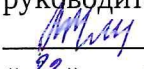


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАМЧАТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»)

НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР «ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ»

Кафедра «Экология и природопользование»

УТВЕРЖДАЮ
руководитель департамента ПБТ
 /В. Б. Чмыхалова/
«23» 10 2024 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«БИОХИМИЯ»

направление подготовки
19.03.04 «Технология и продукции и организация общественного питания»
(уровень бакалавриата)

направленность (профиль):
«Технология и продукции и организация общественного питания»

Петропавловск-Камчатский
2024

Рабочая программа по дисциплине «Биохимия» составлена на основании ФГОС ВО направления подготовки 19.03.04 «Технология и продукции и организация общественного питания»

Составитель рабочей программы:

Доцент кафедры ЭП, к.б.н. Саушкина Л.Н. Саушкина Л.Н.

Рабочая программа рассмотрена на заседании кафедры ЭП

«23» 10 2024 г., протокол № 5/1

И.о. заведующего кафедрой ЭП

«23» 10 2024 г., Авдощенко В.Г. Авдощенко В.Г.

1. Цели и задачи учебной дисциплины

Целью дисциплины является изучение химического состава живых систем, функционального значения веществ, составляющих живой организм, а также изменение этих веществ в процессе жизнедеятельности организмов.

В задачи данного курса входит:

- сформировать теоретические знания в области биологической химии, в особенности, биоорганических соединений;
- дать знания по химическому составу живых организмов и химических процессов, лежащих в основе их жизнедеятельности;
- выработать умения для успешного усвоения курсов технологии продуктов питания, теххимического контроля, общей микробиологии и микробиологии;
- научить технике проведения биохимического анализа;
- привить навыки экспериментальной работы, закрепить и углубить на практике полученные теоретические знания;
- способствовать развитию опыта самостоятельной научно-исследовательской работы, навыков наблюдения, обобщения и обработки экспериментальных данных;
- научить пользованию специальной биохимической литературой.

2. Требования к результатам освоения дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование общепрофессиональной компетенции:

- способен применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности (ОПК-2).

Планируемые результаты обучения при изучении дисциплины, соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы, представлены в таблице.

Таблица – Планируемые результаты обучения по дисциплине, соотнесенные с установленными в программе бакалавриата индикаторами достижения компетенций

Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения	Планируемый результат обучения по дисциплине	Код показателя освоения
ОПК-2	способен применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности	ИД-1_{ОПК-2} : Знает основные законы и закономерности математических, физических, химических и биологических наук и их взаимосвязи. ИД-2_{ОПК-2} : Умеет решать профессиональные задачи с применением основных законов математических, физических, химических и биологических наук.	Знать:	3(ОПК-2)1
			- химический состав живых организмов;	3(ОПК-2)2
			- строение и свойства белков, нуклеиновых кислот, липидов и углеводов;	3(ОПК-2)3
			- витамины и их значение;	3(ОПК-2)4
			- значение и свойства ферментов;	3(ОПК-2)5
			- основные закономерности протекания биохимических процессов в живых организмах;	3(ОПК-2)6
			- фотосинтез;	3(ОПК-2)7
			- процессы диссимиляции;	3(ОПК-2)8
			- ферментативные превращения углеводов;	3(ОПК-2)9
			- обмен азота;	3(ОПК-2)10
			- взаимосвязь процессов обмена веществ в организме;	3(ОПК-2)11
- строение, состав, роль мышечной, соединительной и жировой ткани в организме;				

Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения	Планируемый результат обучения по дисциплине	Код показателя освоения
			<ul style="list-style-type: none"> – биохимические основы учения о питании; – пищевую ценность сырья; – биохимические изменения белков, липидов, витаминов в ходе технологических процессов. 	<p>3(ОПК-2)12</p> <p>3(ОПК-2)13</p> <p>3(ОПК-2)14</p>
			<p>Уметь:</p> <ul style="list-style-type: none"> – применять полученные знания при изучении специальных дисциплин и при последующей самостоятельной работе на производстве; – проводить необходимые биохимические исследования продуктов питания; – использовать результаты биохимических исследований для определения химического состава сырья, используемого при производстве продуктов питания; – проводить оценку качества сырья и готовой продукции по биохимическим показателям; – применять полученные знания для рационального и безотходного использования сырья, его хранения, создание прогрессивных технологических схем его переработки; – оценивать возможность загрязнения окружающей среды вредными отходами производства. 	<p>У(ОПК-2)1</p> <p>У(ОПК-2)2</p> <p>У(ОПК-2)3</p> <p>У(ОПК-2)4</p> <p>У(ОПК-2)5</p> <p>У(ОПК-2)6</p>
			<p>Владеть:</p> <ul style="list-style-type: none"> – навыками работы с едкими веществами и другими химическими соединениями; – навыками проведения биохимических исследований; – навыками составления отчета о проделанной работе. 	<p>В(ОПК-2)1</p> <p>В(ОПК-2)2</p> <p>В(ОПК-2)3</p>

3 Место дисциплины в структуре образовательной программы

Учебная дисциплина «Биохимия» является дисциплиной обязательной части в структуре образовательной программы.

4. Содержание дисциплины

4.1 Тематический план дисциплины

Очная форма обучения

Наименование разделов и тем	Всего	Аудит	Контактная работа по видам учебных занятий	Самос	Формы текущ	Итого вый

	часов	орные занятия	Лекции	Практические занятия	Лабораторные работы	тоятельная работа	его контроля	контроль знаний по дисциплине
Раздел 1. Статическая биохимия	54	40	16	–	24	14	Тест	
Тема 1: Химический состав живых организмов	11	4	2	–	4	7	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Тема 2: Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах	41	34	14	–	20	7	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы	
Раздел 2. Динамическая и функциональная биохимия	54	40	16	–	24	14	Тест	
Тема 3: Обмен веществ и энергии	25	20	10	–	10	5	Опрос, выполнение и защита лабораторной работы, выполнение практических заданий	
Тема 4: Функциональная биохимия	16	11	4	–	7	5	Опрос	
Тема 5: Биологическая ценность пищевого сырья	13	9	2	–	7	4	Опрос	
Экзамен	36							36
Всего	144	80	32	–	48	28		

4.2 Содержание дисциплины

Раздел 1. Статическая биохимия

Тема 1. Химический состав живых организмов

Лекция

Предмет и задачи курса биологической химии. Биохимия – наука о химическом составе живой материи и химических процессах, лежащих в основе жизненных явлений. Биохимия как часть биологии – комплекса наук, изучающих живую природу. Рабочие направления в биохимии. Общая биохимия. Статическая, динамическая и функциональная биохимия.

Химические элементы, входящие в состав живых организмов. Органогены. Строение, состав клетки, как структурной единицы живого

Основные понятия темы: биологическая химия, статическая биохимия, динамическая биохимия, функциональная биохимия, органогены, клетка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма с органоидами, ядро, эндоплазматическая сеть, рибосомы, митохондрии и пластиды, комплекс Гольджи и лизосомы, клеточный центр, клеточные включения, органоиды движения клеток.

Вопросы для самоконтроля:

1. Назовите предмет и задачи биологической химии.
2. С какими науками связано развитие биологической химии?
3. Что является предметом статической, динамической и функциональной биохимии?
4. Какие химические элементы входят в состав живых организмов?
5. Перечислите основные компоненты клетки.
6. Какие химические вещества входят в состав ядра?
7. Какие биохимические процессы протекают в митохондриях?
8. Назовите роль эндоплазматического ретикулума в клетке?
9. Какова функция рибосом?
10. Опишите строение лизосом и их функции.

