

Федеральное агентство по образованию
ГОУ ВПО «Уральский государственный технический университет – УПИ»



М.И. Токарева, И.С. Селезнева

БИОХИМИЯ

В 3 частях

Часть 3

Учебное электронное текстовое издание
Подготовлено кафедрой «Технология органического синтеза»
Научный редактор: доц., канд. хим. наук Е.А. Садчикова

Методические указания к лабораторному практикуму для студентов дневной формы обучения специальности 070100 – Биотехнология.

Методические указания предназначены для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Биохимия». В практикум включены лабораторные работы по методам качественного обнаружения липидов, нуклеопротеидов и гормонов в различных биологических материалах, а также по методам исследования минерального состава мочи и определения мочевой кислоты, кетонных тел и белка в моче. Данная работа представляет собой 3-ю часть методических указаний к лабораторному практикуму.

© ГОУ ВПО УГТУ–УПИ, 2005

Екатеринбург
2005

СОДЕРЖАНИЕ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8. ВИТАМИНЫ	3
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9. ФЕРМЕНТЫ	17
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10. АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	22
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	25

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 8

ВИТАМИНЫ

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, имеющие разнообразную химическую природу. Классификация витаминов основана на их растворимости. Различают витамины, растворимые в воде (витамины С, Р, группы В, РР), и витамины, растворимые в жирах (витамины А, Д, Е, К, F).

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

Полное отсутствие витаминов в пище приводит к развитию ряда тяжелых заболеваний (цинга, рахит, бери-бери, пеллагра и др.). Такое состояние называют авитаминозом. Недостаточное содержание витаминов в пище приводит к гиповитаминозам. Суточная потребность организма в витаминах резко возрастает при тиреотоксикозе, беременности, лактации, при интенсивной мышечной деятельности и при нарушении процесса всасывания витаминов в желудочно-кишечном тракте.

Витамины отличаются от других органических пищевых веществ следующими признаками: они не входят в состав структуры органов и тканей и не используются организмом в качестве источника энергии.

Для обнаружения витаминов в пищевых продуктах и биологических объектах используются качественные (цветные) реакции.

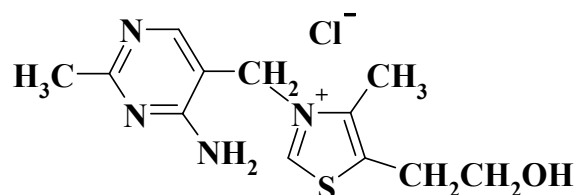
Результаты опытов следует представить в виде таблицы.

Таблица 8.1

Наименование витамина	Химическая структура витамина	Употребляемые реактивы	Получаемое окрашивание	Чем обусловлена реакция

8.1. ВИТАМИН В₁ (ТИАМИН, АНЕЙРИН)

Витамин В₁ (солянокислый) – бесцветные кристаллы в виде игл, растворимые в воде, спирте, кислотах, и нерастворимые в эфире и хлороформе. В кислой среде В₁ устойчив к действию высокой температуры, а в щелочной среде легко разрушается. Длительное время он сохраняется в сушеных овощах и фруктах. При В₁-авитаминозе развивается полиневрит (болезнь «бери-бери»). Это заболевание состоит в прогрессирующей дегенерации нервных окончаний и проводящих пучков, следствием чего являются потеря кожной чувствительности, нарушение нормальной моторики желудочно-кишечного тракта, сердечные боли и т. п.; в конце концов наступает паралич и смерть. Витамин В₁ содержит тиазольное и пиримидиновое кольца:



8.1.1. Диазореакция на витамин В₁

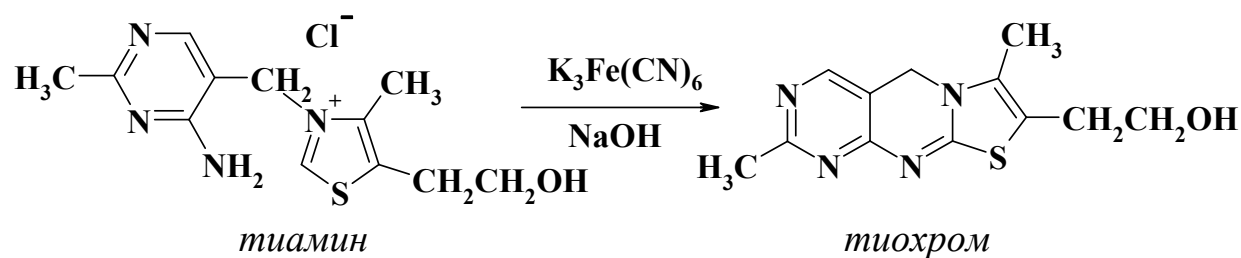
В основе этого метода обнаружения лежит способность тиамин образовать в щелочной среде с диазореактивом (диазосульфаниловой кислотой) комплекс оранжево-красного цвета.

Ход определения

Диазореактив готовят, сливая в пробирку по 5 капель 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты и 5 %-го раствора нитрита натрия. В эту же пробирку добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и затем по стенке наклоненной пробирки осторожно приливают 5–7 капель 10 %-го раствора карбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжево-красного цвета.

8.1.2. Реакция окисления витамина В₁ в тиохром

Витамин В₁ под действием железосинеродистого калия K₃Fe(CN)₆ окисляется в тиохром – пигмент желтого цвета:

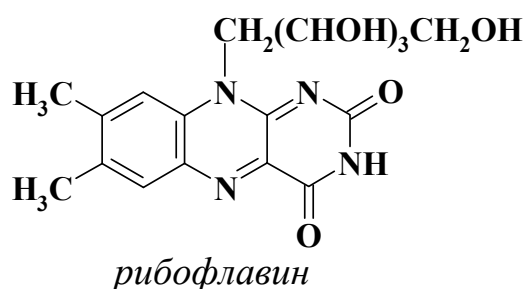


Ход определения

Одну каплю 5 %-го раствора тиамин (или 1–2 мг порошка) смешивают в пробирке с 5–10 каплями 10 %-го раствора гидроксида натрия и добавляют 1–2 капли 5 %-го раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. При нагревании смесь окрашивается в желтый цвет в результате окисления тиамин в тиохром, который в щелочном растворе при облучении ультрафиолетом обладает интенсивной флуоресценцией.

