого белка фотоколориметрическим методом Лоури.
4.	Физико-химические свойства белков. Высаливание, денатурация, изоэлектрическое состояние. Гидролиз.
5.	Ферменты. Качественные реакции на отдельные ферменты.
6.	Физико-химические свойства ферментов. Специфичность действия. Влияние рН, температуры на активность ферментов.
7.	Количественное определение активности пепсина по методу Пятницкого. Количественные определение активности трипсина.
8.	Количественное определение активности амилазы методом Вольгемута. Количественное определение активности липазы.
9.	Липиды. Кислотное число, число омыления, эфирное число. Иодное число. Пероксидное число. Альдегидное число.
10.	Анализ желчных кислот. Эмульгирование жиров.
11.	Углеводы. Качественные реакции на углеводы.
12.	Количественное определение углеводов.
13.	Водорастворимые витамины (качественные реакции).
14.	Количественное определение содержания витамина С в биологическом материале йодометрическим методом. Количественное определение витамина С в биологическом материале при взаимодействии с 2,6-дихлориндофенолом.
15.	Жирорастворимые витамины (качественные реакции).
16.	Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)
17.	Определение активности фермента внутренней митохондриальной мембраны – сукцинатдегидрогеназы
18.	Количественное определение фосфотриоз (фосфодиоксиацетона и фосфоглицеральдегида) в мышечной ткани фотоколориметрическим методом
19.	Переаминирование аминокислот
20.	Фракционирование белков
21.	Количественное определение содержания миозина
22.	Влияние температуры на активность холинэстеразы
23.	Определение некоторых нормальных составных частей мочи
24.	Ферменты молока. Кислотность молока
25.	Определение изоэлектрической точки казеина
26.	Количественное определение содержания жира в печени трески методом Блайя – Дайера
27.	Молочнокислое брожение бактерий

### 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).

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

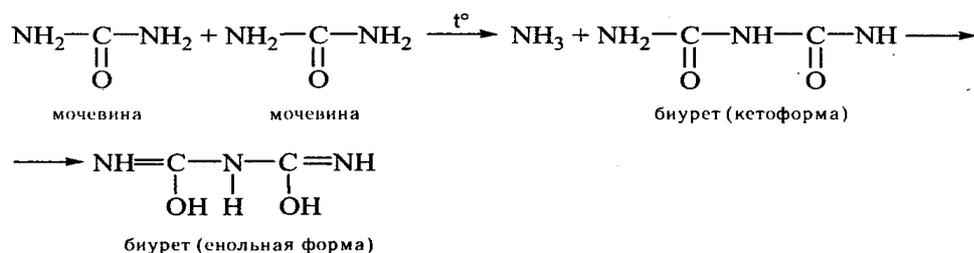
### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1 УНИВЕРСАЛЬНЫЕ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ

**Цель работы** - изучить цветные реакции на белки и аминокислоты, 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.

#### 1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

*Биуретовая реакция* — универсальная цветная реакция — является показателем наличия пептидных связей в соединении. Свое название реакция получила от производного мочевины — биурета, молекула которого состоит из двух остатков мочевины. Биурет образуется при нагревании сухой мочевины с отщеплением  $\text{NH}_3$  в щелочной среде переходит в енольную форму:



Молекула биурета содержит две пептидные группировки  $\text{CO}-\text{NH}$ . В щелочной среде биурет за счет пептидных связей образует окрашенный комплекс с  $\text{CuSO}_4$ , поэтому реактив сегнетова соль ( $\text{CuSO}_4 + \text{NaOH} + \text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) называется *биуретовым реактивом*.

Биуретовую реакцию дают соединения, содержащие не менее двух пептидных связей. Как и биурет, белки, полипептиды, олигопептиды при взаимодействии с биуретовым реактивом образуют солеобразные биуретовые комплексы красно-фиолетового и сине-фиолетового цвета, поэтому данная реакция на белки называется биуретовой.

Биуретовая реакция характеризует степень гидролиза белков; полный гидролиз белка до аминокислот фиксируется отсутствием биуретовой реакции.

Биуретовую реакцию могут давать небелковые вещества: оксамид ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), а также ряд аминокислот (гистидин, серии, треонин, аспарагин).

Рассмотрим механизм этой реакции. Для пептидной связи характерна кетоформа, енольная форма встречается редко.

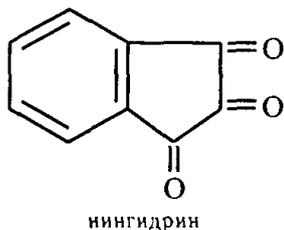
В щелочной среде из кетотаутомера (изомера) образуются енольные формы:



В четыре пробирки наливают: в первую — 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора белка, во вторую — 1 см<sup>3</sup> 0,1 %-го раствора желатина, в третью — 1 см<sup>3</sup> водной вытяжки из мышечной ткани, в четвертую — 1 см<sup>3</sup> раствора биурета. Во все пробирки добавляют по 1 см<sup>3</sup> свежеприготовленного биуретового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Появление сине-фиолетового окрашивания свидетельствует об образовании биуретового комплекса и подтверждает наличие пептидных связей.

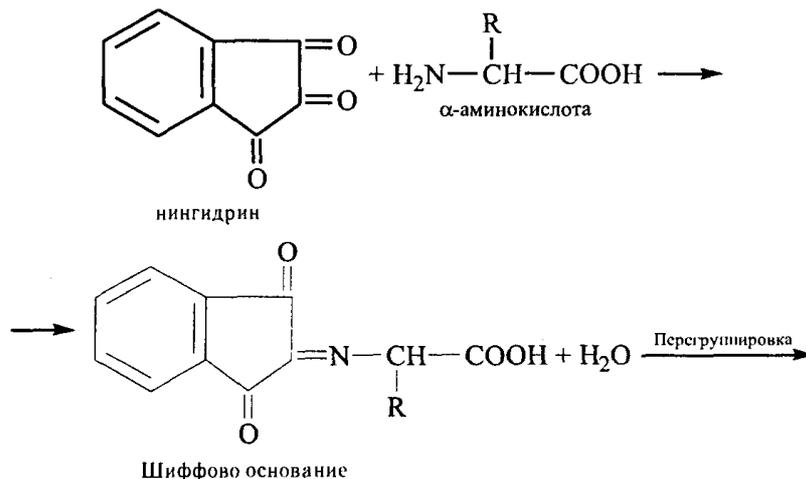
## 2. Нингидриновая реакция

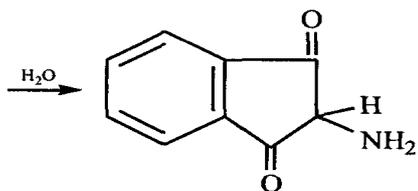
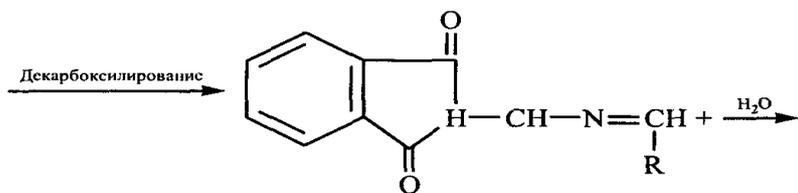
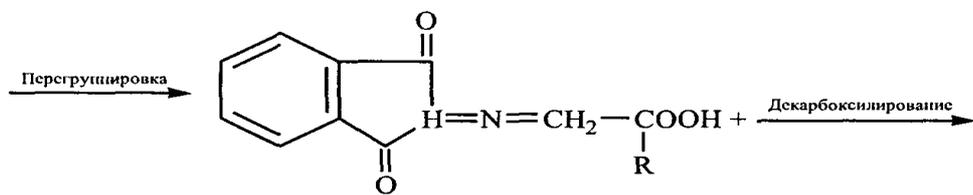
Нингидриновая реакция — универсальная цветная реакция; формула нингидрина (трикетогидриндендрата) выглядит следующим образом:



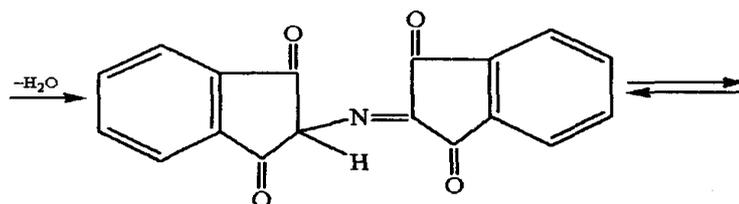
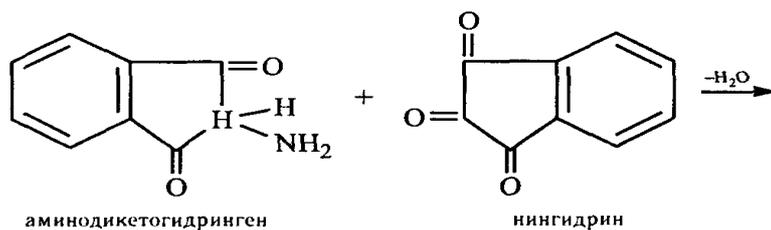
Нингидриновая реакция характерна для аминогрупп, находящихся в α-положении и входящих в состав белков, полипептидов, олигопептидов, свободных аминокислот. При кипячении с разбавленным водным раствором нингидрина α-аминокислоты, полипептиды и белки дают синее и сине-фиолетовое окрашивание. При взаимодействии α-аминокислоты с нингидрином образуется шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется, в результате образуются аминокетогидринден, альдегид и CO<sub>2</sub>. Аминокетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образующееся соединение, енолизируясь, переходит в сине-фиолетовый комплекс Руэмана (продукт конденсации мурексидного строения).

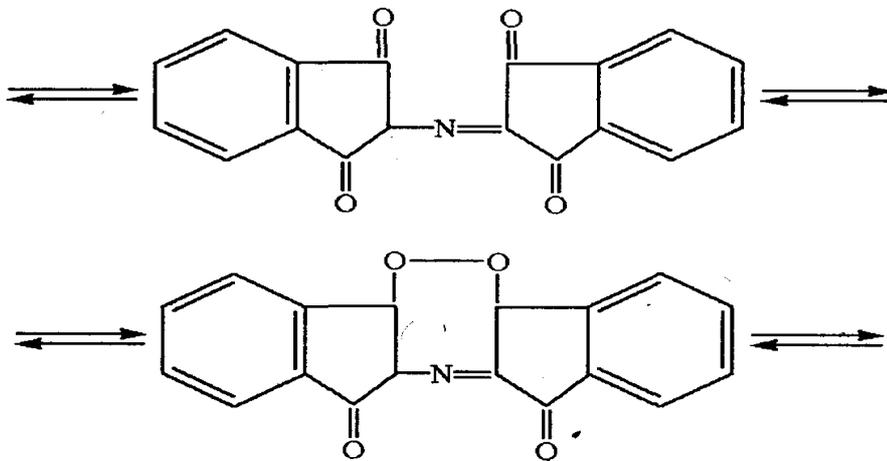
Первый вариант механизма реакции:





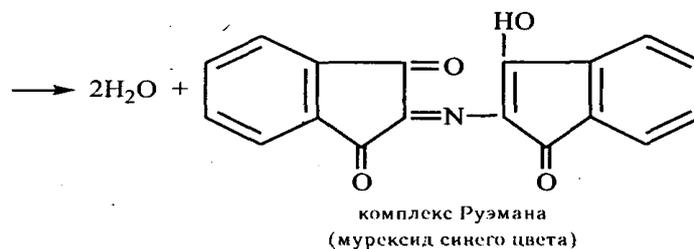
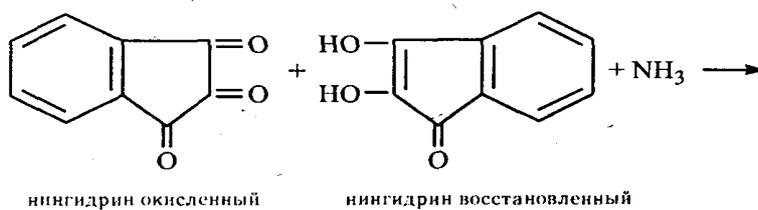
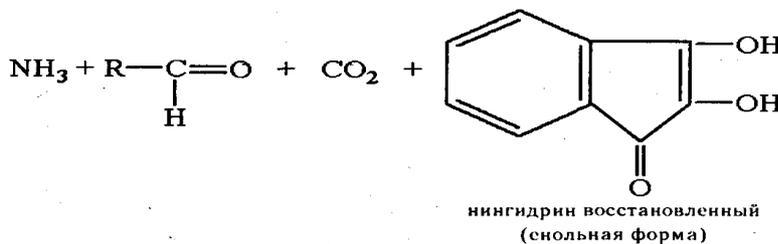
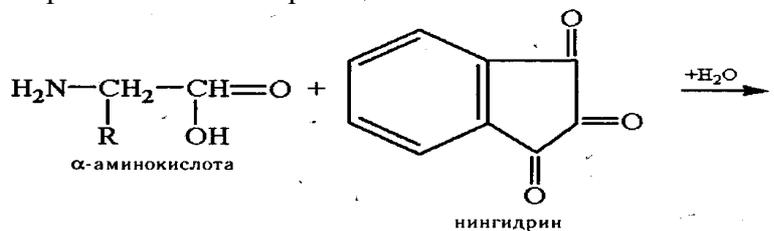
аминодикетогидринден





сине-фиолетовый комплекс Руэмана (ДИДА, продукт конденсации мурексидного строения, или продукт Руэмана)

Второй вариант механизма реакции:



**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Баня водяная. 3) Белок яичный (1 %-й раствор). 4) Водная вытяжка из мышечной ткани. 5) Нингидрин (0,5 %-й раствор в органическом растворителе ацетоне).

**Ход работы**

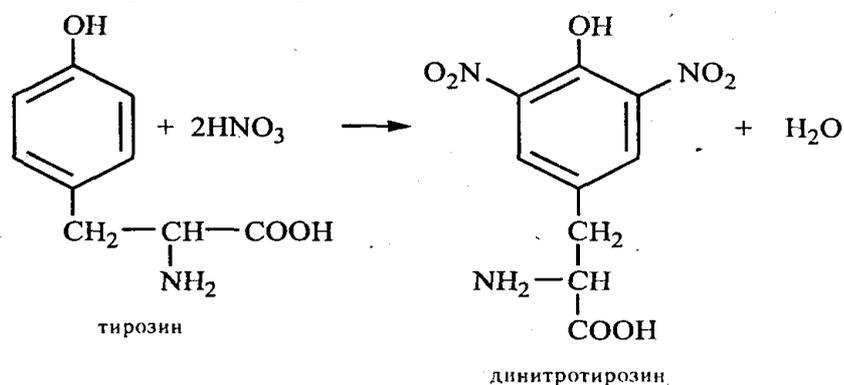
В первую пробирку вносят 1 см<sup>3</sup> раствора белка, во вторую — 1 см<sup>3</sup> раствора желатины, в третью — 1 см<sup>3</sup> водной вытяжки из мышечной ткани, в каждую добавляют по 0,5 см<sup>3</sup> раствора нингидрина. Пробирки нагревают до кипения на водяной бане. Через 2—3 мин во всех пробирках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

### 3. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера)

Ксантопротеиновая (греч. *xanthos* — желтый) реакция — это реакция на циклические аминокислоты. При нагревании раствора белка с концентрированной азотной кислотой жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, который при добавлении щелочи переходит в оранжевый. Реакция обусловлена наличием в белке циклических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), которые при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные желтого цвета (реакция нитрования). Нитро-производные при добавлении щелочи превращаются в соли хиноид-ной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Белки и полипептиды, в состав которых не входят циклические аминокислоты, не дают ксантопротеиновой реакции. К таким соединениям относятся желатина, а также клупеин и сальмин, которые являются протаминнами из спермы рыб. Ксантопротеиновую реакцию (появление желтой окраски) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти при попадании на них концентрированной азотной кислоты.

Схема ксантопротеиновой реакции:



**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Баня водяная. 3) Кислота азотная (конц.). 4) Гидроксид натрия (30 %-й водный раствор) 5) Белок яичный (1 %-й раствор). 6) Желатин (1 %-й раствор). 7) Водная вытяжка из мышечной ткани. 8) Тирозин (1 %-й раствор).

#### Ход работы

В первую пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора яичного белка, во вторую — 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора желатина, в третью — 1 см<sup>3</sup> водной вытяжки из мышечной ткани, в четвертую — 1 см<sup>3</sup> раствора тирозина. Во все пробирки добавляют по 0,5 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. В пробирках с белком, содержащим циклические аминокислоты, и тирозином появляется лимонно-желтое окрашивание. В пробирке с желатином появляется едва заметное бледно-желтое окрашивание из-за примесей других белков.

Пробирки охлаждают, затем осторожно добавляют в каждую по 1,5 см<sup>3</sup> 30 %-го раствора NaOH. В пробирках с циклической аминокислотой и белком, содержащим циклические аминокислоты, наблюдается переход желтой окраски в оранжевую.

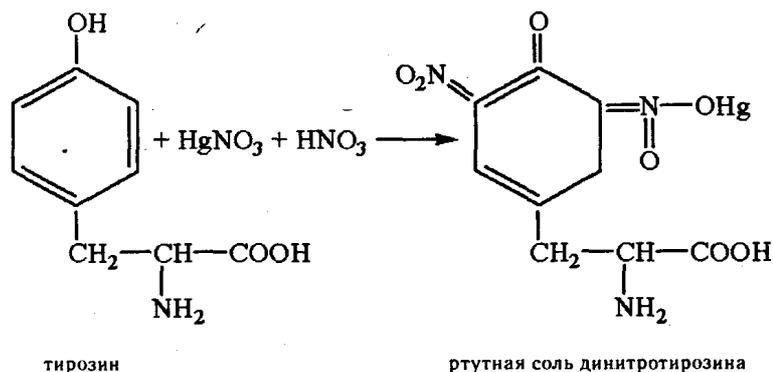
### 4. Реакция на тирозин (реакция Миллона)

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 закиси ртути (HgNO<sub>3</sub> и HgNO<sub>2</sub>), растворенных в концентрированной азотной кислоте.

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

Реакцию Миллона дают фенолы, полифенолы, алкалоиды, содержащие фенольную группу.

К раствору белка не следует добавлять избыток реактива Миллона, так как он содержит  $\text{HNO}_3$ , которая при взаимодействии с белком может дать ксантопротеиновую реакцию (желтая окраска), маскирующую реакцию Миллона:



**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Тирозин (1 %-й раствор). 3) Белок яичный (1 %-й раствор). 4) Желатин (0,1 %-й раствор). 5) Водная вытяжка из мышечной ткани рыбы. 6) Реактив Миллона.