Лабораторные работы

Лабораторная работа. Введение в лабораторный практикум. Техника безопасности в биохимической лаборатории.

Литература: [1], [2], [4]

Тема 2. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах

Лекция

Белки. Содержание в органах и тканях живых организмов. Структуры белковых молекул. Глобулярные и фибриллярные белки. Физико-химические свойства белков. Растворимость и осаждение белков. Амфотерность и изоэлектрическая точка белков. Высаливание и денатурация, разделение и очистка белков. Номенклатура и классификация белков. Простые и сложные белки. Состав и строение, биологическая роль.

Лекция

Липиды. Общая характеристика, роль в живых организмах. Классификация липидов. Простые липиды. Триацилглицерины (нейтральные жиры). Содержание жиров в тканях. Состав природных жиров. Физико-химические свойства жиров. Воска, основные представители и их характеристика. Сложные липиды. Фосфолипиды, основные представители и их характеристика. Гликолипиды, основные представители и их характеристика. Липопротеиды. Стероиды. Стерины и стериды, основные представители и их характеристика.

Лекция

Углеводы. Общая характеристика, роль в живых организмах. Классификация углеводов. Моносахариды, строение, основные представители. Олигосахариды. Дисахариды, основные представители, их состав, строение. Полисахариды. Гомополисахариды, их строение и важнейшие представители. Гетерополисахариды, их строение и важнейшие представители.

Лекция

Ферменты. Общее понятие о ферментах. Простетические группы, коферменты. Механизм ферментативного катализа. Свойства ферментов как биологических катализаторов. Номенклатура и классификация ферментов. Классы ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Их представители и роль в обмене веществ. Локализация в живой клетке.

Лекция

Нуклеиновые кислоты. Состав, элементарное строение и типы нуклеиновых кислот. Первичная структура ДНК и РНК. Вторичная структура ДНК и РНК. Третичная структура ДНК и РНК. Нуклеопротеины.

Лекция

Витамины. Общая характеристика витаминов и их биологическая роль. Источники витаминов. Провитамины. Классификация витаминов. Водо- и жирорастворимые витамины, их биологическая роль. Потребность в витаминах. Витамины в тканях животных и растений. Витаминоподобные вещества.

Лекция

Вода и минеральные вещества. Содержание воды в живых организмах. Понятие о формах связи воды в тканях, биологическая роль воды. Содержание и роль минеральных веществ в живых организмах. Макро- и микроэлементы.

Основные понятия темы: белки, аминокислоты, первичная структура белка, пептидная связь, вторичная структура белка, α -спираль, β -структура, третичная структура белка, глобулярные белки, фибриллярные белки, четвертичная структура белковой молекулы, простые белки, сложные белки, простетическая группа, гидратация белковой молекулы, изоэлектрическая точка белка, высаливание белков, денатурация белков, липиды, простые липиды, триацилглицерины, воска, сложные липиды, фосфолипиды, гликолипиды, липопротеиды, стероиды, стеринны и стериды, моносахариды, олигосахариды, дисахариды, полисахариды, гомополисахариды, гетерополисахариды, ферменты, коферменты, ферментативный катализ, термолабильность ферментов, температурный оптимум, pH-оптимум, абсолютная и относительная специфичность ферментов, активирование и ингибирование ферментов, оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы, нуклеиновые кислоты, азотистые основания, пиримидиновые и пуриновые основания, нуклеозиды, нуклеотиды, ДНК, РНК, транспортные РНК, рибосомные РНК, матричные РНК, вирусные РНК, первичная структура ДНК и РНК, правила Чаргаффа, комплементарность, вторичная структура ДНК и РНК, антикодон, третичная структура ДНК и РНК, нуклеосома, нуклеопротеины, витамины, провитамины, водо- и жирорастворимые витамины, суточная потребность в витаминах, витаминоподобные вещества, макро- и микроэлементы в живых организмах.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дайте определение белкам как химическим соединениям. Охарактеризуйте их химический состав, молекулярную массу, форму молекул.
2. Дайте характеристику аминокислотного состава белков. Как классифицируют аминокислоты в зависимости от строения радикала? Какова природа пептидной связи в белках?
3. Охарактеризуйте первичную структуру белка. Почему изменения в первичной структуре отражаются на биологических свойствах белков?
4. Охарактеризуйте вторичную структуру белков. Чем отличается α -спираль от β -структуры? Какова роль слабых взаимодействий в стабилизации вторичной структуры?
5. Опишите третичную структуру белковой молекулы. Охарактеризуйте типы связей в третичной структуре.
6. В чем заключаются особенности четвертичной структуры белков? Какие связи реализуются между субъединицами? Приведите примеры белков с изученной четвертичной структурой.
7. Опишите физико-химические свойства белков. Чем отличается процесс осаждения белков от денатурации?
8. Каким образом заряд белковой молекулы в растворе зависит от показателя pH среды? Дайте определение понятия «изоэлектрическая точка белков».
9. Какие признаки лежат в основе классификации белков?
10. Охарактеризуйте важнейшие группы белков.
11. В чем заключаются особенности строения и свойства ферментов как биокатализаторов?
12. Чем отличаются простые и сложные ферменты?
13. Охарактеризуйте функциональные центры в молекуле фермента.
14. Как влияют на активность ферментов температура и показатель pH среды?
15. Охарактеризуйте специфичность действия ферментов, влияние ингибиторов, ионов металлов на активность ферментов. Приведите примеры.
16. Какие принципы лежат в основе современной номенклатуры и классификации ферментов? Назовите классы ферментов.
17. Что называют витаминами? Как их классифицируют?
18. Каково значение витаминов в метаболизме в живого организма?

19. Каково химическое строение, суточная потребность и биологическая роль витаминов, растворимых в жирах?
20. Каково химическое строение, суточная потребность и биологическая роль витаминов, растворимых в воде?
21. Что называют углеводами? Как их классифицируют?
22. Каковы функции углеводов в живых организмах?
23. Чем отличаются альдозы от кетоз? Приведите примеры.
24. Охарактеризуйте структуру, строение и свойства основных олигосахаридов.
25. Охарактеризуйте структуру, строение и свойства гомо- и гетерополисахаридов.
26. Дайте определение понятию «липиды». Как классифицируют липиды?
27. Охарактеризуйте структуру и роль различных липидов в организме.
28. Охарактеризуйте нуклеиновые кислоты и их функции в организме.
29. Опишите обязательные азотистые (пуриновые пиримидиновые) основания в составе ДНК и РНК, их способность к кето-енольной таутомерии и образованию водородных связей. Дайте определение минорным основаниям.
30. Что такое нуклеозиды и нуклеотиды? Охарактеризуйте межнуклеотидную связь.
31. Перечислите виды рибонуклеиновых кислот и их функции в клетке.
32. Охарактеризуйте первичную структуру ДНК и РНК на примере мРНК.
33. Рассмотрите вторичную структуру ДНК, перечислите параметры двойной спирали. В чем заключается принцип комплементарности как он реализуется во вторичной структуре ДНК и РНК? Опишите вторичную структуру РНК на примере тРНК.
34. Опишите третичную структуру нуклеиновых кислот на примере тРНК и суперсперализации ДНК в составе хроматина. Дайте определение понятию «нуклеосома». Каково ее строение?
35. Как связаны между собой белки и нуклеиновые кислоты в составе нуклеопротеинов? Какова роль белков в этих комплексах?
36. Каково содержание и роль воды в живых организмах?
37. Охарактеризуйте содержание и роль минеральных веществ в живых организмах.
38. Какие вещества в живых организмах относятся к макро- и микроэлементам?