8.2. ВИТАМИН В₂ (РИБОФЛАВИН)

Витамин В₂ представляет собой производное изоаллоксазина, связанное с пятиатомным спиртом рибитолом:

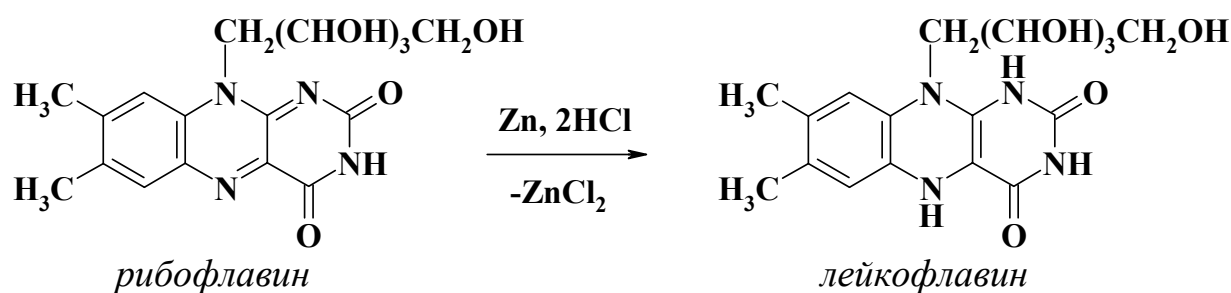


Его полное название: 6,7-диметил-9-D-рибитил-изоаллоксазин. Витамин В₂ мало растворим в воде и спиртах, нерастворим в других органических растворителях, хорошо растворим в растворах кислот и щелочей, кристаллизуется в виде желто-оранжевых игольчатых кристаллов горького вкуса. Насыщенные водные растворы рибофлавина окрашены в желто-зеленый цвет с характерной желто-зеленой флуоресценцией в видимом и в ультрафиолетовом свете. Рибофлавин не теряет биологической активности при нагревании до 120⁰С в течение нескольких часов. При действии восстановителей рибофлавин превращается в бесцветный и нефлуоресцирующий лейкофлавин.

При недостатке витамина В₂ у больных развивается дерматоз с поражением слизистой оболочки в уголках рта, в области носа и глаз, воспаление роговой оболочки и помутнение хрусталика (катаракта).

8.2.1. Реакция восстановления витамина В₂

Водород, образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте, восстанавливает рибофлавин через промежуточное соединение красного цвета (родофлавин) в бесцветный лейкофлавин:



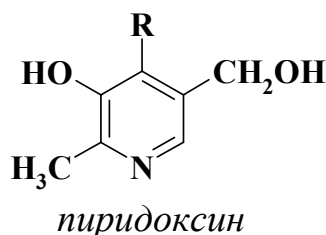
При этом желтая окраска раствора переходит в розовую, затем раствор обесцвечивается.

Ход определения

Наливают 10 капель взвеси рибофлавина в воде (0,025 %-й раствор) в пробирку, туда же добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, и раствор изменяет окраску из желтой в красную и розовую, а затем обесцвечивается и не флуоресцирует.

8.3. ВИТАМИН В₆ (ПИРИДОКСИН, АДЕРМИН)

Активностью витамина В₆ обладает группа веществ, производных пиридина и носящих общее название пиридоксин:



К ним относятся, отличающиеся только характером радикала в 4-м положении пиридинового цикла, пиридоксол (R = CH₂OH), пиридоксаль

(R = CHO) и пиридоксамин (R = CH₂NH₂). Свободные основания и гидрохлориды этих соединений представляют собой кристаллические порошки горьковатого вкуса, хорошо растворимые в воде, хуже – в спирте и нерастворимые в эфире и хлороформе. Лекарственная форма витамина В₆ – монохлоргидрат пиридоксола – растворим в воде и спирте, выдерживает нагревание в растворах минеральных кислот и щелочей, в нейтральной и щелочной средах легко разлагается на свету. Сильные окислители разрушают его.

Недостаточность витамина В₆ у человека встречается крайне редко, так как он широко распространен в продуктах питания. У животных авитаминоз В₆ проявляется отечной формой дерматита на мордочке, лапках и хвосте, а также гипохромной анемией и поражением нервной системы. Это вызвано нарушением обмена белков и липидов, что ведёт к нарушению кроветворения и развитию дерматитов, которые не лечатся никотиновой кислотой, а также к атеросклерозу.

8.3.1. Феррихлоридная проба на витамин В₆

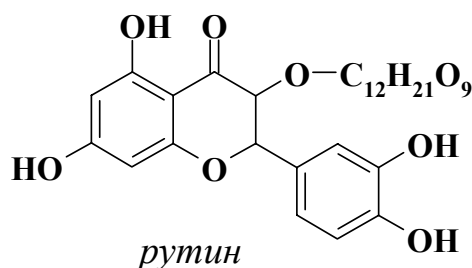
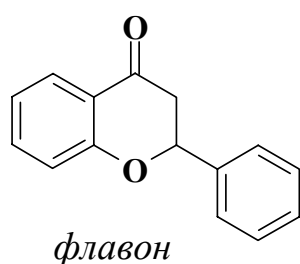
Бесцветный раствор витамина В₆ приобретает красную окраску в присутствии хлорного железа. Реакция обусловлена образованием комплексной соли красного цвета типа фенолята железа.

Ход определения

В пробирке смешивают 5 капель 5 %-го водного раствора витамина В₆ и 1 каплю 5 %-го раствора хлорного железа и встряхивают ее. Смесь окрашивается в красный цвет.