*Реактив Миллона* готовят следующим образом: в 60 см<sup>3</sup> концентрированной  $\text{HNO}_3$  ( $\rho = 1$  г/см<sup>3</sup>) растворяют 40 г ртути при комнатной температуре, помещают в теплую водяную баню до прекращения выделения бурых паров оксидов азота и перемешивают. Затем добавляют 300 см<sup>3</sup> воды.

#### Ход работы

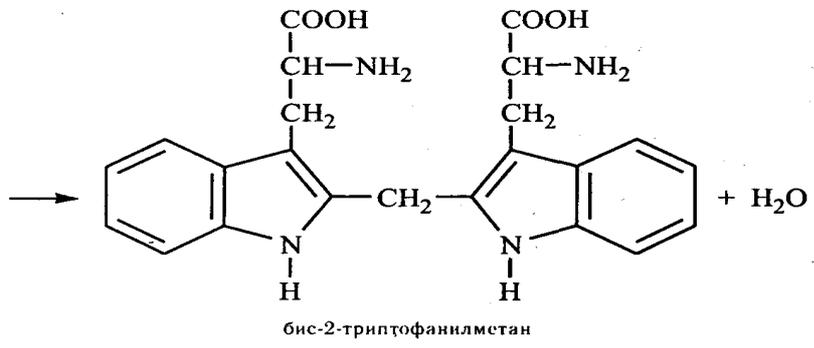
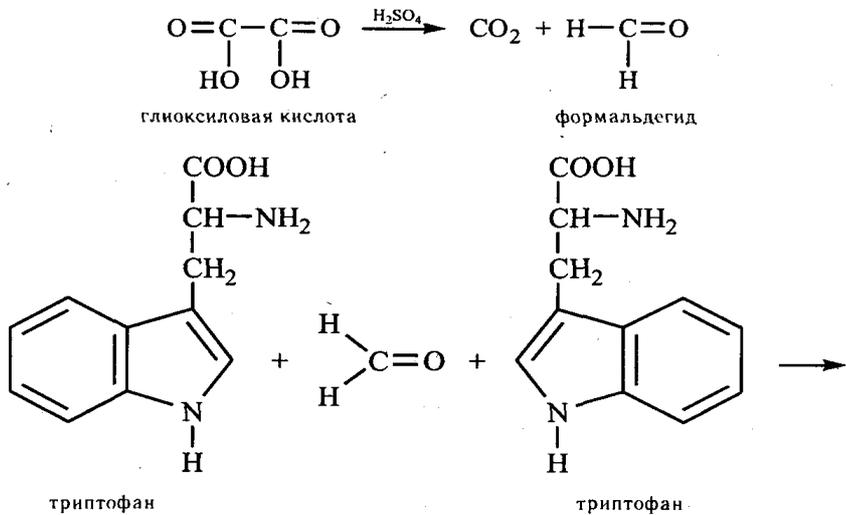
В одну пробирку наливают 0,5 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора яичного белка, во вторую — 0,5 см<sup>3</sup> 0,1 %-го раствора желатина, в третью — 0,5 см<sup>3</sup> водной вытяжки из мышечной ткани. Во все пробирки добавляют по 5 капель реактива Миллона и осторожно нагревают.

В пробирках с белком, содержащим тирозин, осадок белка приобретает красное окрашивание. В пробирке с желатином осадок растворяется и жидкость остается бесцветной.

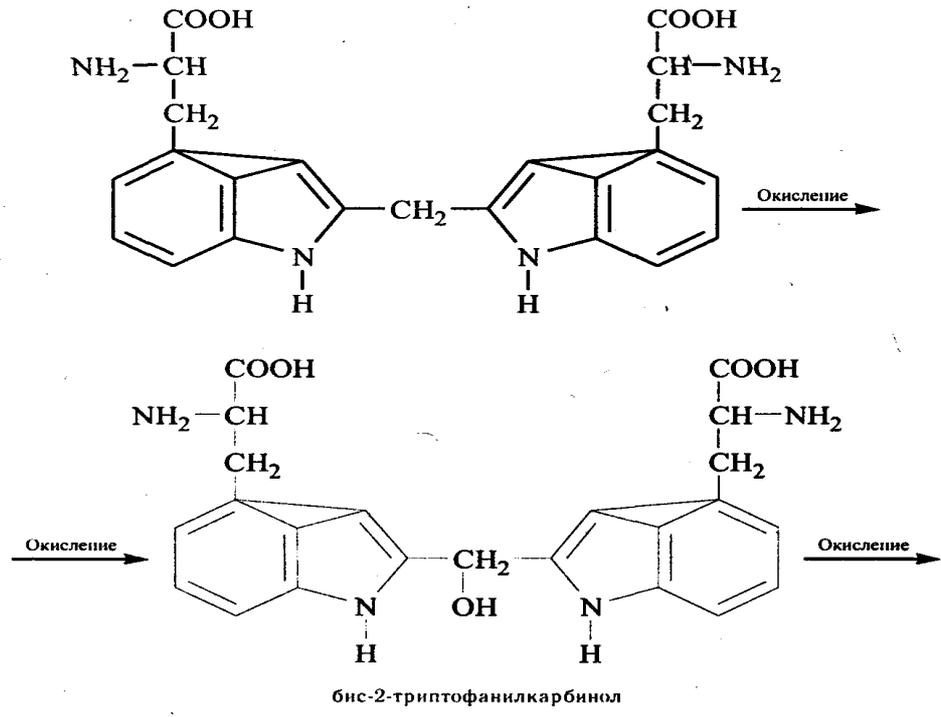
#### 5. Реакция на триптофан (реакция Адамкевича)

Триптофан является гетероциклической альфа-аминокислотой. В кислой среде он реагирует с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под воздействием концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , образуя продукты конденсации красно-фиолетовой окраски. Глиоксиловая кислота является альдегидокислотой.

Она всегда присутствует в виде примеси в ледяной уксусной кислоте, поэтому в реакции Адамкевича уксусную кислоту  $\text{CH}_3\text{COOH}$  используют как источник глиоксиловой кислоты. Растворы белков, содержащих триптофан, при взаимодействии с глиоксиловой кислотой в присутствии концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  также приобретают красно-фиолетовую окраску:



Бис-2-триптофанилметан окисляется до бис-2-триптофанил-карбинола, который в присутствии минеральных кислот образует красно- или сине-фиолетовые комплексы:



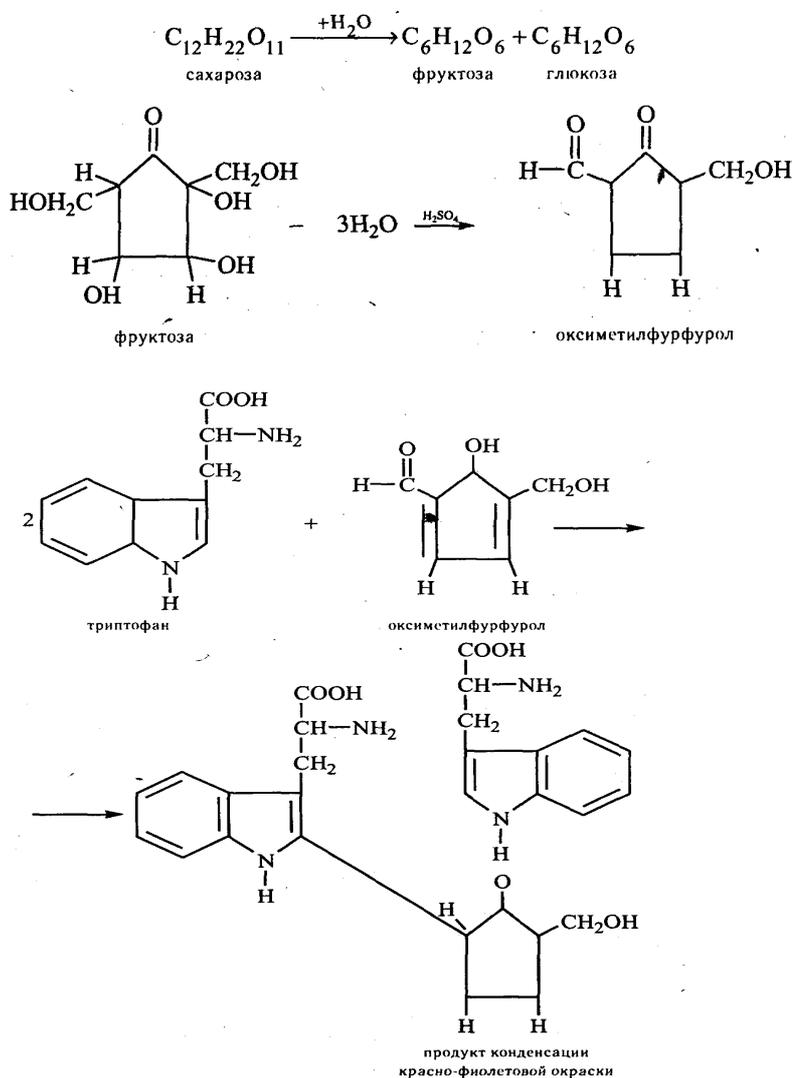
**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Баня водяная. 3) Белок яичный (1 %-й раствор). 4) Желатин (1 %-й раствор). 5) Кислота уксусная, содержащая глиоксиловую кислоту (конц.). 6) Кислота серная (конц.); 7) Водная вытяжка из мышечной ткани.

### Ход работы

В первую пробирку наливают  $0,5 \text{ см}^3$  1 %-го раствора белка, во вторую —  $0,5 \text{ см}^3$  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 глиоксильную кислоту. Пробирки слегка нагревают на водяной бане, охлаждают. В каждую пробирку наслаивают по стенкам по  $1 \text{ см}^3$  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 по стенке пробирки осторожно спускать из пипетки концентрированную серную кислоту, то на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Это объясняется взаимодействием триптофана с оксиметилфурфуолом, образующимся из фруктозы. Сахароза является дисахаридом; при расщеплении одной молекулы сахарозы образуются молекулы фруктозы и глюкозы:



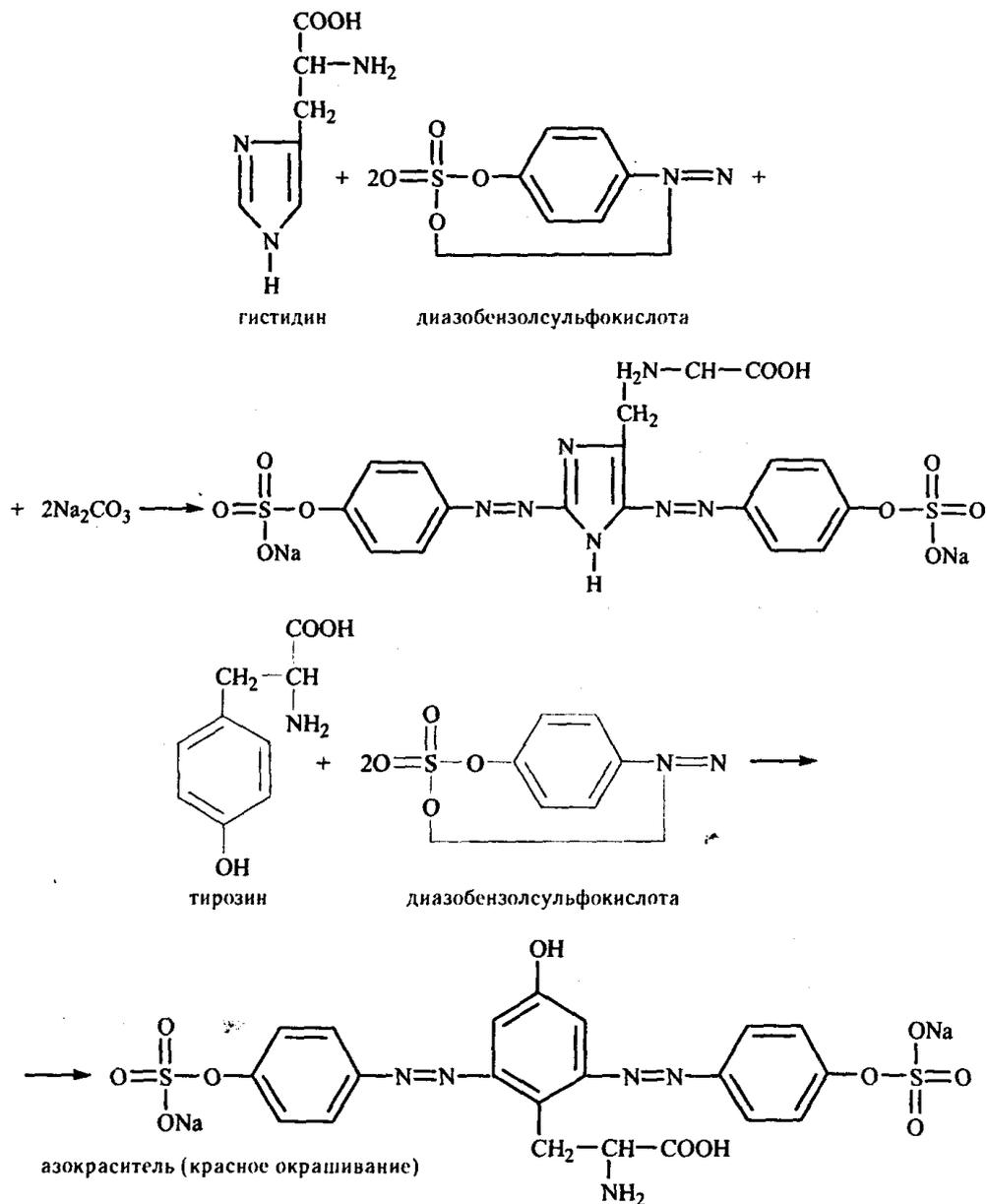
**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Белок яичный (1 %-й раствор). 3) Кислота серная (конц.). 4) Раствор сахарозы.

### Ход работы

В пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора белка, добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора сахарозы, затем осторожно, по стенке пробирки, наслаивают 0,5 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей появляется красно-фиолетовое кольцо.

### 7. Реакция на гистидин (реакция Паули)

Реакция Паули — diazo-реакция на гистидин и тирозин. При добавлении diazo-реактива к щелочному раствору белка появляется оранжево-красное окрашивание. Гистидин и тирозин при взаимодействии с diazo-бензолсульфокислотой образуют азокраситель красного цвета:



Реакцию Паули дают также вещества, имеющие фенольное, ими-дазольное, пиррольное или тиазоловое кольцо (адреналин, тиамин, кар-нозин, желчные пигменты, гистамин).

Диазобензолсульфо кислота — неустойчивое соединение, при хранении разрушается. Поэтому подготовку диазореактива следует проводить перед началом опыта.

**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Гистидин (1 %-й раствор). 3) Желатин (1 %-й раствор). 4) Белок яичный (1 %-й раствор). 5) Водная вытяжка из мышечной ткани. 6) Кислота сульфаниловая (1 %-й раствор в 5 %-м растворе соляной кислоты). 7) Нитрит калия (0,5 %-й раствор). 8) Карбонат натрия (10 %-й раствор). 9) Диазореактив (1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты смешивают с 2 см<sup>3</sup> 0,5 %-го раствора нитрита калия).

#### Ход работы

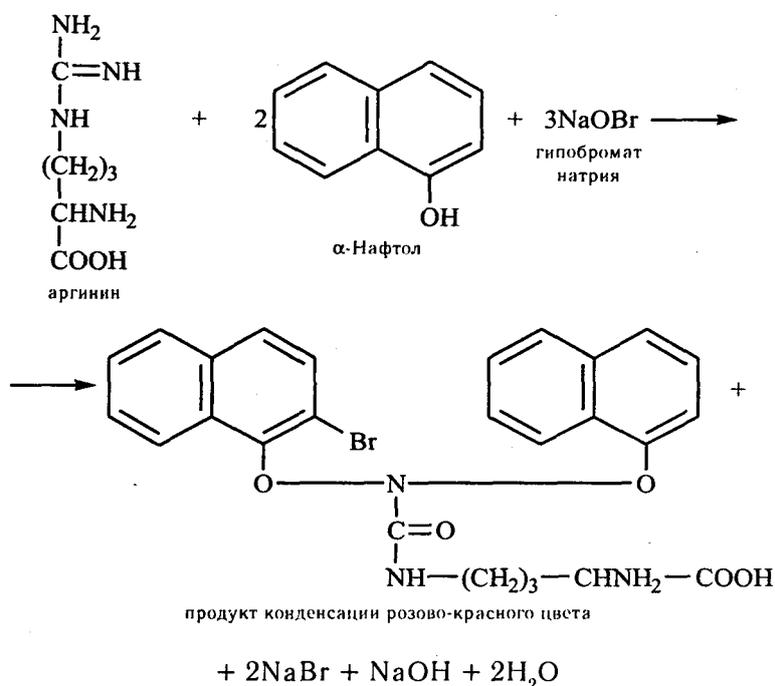
В первую пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора гистидина, во вторую — 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора яичного альбумина, в третью — 1 см<sup>3</sup> 1 %-го раствора желатина, в четвертую — 1 см<sup>3</sup> водной вытяжки из мышечной ткани. Во все пробирки добавляют по 3 см<sup>3</sup> свежеприготовленного диазореактива, сильно встряхивают и приливают по 6 см<sup>3</sup> 20 %-го раствора карбоната натрия.

В пробирках, где присутствует гистидин, развивается интенсивная вишнево-красная окраска.

### 8. Реакция на аргинин (реакция Сакагучи)

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина, имеющей гуанидиновую группу.

В щелочном растворе в присутствии гипобромита натрия (NaOBr) гуанидиновая группа аргинина окисляется. Окисленный продукт, соединяясь с α-Нафтолом, образует продукт конденсации розово-красного цвета:



Реакцию Сакагучи дают и другие монозамещенные производные гуанидина (метилгуанидин, гликоциамин, агматин).

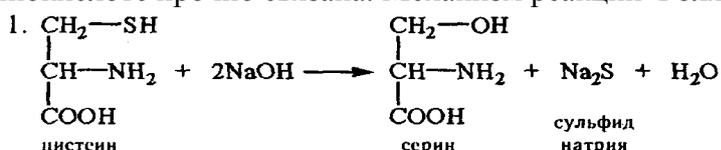
**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Аргинин (0,01 %-й раствор). 3) Гидроксид натрия (10 %-й раствор). 4) α-Нафтол (0,2 %-й спиртовой раствор). 5) Гипобромит натрия (1 %-й раствор). 6) мочевина (40 %-й раствор).