Лабораторные работы

Лабораторная работа. Качественные реакции на белки

Лабораторная работа. Физико-химические свойства белков

Лабораторная работа. Ферменты

Лабораторная работа. Витамины

Лабораторная работа. Липиды. Определение насыщенности жиров

Литература: [1], [2], [4]

Раздел 2. Динамическая и функциональная биохимия

Тема 3. Обмен веществ и энергии

Лекция

Процессы диссимиляции. Основы химической термодинамики. Распад веществ в процессе метаболизма. Процессы распада и энергетический обмен. Энергетические эффекты биохимических реакций. Энтропия и ее изменения при биохимических реакциях. Энергия Гиббса, энергия Гельмгольца и направленность биохимических реакций.

Биологическое окисление. Основной и промежуточный обмен. Роль АТФ в биоэнергетике организма. Современные представления о механизме биологического окисления. Образование воды и углекислого газа. Дыхательная цепь. Окислительное и субстратное фосфорилирование.

Лекция

Обмен углеводов. Анаэробный распад углеводов в тканях. Гликолиз. Гликогенолиз. Молочнокислое и спиртовое брожение. Аэробный распад углеводов. ЦТК. Энергетический баланс анаэробного и аэробного распада углеводов. Образование АТФ, ферментативное

превращение углеводов. Фотосинтез углеводов в растениях.

Лекция

Обмен липидов. Переваривание и всасывание липидов в ЖКТ. Распад липидов в тканях. Окисление глицерина. Механизм окисления жирных кислот. Образование и использование ацетилкоэнзима. Энергетический эффект окисления жиров. Понятие о биосинтезе глицерина и жирных кислот. Синтез простых и сложных липидов.

Лекция

Обмен белков. Переваривание и всасывание продуктов гидролиза в ЖКТ. Промежуточный обмен белков и аминокислот. Деаминирование, декарбоксилирование, переаминирование аминокислот. Биосинтез белка. Конечные продукты обмена белков. Биосинтез мочевины. Регуляция обмена белков. Обмен азота у растений. Взаимосвязь между обменом белков, углеводов, жиров и других веществ. Единство процессов обмена веществ и энергии в организме. Общность продуктов окисления и выработки АТФ.

Основные понятия темы: анаболизм, катаболизм, энтропия, энергия Гиббса, энергия Гельмгольца, направленность биохимических реакций, макроэргические связи (вещества), АТФ, АДФ, фосфорилирование, биологическое окисление, свободное окисление, сопряженное окисление, окислительное фосфорилирование на уровне субстрата, окислительное фосфорилирование на уровне дыхательной цепи ферментов, гидролиз сахаридов, фосфолиз, дихотомический путь распада, молочнокислое брожение, гликолиз, гликогенолиз, спиртовое брожение, цикл Кребса, тканевое дыхание, апопомический путь распада, световые реакции фотосинтеза, темновые реакции фотосинтеза, β -окисление высших жирных кислот, перекисное окисление липидов, синтаза (синтетазы) высших жирных кислот, ацилпереносящий белок, гидролиз белков, деаминирование аминокислот, переаминирование аминокислот, декарбоксилирование аминокислот, аминокислоты, матричная теория биосинтеза белка, транскрипция, активация, трансляция, кодоны, кодирование, антикодон, рибосомы, полисома, оперон, репрессор, амплификация.

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем заключается обмен веществ? Чем отличается анаболизм от катаболизма?
2. Докажите, что обмен веществ тесно связан с обменом энергии.
3. Какова структура АТФ и ее роль в обмене энергии? Какая связь называется макроэргической?
4. В чем отличие свободного окисления от окисления, сопряженного с фосфорилированием?
5. Какие виды окислительного фосфорилирования реализуются в организме? Каковы их механизмы и биологическое значение?
6. Опишите строение дыхательной цепи ферментов митохондрий.
7. Охарактеризуйте этапы и ферменты распада поли- и олигосахаридов до моносахаридов. В чем различие процессов гидролиза и фосфолиза?
8. Опишите основные этапы дихотомического распада глюкозы в анаэробных и аэробных условиях. Назовите ключевые соединения.
9. В чем отличие дыхания от гликолиза и спиртового брожения?
10. Охарактеризуйте цикл Кребса. Какова его роль в жизнедеятельности организмов?
11. В чем отличие дихотомического распада углеводов от апопомического? Сравните энергетическую эффективность распада углеводов в аэробных и анаэробных условиях.
12. Чем различаются процессы синтеза углеводов у автотрофов и гетеротрофов? Опишите световые и темновые реакции фотосинтеза.
13. Опишите гликозилтрансферазные реакции в процессе биосинтеза олиго- и полисахаридов.
14. Опишите основные этапы гидролитического распада жиров с последующим окислением глицерина и β -окислением высших жирных кислот. Обоснуйте более высокую энергетическую эффективность распада жиров по сравнению с распадом углеводов.
15. Посредством каких реакций осуществляется биосинтез триглицеридов?

16. Рассмотрите строение и отдельные стадии участия мультиферментного комплекса – синтазы высших жирных кислот– в синтезе жиров.
17. Как образуется малонил-коэнзим А и какова его роль в биосинтезе высших жирных кислот?
18. Охарактеризуйте особенности структуры и роль ацилпереносящего белков в функционировании синтазы высших жирных кислот.
19. Почему белковый обмен занимает центральное место в организме?
20. Охарактеризуйте этапы распада белков до аминокислот. Какие ферменты принимают участие в процессах распада белков?
21. Перечислите конечные продукты обмена белков.
22. Какие три типа превращений происходят при обмене аминокислот? Приведите примеры.
23. Каким образом происходит биосинтез аминокислот? В чем особенности биосинтеза аминокислот в растениях и у животных? Чем определяется биологическая ценность белков? Охарактеризуйте заменимые и незаменимые аминокислоты.
24. Каково строение и биологическое значение рибосом? В чем заключается роль полисом?
25. Охарактеризуйте строение т РНК в связи с участием в биосинтезе белка. Что такое антикодонавая петля и акцепторный конец? Какова роль изоакцепторных тРНК?
26. Перечислите условия, необходимые для биосинтеза белка в соответствии с матричной схемой синтеза.
27. Опишите роль аминоацил-тРНК-синтетаз в подготовке аминокислот к белковому синтезу. Рассмотрите реакции активирования аминокислот при участии АТФ и последующие реакции кодирования при участии тРНК. Каков биологический смысл подготовительных реакций аминокислот к их участию в биосинтезе белка на рибосоме?
28. Рассмотрите отдельные реакции трансляции при участии белковых факторов. Какое значение имеют аминокислотный и пептидилный центры рибосом? В чем заключается реакция транспептидирования?
29. Охарактеризуйте кодирующую роль мРНК в белковом синтезе. Опишите свойства биологического кода.
30. В чем биологический смысл взаимосвязи процессов обмена веществ в организме?
31. Приведите примеры путей превращения глюкозы в жиры и белки.
32. Назовите ключевые соединения при превращении углеводов в белки и обратно; жиров – в углеводы; углеводов – в нуклеиновые кислоты.
33. Охарактеризуйте виды взаимосвязей в обмене основных биополимеров.
34. Какова роль цикла Кребса во взаимосвязи процессов обмена важнейших классов биополимеров?
35. Опишите механизм оперонной регуляции синтеза белков.
36. В чем особенности влияния гормонов на обмен веществ?