8.4. ВИТАМИН Р (РУТИН, ЦИТРИН)

Р-витаминной активностью обладают более десятка соединений, находящихся в растениях и близких по структуре. Они имеют скелет флавона и различаются различной степенью гидроксирования флавонового ядра, а также гликозидными группировками у 3-го углеродного атома пиранового цикла:



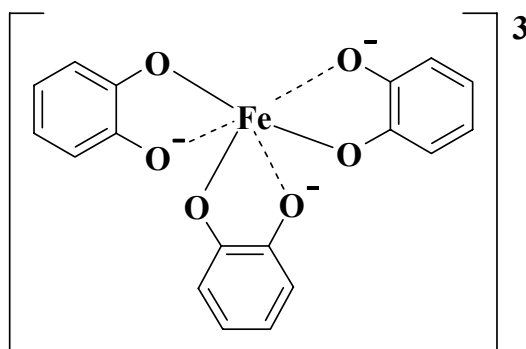
Препаратами витамина Р, имеющими практическое значение, являются:

- 1) **цитрин** (геспередин), выделяемый из кожуры citrusовых;
- 2) препарат, называемый «**витамин Р**», выделяемый из листьев чайного дерева;
- 3) **рутин** (гликозид кверцетина), получаемый из листьев гречихи.

Витамин Р содержится в тех продуктах, которые богаты витамином С. Высокое содержание витамина Р обнаружено в лимонах, венгерском перце, чае, черной смородине. Недостаток витамина Р в пище приводит к повышенной проницаемости капилляров, ломкости кровеносных сосудов. Авитаминоз Р обычно сопутствует авитаминозу С. Таким образом, цинга – полиавитаминоз С и Р, при котором такие клинические симптомы, как кровоизлияния в ткани, боль в конечностях, общая слабость и быстрая утомляемость являются прежде всего выражением авитаминоза Р. Действие витамина Р проявляется лишь в присутствии минимальных количеств витамина С.

8.4.1. Качественная реакция на рутин

Метод основан на взаимодействии рутина с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения зеленого цвета, имеющего следующее строение:

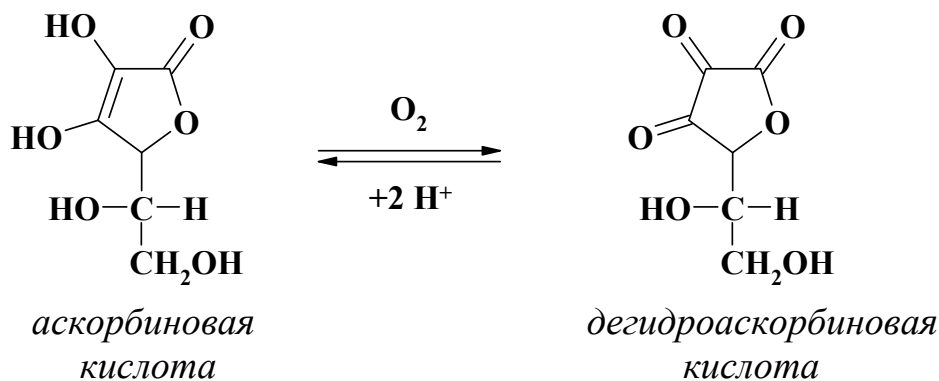


Ход определения

На аналитических весах берут навеску 100 мг чая, добавляют 15 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 3 минут. Дают остыть, отбирают в пробирку 1 мл жидкости и добавляют несколько кристалликов хлорида железа (III). Перемешивают и разбавляют в 2–3 раза дистиллированной водой. Наблюдают за появлением окрашивания.

8.5. ВИТАМИН С (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

Аскорбиновая кислота является лактоном ненасыщенной гексоновой кислоты. Наличие в ее молекуле двойной связи $C_2=C_3$ делает подвижными протоны гидроксильных групп у тех же атомов, что обуславливает кислый характер соединения с резко выраженной редуцирующей способностью. При окислении аскорбиновая кислота переходит в дегидроаскорбиновую кислоту:



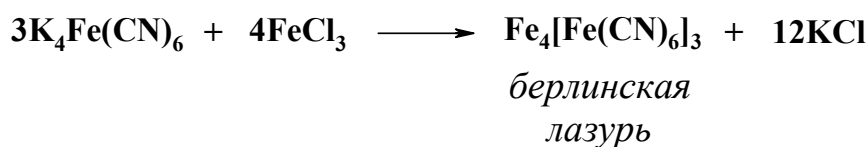
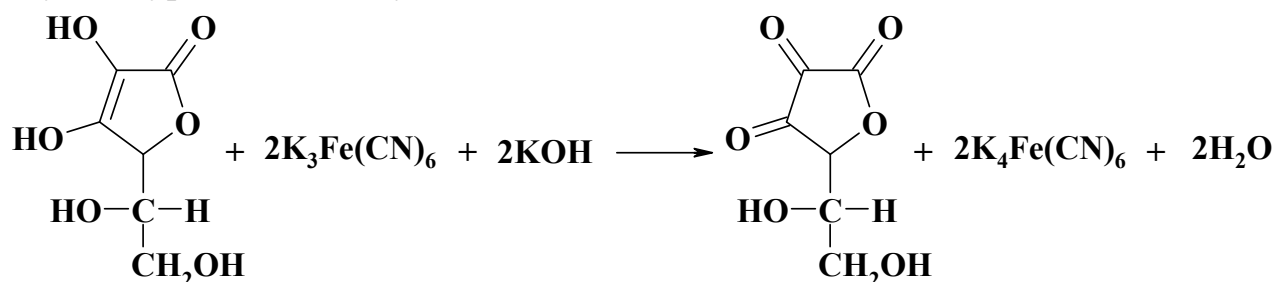
В чистом виде аскорбиновая кислота представляет собой бесцветные кристаллы без запаха, кислого вкуса, хорошо растворимые в воде и спирте, нерастворимые в органических растворителях. В кристаллическом виде аскорбиновая кислота устойчива, но в присутствии окислителей легко разрушается в водных и особенно в щелочных растворах, образуя щавелевую и треоновую кислоты:



Недостаточность аскорбиновой кислоты в пище вызывает у человека цингу, клинические симптомы которой проявляются сначала быстрой утомляемостью, анемией, головокружением. Затем появляются кровоточивость десен, склонность к кровоизлияниям в подкожную клетчатку, признаки нарушения сердечной деятельности, а также резкое снижение сопротивляемости организма инфекциям.