### Ход работы

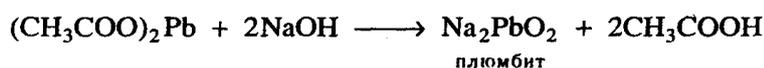
В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> раствора аргинина, добавляют 2 см<sup>3</sup> 10 %-го раствора NaOH, пять капель 0,2 %-го спиртового раствора α-Нафтола. Тщательно перемешивают содержимое пробирки и добавляют 0,5 см<sup>3</sup> раствора гипобромита натрия, перемешивают, появляется оранжево-красное окрашивание. Для стабилизации окраски сразу приливают 1 см<sup>3</sup> раствора мочевины.

### 9. Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фоля)

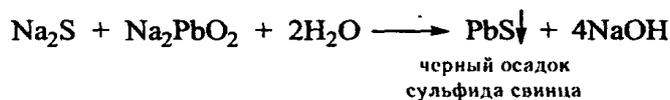
При добавлении к раствору белка реактива Фоля, состоящего из ацетата свинца и гидроксида натрия, и последующем кипячении раствор темнеет, наблюдается выпадение черного осадка. Это объясняется тем, что в состав белка входят аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистеин, цистин). Эти аминокислоты при нагревании в присутствии щелочи разрушаются, образуя сульфид натрия. Метионин этой реакции не дает, так как сера в данной аминокислоте прочно связана. Механизм реакции Фоля следующий:



2. Ацетат свинца реагирует со щелочью с образованием плюмбита натрия:



3. Сульфид натрия при взаимодействии с плюмбитом натрия образует черный осадок сульфида свинца:



**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Баня водяная. 3) Белок яичный (1 %-й раствор). 4) Желатин (1 %-й раствор). 5) Волос. 6) Реактив Фоля, включающий гидроксид натрия (30 %-й раствор) и ацетат свинца (5 %-й раствор).

Для приготовления *реактива Фоля* следует смешать равные объемы 5 %-го раствора Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> и 30 %-го раствора NaOH.

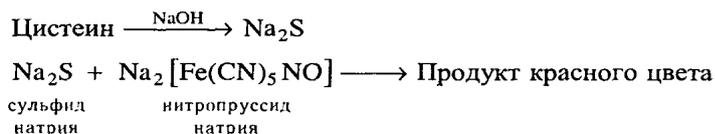
### Ход работы

Берут три пробирки. В первую наливают 0,5 см<sup>3</sup> раствора белка, во вторую - 0,5 см<sup>3</sup> желатина, в третью - помещают волос (желательно светлый). В каждую пробирку добавляют 0,5 см<sup>3</sup> свежеприготовленного реактива Фоля. Пробирки помещают на кипящую водяную 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 в желатине почти отсутствуют серосодержащие аминокислоты. Волос состоит из белков кератинов, содержащих аминокислоты со слабосвязанной 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.

### 10. Нитропруссидная реакция на серосодержащие аминокислоты

Если раствор белка прокипятить со щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропрусида натрия Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>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  $\text{Na}_2\text{S}$  дает продукт красного цвета:



**Оборудование, реактивы.** 1) Пробирки. 2) Белок яичный (1 %-й раствор). 3) Гидроксид натрия (20 %-й раствор). 4) Нитропруссид натрия (5 %-й раствор).

#### Ход работы

Наливают в пробирку  $0,5 \text{ см}^3$  1 %-го раствора белка, добавляют  $0,5 \text{ см}^3$  20 %-го раствора  $\text{NaOH}$ , 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.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА ФОТОКОЛОМЕТРИЧЕСКИМ БИУРЕТОВЫМ МАКРО- И МИКРОМЕТОДОМ

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА ФОТОКОЛОМЕТРИЧЕСКИМ БИУРЕТОВЫМ МАКРОМЕТОДОМ

Цель работы - определить содержание водорастворимого белка, полипептидов, олигопептидов в растворе или вытяжке из мышечной ткани различных животных организмов.

Метод основан на биуретовой реакции, которая является показателем наличия пептидных связей в соединении.

Диапазон определяемых концентраций белка 0,2...1,0%.

Фотоколориметрирование проводится при длине волны 540 нм, рабочая длина кюветы 1 см. Для концентрации белка меньше 0,2% применяется фотоколориметрический биуретовый микрометод, где используется модифицированный биуретовый реактив Бенедикта.

Оборудование, реактивы:

Фотоколориметр; кюветы; раствор белка сывороточного альбумина стандартный (1%-й); водные вытяжки из мышечной ткани; реактив биуретовый.

Для приготовления биуретового реактива 0,15 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 0,6 г  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (виннокислый калий или сегнетова соль) растворяют в 50 мл  $\text{H}_2\text{O}$  при энергичном перемешивании, приливают 30 мл 10%-го раствора  $\text{NaOH}$ , добавляют 0,1 г  $\text{KJ}$ , раствор доводят водой до 100 мл.

Порядок выполнения работы:

В чистую пробирку помещают 1 мл раствора водорастворимого белка неизвестной концентрации или вытяжки, добавляют 4 мл 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 (Д) с калибровочным графиком, определяют неизвестную концентрацию раствора белка, делают выводы.

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО БЕЛКА ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ БИУРЕТОВЫМ МИКРОМЕТОДОМ (С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКТИВА БЕНЕДИКТА)

**Ц е л ь р а б о т ы** - 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/л (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:

Фотоколориметр; кюветы; раствор белка (сывороточный альбумина) стандартный (с = 2 г/л); 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; для получения раствора 2 растворяют в 10 мл воды 1,73 г медного купороса. Раствор 2 добавляют в раствор 1 и доводят теплой водой до 100 мл.

Порядок выполнения работы:

Помещают в пробирку 2 мл раствора исследуемого белка, добавляют 2 мл 6%-й раствора NaOH и 0,2 мл 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. Построение калибровочного графика проводится по указанию преподавателя.

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3** **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 сине-зеленых 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:

Фотоколориметр; 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  $\text{CuSO}_4$  в 1%-м растворе виннокислого натрия или калия  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  в 25 мл воды. Растворы смешивают.

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

Приготовление реактива Фолина-Чокальтеу (фенольного реактива):

в круглодонную колбу на 1,5-2 л вносят 100 г вольфрама натрия  $\text{NaW}_{04}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и 25 г молибдата натрия  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,

растворяют все в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-го раствора ортофосфорной кислоты  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и 100 мл концентрированной  $\text{HCl}$ .

К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, далее прибавляют 150 г  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 мл воды, 3-4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин под тягой для удаления избытка брома.

Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой, фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Реактив следует хранить в темной склянке, перед употреблением разбавить дистиллированной водой 1:1. Определяют кислотность полученного реактива: разводят 10 раз и титруют 0,1 н раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Полученный реактив должен быть 0,1 н.

Порядок выполнения работы:

Помещают в пробирку 0,4 мл раствора белка, добавляют 2 см реактива С.

Через 10 мин добавляют 0,2 мл 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.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ВЫСАЛИВАНИЕ, ДЕНАТУРАЦИЯ, ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ. ГИДРОЛИЗ.

**Цель работы** - изучить процесс обратимого осаждения (высаливания) белков, денатурацию белков, влияние физических и химических денатурирующих факторов на денатурацию белков, 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 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Mg SO}_4$  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 образуют лиотропные ряды - ряды Гофмейстера.

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



Лиотропный ряд для катионов:  $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Cs^+ > Pb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$

Практически для высаливания часто используют NaCl,  $(NH_4)_2SO_4$ , Mg SO<sub>4</sub>.

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  $(NH_4)_2SO_4$  до полного насыщения раствора, так как альбумины хорошо растворяются в воде и осаждаются при 100%-м насыщении раствора  $(NH_4)_2SO_4$ ; полное насыщение реализуется, когда очередная порция  $(NH_4)_2SO_4$  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  $(NH_4)_2SO_4$  и воду в количествах, указанных в табл. 2.

Таблица 2

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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ;  $\text{HNO}_3$ );
- катионы тяжелых металлов и анионы иода, тиоцианата;
- органические растворители (низшие спирты, этиленгликоль, диоксан, диметилсульфоксид);
- трихлоруксусная кислота;
- сульфосалициловая кислота;
- таннин;
- мочевины и другие амиды (формамид, гуанидинхлорид).

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

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 большей 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  $\text{CuSO}_4$  (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  $\text{CuSO}_4$ , во вторую – 1 мл раствора  $\text{CuSO}_4$ . 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  $\text{HNO}_3$ , осадок растворяется. Качественная реакция с  $\text{HNO}_3$  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  $45^\circ$ , наслаивают 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  $45^\circ$ , 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.

#### 2.2. 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.

#### 2.3. 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.

#### 2.4. Осаждение белка при высоких температурах.

Тепловая денатурация – денатурация белков при высоких температурах.

Белки термолабильны, денатурация в основном происходит при температуре выше 70<sup>0</sup> С. 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 сильнокислой 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 –NH<sub>2</sub>- 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. 3).

Таблица 3

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

В ИЭТ белок является наименее устойчивым. Электронейтральные молекулы легко сближаются, склеиваются, коагулируют, выпадают в осадок.

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 рН 10-12 (рН > 7), для белков с кислотными свойствами ИЭТ – при рН < 7.

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

Изоионной точке соответствует такое значение рН, 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  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,1 н и 0,01 н растворы).

Порядок выполнения работы:

Берут восемь пробирок, в каждую из них вносят молоко (раствор казеина), раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в соотношениях, указанных в табл. 4 (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 4

Номер пробирки	Объем, мл				рН	Степень помутнения
	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (0,01 н)	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (0,1 н)	$\text{H}_2\text{O}$	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.

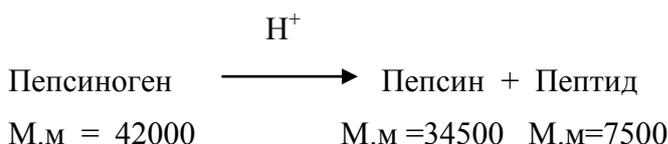
Ферментативный гидролиз белков протекает с участием протеолитических ферментов. Для оценки скорости ферментативного гидролиза белков используют метод формольного титрования, позволяющий одновременно оценить и активность ферментов.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5

### ФЕРМЕНТЫ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ОТДЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

#### 1. Обнаружение действия пепсина.

Пепсин является гидролазой. Пепсин - протеолитический пищеварительный фермент. Пепсин катализирует протеолиз, разрывает пептидные связи белковых молекул по месту присоединения фенилаланина и тирозина. Пепсин является ферментом желудка, вырабатывается обкладочными клетками слизистой желудка, входит в состав желудочного сока. Профермент пепсина - пепсиноген, активатор - соляная кислота (ионы водорода). Оптимум pH для пепсина 1,5-2,5. Превращение пепсиногена в пепсин происходит при  $\text{pH} < 5$ . Данная реакция является автокаталитической, сам пепсин активирует превращение зимогена в фермент:



В процессе активации происходит отщепление пептида с молекулярной массой 7500. Пепсин - фосфопротеид, его молекула содержит 321 аминокислоту, причем преобладают дикарбоновые аминокислоты, такие, как глутаминовая и аспарагиновая. Молекулярная масса пепсина 34500.

Пепсин устойчив до  $\text{pH} = 5,5$ , при  $\text{pH} > 6,5$  пепсин инактивируется. Пепсин проявляет створаживающую активность, например створаживает молоко при  $\text{pH} = 5,5$ . Под действием пепсина казеин (белок молока) образует с кальцием молока нерастворимую соль, коагулирует.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; баня водяная; сок желудочный (или раствор пепсина); молоко; карбонат кальция ( $\text{CaCO}_3$ ).

Порядок выполнения работы:

В три пробирки наливают по 1 мл 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 ( $\text{CaCO}_3$ ) по лакмусу.

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

## 2. Открытие действия каталазы.

Каталаза - фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. Каталаза - металлопротеид, содержащий железо. Каталаза разлагает пероксид водорода на кислород и воду:



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  $5 \cdot 10^6$  молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  на  $\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Оборудование и реактивы:

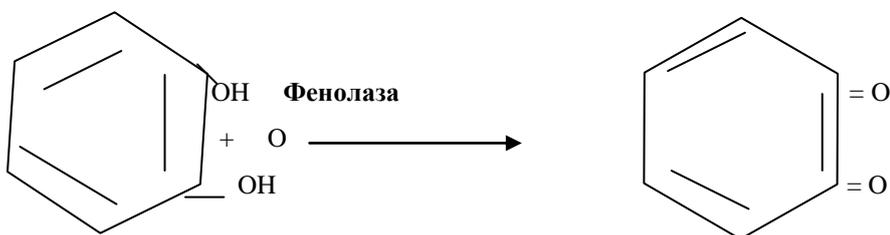
Пробирки; пероксид водорода (1%-й раствор, свежеприготовленный); раствор каталазы.

Порядок выполнения работы:

В две пробирки наливают по 1 мл 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 водорода, во второй пробирке с инактивированным энзимом изменений нет.

Качественная реакция на фенолоксидазу (фенолазу):

Фенолоксидазы (фенолазы) - ферменты, катализирующие окисление фенолов и полифенолов с участием кислорода как акцептора водорода. Фенолаза - хромопротеид, содержащий медь. Фенолаза является ферментом растительных тканей, особенно характерна для картофеля. При действии фенолоксидазы на пирокатехин (полифенол) образуется ортобензохинон - продукт окисления синего цвета:



Пирокатехин  
Ортобензохинон

Оборудование, реактивы:

Пирокатехин; смола, содержащая пирокатехин; картофель.

Порядок выполнения работы:

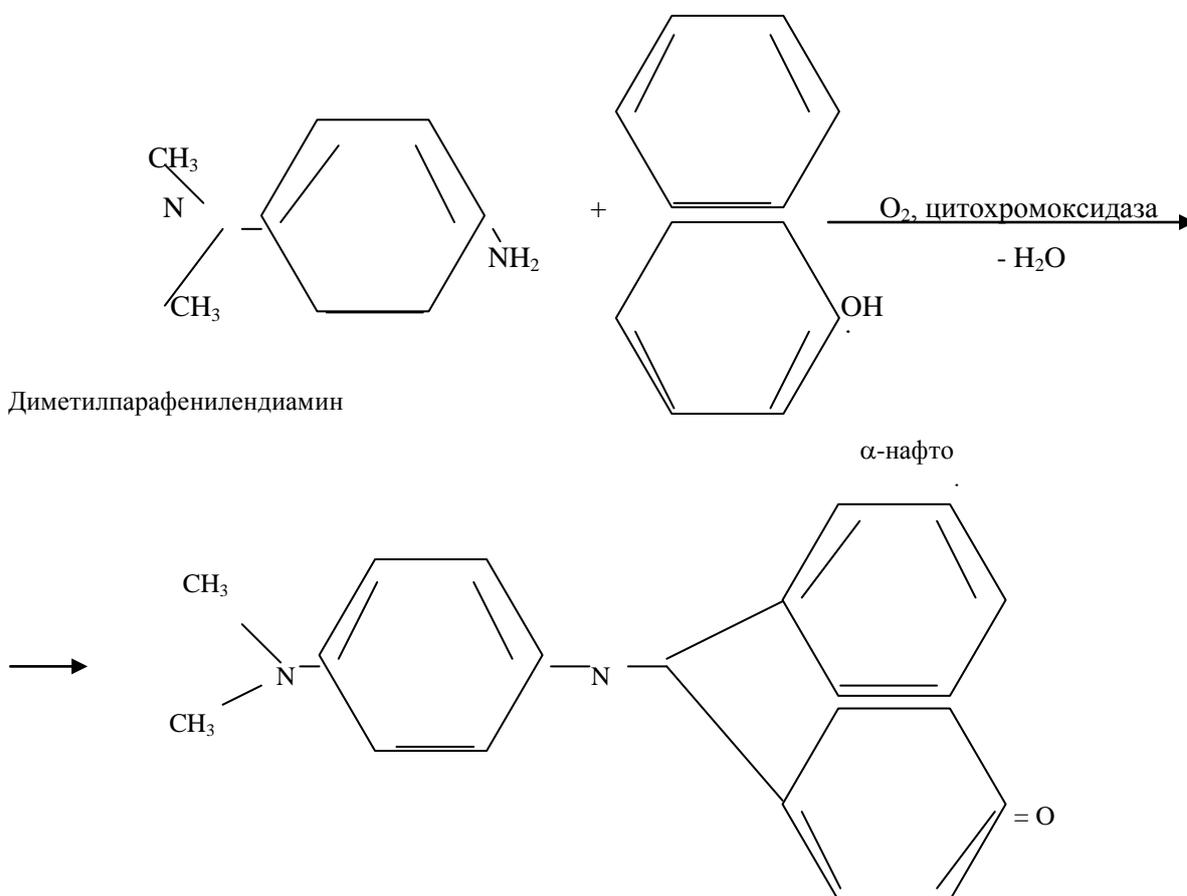
На разрез сырого или вареного картофеля нанести 1-2 капли раствора пирокатехина или гваяковой смолы, содержащей пирокатехин. Наблюдается появление синей окраски.

### 3. Обнаружение цитохромоксидазы в мышечной ткани:

Цитохромоксидаза ( $a_3$ ) - компонент дыхательной цепи. Является геминным дыхательным ферментом. Белковый компонент цитохромоксидазы содержит медь.

Для обнаружения цитохромоксидазы используют реакцию окисления аминов и фенолов (парафенилендиамин, гидрохинон, диметилпарафенилендиамина) кислородом в присутствии данного фермента.

Реактив «Нади» (щелочной раствор  $\alpha$ -нафтола и диметилпарафенилендиамина) легко окисляется с образованием индофенолового голубого:



## Индофеноловый голубой

Оборудование, реактивы:

Пипетки; колбы; воронки; марля; фильтры бумажные; баня водяная; пробирки; реактив «Нади».

Название «Нади» образовано из первых двух букв слов - нафтол, диамин.

Реактив «Нади» - смесь 1%-го раствора  $\alpha$ -нафтола и 1%-го раствора парафенилендиамина.

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.