Лабораторные работы

Лабораторная работа. Нуклеопротеиды

Лабораторная работа. Количественное определение пировиноградной кислоты

Литература: [1], [2], [4]

Тема 4. Функциональная биохимия

Лекция

Мышечная ткань. Строение, состав, роль мышечной ткани в организме. Важнейшие белки мышц: миозин, актин, миоген, актомиозин и др. Углеводы, липиды, минеральные, экстрактивные вещества мышечной ткани. Биохимическая сущность процессов сокращения и расслабления мышц. Посмертные изменения мышечной ткани. Автолиз. Азотистые экстрактивные вещества мышечной ткани. Значение для характеристики сырья.

Лекция

Соединительная ткань. Роль, строение, химический состав. Белки соединительной ткани. Их строение, свойства, биохимическая роль. Углеводы соединительной ткани. Автолитические превращения соединительной ткани. Роль, строение, состав костной и хрящевой ткани. Жировая ткань. Роль, распределение, химический состав жировой ткани организмов. Гидролитический и окислительный процесс в жировой ткани. Виды порчи жиров. Предотвращение порчи жиров. Антиокислители.

Основные понятия темы: мышцы, мышечная ткань, миоциты, миосимпласт, миофибриллы, сарколемма, саркоплазма, ядра, миозин, актин, саркомер, тропомиозин, тропонин, актомиозин, миоген, миоглобин, механизм сокращения мышцы, азотистые и безазотистые экстрактивные вещества, автолиз, соединительная ткань, плотная и рыхлая соединительные ткани, коллагеновые волокна, эластиновые волокна, клетка, ядро, коллаген, эластин, ретикулин, мукопротеиды (муцины, мукоиды), альбумины и глобулины, мукополисахариды, гиалуроновая и хондроитинсерная кислоты, хрящевая ткань, межклеточное пространство, клетка, ядро, гиалиновый хрящ, волокнистый хрящ, эластичный хрящ, костная ткань, остециты, ядро, межклеточное вещество, коллагеновые волокна, оссеин, фосфаты кальция, жировая ткань, жировая клетка, жировая капля, протоплазма, ядро, волокна межклеточного вещества, тристеарин, трипальмитин, триолеин, липоиды, фосфатиды, стерины, стероиды, порча жиров, гидролиз жиров, окисление жиров, свободный радикал, перекисное число, прогоркание и осаливание жиров, антиокислители (каротин, лецитин, кефалин, аскорбиновая, лимонная, молочная кислоты и др.)

Вопросы для самоконтроля:

1. Охарактеризуйте строение и состав мышечной ткани.
2. Какова роль мышечной ткани в организме?
3. Дайте характеристику важнейшим белкам мышц.
4. Опишите механизм сокращения и расслабления мышц.
5. Что относится к азотистым экстрактивным веществам мышц? Каково их значение для характеристики сырья?
6. Перечислите безазотистые экстрактивные вещества мышц.
7. Какие виды соединительной ткани существуют?
8. Опишите строение и состав соединительной ткани.
9. Охарактеризуйте строение, свойства и биохимическую роль белков и углеводов в соединительной ткани.
10. Опишите строение, состав и роль хрящевой ткани.
11. Охарактеризуйте строение, состав и роль костной ткани.
12. Каково строение и химический состав жировой ткани?
13. Опишите гидролитический и окислительный процесс в жировой ткани.
14. Назовите виды порчи жиров. Как предотвратить порчу жиров?
15. На какие две группы делятся антиокислители? Перечислите основные антиокислители жиров.

Литература: [1], [3], [4]

Тема 5. Биологическая ценность пищевого сырья

Лекция

Биохимические основы учения о питании. Пищевая ценность сырья и биохимические основы технологических процессов его обработки. Пищевое значение белка. Баланс азота. Биологическая ценность белков. Сбалансированное питание. Нормы потребления белка. Роль мясной, рыбной и растительной пищи в пищевом балансе населения страны. Особенности химического состава мясного, рыбного и растительного сырья. Пищевое значение органов и тканей животных и растений. Биохимические изменения белков, липидов, витаминов в ходе технологических процессов.

Основные понятия темы: пищевая ценность, энергетическая ценность, биологическая ценность, азотистое равновесие, сбалансированное питание, нормы потребления, гидратация и

денатурация белков, гидролитическое расщепление жиров, окислительные изменения жиров, разрушение витаминов.

Вопросы для самоконтроля:

1. Чем определяется пищевая ценность сырья?
2. В чем состоит пищевая ценность белков?
3. Что такое положительный и отрицательный баланс азота?
4. Каковы нормы потребления белка для человека?
5. Чем определяется биологическая ценность белков?
6. Охарактеризуйте основы сбалансированного питания.
7. Опишите особенности химического состава мясного, рыбного и растительного сырья.
8. Каково пищевое значение органов и тканей животных и растений?
9. Каким биохимическим изменениям подвергаются белки в ходе технологических процессов?
10. Что происходит с липидами и витаминами в ходе переработки сырья?

Литература: [1], [3], [4]

5 Учебно-методическое обеспечение для самостоятельной работы обучающихся

5.1. Внеаудиторная самостоятельная работа студентов

В целом внеаудиторная самостоятельная работа студента при изучении курса включает в себя следующие виды работ:

- проработка (изучение) материалов лекций;
- чтение и проработка рекомендованной основной и дополнительной литературы;
- подготовка к лабораторным занятиям;
- поиск и проработка материалов из Интернет-ресурсов, научных публикаций;
- подготовка к защите лабораторных работ;
- подготовка к текущему и итоговому (промежуточная аттестация) контролю знаний по дисциплине.

Основная доля самостоятельной работы студентов приходится на подготовку к лабораторным работам и их защите, тематика которых полностью охватывает содержание курса. Самостоятельная работа по подготовке к лабораторным работам и их защите предполагает умение работать с первичной информацией.

Самостоятельная работа по разделу 1:

Работа с конспектом лекций и рекомендованной литературой (основная и дополнительная).

Подготовка материалов к контрольному опросу по изученным темам, лабораторным занятиям, тестовым проверкам знаний, защите лабораторных работ, диалогам с преподавателем и участниками проверки знаний первого раздела дисциплины.

Самостоятельная работа по разделу 2:

Работа с конспектом лекций и рекомендованной литературой (основная и дополнительная).

Подготовка материалов к контрольному опросу по изученным темам, лабораторным занятиям, тестовым проверкам знаний, защите лабораторных работ, диалогам с преподавателем и участниками проверки знаний второго раздела дисциплины.

6 Фонд оценочных средств для проведения промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине

Фонд оценочных средств для проведения промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине «Биохимия» представлен в приложении к рабочей программе дисциплины и включает в себя:

- перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы;
- описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания;
- типовые контрольные задания или материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций;
- методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций.