8.5.1. Восстановление феррицианида калия витамином С

Метод основан на том, что аскорбиновая кислота, содержащаяся в вытяжке из шиповника, восстанавливает железосинеродистый калий – $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в железистосинеродистый калий – $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Последний образует с хлорным железом плохо растворимую в воде соль железа (III) – берлинскую лазурь, выпадающую в виде темно-синего осадка.

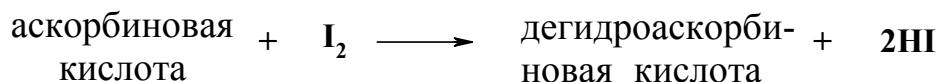


Ход определения

В каждую из двух пробирок вносят по 2–3 капли 5 %-го раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и 1 %-го раствора FeCl_3 , перемешивают. Жидкость приобретает бурую окраску. Затем в первую пробирку добавляют 5–10 капель 1 %-й вытяжки из шиповника, а во вторую – такое же количество дистиллированной воды. В первой пробирке жидкость окрашивается в зеленовато-синий цвет, и затем выпадает темно-синий осадок берлинской лазури, который при осторожном насаивании дистиллированной воды становится более отчетливым. Во второй пробирке жидкость не меняет окраски.

8.5.2. Йодная проба на витамин С

Раствор йода в KI при добавлении к нему вытяжки из шиповника обесцвечивается за счет восстановления молекулярного йода аскорбиновой кислотой и образования йодистоводородной кислоты:



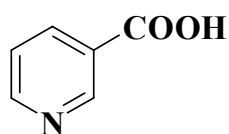
Ход определения

В 2 пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1–2 капли 0,1 %-го раствора йода в 0,2 %-м растворе KI . В одну пробирку добав-

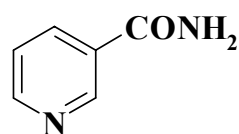
ляют на кончике шпателя порошок аскорбиновой кислоты, а в другую – несколько капель дистиллированной воды. В пробирке с вытяжкой из шиповника раствор йода обесцвечивается.

8.6. ВИТАМИН РР (ПРОТИВОПЕЛЛАГРИЧЕСКИЙ ВИТАМИН)

Противопеллагрической активностью обладают никотиновая кислота и ее амид, который встречается в природе в больших количествах. В чистом виде никотинамид – бесцветный, кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде, спирте и органических растворителях:



никотиновая кислота



никотинамид

При недостаточности витамина РР у человека развивается заболевание, известное под названием пеллагра (шершавая кожа). Она характеризуется поражением нервной системы в виде невритов и тяжелых нарушений психики; поражением кожи и слизистых оболочек в виде дерматита, стоматита; поражением желудочно-кишечного тракта, проявляющимся диареей.

8.6.1. Проба с медью на никотиновую кислоту

Никотиновая кислота при нагревании с раствором уксуснокислой меди (II) образует синий осадок плохо растворимой медной соли (никотинат меди).

Ход определения

Растворяют 10 мг никотиновой кислоты в 20 каплях 10 %-го раствора уксусной кислоты при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5 %-го раствора уксуснокислой меди (II).

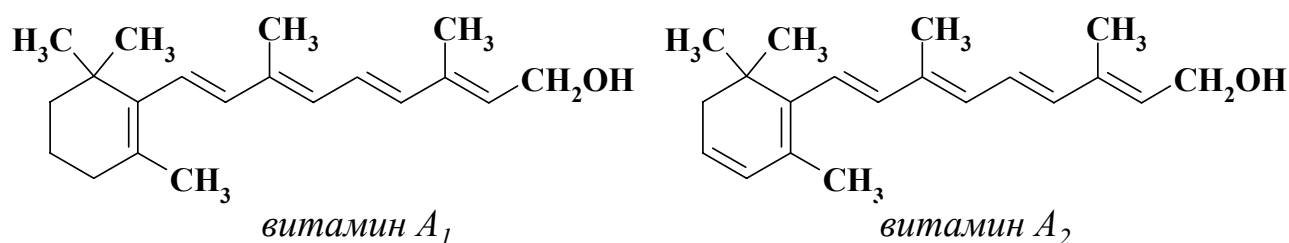
При постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

8.7. ВИТАМИН А (РЕТИНОЛ, АКСЕРОФТОЛ)

По химической природе витамин А является производным каротинов – желтых пигментов растений, относящимся к ненасыщенным углеводородам.

Он содержит β -иононовое кольцо и боковую цепь, в состав которой входят два остатка изопренов и первичная спиртовая группа, благодаря которой витамин А получил название ретинола.

В чистом виде витамин А представляет собой светло-желтые кристаллы, нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в жирах и некоторых органических растворителях. Масляные растворы витамин А устойчивы к окислению, однако в чистом виде и в других растворителях витамин А легко окисляется кислородом воздуха, теряя свою биологическую активность. В свежих продуктах он более стоек к нагреванию благодаря наличию в них антиокислителей. Изолированы два вида витамина А: A_1 – из печени морских рыб и A_2 – из печени пресноводных рыб. Из каротина, содержащегося в растениях и овощах, образуется витамин A_2 .



Основным клиническим проявлением авитаминоза А у детей является ксерофтальмия (поражение (сухость) роговой оболочки глаз), задержка роста. У взрослых одним из ранних симптомов авитаминоза А является снижение способности видеть и различать предметы в сумерках (гемералопия или куриная (ночная) слепота). Помимо этого, при авитаминозе А наблюдается общее снижение иммунобиологических защитных сил организма к инфекциям.