### 4.Открытие амилазы в слюне.

Под влиянием фермента слюны  $\alpha$ -амилазы крахмал расщепляется до дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через целый ряд промежуточных продуктов, называемых декстринами, дающими с раствором йода различное окрашивание. Расщепляется крахмал по следующей схеме:



Декстрины, близкие к крахмалу (амилодекстрины), дают синее окрашивание с йодом, эритродекстрины - коричневое, ахродекстрины и мальтоза не окрашиваются.

В пробирку наливают 5-10 мл 1%-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10-20 раз слюны. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на водяную баню с температурой 37-40 °С. Затем через 2-3 мин стеклянной палочкой отбирают 1-2 капли раствора крахмала и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость, взятая из пробирки, будет давать с йодом синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться с йодом в темно-коричневый, коричневый и, наконец, окажутся бесцветными.

Наличие слабого желтого окрашивания при этом обусловлено цветом прибавляемого раствора йода.

### 5. Открытие пероксидазы в картофеле.

Пероксидаза широко распространена в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных клетках. В животных организмах он встречается преимущественно в крови, мышцах, молоке (реакцией на пероксидазу в молочной промышленности контролируют эффективность пастеризации молока). Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов в присутствии перекисей (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамида и других).

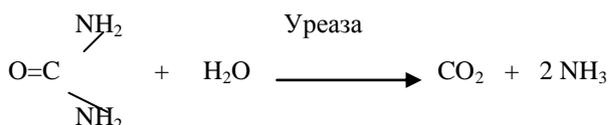
При окислении гваякола пероксидазой картофеля образуется продукт коричневого цвета.

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

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

### 6. 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.

В пробирку наливают 5 мл 2%-го раствора мочевины и добавляют около

1 г соевой муки. Пробирку выдерживают 5-10 мин в водяной бане с температурой 37-40 °С. Выделившийся аммиак определяют по запаху или по посинению красной лакмусовой бумажки, предварительно смоченной дистиллированной водой.

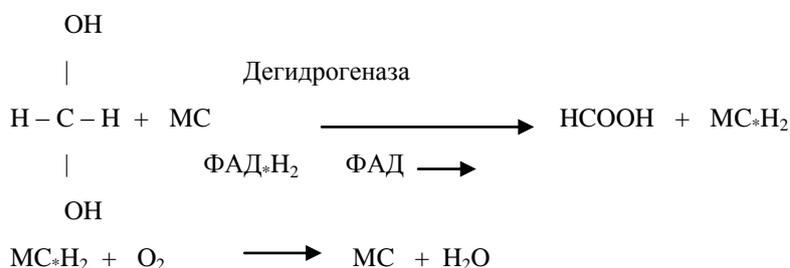
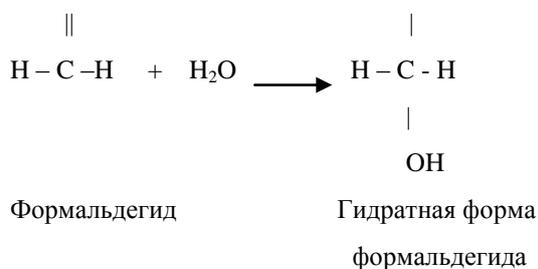
### 7. Открытие ксантиноксидазы в сыром молоке.

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.

Наливают в пробирку около 5 мл свежего молока, 1 мл 1,5%-го раствора формальдегида, 4 капли 0,02%-го раствора метиленовой сини. Смесь взбалтывают и ставят в водяную баню с температурой 37-40 °С. Через некоторое время молоко обесцвечивается вследствие переноса водорода ферментом дегидрогеназой от формальдегида на метиленовую синь (образуется неокрашенная восстановленная форма метиленовой сини). Формальдегид при этом окисляется в муравьиную кислоту. После обесцвечивания молока пробирку вынимают из бани и сильно взбалтывают, появляется вновь синее окрашивание. Последнее объясняется передачей водорода от метиленовой сини к кислороду воздуха.

Реакции можно изобразить в следующем виде:





В пробе с кипяченым молоком обесцвечивания метиленовой сини не происходит.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ. ВЛИЯНИЕ pH, ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ 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-Гофа. 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. 5).

Таблица 5

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
$\alpha$ -Амилаза (панкреатическая)	6,7-7,2	Крахмал

Оборудование, реактивы:

Термостат; пробирки; баня водяная; крахмал (1%-й раствор); кислота соляная (0,1 н раствор); раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия).

Порядок выполнения работы:

Ферментом, расщепляющим крахмал, является амилаза (фермент слюны). Оптимум pH для амилазы 6,9-7,0.

Гидролиз крахмала под действием амилазы проходит следующие стадии образования декстринов:



В три пробирки наливают по 5 сл свежеприготовленного 1%-го раствора крахмала. В пробирки 1 и 2 добавляют по 1 мл воды, в пробирку 3 - 1 мл 0,1 н раствора соляной кислоты (происходит сдвиг pH в кислую область). В пробирки 1 и 3 добавляют по 1 мл разбавленной слюны (активной амилазы), в пробирку 2 - 1 мл прокипяченной слюны. Содержимое пробирок перемешивают, ставят пробирки в термостат при температуре 37 °C на 10 мин. Пробирки охлаждают и добавляют в каждую по две капли раствора Люголя.

Делают выводы о зависимости активности амилазы от pH и температуры (по глубине гидролиза крахмала, окраске продукта 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:

Пробирки; термостат; крахмал (1%-й раствор); молоко; пепсин; раствор Люголя (раствор йода в йодиде калия).

Порядок выполнения работы:

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

В первую и третью пробирки вносят по 1 мл разбавленной слюны, содержащей активный фермент амилазу, во вторую и четвертую пробирки - по 1 мл пепсина. 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 (табл. 6). 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 6

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 Активация и ингибирование.

Активация ферментов - повышение активности ферментов. Активаторы - вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции (табл. 7). Ингибирование - понижение активности ферментов. Ингибиторы - соединения, инактивирующие энзимы. Самоактивация - превращение профермента в активный фермент. К активаторам относятся ионы натрия, калия, магния; к ингибиторам - ионы тяжелых металлов (меди, ртути, свинца).

Таблица 7

Фермент	Активатор
Амилаза	Cl <sup>-</sup>
Пепсин	H <sup>+</sup>
Гастрин	H <sup>+</sup>
Трипсин	Энтерокиназа, трипсин
Химотрипсин	Трипсин

Оборудование, реактивы:

Пробирки; пипетки; крахмал (1%-й); хлорид натрия (1%-й раствор); сульфат меди (1%-й раствор); раствор Люголя (J<sub>2</sub> и KJ); слюна, разведенная 1:5.

Порядок выполнения работы:

Для изучения процессов активации и ингибирования ферментов используют хлорид натрия и сульфат меди, NaCl является активатором  $\alpha$ -амилазы слюны, сульфат меди - ингибитором.

Берут три пробирки. Наливают в пробирки реактивы в соотношениях, указанных в табл. 8, перемешивают и оставляют на 5 мин.

Таблица 8

Номер Пробирки	Объем, мл				
	вода	NaCl	CuSO <sub>4</sub>	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 J<sub>2</sub> и KJ. Наблюдается изменение окраски. Опыт повторяют еще два раза - продолжительность действия  $\alpha$ -амилазы 10 мин, 15 мин (табл. 9).

Таблица 9

Номер опыта	Время действия $\alpha$ -амилазы, мин	Результаты (окраска)		
		NaCl	H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub>
1	5	Желтая или красная	Красная	Синяя
2	10	Желтая или красная	Красная	Синяя
3	15	Желтая	Красная	Синяя

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА ПО МЕТОДУ ПЯТНИЦКОГО. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА ПО МЕТОДУ ПЯТНИЦКОГО

Ц е л ь р а б о т ы - количественно определить активность пепсина.

Метод Пятницкого - экспресс-метод. В основе метода лежит способность пепсина створаживать белок молока казеиноген. Створаживание молочно-ацетатной смеси пепсином при  $pH = 4,9$  и температуре  $25^{\circ}C$  происходит пропорционально его способности переваривать белок. За единицу активности пепсина принимают количество пепсина (мг), которое при  $pH = 4,9-5,0$  и температуре  $25^{\circ}C$  створаживает 5 мл молочно-ацетатной смеси (данная единица соответствует 0,010 мг кристаллического пепсина). Желудочный сок человека в норме содержит в 1 мл 40-60 единиц пепсина, т.е. в 1 мл желудочного сока содержится 0,4-0,6 мг пепсина.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; секундомер; баня водяная; 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  $\frac{1}{2}$  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 мл 0,2 н раствора  $CH_3COONa$  и 520 мл 0,2 н раствора  $CH_3COOH$ , проверяют  $pH$  буфера

( $pH = 4,8-4,9$ ).

Порядок выполнения работы:

В одну пробирку помещают 0,1 мл желудочного сока, в другую - 5 мл молочно-ацетатной смеси. Обе пробирки помещают в водяную баню, нагретую до  $25^{\circ}C$  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: 
$$K = \frac{60 \cdot 10}{t}$$

где  $K$  - число единиц активности пепсина в 1 мл желудочного сока;  $t$  - время створаживания, с.

$m = K \cdot 0,01$ ,

где  $m$  - количество пепсина, соответствующее  $K$  единицам активности, мг в 1 мл сока.

П р и м е р 1. Провести анализ желудочного сока, если створаживание 5 мл молочно-ацетатной смеси при добавлении 0,1 мл сока произошло за 15 с.

Определяем, сколько единиц активности пепсина в 0,1 мл желудочного сока: K<sub>1</sub>  
=  $\frac{60}{15} = 4$  единицы активности в 0,1 мл желудочного сока.

Определяем количество единиц активности в 1 мл сока:

$K_2 = 4 \cdot 10 = 40$  единиц активности в 1 мл желудочного сока.

Определяем массу пепсина в 1 мл сока:

$M(\text{пепсина}) = K \cdot 0,01 = 40 \cdot 0,01 = 0,4$  мг пепсина в 1 мл желудочного сока.

Активность пепсина соответствует норме.

**П р и м е р 2.** Провести анализ препарата пепсина, если исследуемый

0,1 %-й раствор препарата пепсина, взятый в количестве 0,1 мл, произвел створаживание 5 мл молока через 40с.

Одна единица (0,01 мг) створаживает 5 мл молока за 60 с, K единиц или

X мг - за 40 с.

$$\frac{X}{0,01} = \frac{60}{40}$$

$$X_1 = \frac{0,01 \cdot 60}{40} = 0,015 \text{ мг в } 0,1 \text{ мл}$$

$$\text{или } K_1 = \frac{60}{40} = 1,5 \text{ единиц активности в } 0,1 \text{ мл.}$$

В 1,00 мл раствора препарата:

$$K_2 = 1,5 \cdot 10,0 = 15,0 \text{ ед. активности пепсина или } X_2 = 0,015 \cdot 10,0 = 0,15 \text{ мг пепсина в } 1 \text{ мл.}$$

## **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА**

**Ц е л ь р а б о т ы** - определить активность трипсина формольным титрованием.

Активность трипсина определяют по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируется с ферментом.

Оборудование, реактивы:

Колбы конические; пипетки мерные; бюретки; термостат; раствор казеина; раствор трипсина; гидроксид натрия (0,1 н раствор); фенолфталеин; формалин (нейтрализованный раствор формальдегида).

Порядок выполнения работы:

В колбу помещают 50 мл раствора казеина, ставят в термостат при температуре 35...37 °С (оптимальной температуре для проявления максимальной активности фермента). Через 15 мин прибавляют 2 мл раствора трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора для определения аминного азота, далее проводят отбор проб по 10 мл через 30, 60, 90, 120 мин (табл. 11).

Для определения аминного азота к 10 мл каждой пробы (всего пять проб) прибавляют 5-6 капель раствора фенолфталеина и нейтрализуют 0,1 н раствором NaOH до слабо-розового

окрашивания. Далее к пробе прибавляют 2 мл формалина и снова титруют 0,1 н раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски раствора.

Обработка результатов:

Содержание аминного азота в 1 мл каждой из пяти проб определяют по формуле:  $m(N) = \frac{1,4 \cdot v(\text{NaOH})}{v(\text{пробы})}$ ,

где  $v(\text{NaOH})$  – объем NaOH, пошедший на титрование 10 мл каждого раствора, мл;  $v(\text{пробы})$  – объем пробы, взятый для титрования 10 мл; 1,4 – масса N, эквивалентная 1 мл 0,1 н раствора раствора NaOH, мг.

Таблица 11

Номер пробы	t, мин	v(NaOH), мл	m(N), мг/мл
1	0		
2	30		
3	60		
4	90		
5	120		

Строят график зависимости  $m(N) = t$ , откладывая по оси ординат для пяти проб содержание аминного азота (мг/мл), по оси абсцисс - t (мин).

Активность трипсина (мг/мл мин) рассчитывают по формуле:

$$A(\text{трипсина}) = \frac{m(N)_n - m(N)_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

где A - активность трипсина;  $m(N)$  - содержание аминного азота, мг/мл;  
t - время отбора пробы, мин; n = 1-5 - номер пробы.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МЕТОДОМ ВОЛЬГЕМУТА.

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ МЕТОДОМ 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 мл 0,1%-го раствора крахмала за 30 мин при температуре 36 °С. Данное минимальное количество фермента принимают за единицу амилазной активности.

Амилазная активность слюны (амилокластическая сила слюны - А) выражается количеством мл 0,1%-го раствора крахмала, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при температуре 38 °С в течение 30 мин,

$$A = \frac{V(\text{крахмала})}{V(\text{слюны})}$$

В норме амилазная активность слюны ( $A_{30}^{38}$ ) равна 160-320 мл.

Оборудование, реактивы:

Пробирки; термостат; раствор крахмала (0,1%-й); слюна (1%-й раствор); вода дистиллированная; хлористый натрий (0,1%-й раствор).

Порядок выполнения работы:

Готовят два набора по шесть пробирок. В каждую пробирку одного набора вносят по 1 мл 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 мл воды, во все пробирки второго набора - по 1 мл 0,1%-го раствора NaCl (NaCl - активатор амилазы). Во все пробирки добавляют по 2 мл 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. Результатом работы по определению амилазной активности фиксируют в форме табл. 12. Заполняют таблицу. Синяя окраска свидетельствует о том, что расщепления крахмала нет, желтая -

о максимальной активности амилазы.

Таблица 12

Показатель	Н о м е р п р о б и р к и						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:

$$A = V_{\text{кп}} \cdot P,$$

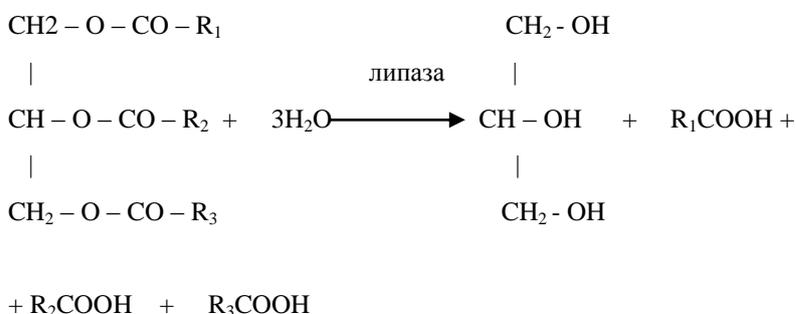
где P - максимальное разведение слюны, при котором начинается гидролиз;  $V_{\text{кп}}$  - объем 1%-го раствора крахмала,  $V_{\text{кп}} = 2$  мл;

A - амилазная активность исследуемой слюны.

Полученное значение амилазной активности сравнивают с амилазной активностью в норме, делают выводы.

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

Липаза относится к липолитическим ферментам, является гидролазой, катализирует липолиз. Липолиз - гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты.



К пищеварительным липолитическим ферментам относятся липаза желудка,

которая катализирует гидролиз жиров молока, и липаза тонкого кишечника. Основной гидролиз жиров происходит именно в тонком кишечнике. Активатором липазы являются желчные кислоты, оптимум pH для фермента - 7...8.

Тканевая липаза контролирует гидролиз тканевых жиров, участвует в автолизе жировой ткани. Тканевые липазы активны при низких температурах.

Для определения липолитической активности липазы используют метод количественного определения свободных жирных кислот, образующихся в результате гидролиза нейтральных жиров. Жирные кислоты оттитровывают щелочью и по объему щелочи, идущей на титрование жирных кислот, определяют активность липазы.

Оборудование, реактивы:

Установка для титрования; термостат; молоко; липаза; гидроксид натрия (0,1 и 0,01 н растворы); фенолфталеин.

Порядок выполнения работы:

В колбу вносят 50 мл молока, прибавляют 3-5 капель фенолфталеина, нейтрализуют 0,1 н раствором NaOH до слегка розового окрашивания.

Реакционную смесь выдерживают в термостате при температуре 37...40 °C в течение 5 мин. Затем добавляют 3 мл

раствора липазы, перемешивают, замечают начальное время. Сразу в начале гидролиза отбирают 5 мл смеси, титруют 0,01 н раствором NaOH, последующие пробы по 5 мл для титрования отбирают через 5, 15, 30, 60, 120 мин.

На основании полученных результатов строят зависимость  $v(\text{NaOH}) = t$ .

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 ЛИПИДЫ. КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО, ЧИСЛО ОМЫЛЕНИЯ, ЭФИРНОЕ ЧИСЛО. ЛИПИДЫ. ИОДНОЕ ЧИСЛО. ПЕРОКСИДНОЕ ЧИСЛО. АЛЬДЕГИДНОЕ 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 мл с притертой пробкой наливают 100 мл 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 жира 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.

Проведение анализа

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.

Проведение анализа

Перед анализом жир, помещенный в химический стакан, осторожно нагревают на водяной бане до температуры 60...70 °С (медицинский рыбий жир должен иметь температуру 5 °С). В цилиндр переносят 100 мл 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.

Проведение анализа

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.1.

Таблица 1

Цвет жира	Относительная оптическая Плотность, $D_1$ , о.е.
Светло-желтый	До 0,6
Желтый	0,6-0,8
Темно-желтый (светло-коричн.)	Свыше 0,8 до 2,0
Коричневый	Свыше 2,0 до 3,0
Темно-коричневый	Свыше 3,0

## 2.2. Определение относительной плотности жира пикнометром.

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

Оборудование, материалы, реактивы:

Пикнометры стеклянные; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до 200 °С; весы аналитические; баня водяная; пипетки; бумага фильтровальная; вода дистиллированная.

Проведение анализа

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.

$$\text{Относительную плотность жира } \rho_{20}^{20} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m},$$

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 упрощенным методом.