Вопросы для проведения промежуточной аттестации по дисциплине (экзамен)

1. Химический состав живых организмов.
2. Функции белков в живых организмах. Содержание в органах и тканях.
3. Аминокислотный состав белков.
4. Первичная структура белка.
5. Вторичная структура белка.
6. Третичная структура белка.
7. Четвертичная структура белка.
8. Свойства белков.
9. Простые белки.
10. Сложные белки.
11. Ферменты, их состав и структура. Простетические группы и коферменты.
12. Механизм ферментативного катализа.
13. Свойства ферментов как биологических катализаторов: влияние температуры, рН и окислительно-восстановительного потенциала на активность ферментов; влияние активаторов и ингибиторов; специфичность действия ферментов.
14. Номенклатура и классификация ферментов.
15. Витамины, их биологическая роль. Связь витаминов и ферментов. Классификация витаминов.
16. Биологическая роль водорастворимых витаминов. Состав, строение, содержание в пищевом сырье различного происхождения.
17. Биологическая роль жирорастворимых витаминов. Состав, строение, содержание в пищевом сырье различного происхождения.
18. Простые липиды. Состав, строение, содержание в тканях.
19. Сложные липиды. Фосфолипиды и гликолипиды. Состав, строение, содержание в тканях.
20. Гомополисахариды. Строение. Представители.
21. Гетерополисахариды. Строение. Представители.
22. Состав, элементарное строение и типы нуклеиновых кислот.
23. Первичная структура ДНК и РНК.
24. Вторичная структура ДНК и РНК.
25. Третичная структура нуклеиновых кислот.
26. Содержание воды в органах и тканях живых организмов. Биологическая роль и функции воды в живых организмах.
27. Содержание минеральных веществ в органах и тканях живых организмов. Биологическая роль и функции минеральных веществ в живых организмах.
28. Обмен веществ как важнейшая особенность живой материи. Понятие об основном и промежуточном обмене.
29. АТФ и ее роль в биоэнергетике организма.

30. Механизм биологического окисления. Тканевое или клеточное дыхание.
31. Дыхательная цепь. Окислительное фосфорилирование.
32. Субстратное окисление и субстратное фосфорилирование.
33. Гликолиз и гликогенолиз. Ферменты, участвующие в этих процессах.
34. ЦТК. Ферменты, участвующие в этих процессах
35. Энергетический баланс анаэробного и аэробного распада углеводов. Образование АТФ.
36. . Фотосинтез углеводов в растениях.
37. Окислительное дезаминирование. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
38. Декарбоксилирование аминокислот. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
39. Переаминирование или трансаминирование аминокислот. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
40. Биосинтез белка. Его основные этапы и локализация в клетке.
41. Конечные продукты обмена белков. Пути обезвреживания аммиака.
42. Биосинтез мочевины.
43. Окисление глицерина. Образование и использование ацетилкоэнзима. Ферменты, участвующие в превращениях.
44. Окисление ВЖК.
45. Синтез простых и сложных липидов.
46. Взаимосвязь между различными типами обменов веществ.
47. Состав и строение белков мышечной ткани.
48. Биохимическая сущность процессов сокращения и расслабления мышц. Посмертные изменения мышечной ткани. Автолиз.
49. Азотистые экстрактивные вещества мышечной ткани. Значение для характеристики сырья.
50. Соединительная ткань, ее состав и строение.
51. Роль, строение и состав костной и хрящевой ткани.
52. Роль, строение и состав жировой ткани. Гидролитический и окислительный процесс в жировой ткани.
53. Виды порчи жиров. Предотвращение порчи жиров. Антиокислители.
54. Биологическая ценность белков. Баланс азота и азотистое равновесие.
55. Биохимические изменения белков, липидов, витаминов в ходе технологических процессов.

7 Рекомендуемая литература

7.1 Основная

1. Биологическая химия: учеб. пособие/ Ю.Б. Филиппович [и др.]. — м.: Академия, 2005. — 256 с. (38 экз.)

7.2 Дополнительная

2. Березовская В.А. Биохимия: лаб. практикум. — Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2005. — 83 с. (41 экз.)
3. Рогожин В.В. Биохимия мышц и мяса: учеб. пособие. — СПб.: Гиорд, 2009. — 240 с. (7 экз.)
4. Биологическая химия / под ред. Н. И. Ковалевской. — М.: Академия, 2009. — 256 с. (17 экз.)

8 Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Химическая информационная сеть [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.chemnet.ru>

Электронная библиотека учебных материалов по химии [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.chem.msu.su/rus/elibrary>

Электронные книги для образования [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.biblioclub.ru>

Медицинская библиотека [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.booksmed.com>

9 Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

Методика преподавания данной дисциплины предполагает чтение лекций, проведение лабораторных занятий, групповых и индивидуальных консультаций по отдельным вопросам дисциплины. Предусмотрена самостоятельная работа студентов, а также прохождение аттестационных испытаний промежуточной аттестации.

На лекциях рассматриваются такие важные разделы биологической химии как: статическая, динамическая и функциональная биохимия. В ходе лекций студентам следует подготовить конспекты лекций: кратко, схематично, последовательно фиксировать основные положения, выводы, формулировки, обобщения; помечать важные мысли, выделять ключевые слова, термины; проверять термины, понятия с помощью энциклопедий, словарей, справочников с выписыванием толкований в тетрадь; обозначить вопросы, термины, материал, который вызывает трудности, пометить и попытаться найти ответ в рекомендуемой литературе. Если самостоятельно не удастся разобраться в материале, необходимо сформулировать вопрос и задать преподавателю на консультации, на лабораторном занятии. Уделить внимание понятиям, которые обозначены обязательными для каждой темы дисциплины

Целью проведения лабораторных занятий является закрепление теоретических знаний студентов, полученных ими в ходе изучения дисциплины на лекциях и самостоятельно. Занятия лабораторного типа включают в себя следующие этапы: изучение теоретической части лабораторной работы; конспектирование хода выполнения лабораторной работы и проведение ее экспериментальной части; выполнение необходимых графиков; оформление отчета о проделанной работе; защита лабораторной работы. Для подготовки к занятиям лабораторного типа и защиты выполненных лабораторных работ студенты выполняют проработку методических указаний по выполнению лабораторной работы, уделяя особое внимание целям и задачам, теоретической части и порядку выполнения лабораторной работы; конспектирование источников; работу с конспектом лекций, просмотр рекомендуемой литературы.

В ходе групповых и индивидуальных консультаций студенты имеют возможность получить квалифицированную консультацию по организации самостоятельного управления собственной деятельностью на основе анализа имеющегося у студента опыта обучения, используемых учебных стратегий, через обсуждение сильных сторон и ограничений стиля учения, а также поиск ресурсов, предоставляемых вузом для достижения намеченных результатов; для определения темы и проблемы исследования, выполнения мини-проектов по дисциплине, обсуждения научных текстов и текстов студентов, решения учебных задач, для подготовки к контрольным точкам, в том числе итоговой; детально прорабатывать возникающие проблемные ситуации, осуществлять поиск вариантов их решения, определять преимущества и ограничения используемых средств для решения поставленных учебных задач, обнаруживать необходимость изменения способов организации своей работы и др.

При изучении дисциплины используются интерактивные методы обучения, такие как:

1. Лекция:

– лекция-визуализация – подача материала осуществляется средствами технических средств обучения с кратким комментированием демонстрируемых визуальных материалов (презентаций).

2. Лабораторное занятие:

–тренинг – метод обучения и развития способностей к овладению деятельностью проведения химических лабораторных исследований. Интенсивная работа во время тренинга помогает достичь высоких результатов за короткий срок, а последующая система после

тренингового сопровождения обеспечивает надежное закрепление материала

– работа в малых группах обеспечивает активную познавательную деятельность обучающихся, предусматривает распределение обязанностей между ними, исполнительную и организаторскую инициативу, актуализацию, как опыта самостоятельной деятельности, так и совместной работы по выполнению лабораторных работ, что согласуется с реалиями профессиональной деятельности будущих специалистов.