8.7.1. Проба Друммонда на ретинол

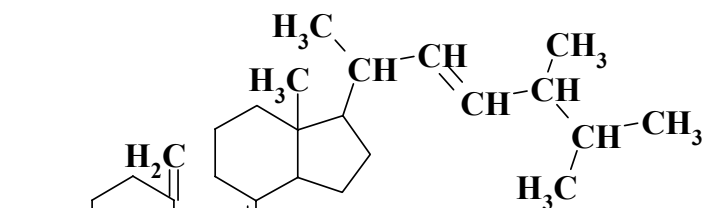
Метод основан на способности конц. H_2SO_4 дегидратировать ретинол с образованием окрашенных продуктов. При смешивании раствора рыбьего жира, содержащего витамин А, в хлороформе с конц. H_2SO_4 происходит окрашивание смеси в красно-бурый цвет.

Ход определения

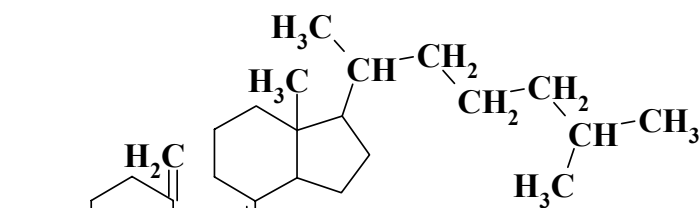
В сухой пробирке смешивают 2 капли рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и добавляют 1–2 капли конц. H_2SO_4 . Наблюдают изменения в окраске раствора.

8.8. ВИТАМИН D (КАЛЬЦИФЕРОЛ, АНТИРАХИТИЧЕСКИЙ)

D-витаминной активностью обладают несколько ненасыщенных стероидов, содержащих структуру циклопентанопергидрофенантрена. К ним относятся *эргокальциферол* (витамин D₂), получаемый из провитамина эргостерола облучением его УФ-лучами, и *холекальциферол* (витамин D₃), образующийся в коже животных из 7-дегидрохолестерина также при УФ-облучении:



витамин D₂ (эргокальциферол)



витамин D₃ (холекальциферол)

Оба витамина D в чистом виде представляют собой бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в жирах и органических растворителях. Витамины D устойчивы к действию щелочей, но минеральные кислоты, длительное воздействие кислорода воздуха и нагревание растворов витаминов до 200°C приводят к разрушению и потере их биологической активности.

При отсутствии или недостатке витамина D в пище у детей развивается рахит. У взрослых недостаточность витамина D проявляется в виде остеомаляции и остеопороза, которые возникают вследствие вымывания из костей солей кальция и фосфора.

8.8.1. Бромхлороформная проба на витамин D

Содержащий витамин D рыбий жир окрашивается в зелено-голубой цвет при смешивании его с раствором брома в хлороформе.

Ход определения

В сухой пробирке смешивают по две капли рыбьего жира и раствора брома в хлороформе. Наблюдают за изменением окраски.

8.8.2. Анилиновая проба на витамин D

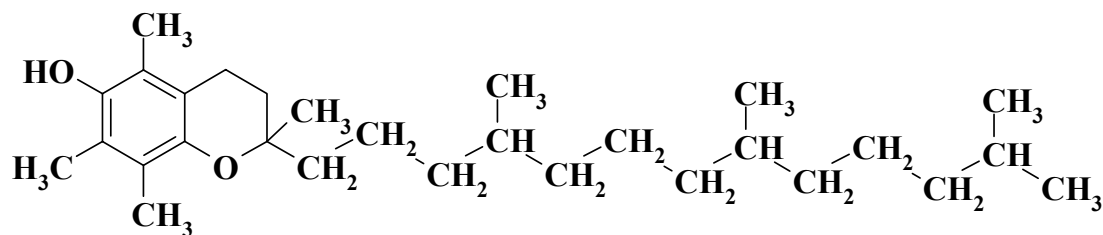
В основе метода лежит взаимодействие кальциферола с гидрохлоридом анилина с образованием окрашенных продуктов.

Ход определения

В сухой пробирке смешивают 5 капель рыбьего жира с 5–10 каплями хлороформа и затем добавляют при помешивании 5–10 капель анилинового реактива (15 частей + 1 часть концентрированной HCl). Содержимое пробирки осторожно при постоянном перемешивании нагревают до кипения и кипятят 30 секунд. В присутствии витамина D желтая эмульсия приобретает вначале грязно-зеленое, а затем буро-красное или красное окрашивание.

8.9. ВИТАМИН E (ТОКОФЕРОЛ, АНТИСТЕРИЛЬНЫЙ)

E-витаминной активностью обладает группа веществ (α -, β -, γ -, δ -токоферолы). Наиболее активен и широко распространен в природных источниках (растительных маслах) α -токоферол. Последний в своей молекуле содержит ядро хромана и изопреноидную боковую цепь:



α -токоферол

В виде эфира уксусной кислоты α -токоферол выделен как кристаллическое вещество, растворимое в жирах и органических растворителях. Токоферолы устойчивы к действию щелочей и кислот, при обычных условиях приготовления пищи не разрушаются, однако сильные окислители превращают их в биологически инертные соединения типа хинонов.

Витамин E влияет на репродуктивную функцию и обмен селена в организме, выполняет антиоксидантную роль, защищая мембраны от перекисного окисления липидов.

Гипо- и авитаминоз Е: у детей – гемолитическая желтуха, у взрослых – дегенеративные процессы в репродуктивных органах, выкидыши у беременных, жировая дегенерация печени и дистрофические изменения в скелетных мышцах.

Ход определения

В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1 %-го спиртового раствора витамина Е и 10 капель концентрированной HNO_3 и энергично встряхивают. На границе двух слоев расслоившейся эмульсии со временем появляется кольцо красного цвета.

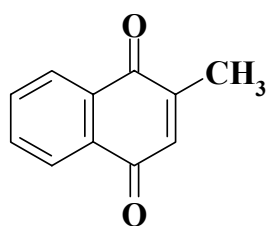
8.10. ВИТАМИН К (ФИЛЛОХИНОН, АНТИГЕМОМОРРАГИЧЕСКИЙ)

Биологической активностью витамина К обладает группа веществ, относящихся к нафтохинонам, в состав которых входит метилнафтохинон с боковой цепью из 4–5 остатков изопрена. Чистый препарат витамина K_1 – светло-желтое маслянистое флуоресцирующее вещество, кристаллизующееся в виде бесцветных пластинок при -20°C .