Сухой чистый цилиндр емкостью 5-10 мл 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.

$$\text{Плотность } D \text{ определяют по формуле: } D = \frac{M_2 - M_1}{U},$$

где  $M_2$  - масса цилиндра с жиром;

$M_1$  - масса пустого цилиндра;

$U$  - объем жира.

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.

Проведение анализа

После тщательного перемешивания пробы отбирают 100 мл жира, вносят его в стеклянный мерный цилиндр вместимостью 100 мл и оставляют на 24 часа, 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.

##### Проведение анализа

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.

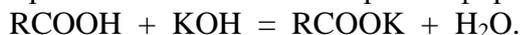
#### 3.1. Определение кислотного числа жиров.

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

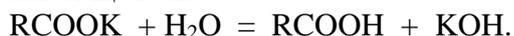
Ферментативный гидролиз жиров протекает с участием липазы. Процесс гидролиза обратим. Для оценки степени гидролиза и количества свободных жирных кислот определяют кислотное число. *Кислотное число* - это количество миллиграммов КОН, идущее на нейтрализацию всех свободных жирных кислот, которые содержатся в 1 г жира. Чем больше кислотное число, тем выше содержание свободных жирных кислот, 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 KOH 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 мл помещают 2-10 г пищевого жира, добавляют 30-50 мл 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 мл 1%-го спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором гидроксида калия до появления слабо-розового окрашивания.

Расчетная формула:

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

$$X = 5,61Kv / m$$

m

где v - объем 0,1 н раствора гидроксида калия, израсходованного на титрование, мл; K - коэффициент пересчета на точный 0,1 н раствор гидроксида калия; m - масса исследуемого жира, г; 5,61 - количество гидроксида калия, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора гидроксида калия, мг.

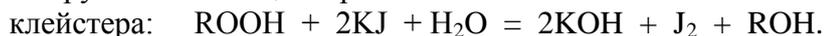
За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

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

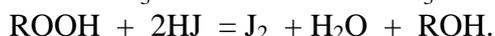
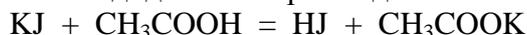
### 3.2. Определение пероксидного числа жиров.

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

Пероксидное число определяется количеством граммов йода, выделенным из йодида калия в присутствии ледяной уксусной кислоты, выделяя из него J<sub>2</sub>; образование свободного йода фиксируется с помощью крахмального



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

Расчетная формула: 
$$X = \frac{(v - v_1)K \cdot 0,001269 \cdot 100}{m}$$

где X - пероксидное число,%; v - объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование в опыте с навеской жира, мл; v<sub>1</sub> – объем 0,01 н раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование

в контрольной пробе, мл; 0,001269 - масса йода, соответствующая 1 мл 0,01 н раствора тиосульфата натрия, г; m – масса навески жира, г; K – коэффициент пересчета на точный 0,01 н раствор тиосульфата натрия.

### 3.3. 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. 2).

Таблица 2

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

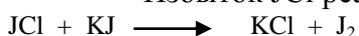
Изменение йодного числа свидетельствует о том, что в период интенсивного нагула в организме рыб откладываются липиды, содержащие наибольшее количество ненасыщенных жирных кислот.

При одинаковой упитанности липиды рыб младшего возраста содержат наибольшее 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 JCl реагирует с KJ с выделением йода:



Методом обратного титрования выделившегося йода раствором тиосульфата натрия устанавливают содержание  $J_2$ , вступившего в реакцию с жиром.

Оборудование, реактивы, материалы:

Установки для титрования; колбы емкостью 200 мл; 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

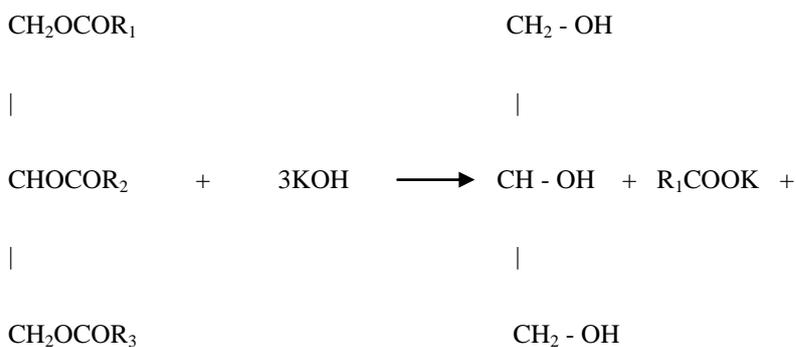
В колбу емкостью 200 мл помещают 0,12 г пищевого жира. Для растворения жира в колбу добавляют 3 мл этилового эфира, свободного от перекисей, и 25 мл 0,2 н солянокислого раствора хлористого йода. После пере-мешивания в колбу помещают на 10-15 мин в темное место. Затем приливают 10 мл 10%-го раствора йодида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

Расчетная формула: 
$$X = \frac{(v - v_1)K \cdot 0,01269 \cdot 100}{m}$$

где X - йодное число, г на 100 г жира; v - объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного в контрольном опыте, мл;  $v_1$  - объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованного в рабочем опыте, мл; 0,01269 - масса йода, соответствующая 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата натрия, г; m - масса навески жира, г; K - коэффициент пересчета на точный 0,1 н раствор тиосульфата натрия.

### 3.4. Определение числа омыления.

Число омыления - это количество миллиграммов KOH, необходимое для нейтрализации всех свободных и связанных кислот, содержащихся в 1 г жира:



связанные жирные кислоты



Свободные жирные кислоты

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, материалы:

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 мл 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 мл 1%-го раствора фенолфталеина (при анализе темно-окрашенных жиров 0,5 мл 2%-го раствора алкалиблау) и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до нейтральной реакции. Параллельно проводят контрольный анализ без навески жира.

$$\text{Расчетная формула: } X = \frac{28,055 K (v - v_1)}{m}$$

где X - число омыления исследуемого жира, мг КОН на 1 г жира;

v - объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование раствора в контрольном анализе, мл; v<sub>1</sub> - объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование раствора в рабочем анализе, мл; K - коэффициент пересчета на точный 0,5 н раствор соляной

кислоты;  $m$  - навеска жира, г; 28,055 - количество гидроксида калия, соответствующее 1 мл 0,5 н раствора соляной кислоты, мг.

### 3.5. 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 ( $\beta$ -фенилакролеин  $C_6H_5CH=CHCHO$ ). Альдегидное число выражается в миллиграммах коричневого альдегида на 100 г жира (или в %-х коричневого альдегида). Альдегидное число характеризует окислительную порчу жиров.

Оборудование, реактивы, материалы:

Фотоэлектроколориметр; кюветы; весы аналитические; колбы мерные емкостью 25 мл; 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 мл, 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 к колбу емкостью 25 мл помещают 10 мл спиртохлороформного раствора препарата, прибавляют 1 мл 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, обусловленная окраской, которая развивается в результате взаимодействия альдегидов с бензидином, равна:

$$D = D_1 \cdot 1,1 - D_1,$$

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

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

Расчетные формулы:

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

$$X = cv \cdot 100,$$

мг

где  $c$  - содержание коричневого альдегида в 1 мл испытуемого образца, мг;

$v$  - объем спиртохлороформного раствора жира, взятого для анализа;

$m$  - навеска, г;  $n$  - толщина рабочего слоя кюветы, см.

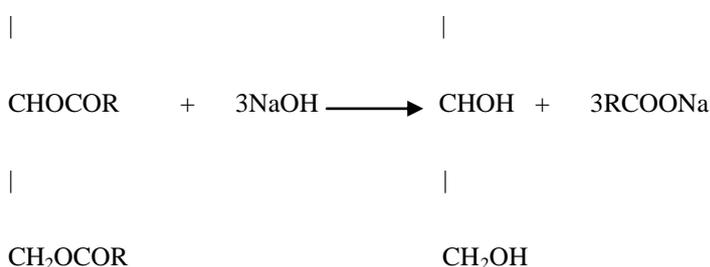
### 3.6. Расчет эфирного числа.

Эфирное число - это количество миллиграммов KOH, 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.

### 3.7. Определение числа 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. Число Рейхерта-Мейссля характеризует содержание в жире летучих нерастворимых в воде жирных кислот.

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 числа Рейхерта-Мейссля и Поленске ведут одновременно.

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

В колбу на 300 мл отвешивают 5 г профильтрованного жира, прибавляют 2 мл 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 мл дистиллированной воды, нагретой до 90 °С. Жидкость в колбе после прибавления воды должна быть прозрачной.

В колбу опускают несколько кусочков пемзы, приливают 50 мл раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> разводят водой до 1 л),

быстро соединяют колбу с холодильником, подставив для собирания дистиллята мерную колбу емкостью 110 мл. Перегонку ведут, регулируя пламя горелки так, чтобы 110 мл 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 мл. Фильтрат содержит летучие растворимые в воде жирные кислоты. Воронку с фильтром и колбу на 110 мл 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 миллилитров щелочи, пошедшее на титрование, умножают на 1,1 (так как для титрования было взято 100 мл фильтрата вместо отогнанных 110 мл) и получают количество летучих растворимых в воде жирных кислот в 5 г жира - число Рейхерта-Мейссля.

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

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10** **АНАЛИЗ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ. ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ**

**Ц е л ь р а б о т ы** - изучить свойства желчных кислот. проверить биологическую роль желчных кислот как эмульгаторов жиров.

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде и как парные соединения с гликоколом или таурином.

Гликокол и таурин связаны с желчными кислотами пептидными связями.

В желчи человека содержатся щелочные соли гликохолевой, гликодезоксихолевой, таурохолевой, тауродезоксихолевой и литохолевой кислот.

Желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами, принимают участие в эмульгировании и всасывании жиров, активизируют липолитические ферменты.

Холевая и дезоксихолевая кислоты близки по строению к холестерину и являются производными холановой кислоты.

Соли желчных кислот значительно уменьшают поверхностное натяжение. Эмульгирование жиров ускоряет процессы переваривания пищевых веществ, так как увеличивается поверхность соприкосновения жира с липазой поджелудочной железы. Подтверждением является эксперимент, в котором серный порошок, удерживающийся на поверхности воды, при добавлении эмульгатора тонет.

### **1. Понижение поверхностного натяжения воды**

Реактивы, оборудование, материалы:

Пробирки; жир; вода дистиллированная; гидроксид калия (1%-й раствор); белок яичный (1%-й раствор); карбонат натрия (1%-й раствор); желчь.

Порядок выполнения работы

В пять пробирок наливают по 2-3 мл дистиллированной воды.

В четыре пробирки добавляют по пять капель эмульгаторов: в первую - желчь, во вторую - раствор белка, в третью - раствор соды, в четвертую - раствор гидроксида калия. В пятую (контрольную) пробирку эмульгатора не добавляют.

Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием. Во все пробирки на поверхность жидкости насыпают небольшое количество серного порошка. Делают соответствующие выводы.

### **2. Качественные реакции на желчные кислоты**

Желчные кислоты обнаруживают реакцией Петтенкофера. При взаимодействии кислот с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием концентрированной серной кислоты, проявляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реактивы, оборудование, материалы:

Сахароза (20%-й раствор); кислота серная (конц.); желчь, предварительно разведенная в два раза; чашка Петри; палочки стеклянные.

Порядок выполнения работы

На сухую чашку Петри наносят 2 капли желчи, 2 капли 20%-го раствора сахарозы и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

Далее приливают 7 капель серной кислоты и снова перемешивают. Наблюдается появление красной окраски, которая при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

### 3. Эмульгирование жиров

Реактивы, оборудование, материалы:

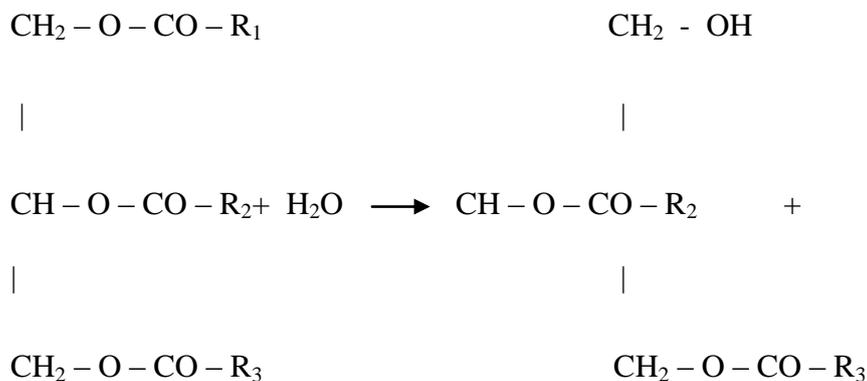
Пробирки; жир; желчь; белок (1%-й раствор); гидроксид калия (1%-й раствор); сода (1%-й раствор).

В пять пробирок помещают по пять капель расплавленного жира и 5 капель дистиллированной воды. В четыре пробирки добавляют по 5 капель эмульгаторов: в первую - желчь, во вторую - раствор белка, в третью - раствор едкого калия, в четвертую - раствор соды. В пятую (контрольную) пробирку эмульгатора не добавляют. Если жир твердый, все пробирки помещают в горячую водяную баню. Взбалтывают содержимое всех пробирок. В первых четырех пробирках наблюдается образование устойчивых эмульсий в присутствии эмульгаторов. В пятой пробе имеет место расслоение неустойчивой эмульсии, так как эмульгатор отсутствует.

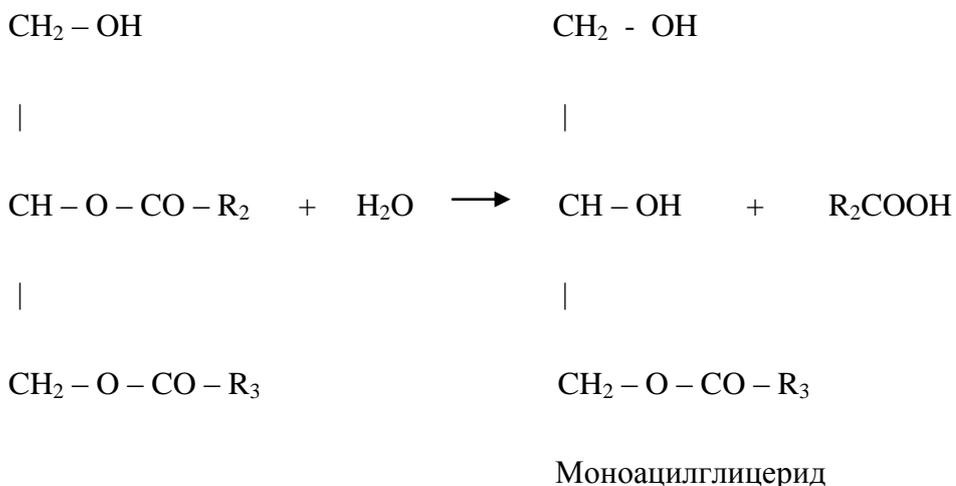
#### 1. Влияние липазы на гидролиз жиров (без и в присутствии эмульгатора)

Ферментом, расщепляющим жиры, является липаза панкреатического сока, активаторами липазы - соли желчных кислот, белки, ионы кальция. Оптимум pH для панкреатической липазы 7-9.

Жиры распадаются ступенчато:



Диацилглицерид



При исследовании влияния липазы на гидролиз в качестве субстрата используется молоко; эмульгированные жиры молока легко гидролизуются с образованием глицерина и свободных жирных кислот, в результате чего наблюдается сдвиг pH в кислую область.

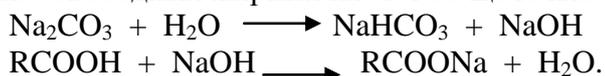
Реактивы, оборудование, материалы:

Пробирки; молоко; глицериновый экстракт поджелудочной железы, содержащий липазу; фенолфталеин (1%-й раствор); сода (10%-й раствор); термостат.

Порядок выполнения работы

В три пробирки наливают по 2-3 мл прокипяченного и охлажденного молока, добавляют в каждую по 1 капле фенолфталеина и для подщелачивания по 1-2 капле 10%-го раствора соды до слабо-розового окрашивания.

В первую пробирку приливают 1 мл препарата липазы, во вторую - 1 мл прокипяченного и охлажденного препарата, в третью - 1 мл препарата липазы + 5 капель желчи. Пробирки помещают на 30 мин в термостат при температуре 37 °С. В первой пробирке с активной липазой и в третьей с липазой и эмульгатором наблюдается ослабление или исчезновение розовой окраски в результате взаимодействия образующихся при гидролизе свободных жирных кислот со щелочью:



Во второй пробирке розовая окраска не исчезает, так как инактивированная липаза не гидролизует жиры молока.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11 УГЛЕВОДЫ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДЫ

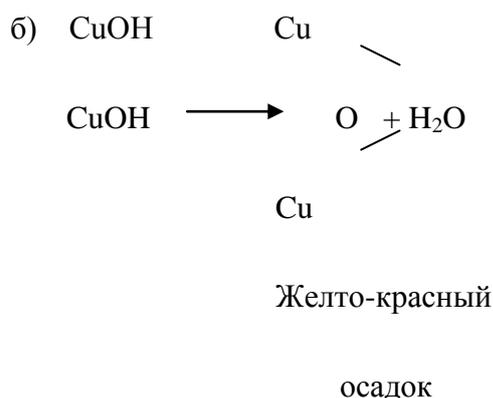
Ц е л ь р а б о т ы - провести качественный анализ углеводов.

### 1.Проба Троммера-Фелинга

Проба Троммера-Фелинга является качественной реакцией на глюкозу и представляет собой восстановление  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  глюкозой в присутствии щелочи до желто-красного осадка  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Для получения лучших результатов используют реактив Фелинга - раствор  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  в сегнетовой соли.

Фруктоза также может дать положительную пробу Троммера-Фелинга.

Основные реакции:



в) продуктами окисления глюкозы являются гликолевая и муравьиная кислоты.

Реактивы, оборудование, материалы:

Пробирки, пипетки; жидкость Фелинга; глюкоза (1%-й раствор).

Порядок выполнения работы

К 2 мл исследуемого раствора глюкозы добавляют 2 мл реактива Фелинга. Нагревают смесь до кипения. Образуется желто-осадок  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

1. Реакция Подобедова-Молиша

Углеводы под воздействием концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> образуют фурфурол. Фурфурол при взаимодействии с α-нафтолом образует соединение фиолетового цвета.

Реактивы, оборудование, материалы:

Пробирки; кислота серная (конц.); α-нафтол; раствор углеводов.