10 Курсовой проект (работа)

Выполнение курсового проекта (работы) не предусмотрено учебным планом.

11 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине, включая перечень программного обеспечения и информационно-справочных систем

11.1 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса

– электронные образовательные ресурсы, представленные в п. 8 рабочей программы;
– использование слайд-презентаций;
– интерактивное общение с обучающимися и консультирование посредством электронной почты.

11.2 Перечень программного обеспечения, используемого при осуществлении образовательного процесса

При освоении дисциплины используется лицензионное программное обеспечение:

- операционные системы Astra Linux (или иная операционная система, включенная в реестр отечественного программного обеспечения);
- комплект офисных программ Р-7 Офис (в составе текстового процессора, программы работы с электронными таблицами, программные средства редактирования и демонстрации презентаций);
- программа проверки текстов на предмет заимствования «Антиплагиат».

11.3 Перечень информационно-справочных систем

– справочно-правовая система Консультант-плюс <http://www.consultant.ru/online>
– справочно-правовая система Гарант <http://www.garant.ru/online>

12 Материально-техническое обеспечение дисциплины

Для проведения занятий лекционного типа, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации используются учебные аудитории-6-507, 6-519 с комплектом учебной мебели.

При проведении лабораторных работ используется лаборатория биохимии – аудитория 6-502 на 16 посадочных мест с оборудованием: колориметр КФК-2; рефрактометр УРЛ; поляризатор; диспергатор; сушильный шкаф SNOL 58/350; весы лабораторные; шкаф вытяжной; лабораторная посуда (стаканы, пробирки биохимические, пипетки, спиртовки, цилиндры и др.), расходные материалы (химические реактивы); плакаты (периодическая таблица Д.И. Менделеева, таблица растворимости).

Для самостоятельной работы обучающихся используется кабинеты 6-522; оборудован комплект учебной мебели, двумя компьютерами с доступом в информационно-телекоммуникационную сеть «Интернет» и в электронную информационно-образовательную среду организации.

Технические средства обучения для представления учебной информации включают аудиторную доску, мультимедийное оборудование.

При изучении дисциплины используется библиотечный фонд КамчатГТУ: учебники, учебные пособия, периодические журналы, электронный ресурс; раздаточный материал (тесты и др.).

Дополнения и изменения в рабочей программе

Дополнения и изменения в рабочей программе за ____/____ учебный год

В рабочую программу по дисциплине «Биохимия» для направления подготовки 19.03.04 «Технология и продукции и организация общественного питания» вносятся следующие дополнения и изменения:

Дополнения и изменения внес _____
(должность, Ф.И.О., подпись)

Рабочая программа пересмотрена и одобрена на заседании кафедры _____
«____» _____ 202__ г.

Заведующий кафедрой _____
(подпись) (Ф.И.О.)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАМЧАТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»)

Научно-образовательный центр «Экология и природопользование»
Кафедра «Экология и природопользование»

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель департамента
«Пищевые биотехнологии»

 В.Б. Чмыhalова
«23» / 10 2024 г.

ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ
по дисциплине

«Биохимия»

направление подготовки

19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания


направленность (профиль):

«Технология продукции и организация общественного питания»

Петропавловск-Камчатский,
2024

Составитель фонда оценочных средств

Доцент кафедры «Экология и природопользование», к.б.н.



Авдощенко В.Г.

Фонд оценочных средств рассмотрен на заседании кафедры «Экология и природопользование»
«23» 10 2024 г., протокол № 5/1

И.о. заведующего кафедрой «Экология и природопользование»

«23» 10 2024 г.



Авдощенко В.Г.

АКТУАЛЬНО НА

2025/2026 учебный год



(подпись)

Авдощенко В.Г.

2026/2027 учебный год

(подпись)

Авдощенко В.Г.

1. Перечень компетенций с указанием этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы

Схема формирования компетенций ОПК-2 в процессе освоения образовательной программы 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания									
Код дисциплины из УП	Наименование дисциплины (в соответствии с УП)	1 семес тр	2 семес тр	3 семес тр	4 семес тр	5 семес тр	6 семес тр	7 семес тр	8 семес тр
ОПК-2 способность применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности									
Б1.О.10	Математика	Э	диф з	Э					
Б1.О.11	Физика	диф з	Э						
Б1.О.12	Биология	зачет							
Б1.О.13	Основы общей и неорганической химии	Э	Э						
Б1.О.14	Введение в технологию продуктов питания		диф з						
Б1.О.15	Аналитическая химия и физико-химические методы анализа			зачет	Э				
Б1.О.16	Органическая химия			зачет	Э				
Б1.О.17	Биохимия					Э			
Б1.О.18	Физическая и коллоидная химия					Э	Э		
Б1.О.19	Пищевая химия						диф з		
Б1.О.24	Физико-химические основы и общие принципы переработки продуктов питания				Э				
Б1.О.26	Пищевая микробиология						Э		
Б2.О.01.02(Н)	Научно-исследовательская работа (получение первичных навыков научно-исследовательской работы)				диф з				
Б3.01	Подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы								Защита ВКР

Таблица 1 – Паспорт ФОС

Контролируемые разделы (темы) дисциплины	Код контролируемой компетенции или ее части	Наименование оценочного средства
Раздел 1. Химический состав живых организмов		

Тема 1: Введение	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1, 3(ОПК-2)11 Выполнение и защита лаб. работы: 3(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 2: Химический состав живых организмов	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1, 3(ОПК-2)11 Выполнение и защита лаб. работы: 3(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Раздел 2. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах		
Тема 3: Белки	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 4: Липиды	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 5: Углеводы	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)1 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 6: Ферменты	ОПК-2	Опрос: 3(ОПК-2)3 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 7: Нуклеиновые кислоты	ОПК-1 ПК-5	Опрос: 3(ПК-5)1 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 8: Витамины	ОПК-1 ПК-5	Опрос: 3(ОПК-2)2 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 9: Вода и минеральные вещества	ОПК-1 ПК-5	Опрос: 3(ОПК-2)1 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)2; У(ОПК-2)3; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2 Тест:

		З(ОПК-2)1, З(ОПК-2)1, ЗОПК-2)2, З(ОПК-2)3, З(ОПК-2)11
Раздел 3. Обмен веществ и энергии		
Тема 10: Обмен веществ и энергии	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)4, З(ОПК-2)5, З(ОПК-2)6, З(ОПК-2)9 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 11: Обмен углеводов	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)4, З(ОПК-2)7, З(ОПК-2)9 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 12: Обмен липидов	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)4, З(ОПК-2)9 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 12: Обмен белков	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)4, З(ОПК-2)8, З(ОПК-2)9 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Раздел 4. Функциональная биохимия		
Тема 13: Мышечная ткань	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)10 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Тема 14: Соединительная ткань	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ПК-5)10 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2
Раздел 5. Биологическая ценность пищевого сырья		
Тема 15: Биологическая ценность пищевого сырья	ОПК-1 ПК-5	Опрос: З(ОПК-2)11, З(ОПК-2)12, З(ОПК-2)13 Выполнение и защита лаб. работы: У(ОПК-2)1, В(ОПК-2)1, У(ОПК-2)1; У(ОПК-2)4; У(ОПК-2)5; В(ОПК-2)1, В(ОПК-2)2 Тест: З(ОПК-2)4, З(ОПК-2)5, З(ОПК-2)6, З(ОПК-2)8, З(ОПК-2)9, З(ОПК-2)10, З(ОПК-2)11, З(ОПК-2)12, З(ОПК-2)13

2. Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания

2.1 Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования

Код компетенции	Планируемые результаты обучения по дисциплине	Критерии оценивания результатов обучения*				
		1	2	3	4	5
ОПК 2 способность применять основные законы и методы исследований естественных наук для решения задач профессиональной деятельности	Знать: – химический состав живых организмов.	Не сформированы знания в отношении биологической химии	Фрагментарные знания в области биологической химии	Неполные представления о вопросе	Определенные пробелы в знаниях	Сформированы системные представления о биологической химии
	Уметь: применять полученные знания при изучении специальных дисциплин и при последующей самостоятельной работе на производстве;	Отсутствие умений. Данный результат указывает на несформированность порогового уровня умений	Фрагментарные умения	Несистемное использование знаний	Несистематическое использование умений	Сформированное умение использовать полученные знания
	Владеть: навыками составления отчета о проделанной работе.	Отсутствие навыков в области биологической химии	Фрагментарные навыки в области биологической химии	В целом успешное, но не систематическое применение навыков.	В целом успешное, но содержащее определенные пробелы применения навыков.	Успешное и систематическое применение навыков.

*1 - Неудовлетворительная оценка результатов обучения. Отсутствие знаний, умений, навыков. Данный результат указывает на несформированность порогового уровня знаний, умений, навыков.

2 - Неудовлетворительная оценка результатов обучения. Фрагментарные знания, умения, навыки.

3 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Несистематическое использование знаний, умений, навыков.

4 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Определенные пробелы. В целом, успешное использование знаний, умений, навыков.

5 - Удовлетворительная оценка результатов обучения. Успешное и систематическое применение знаний, умений, навыков

2.2 Описание шкал оценивания

Формы контроля	Шкала оценивания
устный опрос	<p>Оценка «отлично»: ответы на поставленные вопросы излагаются четко, логично, последовательно и не требуют дополнительных пояснений, делаются обоснованные выводы, демонстрируются глубокие знания теоретических вопросов, соблюдаются нормы литературной речи.</p> <p>Оценка «хорошо»: ответы на поставленные вопросы излагаются систематизировано и последовательно, материал излагается уверенно, демонстрируется умение анализировать материал, однако не все выводы носят аргументированный и доказательный характер, соблюдаются нормы литературной речи, обучающийся демонстрирует хороший уровень освоения материала.</p> <p>Оценка «удовлетворительно»: допускаются нарушения в последовательности изложения ответов на поставленные вопросы, демонстрируются поверхностные</p>

	<p>знания вопроса, имеются затруднения с выводами, допускаются нарушения норм литературной речи.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно»: материал излагается непоследовательно, сбивчиво, не представляет определенной системы знаний по дисциплине, имеются заметные нарушения норм литературной речи, обучающийся допускает существенные ошибки в ответах на вопросы, не ориентируется в понятийном аппарате.</p>
<p>индивидуальные устные опросы по разделам дисциплины</p>	<p>Оценка «отлично»: ответы на поставленные вопросы по разделу излагаются четко, логично, последовательно и не требуют дополнительных пояснений, делаются обоснованные выводы, демонстрируются глубокие знания теоретических вопросов, соблюдаются нормы литературной речи.</p> <p>Оценка «хорошо»: ответы на поставленные вопросы по разделу излагаются систематизировано и последовательно, материал излагается уверенно, демонстрируется умение анализировать материал, однако не все выводы носят аргументированный и доказательный характер, соблюдаются нормы литературной речи, обучающийся демонстрирует хороший уровень освоения материала.</p> <p>Оценка «удовлетворительно»: допускаются нарушения в последовательности изложения ответов на поставленные по разделу вопросы, демонстрируются поверхностные знания вопросов, изученных в данном разделе, имеются затруднения с выводами, допускаются нарушения норм литературной речи.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно»: материал излагается непоследовательно, сбивчиво, не представляет определенной системы знаний по разделу дисциплины, имеются заметные нарушения норм литературной речи, обучающийся допускает существенные ошибки в ответах на вопросы, не ориентируется в понятийном аппарате.</p>
<p>решение заданий в тестовой форме</p>	<p>Для оценивания результатов тестирования возможно использовать следующие критерии оценивания:</p> <ul style="list-style-type: none"> - правильность ответа или выбора ответа. - скорость прохождения теста. - наличие правильных ответов во всех проверяемых темах (дидактических единицах) теста, <p>Общее количество вопросов принимается за 100%, оценка выставляется по значению соотношения правильных ответов к общему количеству вопросов в процентах.</p> <p>Оценка «отлично» - 85–100% правильных ответов; Оценка «хорошо» - 70–84% правильных ответов; Оценка «удовлетворительно» - 55–69% правильных ответов; Оценка «неудовлетворительно» - 54% и менее правильных ответов;</p>
<p>выполнение и защита лабораторных работ</p>	<p>Оценка «отлично» выставляется, если лабораторная работа выполнена в полном объеме, правильно, с соблюдением необходимой последовательности и правил работы в лаборатории. Обучающийся работал полностью самостоятельно, показал отличные владения навыками применения полученных знаний и умений при решении профессиональных задач в рамках усвоенного теоретического материала. Отчет по лабораторной работе выполнен в соответствии с требованиями, предъявляемые к данному виду работ, в нем приведены точно выполненные расчеты результатов определений и корректно сформулированные выводы. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует знание методики определения, умение объяснить полученные результаты, полно и правильно отвечает на все контрольные вопросы;</p> <p>Оценка «хорошо» выставляется, если лабораторная работа выполнена в полном объеме, правильно, с соблюдением необходимой последовательности и правил работы в лаборатории. Обучающийся работал полностью самостоятельно, показал хорошее владение навыками применения полученных знаний и умений при решении профессиональных задач в рамках усвоенного теоретического материала. Отчет по лабораторной работе выполнен с</p>