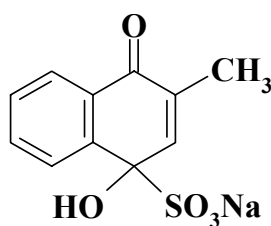
Витамин К растворим в органических растворителях, устойчив в растворах кислот и при нагревании в нейтральной среде до 120°C , в растворах щелочей инактивируется при 100°C , а также при действии УФ-лучей.

Недостаток в организме животных и человека витамина К приводит к замедления процесса свертывания крови в результате нарушения в печени синтеза протромбина и других факторов свертывания. Явления выраженного авитаминоза К могут возникать только у птиц, т. к. у человека и животных естественным источником витамина К является микрофлора кишечника. Однако на состояние микрофлоры может влиять множество факторов, что может приводить при некоторых патологических состояниях к явлениям гиповитаминоза К.

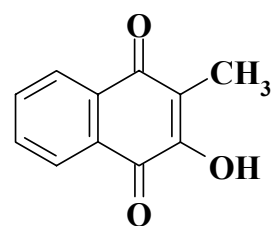
Высокой биологической активностью обладают синтетические аналоги витамина K_1 – метинон, викасол и др., применяемые в лечебной практике при кровотечениях. Преимуществом викасола и других препаратов является их хорошая растворимость в воде.



метионон



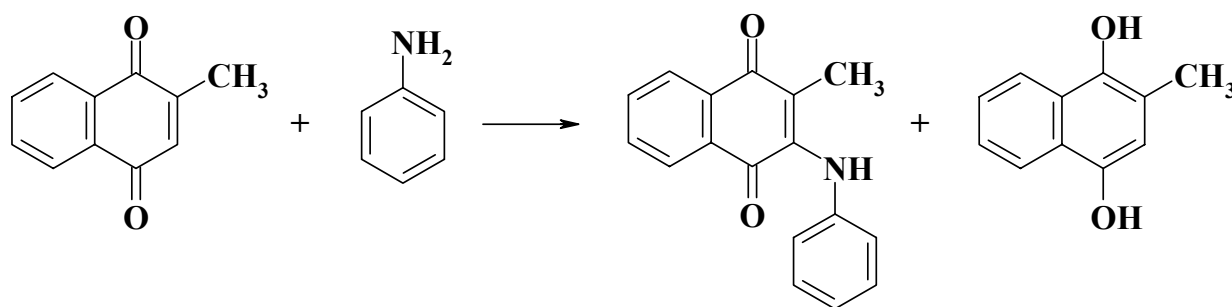
викасол



фтиокол

8.10.1. Качественная реакция на метионон

В основе метода лежит образование окрашенного 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинона при реакции метионона с анилином:



Ход определения

В пробирке смешивают 5 капель 0,26 %-го спиртового раствора метионона с 2 каплями анилина. Смесь окрашивается в красный цвет.

8.10.2. Качественная реакция на викасол

Раствор викасола в щелочной среде окрашивается в желто-оранжевый цвет при добавлении цистеина.

Ход определения

В пробирке смешивают по 5 капель 0,05 %-го раствора викасола и 0,025 %-го раствора цистеина. Добавляют 1 каплю 10 %-го раствора NaOH. Смесь окрашивается в желто-оранжевый цвет.

Практическое значение работы

Качественные реакции на витамины позволяют обнаружить их наличие в лекарственных препаратах и после экстракции в пищевых продуктах и лекарственных растениях. Принцип, положенный в основу качественных реакций на витамины, используется при разработке количественного определения их в различных природных объектах и лекарствах.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 9

ФЕРМЕНТЫ

Ферментами называются биологически активные катализаторы белковой природы, обеспечивающие многообразные превращения в организме. В основе действия ферментов лежит их способность взаимодействовать с субстратами с образованием комплекса. В результате этого происходит активация субстрата, который в дальнейшем вступает в реакции при значительно сниженной энергии активации с высокой скоростью.

9.1. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ

9.1.1. Ферментативный гидролиз крахмала

С помощью гидролиза изучают состав веществ. Гидролиз может быть кислотным, щелочным или ферментативным. В первых двух случаях процесс идет при повышенной температуре, а в последнем – при температуре тела человека.

В качестве фермента, гидролизующего крахмал на составные части (декстрины, мальтозу, глюкозу), выступает амилаза слюны. Оценка результатов опыта проводят с помощью цветных реакций: Троммера и иодокрахмальной. Негидролизованый крахмал дает синее окрашивание с I_2 (положительная реакция) и отрицательную реакцию Троммера, т. к. он не обладает восстанавливающей способностью. Продукты же гидролиза крахмала (мальтоза и глюкоза) не дают реакции с I_2 , но вступают в реакцию Троммера.

Ход определения

В две пробирки наливают по 10 капель 1 %-го раствора крахмала. В одну из них вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую – 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят в термостат на 15 минут при 37°C . Затем из первой пробирки дважды отбирают по 4 капли исследуемого вещества, которые вносят в две разные пробирки. В одну из них добавляют 1 каплю 1 %-го раствора I_2 в KI , а в другую – 1 каплю 5 %-го раствора $CuSO_4$ и 4 капли 10 %-го раствора $NaOH$ и осторожно нагревают до кипения. Отмечают результат. Аналогичную процедуру выполняют с содержимым второй пробирки и результаты опыта заносят в таблицу.

9.1.2. Ферментативный гидролиз белков

Опыт служит моделью переваривания белков пищи. Для опыта необходимы растворы яичного белка – пища, раствор пептидазы (можно использовать лекарственные препараты – фестал, панзинорм, панкреатин), фермент, насыщенный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – высаливающий агент (вещество, вызывающее выпадение белков в осадок).