Порядок выполнения работы

В пробирку помещают 1 мл исследуемого раствора глюкозы, прибавляют 2 капли α-нафтола. По стенке пробирки приливают 1 мл концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. На границе двух жидкостей образуется кольцо красно-фиолетового цвета.

1. Качественная реакция на пентозы - образование фурфурола и конденсация его с анилином.

Реактивы, оборудование, материалы:

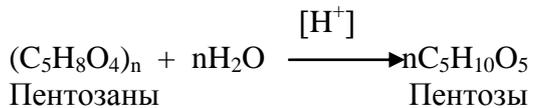
Пробирки; баня водяная; водоросли; опилки; кислота соляная (конц.); анилин; кислота уксусная (2 н раствор).

Порядок выполнения работы

В пробирку насыпать слой опилок высотой 15-20 см, смочить их приготовленной отдельно смесью концентрированной HCl и воды (1:1) и прокипятить. Смочить узкую полоску фильтровальной бумаги смесью 2 капель анилина и 4 капель 2 н CH<sub>3</sub>COOH. Опустить в пробирку с кипящей смесью. Фильтровальная бумага окрашивается в красный цвет.

Происходят следующие реакции:

а) содержащиеся в древесине пентозаны в кислой среде гидролизуются:



б) под действием кислоты при нагревании пентозы теряют три молекулы H<sub>2</sub>O и превращаются в фурфурол.

в) фурфурол с анилином дает красную окраску.

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, материалы:

Рыба; раствор Люголя.

## Порядок выполнения работы

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

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Количественное определение углеводов йодометрическим методом.

**Ц е л ь р а б о т ы** - определение содержания альдоз йодометрическим методом.

Йодометрический метод основан на окислении альдегидной группы углеводов йодом в щелочной среде. Альдозы окисляются в кислоты, например: глюкоза - в глюкуроновую кислоту, лактоза - в лактобионовую.

Кетоны в щелочном растворе не взаимодействуют с йодом, что дает возможность определить альдозы в присутствии кетоз. Йодометрический метод не обнаруживает нередуцирующие сахара.

Реактивы, оборудование, материалы:

Йод (0,1 н раствор); гидроксид натрия (0,1 н раствор); тиосульфат натрия (0,1 н раствор); крахмал (1%-й раствор); колбы мерные емкостью 100 мл; колбы конические емкостью 200 мл; растворы альдоз (глюкозы, лактозы); кислота соляная (0,5 н раствор).

## Порядок выполнения работы

Отбирают 10 мл исследуемого раствора глюкозы и лактозы и разбавляют водой в 10 раз, используя мерную колбу емкостью 100 мл (проба для титрования должна содержать не более 0,1 г гексоз в 1 см).

Помещают по 10 мл разбавленного раствора альдозы в три конические колбы емкостью 20 мл. В каждую колбу приливают по 25 мл 0,1 н раствора йода и при перемешивании по 35 мл 0,1 н раствора NaOH. Закрытые колбы помещают в темное место на 20 мин.

Далее в колбы приливают по 10-15 мл 0,5 н раствора HCl.

Выделившийся йод титруют титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия.

## Порядок титрования

Первоначально титруют до получения светло-желтого окрашивания. Далее добавляют 1 мл крахмала - наблюдается появление синей окраски. Продолжают титрование до исчезновения синей окраски. По окончании титрования проверяют полноту выделения йода, прибавляя несколько мл 0,5 н раствора HCl.

Параллельно ставят контрольный опыт, при этом вместо раствора углеводов необходимо взять 10 мл дистиллированной воды. Титрование для каждого вида альдоз следует проводить в три раза.

Расчетная формула:

$$\text{Массовая доля } \omega = \frac{(v_2 - v_1) \cdot m_1 \cdot \rho \cdot 100}{m},$$

где  $m_1$  - масса углеводов, соответствующая 1 мл 0,1 н раствора  $J_2$ , г (0,009 г глюкозы, 0,018 г - лактоза);  $m$  - масса раствора, взятого для определения (10 г),  $\rho \approx 1$  г/мл;  $\rho = 10$  - фактор разведения;

$v_2$  - объем 0,1 н раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , использованного для титрования в контрольном опыте, мл;  $p$  - объем 0,1 н раствора  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13 ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ (КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ)

Ц е л ь р а б о т ы - изучить качественные реакции на отдельные витамины.

Качественные реакции на витамин  $\text{B}_1$

### 1. Диазореакция на тиамин

Качественной реакцией на витамин  $\text{B}_1$  является диазореакция. В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета (азокраситель).

Диазобензосульфокислота + тиамин                      азокраситель красного или оранжевого цвета.

Диазобензосульфокислота - неустойчивый диазореактив, поэтому диазореактив готовится непосредственно перед применением путем смешивания равных объемов 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 2%-м растворе соляной кислоты и 5%-го раствора нитрита натрия.

Оборудование, реактивы, материалы:

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 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 2%-м растворе  $\text{HCl}$  и 1 мл 5%-го раствора нитрита натрия.

Затем добавляют 1 мл 5%-го раствора тиамина. По стенке, наклонив пробирку, осторожно наслаивают 2 мл 10%-го раствора бикарбоната натрия  $\text{NaHCO}_3$ . 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  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Тиохром является желтым пигментом, обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

Оборудование, реактивы, материалы:

Флюороскоп; гидроксид натрия (10%-й раствор); феррицианид калия (5%-й раствор); тиамин (5%-й раствор).

## Порядок выполнения работы

К одной капле 5%-го раствора тиамин 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 В<sub>2</sub> (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, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; рибофлавин; кислота соляная (конц.); цинк (металлический).

## Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1,5 мл 0,025%-го раствора рибофлавина и 1 мл 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<sub>3</sub>

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; рибофлавин (0,015%-й раствор); серебро азотнокислое (0,6%-й раствор).

## Порядок выполнения работы

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

Качественная реакция на витамин В<sub>5</sub> (ниацин, никотиновая кислота, никотинамид)

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; витамин В<sub>5</sub>; кислота уксусная (10%-й раствор); ацетат меди (5%-й раствор).

Порядок выполнения работы

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

#### Качественная реакция на витамин В<sub>6</sub>

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; пиридоксин (5%-й раствор); железо хлорное (5%-й раствор).

Порядок выполнения работы

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

#### Качественные реакции на витамин В<sub>6</sub>

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; пиридоксин (5%-й раствор); железо хлорное (5%-й раствор).

Порядок выполнения работы

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

#### Качественные реакции на витамин С

##### 1. Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Аскорбиновая кислота, окисляясь, восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол в лейкоформу.

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; витамин С; сок капусты или картофеля; кислота соляная (2%-й раствор); 2,6-дихлорфенолиндофенол (натриевая соль 0,001 н).

Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 мл раствора витамина С (или 1 мл 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, материалы:

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

Порядок выполнения работы

К 1 мл раствора витамина С (или 1 мл сока капусты или картофеля) добавляют 1 мл 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.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

### **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

**Ц е л ь р а б о т ы** - количественно определить содержание витамина С в биологическом материале.

Оборудование, реактивы, материалы:

Колбы мерные емкостью 100 мл; колбы конические; кислота аскорбиновая (порошок); кислота соляная (2%-й раствор); иодид калия (1%-й раствор); крахмал (0,5%-й раствор); иодат калия (0,01 н раствор); биологический материал.

Порядок выполнения работы

В мерной колбе емкостью 100 мл растворяют в воде 1 г порошка витамина С (или биологического материала), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В коническую колбу емкостью 100 мл помещают 10 мл полученного раствора, прибавляют 1 мл 2%-го раствора соляной кислоты, 0,5 мл 1%-го раствора иодида калия, 2 мл 0,5%-го раствора крахмала, доводят водой до объема, равного 20 мл. Титруют 0,01 н раствором иодата калия до появления стойкого слабо-синего окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт. В коническую колбу помещают 1 мл 2%-го раствора соляной кислоты, 0,5 мл 1 %-го раствора иодида калия, 2 мл 0,5%-го

раствора крахмала, добавляют воду до общего объема 20 мл. Титруют 0,01 н раствором иодата калия до появления стойкого слабо-синего окрашивания.

Расчетная формула

$$A = P * 0,0008806 * (V_2 - V_1),$$

где А - содержание витамина С в 1 г порошка;  $V_2$  - объем 0,01 н раствора иодата калия, пошедшего на титрование опытной пробы, мл;  $V_1$  - объем 0,01 н раствора иодата калия, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; Р - разведение; 0,0008806 - содержание

аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,01 н раствора  $KJIO_3$ , г.

## **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ**

**Ц е л ь р а б о т ы** - определить содержание витамина С в биологическом материале.

Метод Тильманса основан на взаимодействии аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом с образованием бесцветной лейкоформы 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Оборудование, реактивы, материалы:

Центрифуга; пробирки центрифужные; 2,6-дихлорфенолиндофенол (0,001 н раствор); кислота серная (0,3 н раствор); натрий вольфрамвокислый (5%-й раствор); материал биологический (сок капусты, картофеля, вытяжка из шиповника или других плодов).

Порядок выполнения работы

В центрифужную пробирку помещают 2 мл вытяжки из растительных тканей, добавляют 4 мл дистиллированной воды, 2 мл 5%-го раствора вольфрамвокислого натрия. Перемешивают, добавляют 6 мл 0,3 н раствора серной кислоты, снова перемешивают и через 2 мин центрифугуют. Отбирают 5 мл центрифугата и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (5 мл центрифугата соответствуют 1 мл исходного раствора витамина С).

Одновременно ставят контрольный опыт, в котором вместо раствора витамина С берут 2 мл воды.

Расчетная формула

$$X = \frac{(a - b) * 0,088 * 100}{m},$$

где X – содержание витамина С, мг/100 г; а - объем 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; в - объем 0,01 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; 0,088 - количество витамина С, соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг; m - масса вытяжки, г.

## **ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ (КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ)**

Ц е л ь р а б о т ы - изучить качественные реакции на жирорастворимые витамины.

### **Качественные реакции на витамин А**

#### 1. Реакция с треххлорной сурьмой

Оборудование, реактивы, материалы:

Жир рыбий; хлороформ; хлорид сурьмы (насыщ.)

Порядок выполнения работы

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

#### 2. Взаимодействие витамина А с сульфатом железа

Оборудование, реактивы, материалы:

Жир рыбий; сульфат железа в уксусной кислоте.

Порядок выполнения работы

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

#### 3. Реакция с серной кислотой

Оборудование, реактивы, материалы:

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 Д**

#### 1. Реакция витамина Д с бромом

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; жир рыбий; витамин Д; раствор брома в хлороформе.

## 2. Анилиновая проба на витамин Д

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

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; раствор витамина Д (или рыбий жир); анилин; хлороформ; кислота соляная (конц.).

Порядок выполнения работы

В сухую пробирку вносят 1 каплю раствора витамина Д (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 Е (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, материалы:

Пробирки; пипетки; токоферол (0,1%-й спиртовой раствор); кислота азотная (конц.).

Порядок выполнения работы

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

### 2. Реакция с хлоридом железа (Ш)

При окислении  $\alpha$ -токоферола хлоридом железа происходит образование токоферилхинона, раствор приобретает красную окраску.

Токоферилхинон (красная окраска)

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; железо хлорное (насыщ.);  $\alpha$ -токоферол (0,1 %-й спиртовой).

### Порядок выполнения работы

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

### Качественные реакции на витамин К

#### 1. Реакция с анилином

Витамин К восстанавливается анилином, раствор окрашивается в красный цвет:

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; пипетки; анилин; метионин (0,25%-й спиртовой раствор); викасол (0,05%-й спиртовой раствор).

#### Порядок выполнения работы

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

#### 2. Реакция с щелочным раствором цистеина

Оборудование, реактивы, материалы:

Пробирки; викасол (0,1%-й раствор); метионин (0,2%-й спиртовой раствор); цистеин; гидроксид натрия (10%-й раствор).

#### Порядок выполнения работы

В пробирку наливают 1 мл 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.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЫШЦ (АТФ И КРЕАТИНФОСФАТА)

Цель работы – определить количество АТФ и креатинфосфата в мышечной ткани

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцу большим количеством энергии. Основным путем образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе. Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфатный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде – так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после гидролиза дает представление о количестве лабильно

связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Оборудование, реактивы: 1) Пробирки. 2) Пипетки. 3) Воронки. 4) Фильтры. 5) Мерная пробирка или цилиндр вместимостью 10 мл. 6) Ледяная и кипящая водяные бани. 7) ФЭК. 8) Кюветы с толщиной слоя 1 см. 9) ТХУ, 2,5%-й раствор; HCl. 10) 1 моль/л раствор. 11) NaOH, 1 моль/л раствор. 12) Молибдат аммония, 1%-й раствор. 13) Аскорбиновая кислота, 1%-й раствор. 14) Мышечная ткань животного, забитого перед занятием.

#### Ход работы

1. 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в нее 5 мл охлажденного раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 мин. Экстракт фильтруют в мерную пробирку, помещенную в ледяную баню. Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 мин на холоде. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную пробирку и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

2. В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая пробирка – контрольная, вторая – опытная. В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 моль/л HCl, закрывают фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 моль/л NaOH. В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 моль/л раствора HCl и 1 мл 1 моль/л раствора NaOH. В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объема 10 мл.

3. Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 мин.

4. Контрольную и опытную пробы колориметрируют на ФЭКе с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе – только фосфатные соли.

5. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Расчет. Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 100 г сырой ткани, учитывая разведение:

$$X = A \times 3,3 \times 400 \times 100,$$

где X - содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани, мг/100 г; A – содержание АТФ в пробе, мг; 3,3\*400 – коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов. Оформление работы. Принцип метода и полученные результаты заносят в тетрадь.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ВНУТРЕННЕЙ** **МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ –** **СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ**

Цель работы – определить активность сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани.

Сукцинатдегидрогеназа мышц по химической природе является железофлавопротеином и прочно связана с клеточной структурой (внутренней митохондриальной мембраной). Фермент представляет собой интегральный белок внутренней мембраны митохондрий, состоит из двух субъединиц – большой и малой. Более крупный компонент включает субстратсвязывающий центр, а также содержит ФАД который ковалентно связан с гистидиновым остатком фермента. Кроме того, обе субъединицы содержат негеминовое железо (FeS). Коферментом сукцинатдегидрогеназы служит флавинадениндинуклеотид. Активность фермента зависит от наличия в нем сульфгидрильных групп и атомов железа. Фермент катализирует окисление (дегидрирование) янтарной кислоты (сукцината) в фумаровую кислоту. Это единственная реакция дегидрирования в цикле лимонной кислоты, в которой не участвует НАД+. В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол (синего цвета), который, восстанавливаясь, превращается в бесцветную лейкоформу. Источником фермента служит отмытая мышечная ткань (кашица). Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты  $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , являющейся структурным аналогом янтарной кислоты:

Оборудование, реактивы: 1) Штатив с пробирками. 2) Воронки. 3) Стеклянные палочки. 4) Бюретки. 5) Ступки. 6) Марлевые фильтры. 7) Пинцеты. 8) Водяная баня. 9) Термостат. 10) Мышечная кашица. 11) Янтарная кислота, 1%-й раствор. 12) 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,1%-й (0,001 н) раствор. 13) Дистиллированная вода.

Ход работы

1. Для получения ферментного препарата 1–2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды, затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку, и промывают 25 мл дистиллированной воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой с 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в три пробирки. 2. Содержимое первой пробирки кипятят в течение 1–2 мин для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в табл.

Таблица

№ пробы	Сукцинат, мл	$\text{H}_2\text{O}$ , мл	Краситель
1	1	0,5	2–4 капли
2	1	0,5	2–4 капли
3	–	1,5	2–4 капли

Через 15 мин наблюдают изменение окраски в пробирках.

Оформление работы. Результаты и выводы заносят в таблицу.

**ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 18**  
**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОТРИОЗ –**  
**ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА В**  
**МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**

Цель работы - определить содержание фосфотриоз в мышечной ткани фотоколориметрическим методом.

Метод основан на том, что фосфотриозы – промежуточные продукты дихотомического углеводного распада – в отличие от других фосфорилированных метаболитов глюкозы легко подвергаются гидролизу с отщеплением неорганического фосфора в щелочной среде при комнатной температуре, содержание их определяется фотоколориметрически ( $\lambda = 670$  нм, рабочая длина кюветы – 1 см).

Реактивы, оборудование: 1) ФЭК. 2) Кюветы. 3) Бюретки. 4) Ткань мышечная. 5) ТХУ (2,5%-й раствор). 6) Гидроксид натрия (2 моль/л раствор). 7) Кислота соляная (2 моль/л раствор). 8) Кислота аскорбиновая (1%-й свежеприготовленный раствор). 9) Молибдат аммония (1%-й в 0,025 моль/л растворе). Для построения калибровочного графика используется стандартный раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ммоль/мл).

#### Ход работы

В пробирку с 5 мл охлажденного 2,5%-го раствора ТХУ помещают 0,5 г рыбного фарша из измельченных мышц, экстрагируют на льду в течение 10 мин. Смесь интенсивно помешивают палочкой. Приливают 5 мл дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр. В чистую пробирку помещают 1 мл безбелкового фильтрата и добавляют 1 мл 2 М раствора NaOH. Содержимое пробирки перемешивают, оставляют стоять 20 мин. Далее в опытную пробирку приливают 1 мл раствора 2 М HCl, жидкость перемешивают. В контрольную пробирку прибавляют 1 мл раствора HCl, смесь перемешивают и прибавляют 1 мл безбелкового фильтрата, содержимое пробирки перемешивают еще раз. В опытную и контрольную пробирки приливают по 0,5 мл раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  и по 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты. Дистиллированной водой общий объем смеси в обеих пробирках доводят до 10 мл. Пробы оставляют стоять 10 мин при комнатной температуре. Опытную пробу колориметрируют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см, с красным светофильтром, длина волны 670 нм. Контрольную пробу колориметрируют также в кювете толщиной слоя 1 см, длина волны 670 нм.

Расчетные формулы: Оптическая плотность пробы: опытной –  $D_1$ , контрольной –  $D_2$ . Содержание  $\text{PO}_3^-$  моль в пробе: опытной –  $m_1$ , контрольной –  $m_2$ . Лабильный фосфор, соответствующий фосфотриозам:  $m = m_1 - m_2$ . Расчет проводим по формуле:

$$X = (m_1 - m_2) \times 200 \times 100,$$

где  $X$  – содержание фосфотриоз в 100 г мышечной ткани рыбы; 100 – разведение пробы; 200 – пересчет на 100 г мышечной ткани рыбы.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 19 ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ**

Цель работы – провести переаминирование аминокислот.