Ход определения

В контрольную пробирку к 1 мл 10 %-го раствора белка приливают 1 мл дистиллированной воды. В опытную пробирку к 1 мл раствора белка приливают 1 мл раствора фермента. Ставят обе пробирки на 20–30 минут в теплую воду при температуре 30–37°C (идет процесс переваривания). Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония и по несколько кристаллов этой же соли. В первой пробирке наблюдается обильное выпадение осадка (белка). Во второй пробирке – осадок или вообще не образуется, или выпадает в незначительном количестве, так как белок гидролизовался (переварился).

9.2. СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Будучи по своей химической природе белками, ферменты обладают всеми свойствами белков: термолабильностью, амфотерностью, способностью образовывать коллоидные растворы и т. д. Кроме того, им присущи характерные только для них свойства: высокая специфичность, действие при определенном значении рН среды и др.

9.2.1. Влияние температуры на активность ферментов

Ферменты очень чувствительны к температуре и проявляют свою высшую активность при ее оптимальном значении, которое для ферментов человека находится в пределах 35–45°C. При повышении температуры более 50°C их активность падает, а затем наступает инактивация, т.к. при этом нарушается структура активного центра и не происходит его соединение с субстратом.

Ход определения

В две пробирки наливают по 10 капель 1 %-го раствора крахмала. Затем в одну добавляют 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в дру-

гую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 минут слюны (амилаза инактивирована). Пробирки встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 15 минут. После этого с содержимым каждой пробирки проделывают реакцию с I₂ и реакцию Троммера.

9.2.2. Влияние рН среды на активность фермента

Для каждого фермента существует оптимальное значение рН среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменения рН замедляют или полностью тормозят действие ферментов, т. к. происходит нарушение структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра).

Ход определения

В восемь пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку 1 вносят 1 мл 0,2 %-го раствора HCl, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку 2. Перемешивают и отбирают 1 мл, переносят в пробирку 3 и т. д. Из пробирки 8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом получают различные разведения HCl, которые соответствуют различным значениям рН среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1 %-го раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхивают и ставят в термостат на 15 мин. при 37°C, затем охлаждают и добавляют во все пробирки по 1 капле 1 %-го раствора I₂ в KI. Отмечают, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках 5 и 6, где рН = 6,8–7,2, т. е. оптимально для действия амилазы.

9.2.3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Различные вещества могут вызывать активирование действия ферментов (активаторы) или тормозить их активность (ингибиторы). Для амилазы активаторами являются анионы хлора, для липазы поджелудочной железы – желчные кислоты. Ингибиторами амилазы выступают ионы Cu²⁺, цитохромов (ферментов, участвующих в биологическом окислении) – цианиды и т. п. Токсичное действие ионов металлов (Cu, Pb, Ag, Co и т.д.) на живые организмы связано с их взаимодействием с белками с образованием комплексных

соединений. При этом структура белков разрушается, происходит их необратимая денатурация.

Ход определения

В первую пробирку вносят 1 каплю 3 %-го раствора NaCl, во вторую пробирку – 1 каплю 1 %-го раствора CuSO₄, а в третью – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1%-ного раствора крахмала и оставляют на 15–20 мин при 30°C. После этого вносят во все пробирки по 1 капле 1 %-го раствора I₂ в KI. По результатам наблюдений делают выводы об активирующей или ингибирующей способности исследуемых солей.

9.2.4. Белки как противоядие для ионов тяжелых металлов

Взаимодействие ионов металлов с белками лежит в основе использования молока как противоядия при отравлении тяжелыми металлами.

Ход определения

В опытную пробирку наливают по 1 мл раствора амилазы, 1 %-го раствора крахмала, 1 %-го раствора ацетата свинца (II) и молока. В контрольную пробирку наливают по 1 мл растворов амилазы, крахмала, ацетата свинца (II) и воды. Пробирки встряхивают и выдерживают 20 минут при температуре 30°C. Добавляют в обе пробирки по 1 капле 1 %-го йода. В обеих пробирках есть ионы Pb²⁺, инактивирующие амилазу. Но в присутствии молока активность амилазы сохраняется, о чем свидетельствует отсутствие синего окрашивания раствора при добавлении йода.

9.2.5. Воздействие формальдегида на активность амилазы

Формальдегид – высокореакционноспособное карбонильное соединение, способное реагировать с белками, разрушая их структуру. В этом заключается его токсическое действие на организм человека.

Ход определения

В опытную пробирку приливают по 1 мл растворов крахмала, амилазы и 5 %-го формальдегида. В контрольную пробирку приливают по 1 мл раствора крахмала, амилазы и воды. Выдерживают 20 минут при 30°C. Затем в обе пробирки добавляют по 1 капле 1 %-го раствора йода. Синее окрашивание в пробирке с формальдегидом свидетельствует об инактивации амилазы.

9.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

9.3.1. Обнаружение каталазы в пищевых продуктах

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



Ход определения

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

9.3.2. Обнаружение оксидоредуктазы в молоке

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

Ход определения

В первую пробирку наливают 5 капель свежего молока, во вторую – столько же кипяченого. Затем в обе пробирки добавляют по 3 капли формальдегида и по 3 капли 0,1 %-го спиртового раствора метиленовой сини. Обе пробирки нагревают на водяной бане при 70 °С. Наблюдают обесцвечивание раствора метиленовой сини только в одной из пробирок, в отчете укажите в какой и объясните причину.

9.3.3. Обнаружение тирозиназы в картофеле

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

Под влиянием тирозиназы тирозин окисляется до красного пигмента, а при дальнейшем окислении переходит в черный пигмент меланин. Превра-

щение красного пигмента в меланин может протекать и в отсутствии тирозиназы, достаточно действия кислорода воздуха.

Ход определения

Для получения ферментного препарата тирозиназы сырой картофель очищают от кожуры, верхние слои клубня в количестве 2,0–4,0 г нарезают на кусочки и в ступке растирают с 10 мл дистиллированной воды, фильтруют через два слоя марли.