Переаминирование (трансаминирование) – перенос аминогруппы от аминокислоты на кетокислоту с образованием новой аминокислоты и новой кетокислоты. О трансаминировании можно судить по убыли субстратов реакции либо по нарастанию конечных продуктов реакции. Для разделения и последующего количественного

определения глутаминовой кислоты и  $\alpha$ -аланина можно использовать метод хроматографии. Для предотвращения перехода пирувата в лактат реакцию переаминирования следует проводить в присутствии моноуксусной кислоты.

Оборудование, реактивы: 1) Ножницы. 2) Эксикатор. 3) Ледяная баня. 4) Хроматографическая камера. 5) Пробирки. 6) Пипетки. 7) Термостат. 8) Хроматографическая бумага. 9) Фильтры. 10) Фарфоровая чашка. 11) Пестик. 12) Марля. 13) Водяная баня. 14) Пробки. 15) Плита. 16) Печень крысы. 17) Эфир. 18) 0,1-процентный раствор  $\text{KHCO}_3$ . 19) 0,08 М раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . 20) Глутаминовая кислота. 21) Пируват. 22) Моноуксусная кислота. 23) Дистиллированная вода. 24) Аланин. 25) Бутанол. 26) Ледяная уксусная кислота. 27) 1 %-ный раствор нингидрина в ацетоне.

#### Ход работы

Печень крысы размельчают на холоде в фарфоровой ступке с пятикратным объемом 0,1-процентного раствора  $\text{KHCO}_3$ . Полученный гомогенат фильтруют через 2 слоя марли. Готовят 5 проб с реакционной средой, состав которых указан в табл.

Таблица - Приготовление проб с реакционной средой

№	Глутаминовая кислота, мл	Пируват, мл	Моноуксусная кислота, мл	$\text{KHCO}_3$ , мл	$\text{H}_2\text{O}$ , мл	Гомогенат, мл	Аланин, мл
1	1	1	0,5	–	–	1	–
2	1	1	0,5	–	–	1	–
3	–	1	0,5	1	–	1	–
4	1	–	–	–	4	–	–
5	–	–	–	–	4	–	1

Пробу № 1 после добавления гомогената нагревают до кипения в течение 10 мин на кипящей водяной бане, а затем добавляют 1,5 мл 0,08 М раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  для полного осаждения тканевых белков, перемешивают и после охлаждения пропускают через бумажный фильтр. Эта проба необходима для определения исходной концентрации субстратов реакции. Пробы № 2 и 3 после перемешивания закрывают пробками и подвергают инкубации в термостате при 37 °С. Инкубацию проводят в течение 60 мин при периодическом встряхивании. По окончании инкубации пробы № 2 и 3 обрабатывают так же, как и пробу № 1. Пробы № 4, 5 сразу после приготовления наносят на хроматографическую бумагу и отмечают как свидетелей карандашом. Метод бумажной хроматографии. Метод хроматографии на бумаге относится к распределительной хроматографии и основан на различной растворимости разделяемых веществ в двух малосмешивающихся жидкостях, одна из которых удерживается бумагой, а другая является подвижной. При бумажной хроматографии в качестве носителя применяется целлюлоза в виде особой фильтровальной бумаги. Скорость движения аминокислот определяется характерной для данного вещества в данной системе растворителей величиной коэффициента распределения.

$$a = \frac{C_1}{C_2}, \text{ где } C_1 \text{ – концентрация в водной фазе, } C_2 \text{ – концентрация в подвижной фазе.}$$

Следовательно, относительное расположение анализируемых веществ на хроматограмме для данной системы растворителей постоянно и характеризуется величиной коэффициента скорости движения: Расстояние от анализируемого вещества до старта

$$R_f = \frac{l}{L}, \quad l - \text{расстояние, пройденное от старта пятном, } L - \text{расстояние от старта до}$$

фронта подвижной фазы.

Величина  $R_f$  для данной подвижной системы является постоянной, однако она зависит от качества бумаги, постоянства температуры, степени чистоты, растворителей, однотипности процедур и аппаратуры. Приготовление растворителя. В мерном цилиндре смешивают 40 мл бутанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл дистиллированной воды. Смесь встряхивают в течение 1–2 минут. Проведение хроматографии. Берут лист хроматографической бумаги и на расстоянии 3 см от его короткого края проводят простым карандашом горизонтальную линию, которую делят на 5 отрезков. Каждое пересечение нумеруют. На линию старта наносят приготовленные пробы. Нанесение проводят в несколько приемов, следя за тем, чтобы пятно раствора при каждом прикосновении пипетки к бумаге не растекалось более чем на 3 мм. Каждую следующую порцию раствора наносят из пипетки после полного высыхания предыдущей, которое определяют по исчезновению просвечивания бумаги в точке нанесения. В точки наносят по 50 мкл – порциями по 5 мкл полученной пробы. Хроматограмму устанавливают в хроматографическую камеру, на дно которой наливают 50 мл разделительной смеси. Хроматографическую камеру хорошо закрывают, чтобы исключить возможность испарения компонентов подвижной фазы. Разделение ведут до тех пор, пока линия фронта растворителя не приблизится к краю бумаги (не доходя до края 2–3 см). После этого хроматограмму вынимают из камеры и, держа пинцетом, высушивают над плитой для удаления растворителя из бумаги.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 20 ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

**Цель работы** – выделить саркоплазматическую, миофибриллярную фракции, определить содержание миозина в мышечной ткани.

**Оборудование, реактивы:** мышечная ткань; 0,03 М KCl; NaCl; фильтровальная бумага; марля; диализатор; водяная баня; порошок сульфата аммония; 0,6 М KCl; NaOH (0,25 %-й раствор); раствор Бейли (0,03 М NaHCO<sub>3</sub> на 0,5 М KCl); центрифуга; лед; ФЭК; кюветы 0,5 см; 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<sub>4</sub> в 1 %-м растворе виннокислого натрия или калия Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> в 25 мл воды. Растворы смешивают.

Реактив С: перед анализом смешивают 49 мл реактива А и 1 мл реактива В.

Реактив Фолина – Чокальтеу (фенольного реактива): в круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O и 25 г молибдата натрия Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O, растворяют все в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80 %-го раствора ортофосфорной кислоты H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и 100 мл концентрированной HCl. К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 ч, далее прибавляют 150 г Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 мл воды, 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой, фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета.

Реактив следует хранить в темной склянке, перед употреблением разбавить дистиллированной водой 1 : 1. Определяют кислотность полученного реактива: разводят в 10 раз и титруют 0,1 н раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Полученный реактив должен быть 0,1 н.

### *Ход работы*

#### 1. Анализ белков саркоплазматической фракции

##### 1.1. Выделение саркоплазматической фракции

Саркоплазматическая фракция растворяется в солевых растворах с низкой ионной силой (0,03 М КСl или 0,03 М NaCl).

В ступке с 50 мл 0,03 М КСl (или NaCl) настаивают 10 г тщательно измельченной мышечной ткани. Образуется однородная масса, которую фильтруют через двойной слой марли. Мутный фильтрат повторно фильтруют через бумажный фильтр. Получают около 20–30 мл прозрачного розового фильтрата № 1. Данная солевая вытяжка мышечной ткани содержит белки саркоплазматической фракции (альбумины и глобулины). Осадок № 1 содержит остальные белковые фракции.

Содержание белков саркоплазматической фракции можно определить, используя метод Лоури. Отделение альбуминов от глобулинов представлено в п. 1.2.

##### 1.2. Диализ фильтрата № 1

Диализ состоит в том, что через поры полупроницаемой мембраны проходят молекулы и ионы низкомолекулярных соединений, белковые молекулы не способны проходить через поры. В данной работе диализ используют для выделения из фильтрата NaCl. Дальнейшее отделение альбуминов от глобулинов основано на их различной растворимости в воде и солевых растворах. Альбумины растворяются в воде и высококонцентрированных растворах солей, осаждаются при насыщении раствора солью более 50 %.

Глобулины растворимы в растворах солей средней концентрации (6–15 %). При более высокой или при более низкой концентрации растворимость глобулинов уменьшается.

Для проведения диализа используют специальные приборы – диализаторы, простейшим из которых является целлофановый пакет, помещенный в стакан с дистиллированной водой.

Вырезают из целлофана круг диаметром 9–12 см и складывают его в форме мешочка. Вставляют в отверстие стеклянную трубку (длиной 5 см и диаметром 0,8 см), верхний конец трубки должен выступать из мешочка на 1/3 длины. Мешочек туго закрепляют на трубке ниткой. Через трубку вводят в диализатор 10 мл фильтрата № 1 и погружают его в стакан с дистиллированной водой.

Через поры в воду начинают переходить хлорид-ионы Cl<sup>-</sup> из фильтрата. Через 10 мин из стакана пипеткой отбирают 1 мл H<sub>2</sub>O и проделывают качественную реакцию на Cl<sup>-</sup>, подтверждающую диализ:



Меняют воду в стакане. Диализ ведут в течение двух часов. Каждые 10 мин проверяют наличие хлорид-ионов и меняют воду в стакане.

Завершение диализа фиксируется отрицательной реакцией на Cl<sup>-</sup> ионы, что свидетельствует о полной диффузии соли из диализатора через поры в стакан.

Таким образом, фильтрат № 1 содержит только белки и воду. После удаления NaCl фильтрат № 1 мутнеет, так как глобулины не растворяются в воде и выпадают в осадок. Содержимое диализатора фильтруют, в осадке остаются глобулины, в полученном фильтрате № 2 находятся альбумины.

Биуретовая реакция фиксирует наличие белков в обеих фазах. Для осаждения альбуминов к фильтрату № 2 добавляют порошок сульфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до полного насыщения раствора. Наблюдают выпадение альбуминов в осадок. Осадок отфильтровывают. При условии полного насыщения сульфатом аммония фильтрат не дает биуретовой реакции, что подтверждает полное выпадение альбуминов в осадок.

## 2. Выделение белков миофибриллярной фракции.

К осадку № 1 (после отделения саркоплазматической фракции) добавляют 40 мл 0,6 М KCl, настаивают 10–15 мин. В раствор переходит миозин. Раствор фильтруют, отделяя фильтрат с миозином. Далее к осадку снова добавляют 40 мл 0,6 М KCl. При более длительной экстракции в раствор переходит актин. Раствор вновь фильтруют. К фильтрату добавляют ацетон, который осаждает актин. Далее к осадку снова добавляют 40 мл 0,6 М KCl. При экстракции 0,6 М KCl в течение суток в раствор переходит актомиозин, раствор снова фильтруют. При добавлении к осадку насыщенного раствора KCl можно выделить тропомиозин. Снова фильтруют, получают осадок № 2 после определения миофибриллярной фракции.

3. К осадку № 2 добавляют 50 мл 0,25 %-го раствора NaOH и оставляют на 12 ч. Далее жидкую массу центрифугируют. В осадке № 3 остаются белки стромы, в фугате (фильтрате № 3) – белки ядер (нуклеопротеиды). Осадок № 3 помещают в стакан, добавляют 50 мл воды и кипятят в течение часа, периодически добавляя воду. Далее горячую жидкость отфильтровывают. В фильтрате находится желатин (продукт гидролиза коллагена), что подтверждается биуретовой реакцией.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 21 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИОЗИНА

**Цель работы** – определить содержание миозина в мышечной ткани.

Молекула миозина имеет массу 500 000 Да и представляет собой гексамер, в состав которого входят две тяжелые цепи (ММ 200 000 Да) и четыре легкие полипептидные цепи (ММ 15 000–20 000 Да). Молекула миозина сильно вытянута в длину, причем ее длинная стержневая часть образована двумя тяжелыми полипептидными цепями, которые на этом участке имеют структуру  $\alpha$ -спирали и к тому же закручены одна вокруг другой в суперспираль. N-концы тяжелых цепей образуют глобулярные "головки", каждая из которых находится в комплексе с двумя легкими цепями.

АТФазная активность миозина сосредоточена в "головках", имеющих каждая по одному активному центру. В результате ограниченного протеолиза можно получить два типа протеолитических фрагментов, обладающих в полной мере АТФазной активностью: так называемый **тяжелый меромиозин** с ММ 350 000 Да, лишенный большей части стержня, или "хвоста", миозиновой молекулы, а также препараты "головок". Электрофоретическая картина зависит от вида примененной протеазы, ее концентрации и времени обработки белка. "Головки", или, как их называют,

субфрагмент-1, полученный путем химиотрипсинового протеолиза, при ДСН-электрофорезе дают полосу 96 000 Да – фрагмент тяжелой цепи и две полосы легких цепей – примерно 18 000 и 15 000 Да. Две другие легкие цепи отсутствуют вследствие деградации. Тяжелый меромиозин обычно дает целый набор полос, среди которых присутствуют: 81 000 Да, 74 000, 51 000, 37 000, 25 000, 21 000 и некоторые другие. Большинство этих полос соответствует различным фрагментам тяжелых цепей. Следует обратить внимание на то, что несмотря на наличие разрывов в полипептидных цепях, активность

тяжелого меромиозина как АТФазы в полной мере сохраняется. АТФазную активность определяют так же, как и для миозина.

Методы выделения миозина основаны на различной растворимости миозина и актомиозина в растворах солей различной ионной силы и сводятся к многократному последовательному осаждению и растворению миозина в растворах хлористого калия разной концентрации.

**Оборудование, реактивы:** ножницы; ледяная баня; стеклянная палочка; центрифуга; марля; ФЭК; кюветы 0,5 см; бидистиллированная вода; КСl (х. ч., кристаллический); КСl (0,5 М раствор); раствор Бейли (свежеприготовленный); реактив А; реактив В; реактив С; реактив Фолина – Чокальтеу; мышечная ткань.

Раствор Бейли: 0,03 М  $\text{NaHCO}_3$  на 0,5 М КСl.

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

Реактив В: 0,5 %-й раствор  $\text{CuSO}_4$  в 1 %-м растворе виннокислого натрия или калия  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  в 25 мл воды. Растворы смешивают.

Реактив С: перед анализом смешивали 49 мл реактива А и 1 мл реактива В.

Реактив Фолина – Чокальтеу (фенольного реактива): в круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и 25 г молибдата натрия  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , растворяют все в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80 %-го раствора ортофосфорной кислоты  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и 100 мл концентрированной HCl. К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 ч, далее прибавляют 150 г  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 мл воды, 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой, фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Реактив следует хранить в темной склянке, перед употреблением разбавить дистиллированной водой 1 : 1. Определяют кислотность полученного реактива: разводят в 10 раз и титруют 0,1 н раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Полученный реактив должен быть 0,1 н.

### **Ход работы**

Мышечную ткань (15–20 г) измельчают на льду ножницами и гомогенизируют 30–40 сек с 1 объемом раствора Бейли (0,03 М  $\text{NaHCO}_3$  на 0,5 М КСl). К гомогенату добавляют еще 2 объема раствора Бейли и смесь оставляют на холоде на 15–20 мин, время от времени осторожно помешивая ее стеклянной палочкой. Гомогенат центрифугируют на центрифуге с охлаждением в течение 15–20 мин при 10 000–12 000 об/мин.

Центрифугат фильтруют через двойной слой марли (для удаления жира) и разводят охлажденной дистиллированной водой так, чтобы конечная концентрация КС1 (с учетом объема мышечной массы) была равна 0,25 М (воду добавляют медленно, при непрерывном помешивании). Если актомиозин сразу не выпадает в осадок, раствор следует оставить на холоде на 0,5–2 ч. Образовавшуюся желатинообразную массу энергично встряхивают и снова центрифугируют 15–20 мин при 12 000 об/мин. Осадок актомиозина отбрасывают.

Полученный центрифугат разводят дистиллированной водой до конечной концентрации КС1 0,025–0,030 М, оставляют на 1 ч на льду и центрифугировали 20 мин при 2 500 об/мин (можно оставить раствор миозина на ночь и перед центрифугированием декантировать жидкость над осадком). Осадок миозина переносят стеклянной палочкой в мерную пробирку и растворяют его добавлением сухого КС1 до конечной концентрации 0,5 М.

Раствор миозина разводят водой до концентрации КС1, равной 0,03–0,04 М, осторожно перемешивают и центрифугируют 20 мин при 2 500 об/мин. Осадок миозина вновь растворяют, добавив сухой КС1. Эту операцию повторяют еще раз.

В растворе миозина проводят определение белка методом Лоури.

Помещают в пробирку 0,4 мл раствора белка, добавляют 2 мл реактива С. Через 10 мин добавляют 0,2 мл 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.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 22 ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ**

**Цель работы** – провести инкубацию фермента и субстрата в различных температурных условиях и оценить интенсивность ферментативного гидролиза ацетилхолина.

**Холинэстераза** – фермент, играющий существенную роль в процессе передачи возбуждения холинэргическими нервами на воспринимающие ткани. Холинэстераза расщепляет ацетилхолин – медиатор нервного возбуждения на холин и уксусную кислоту.

В процессе реакции происходит закисление среды за счет накопления уксусной кислоты, что можно обнаружить с помощью индикатора. В работе используется двухцветный индикатор бромтимоловый синий. Зона смены окраски находится в области рН 7,6–6,0, в кислой среде окраска желтая, в щелочной – синяя, промежуточная окраска – зеленая. Инкубацию фермента и субстрата проводят в различных температурных условиях. Об интенсивности ферментативного гидролиза ацетилхолина судят по окраске инкубационной смеси.

**Оборудование, реактивы:** пробирки; пипетки; термостат; ледяная баня; ацетилхолин (0,5 %-й раствор); бромтимоловый синий (0,02 %-й раствор); сыворотка крови (разведение 1 : 50) – источник холинэстеразы.

Бромтимоловый синий: 2,5 г сухого индикатора растирают в ступке с 4,5 мл 0,1 н раствора едкого натра, полученный раствор переносят в мерную колбу на 50 мл, добавляют 12,5 мл 0,1 н раствора борной кислоты, приготовленного на 0,1 М растворе KCl, раствор доводят водой до метки, перед опытом раствор разводят водой в 2 раза.

#### *Ход работы*

Берут три пробирки. Вносят в каждую по 2,5 мл сыворотки крови и по 0,5 мл бромтимолового синего. Одну из пробирок помещают в термостат (37 °С), вторую оставляют при комнатной температуре, третью помещают в ледяную баню. Через 5 мин, необходимых для выравнивания температуры, во все три пробирки вносят по 0,5 мл раствора ацетилхолина. Содержимое пробирок перемешивают и вновь оставляют в соответствующих температурных условиях. Через 10–15 мин отмечают цвет в каждой пробирке.

**Оформление работы.** Результаты записывают в табл. Делают выводы о зависимости скорости реакции от температуры.

Таблица

**Влияние температуры на активность холинэстеразы**

№ пробирки	Температура инкубации, °С	Окрашивание с бромтимоловым синим
1	0	
2	20	
3	37	
4	100	

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 23 ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ НОРМАЛЬНЫХ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ МОЧИ**

**Цель работы** – исследовать биохимический состав мочи.

**Оборудование, реактивы:** пробирки; пипетки; лакмусовая и индикаторная бумага; взвесь Ca(OH)<sub>2</sub> в воде; NaOH (10 %-й раствор); HNO<sub>3</sub> (5 %-й раствор); AgCl; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (насыщенный раствор); (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> (3 %-й раствор); моча.

#### *Ход работы*

**Реакция.** О реакции мочи судят по цвету опущенной в нее лакмусовой бумаги: покраснение говорит о кислой, а посинение – о щелочной реакции мочи. Для более точного определения пользуются индикаторной бумагой. Она имеет ряд поперечных полосок. Бумагу погружают в мочу, а затем сравнивают со шкалой и определяют рН мочи.

**Открытие солей аммония в моче.** В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 4 капли известкового молока (взвесь Ca(OH)<sub>2</sub> в воде) и слегка прогревают, укрепив у верхнего края пробирки смоченную водой красную лакмусовую бумагу. Через некоторое время она синее. Результат опыта и уравнение реакции между хлористым аммонием и Ca(OH)<sub>2</sub> записывают.

**Открытие мочевины в моче.** В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 6 капель 10 % раствора NaOH и осторожно кипятят. У верхнего края пробирки укрепляют смоченную

водой лакмусовую бумагу. Вследствие выделения аммиака, образующегося при гидролизе мочевины, лакмусовая бумага синееет. Результат опыта и уравнение реакции записывают.

*Открытие хлоридов в моче.* В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 1–2 капли 5 %-го раствора  $\text{HNO}_3$  и 1–2 капли  $\text{AgCl}$ . Выпадает белый осадок. Результат опыта и уравнение реакции записывают.

*Открытие фосфатов в моче.* В пробирку помещают 1 мл мочи, подкисляют ее азотной кислотой, добавляют 2 мл 3 %-го раствора молибденовокислого аммония  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  и нагревают на спиртовке. Постепенно образуется осадок фосфорномолибденового аммония.

*Открытие ионов кальция в моче.* В пробирку наливают 2 мл мочи и добавляют 4 капли насыщенного раствора щавелевокислого аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ . Сразу же выпадает осадок щавелевокислого кальция.

Требования к оформлению лабораторной работы: в отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы; сделать выводы.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 24** **ФЕРМЕНТЫ МОЛОКА. КИСЛОТНОСТЬ МОЛОКА**

**Цель работы** – провести качественные реакции на ферменты молока и определить кислотность молока.

**Оборудование, реактивы:** штатив с пробирками; термометр; водяная баня; гваяковая смола (3 %-й раствор); перекись водорода (2 %-й раствор); перекись водорода (1 %-й раствор).

### **Ход работы**

#### **1. Качественные реакции на оксидоредуктазы молока**

*1.1. Реакция на пероксидазу.* В две пробирки наливают по 0,5 мл 3 %-го водного раствора гваяковой смолы, столько же 2 %-го раствора перекиси водорода и по 2–3 мл молока, причем в одну пробирку прибавляется свежее молоко, в другую – хорошо прокипяченное. Перемешивают и ставят на баню, нагретую до 40 °С. Сравнивают результат реакции в первой и второй пробирках и делают вывод.

*1.2. Реакция на каталазу.* В одну пробирку берут 2–3 мл молока, добавляют столько же 1 %-го раствора перекиси водорода. Под влиянием каталазы происходит выделение пузырьков кислорода. Вторую пробу проводят с кипяченым молоком.

#### **2. Определение кислотности молока**

Определение кислотности молока имеет большое практическое значение для оценки его свежести. Свежее молоко связывает небольшое количество щелочи. Это зависит от наличия в нем белков и однозамещенных фосфорнокислых солей, обладающих слабокислыми свойствами.

В молоке при его хранении происходит молочнокислое брожение, в результате чего накапливается молочная кислота.

Кислотность молока выражается в градусах. Под одним градусом подразумевается количество миллилитров децинормального раствора щелочи, идущее на нейтрализацию 100 мл исследуемого молока. Свежее молоко коровы имеет 15–18°, стоявшее молоко – 20–22°, несвернувшееся, но свертывающееся при кипячении – 24–27°.

**Оборудование, реактивы:** коническая колба; пипетки на 10 и 20 мл; бюретка; едкий натр (0,1 н раствор); фенолфталеин (0,1 %-й спиртовой раствор); молоко.

### *Ход работы*

В коническую колбу помещают 10 мл исследуемого молока, добавляют 20 мл дистиллированной воды и 2–3 капли фенолфталеина. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и титруют из бюретки 0,1 н раствором щелочи до появления не исчезающего в течение двух минут слабого розового окрашивания.

Количество пошедшей на титрование щелочи, умноженное на 10 (пересчет на 100) и будет показывать кислотность данного молока в градусах.

Например: на титрование 10 мл молока пошло 2,2 мл щелочи. Кислотность молока в градусах равен  $2,2 \times 10 = 22,0^\circ$ .

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 25 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ КАЗЕИНА

**Цель работы** – определить изоэлектрическую точку основного белка молока – казеина.

Изоэлектрической точкой белка называется определенная величина рН среды, при которой белок находится в виде нейтральных молекул (в изоэлектрическом состоянии), несущих равные количества положительных и отрицательных зарядов. При других концентрациях ионов водорода в растворе имеются преимущественно положительные и отрицательные ионы белка. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы и легко выпадают в осадок. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но не вполне совпадает с ней; для многих белков она сдвинута в кислую сторону, а некоторые белки имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной реакции среды. Определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее быстрое и полное выпадение белка в осадок.

**Оборудование, реактивы:** пробирки; воронка; фильтры; стеклянная палочка;  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (10 %-й раствор); дистиллированная вода;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (0,2 М раствор);  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,2 М раствор); молоко.

### *Ход работы*

1. Выделение казеина из молока. К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10 %-й уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, а осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в чистые пробирки.

2. Определение изоэлектрической точки казеина. Для определения изоэлектрической точки казеина в 7 сухих пробирках наливают нужные реактивы в количестве, указанном в табл. При смешивании растворов в каждой пробирке устанавливается определенная концентрация ионов водорода. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Через 5–10 мин во всех пробирках появляется осадок (помутнение). Наибольшее количество осадка наблюдается в той пробирке, рН которой соответствует изоэлектрической точке данного белка.

Таблица

#### Определение изоэлектрической точки казеина

Количество 0,2М $\text{CH}_3\text{COOH}$ , мл	Количество $\text{H}_2\text{O}$ , мл	Количество 0,4 %-го раствора казеина в 0,2 М $\text{CH}_3\text{COONa}$ , мл	рН смеси	Степень помутнения
1,6	0,4	0,2	3,8	
0,8	1,2	0,2	4,1	
0,4	1,6	0,2	4,4	
0,2	1,8	0,2	4,7	
0,1	1,9	0,2	5,0	
0,06	1,94	0,2	5,3	
0,3	1,97	0,2	5,6	

**Оформление работы:** результаты опытов представить в виде табл. 15. В графе "Степень помутнения" отсутствие осадка обозначить знаком "минус" (-), наличие его – знаком "плюс" (+), значительное помутнение – несколькими "плюсами".

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 26 КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРА В ПЕЧЕНИ ТРЕСКИ МЕТОДОМ БЛАЙЯ – ДАЙЕРА

**Цель работы** – ознакомиться с методом количественного определения содержания липидов в печени.

**Оборудование, реактивы:** воронки делительные; колбы; аппарат для встряхивания; воронка Бюхнера; баня водяная; печень трески; хлороформ; спирт этиловый.

### Ход работы

Взвешивают 5 г измельченной печени, помещают в колбу емкостью 250 мл. Приливают 60 мл этанола, экстрагируют в течение нескольких минут, добавляют 30 мл хлороформа. Содержимое колбы встряхивают в течение 10 мин на аппарате для встряхивания, затем добавляют 30 мл хлороформа и встряхивают в течение 5 мин, добавляют еще 30 мл воды, продолжают перемешивание в течение 30 сек. Далее смесь фильтруют. Полученный фильтрат помещают в делительную воронку. Происходит расслаивание фильтрата на две фазы: нижний хлороформный слой содержит липиды, верхний – нелипидные компоненты. Нижний хлороформный слой сливают в предварительно взвешенную фарфоровую чашку, упаривают на кипящей водяной бане.

Фарфоровую чашку охлаждают, взвешивают. Липидный слой с поверхности чашки смывают хлороформом из расчета 1 мл на 100 мг жира.

Расчетная формула:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100,$$

где  $\omega$  – массовая доля жира в печени, %;  $m$  – масса навески, г;  $m_1$  – масса фарфоровой чашки с жиром, г;  $m_2$  – масса чистой фарфоровой чашки, г.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 27 МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

**Цель** - изучить свойства микроорганизмов, осуществляющих молочнокислое брожение.

**Материалы и оборудование.** Молочнокислые продукты, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, спиртовка, предметные стекла, покровные стекла, прибор для окрашивания и промывания мазков, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов, реактив Никифорова.

**Молочнокислое брожение** – процесс анаэробного окисления углеводов, конечным продуктом которого является молочная кислота. Молочнокислые бактерии относятся к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Хотя эта группа морфологически гетерогенна (включает длинные и короткие палочки, кокки), в физиологическом отношении ее можно охарактеризовать достаточно хорошо. Все относящиеся к ней бактерии грамположительны, не образуют спор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*) и в подавляющем большинстве неподвижны. Все они используют в качестве источника энергии углеводы и выделяют молочную кислоту. В отличие от *Enterobacteriaceae*, тоже образующих лактат, молочнокислые бактерии способны только к брожению; не содержат гемопротеинов (таких, как цитохромы и каталаза). Микроорганизмы рода *Lactobacteriaceae* являются факультативными анаэробами, они могут расти в присутствии кислорода воздуха (аэротолерантность).

Отличительный признак молочнокислых бактерий – это их потребность в ростовых веществах. Молочнокислые бактерии являются ауксотрофами, большинство из них нуждается в ряде витаминов и аминокислот, а также в пуринах и пиримидинах. С другой стороны, многие из них обладают способностью, которой нет у большинства микроорганизмов: они могут утилизировать молочный сахар (лактозу).

Распространение молочнокислых бактерий в природе определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способами получения энергии (брожение). Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

а) в молоке, местах его переработки и молочных продуктах (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*, *S. diacetilactis*);

б) на растениях и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbriickii*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*);

в) в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium* и др.).

Благодаря образованию больших количеств молочной кислоты, к которой сами они в значительной степени толерантны, молочнокислые бактерии при подходящих условиях могут довольно быстро размножаться, вытесняя другие микроорганизмы. По этой причине их легко культивировать на селективных средах и легко выделять. Естественные накопительные культуры этих бактерий содержатся в кислом молоке и молочных продуктах, кислом тесте, кислой капусте, силосе и т. п.

Различают гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение, в зависимости от выделяющихся продуктов (помимо молочной кислоты) и их процентного соотношения. Отличие также заключается и в разных путях получения пирувата при деградации углеводов гомо- и гетероферментативными молочнокислыми бактериями.

**Гомоферментативное молочнокислое брожение.** При гомоферментативном молочнокислом брожении углеводов сначала окисляется до пирувата по гликолитическому пути, затем пируват восстанавливается до молочной кислоты при помощи лактатдегидрогеназы. Продуктом гомоферментативного молочнокислого брожения является молочная кислота, которая составляет не менее 90 % всех продуктов брожения. Примеры гомоферментативных молочнокислых бактерий: *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus lactis*.

**Гетероферментативное молочнокислое брожение.** В отличие от гомоферментативного брожения, деградация глюкозы идет по пентозофосфатному пути, образующийся из ксилулозо-5-фосфата глицеральдегид-3-фосфат окисляется до молочной кислоты, а ацетилфосфат восстанавливается до этанола (некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии окисляют полученный этанол частично или полностью до ацетата).

Таким образом, при гетероферментативном молочнокислом брожении образуется больше продуктов: молочная кислота, уксусная кислота, этанол, двуокись углерода. Примеры гетероферментативных молочнокислых бактерий: *L. fermentum*, *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*. На молочнокислом брожении основано получение многих пищевых продуктов, а также производство силоса для нужд животноводства.

**Приготовление силоса.** Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при запасании впрок кормов для скота. Для приготовления силоса используют листья сахарной свеклы, кукурузу, картофель, травы и люцерну. Растительную массу прессуют и прибавляют к ней мелассу, чтобы повысить отношение C/N, муравьиную или какую-либо неорганическую кислоту, чтобы заранее обеспечить преимущественный рост лактобацилл и стрептококков. В таких условиях происходит контролируемое молочнокислое брожение.

**Приготовление кислой капусты.** Кислая капуста тоже представляет собой продукт, в приготовлении которого участвуют молочнокислые бактерии. В мелко нарезанной, посыпанной солью (2–3 %) и спрессованной белокочанной капусте при исключении доступа воздуха начинается молочнокислое брожение, в котором принимает участие сначала *Leuconostoc* (с образованием CO<sub>2</sub>), а позднее *Lactobacillus plantarum*. Молочные продукты. Молочнокислые бактерии, образующие кислоту и придающие продуктам определенный вкус, находят широкое применение в молочной промышленности. Стерилизованное или пастеризованное молоко или же сливки сбраживают, прибавляя в качестве закваски чистые («стартовые») культуры молочнокислых бактерий.

Йогурт получают из пастеризованного гомогенизированного цельного молока, инокулированного *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (после внесения закваски молоко выдерживают 2–3 ч при 43–45 °С).

Под названием биоурт в продажу поступает кислое молоко, сквашенное *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*. Закваску кефира готовят на так называемых «кефирных зернах», которые состоят из не полностью изученного сообщества организмов, включающего лактобациллы, стрептококки, микрококки и дрожжи.

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий впервые описаны И. И. Мечниковым. В настоящее время широко используется понятие «пробиотик» для

обозначения живых микроорганизмов (преимущественно молочнокислых бактерий), употребление которых с пищей в достаточных количествах оказывает благоприятное действие на здоровье. В составе пробиотических кисломолочных продуктов активно используются бифидобактерии.

Бифидобактерии – это облигатная и доминирующая часть кишечной микрофлоры здорового человека и теплокровных животных. Она проявляет антагонистическую активность по отношению к патогенным, условно-патогенным и нежелательным микроорганизмам в кишечнике.

В настоящее время идентифицировано 24 вида бифидобактерий (лат. bifidus – раздвоенный, расщепленный надвое), объединенных в род *Bifidobacterium*. Наиболее изученными видами бифидобактерий являются: *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum* и др. Типовой вид – *B. bifidum*. Морфология бифидобактерий.

Бифидобактерии представляют собой чрезвычайно переменные по форме палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные Y- или V-формы, булабовидные, лопатовидные. Клетки располагаются одиночно, парами, иногда цепочками или розетками, размер клеток 0,5–1,3×1,5–8 мкм. Грамположительные не образуют спор и капсул, неподвижные. Микроскопическая картина каждого вида бифидобактерий имеет особенности по размеру, форме и расположению клеток. При выращивании культур бифидобактерий на печеночном агаре или в молоке ветвление исчезает, клетки становятся грамвариабельными, слабее окрашиваются кислыми и щелочными красителями, появляется много гранулированных форм, которые иногда можно принять за кокки. Грануляция у бифидобактерий наблюдается также в средах с высоким содержанием сухих веществ. В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. У них не обнаружено казеолитической активности, то есть они могут усваивать казеин только после частичного гидролиза. В результате расщепления казеина образуются полипептиды, гликопептиды, аминокислоты, стимулирующие рост бифидобактерий. Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулируют экстракты дрожжей, гидролизованное молоко, а также увеличение соотношения – белок : лактоза.

## Ход работы

### Изучить состав микроорганизмов молочнокислых продуктов

Приготовить, окрасить и промикроскопировать мазки из молочнокислых продуктов.

На предметных стеклах приготовить тонкие препараты – мазки молочнокислых продуктов, подсушить их на воздухе, а затем нанести несколько раз смесь Никифорова. Последнюю порцию смеси оставить на препарате до высыхания. Фиксированные мазки окрасить метиленовой синью Леффлера в течение 3–5 мин, промыть водой, просушить фильтровальной бумагой и микроскопировать.

Для выявления микроорганизмов рода *Leuconostoc* провести исследование по методу Бурри–Гинса. Выявление капсулообразования по методу Бурри–Гинса (модифицированная):

1. На предметное стекло наносят каплю водного раствора фуксина, в которую с помощью стерильной петли вносят исследуемую культуру бактерий.

2. Рядом с первой каплей помещают каплю туши. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу слева от капель под углом 45°.

3. Продвигают шлифованное стекло вправо до соприкосновения с каплей.

4. Затем быстрым движением справа налево делают мазок. Капля должна быть небольшой и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1–1,5 см до

его края. Нельзя прекращать размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана.

5. Мазок высушивают на воздухе.

6. Микроскопируют. На темно-дымчатом фоне препарата видны розовые клетки микроорганизмов, окруженные бесцветной капсулой.

#### **Выявление молочной кислоты, образовавшейся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий путем качественной реакции Уффельмана**

В 2 пробирки внести по 10 мл 5 %-го раствора фенола и прибавить несколько капель слабого раствора хлорного железа. Получается интенсивно-синий раствор хлорного железа. От прибавления нескольких капель продукта, содержащего молочную кислоту, в пробирку № 1 раствор становится желтоватым, тогда как в пробирке № 2, куда вносятся несколько капель воды, окраска раствора не меняется.

#### **Исследование на наличие активности каталазы**

Для выявления активности каталазы на предметное стекло наносят каплю 5 %-го раствора перекиси водорода. В нее помещают бактериальной петлей каплю молочнокислого продукта и тщательно перемешивают. При наличии у микроорганизмов каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.