В две пробирки отмеривают по 1 мл полученного фильтрата. Содержимое одной пробирки кипятят 1–2 мин. и охлаждают водопроводной водой. В обе пробирки добавляют по 1 мл 0,1 %-го раствора тирозина, содержимое пробирок перемешивают и помещают на водяную баню при 37–40°C. Периодически пробирки энергично встряхивают для лучшего соприкосновения с воздухом. Постепенно в одной пробирке под действием тирозиназы раствор темнеет за счет образования продуктов окисления типа меланинов черного цвета. В контрольной пробирке, в которой фермент инактивирован нагреванием, цвет жидкости не изменяется.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 10

АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

10.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Биуретовая реакция – универсальная реакция на все белки, так как в ходе ее образуются окрашенные координационные комплексные соединения ионов меди (II) с компонентами пептидных связей белков. Опыт проводят со следующими пищевыми продуктами: молоком, сметаной, кефиром, творогом, мукой (смесь с водой), любой крупой (размоченной или разваренной до кашеобразного состояния), замоченными дрожжами, желатиной.

Ход определения

К 0,5 мл 10 %-го раствора белка добавляют столько же 10 %-го раствора NaOH и 6–10 капель 1 %-го раствора CuSO₄. Голубая окраска раствора, свойственная солям меди (II), по мере образования комплексного соединения переходит в (в отчете указать окраску).

10.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛАКТОЗЫ В МОЛОКЕ

Для приготовления реактива Фелинга готовят два раствора. В мерной колбе вместимостью 1 л растворяют 200 г сегнетовой соли и 150 г NaOH в воде и доводят до метки. Во второй мерной колбе на 1 л растворяют в воде 40 г CuSO₄. Перед употреблением смешивают равные объемы этих растворов.

Ход определения

В пробирку наливают 2–3 мл молока, добавляют 10-12 капель уксусной кислоты для денатурации белка. Отфильтровывают сыворотку и к ней приливают 1–2 мл Фелинга. Встряхивают и нагревают. Наблюдают за изменением окраски верхней части раствора. Как объяснить наличие восстанавливающих свойств у лактозы?

10.3. ОБНАРУЖЕНИЕ КРАХМАЛА В ХЛЕБЕ, КАРТОФЕЛЕ, РИСЕ

Для обнаружения крахмала в белом хлебе, сыром картофеле и рисе на образцы этих продуктов наносят пипеткой одну каплю 1 %-го раствора йода в 2 %-м растворе KI. По появлению характерного темно-синего окрашивания судят о наличии крахмала в исследуемых образцах.

10.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ЭТАНОЛА В КЕФИРЕ, МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

Лактоза молока при гидролизе образует β-галактозу и β-глюкозу (в отчете запишите схему гидролиза). Глюкоза под влиянием ферментов дрожжей может сбраживаться – окисляться до этилового спирта и оксида углерода (IV):



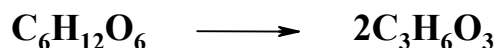
Ход определения

Для открытия этанола кефир и молочную сыворотку фильтруют. В пробирки наливают по 5 капель фильтрата кефира и молочной сыворотки и добавляют по 5 капель 10 %-го раствора гидроксида натрия, а также несколько капель 1 %-го раствора йода в 2 %-м йодиде калия. В присутствии этанола жидкость мутнеет, появляется запах йодоформа:



10.5. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

При хранении молока происходит накопление в нем молочной кислоты. Молочная кислота образуется в результате молочнокислого брожения глюкозы, образовавшейся при гидролизе лактозы, присутствующей в молоке:



Ход определения

Прокипятое молоко фильтруют. С помощью универсального индикатора определяют среду фильтрата. В чистую пробирку приливают 3–5 капли раствора фенола и 2–3 капли раствора хлорида железа (III). К образовавшемуся раствору фенолята железа (III) сине-фиолетового цвета добавляют по каплям полученный фильтрат кислого молока до изменения первоначальной окраски раствора.

10.6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДА

Мед – сложный пищевой продукт, углеводная часть которого представляет собой смесь продуктов гидролиза сахарозы и самой сахарозы. Зрелый мед должен содержать фруктозу и глюкозу. Поддельный мед содержит крахмал, муку, сахар и ряд других веществ.

Ход определения

Готовят раствор меда, добавив к нему равный объем дистиллированной воды, перемешивают. В четыре пробирки наливают по 5 капель меда. В первую пробирку для обнаружения карбонатов добавляют 2–3 капли раствора соляной кислоты, во вторую – 1–2 капли раствора йода для обнаружения крахмала, в третьей пробирке открывают глюкозу с помощью реакции Троммера (см. опыт 3.2.1 в работе № 3), в четвертой – фруктозу открывают реакцией Селиванова (см. опыт 3.2.3 в работе № 3). По результатам исследования делают вывод о наличии карбонатов, крахмала, глюкозы и фруктозы в исследуемом образце меда.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. М.В.Ермолаев, Л.П.Ильичева.– Биологическая химия, М.: Медицина, 1989. – 320 с.
2. Л.М.Пустовалова. – Практикум по биохимии, Ростов н/Д: Феникс, 1999. – 544 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т.Березова. – М.: Медицина, 1976. – 296 с.
4. Е.А.Строев, В.Г.Макарова, Практикум по биологической химии., М.: Высш. шк., 1986. – 232 с.

Учебное электронное текстовое издание

Токарева Мария Игоревна
Селезнева Ирина Станиславовна

БИОХИМИЯ В 3 ЧАСТЯХ
ЧАСТЬ 3

Редактор *Л.Д. Селедкова*
Компьютерная верстка *А.А. Шолina*

Рекомендовано РИС ГОУ ВПО УГТУ-УПИ
Разрешен к публикации 10.11.05.
Электронный формат – PDF
Формат 60x90 1/8

Издательство ГОУ-ВПО УГТУ-УПИ
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19
e-mail: sh@uchdep.ustu.ru

Информационный портал
ГОУ ВПО УГТУ-УПИ
<http://www.ustu.ru>