	<p>некоторой небрежностью, в нем приведены расчеты результатов определений, выполненные с небольшими неточностями и не совсем корректно сформулированные выводы. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует знание методики определения, умение объяснить полученные результаты, отвечает на большинство контрольных вопросов;</p> <p>Оценка «удовлетворительно» выставляется, если обучающийся затрачивает на выполнение лабораторной работы больше отведенного времени, при этом он показывает удовлетворительный уровень знаний теоретического материала, но испытывает затруднение при самостоятельной экспериментальной работе, что приводит к неточностям в результатах определения. При оформлении отчета допущены существенные недостатки. При защите лабораторной работы обучающийся демонстрирует слабое знание методики определения, не может полностью объяснить полученные результаты, при ответах на контрольные вопросы допускает много неточностей;</p> <p>Оценка «неудовлетворительно» выставляется в следующих случаях:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Результаты выполненной лабораторной работы не позволяют сделать правильных выводов и полностью расходятся с поставленной целью. Обучающийся показывает плохое знание теоретического материала и отсутствие необходимых умений. Руководство и помощь со стороны преподавателя оказываются неэффективны в связи плохой подготовкой обучающегося; 2. Лабораторная работа не выполнена.
<p>экзамен</p>	<p>Оценка «отлично» выставляется, если обучающийся показывает всесторонние и глубокие знания программного материала, знание основной и дополнительной литературы; последовательно и четко отвечает на вопросы билета и дополнительные вопросы; уверенно ориентируется в проблемных ситуациях; демонстрирует способность применять теоретические знания для анализа практических ситуаций, делать правильные выводы, проявляет творческие способности в понимании, изложении и использовании программного материала; подтверждает полное освоение компетенций, предусмотренных программой.</p> <p>Оценка «хорошо» выставляется, если обучающийся показывает полное знание программного материала, основной и дополнительной литературы; дает полные ответы на теоретические вопросы, допуская некоторые неточности; правильно применяет теоретические положения к оценке практических ситуаций; демонстрирует хороший уровень освоения материала и в целом подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой.</p> <p>Оценка «удовлетворительно» выставляется, если обучающийся показывает знание основного материала в объеме, необходимом для предстоящей профессиональной деятельности; при ответе на вопросы не допускает грубых ошибок, но испытывает затруднения в последовательности их изложения; не в полной мере демонстрирует способность применять теоретические знания для анализа практических ситуаций, подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой на минимально допустимом уровне.</p> <p>Оценка «неудовлетворительно» выставляется, если обучающийся имеет существенные пробелы в знаниях основного учебного материала по разделу; не способен аргументировано и последовательно его излагать, допускает грубые ошибки в ответах, неправильно отвечает на задаваемые преподавателем вопросы или затрудняется с ответом; не подтверждает освоение компетенций, предусмотренных программой.</p>

Итоговое оценивание обучающегося по дисциплине «Биохимия»

Для оценки качества подготовки студента по дисциплине в целом составляется рейтинг – интегральная оценка результатов всех видов деятельности студента, осуществляемых в процессе ее изучения.

Промежуточная аттестация проводится по окончании изучения дисциплины во время зачетно-экзаменационной сессии, в соответствии с рабочим учебным планом по направлению подготовки – в форме экзамена.

Преподаватель на вводной лекции (первом занятии) знакомит обучающихся группы с программой учебной дисциплины, порядком определения количества ЗЕ, графиком, формами и процедурой прохождения текущего контроля, а также примерными вопросами для подготовки к промежуточному аттестации.

Промежуточная аттестация – это форма контроля теоретических знаний, полученных студентом в процессе изучения всей учебной дисциплины или ее части, и умения их применять в практической деятельности. Он должен учитывать выполнение студентом всех видов работ, предусмотренных программой дисциплины, в том числе самостоятельную работу.

Показатели, критерии оценки сформированности компетенции, шкала оценивания результатов освоения компетенций по уровням освоения представлены в таблице.

Уровень освоения	Критерии освоения	Показатели и критерии оценки сформированности компетенции	Шкала оценивания (традиционная оценка)
Продвинутый	<i>Компетенции сформированы.</i> Демонстрируется высокий уровень самостоятельности, высокая адаптивность практического навыка	Теоретическое содержание курса освоено полностью, без пробелов необходимые практические навыки работы с освоенным материалом сформированы, все предусмотренные программой обучения учебные задания выполнены, качество их выполнения оценено на «отлично». Обучаемый демонстрирует способность к полной самостоятельности (допускаются консультации с преподавателем по сопутствующим вопросам) в выборе способа решения неизвестных или нестандартных заданий в рамках учебной дисциплины с использованием знаний, умений и навыков , полученных как в ходе освоения данной учебной дисциплины, так и смежных дисциплин.	«отлично»
Базовый	<i>Компетенции сформированы.</i> Демонстрируется достаточный уровень самостоятельности устойчивого практического навыка	Теоретическое содержание курса освоено полностью, без пробелов необходимые практические навыки работы с освоенным материалом сформированы недостаточно, все предусмотренные программой обучения учебные задания выполнены, качество выполнения ни одного из них не оценено минимальной оценкой, некоторые виды заданий выполнены с несущественными ошибками. Качество выполнения заданий оценено преимущественно на «хорошо». Способность обучающегося продемонстрировать самостоятельное применение знаний, умений и навыков при решении заданий, аналогичных тем, которые представлял преподаватель при потенциальном формировании компетенции, подтверждает наличие сформированной компетенции, причем на более высоком уровне	«хорошо»
Пороговый	<i>Компетенции сформированы.</i> Демонстрируется недостаточный	Теоретическое содержание курса освоено частично, но пробелы не носят существенного характера, необходимые практические навыки работы с освоенным материалом в основном	«удовлетворительно»

	уровень самостоятельности практического навыка	сформированы, большинство предусмотренных программой обучения учебных заданий выполнено, некоторые из выполненных заданий, возможно, содержат ошибки. Качество выполнения заданий оценено преимущественно на «удовлетворительно». Если обучаемый демонстрирует самостоятельность в применении знаний, умений и навыков к решению учебных заданий в полном соответствии с образцом, данным преподавателем, по заданиям, решение которых было показано преподавателем, следует считать, что компетенция сформирована, но ее уровень недостаточно высок.	
Низкий	Компетенции не сформированы Демонстрируется отсутствие или фрагментарное наличие самостоятельности и практического навыка	Теоретическое содержание курса не освоено, необходимые практические навыки работы с освоенным материалом не сформированы, выполненные учебные задания содержат грубые ошибки. Неспособность обучаемого самостоятельно продемонстрировать наличие знаний при решении заданий, которые были представлены преподавателем вместе с образцом их решения, отсутствие самостоятельности в применении умения к использованию методов освоения учебной дисциплины и неспособность самостоятельно проявить навык повторения решения поставленной задачи по стандартному образцу свидетельствуют об отсутствии сформированной компетенции.	«неудовлетворительно»

3. Типовые контрольные задания или материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

3.1. Задания для оценивания результатов обучения в виде знаний

Вопросы для обсуждения:

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Изучение техники безопасности и правил работы в химической лаборатории» по разделам «Химический состав живых организмов. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах»

1. Общие правила техники безопасности в биохимической лаборатории.
2. Правила техники безопасности при работе с химическими реактивами.
3. Правила техники безопасности при работе с химической посудой, в частности со стеклянной.
4. Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории с электроприборами.
5. Противопожарная безопасность в биохимической лаборатории.
6. Меры первой помощи при отравлениях химическими веществами.
7. Меры первой помощи при термических и химических ожогах.
8. Меры первой помощи при порезах и ранах, возникающих при работе со стеклянной химической посудой.

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Физико-химические свойства белков» по разделам «Химический состав живых организмов. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах»

1. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белки в растворе?
2. Каковы общие принципы осаждения белка из раствора?
3. Каким способом можно осадить белки из раствора, не вызывая их денатурации?
4. Как отделить глобулины от альбуминов в растворе яичного белка?
5. Что такое изоэлектрическая точка белка и изоэлектрическое состояние белка?
6. Какие вещества вызывают денатурацию?
7. Почему белки при нагревании в изоэлектрической точке быстро выпадают в осадок и не выпадают при нагревании в сильнокислой и сильнощелочной среде?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Качественные реакции на белки» по разделам «Химический состав живых организмов. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах»

1. Какие вещества называются белками?
2. Чем обусловлены цветные реакции на белки?
3. Что вы можете сказать об аминокислотном составе белков, если с раствором одного из них реакции Миллона и ксантопротеиновая положительны, а с раствором другого отрицательны.
4. Как с помощью цветных реакций обнаружить в белке аргинин?
5. Как обнаружить в белке цистеин?
6. Как обнаружить в белке тирозин?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Нуклеопротеиды» по разделам «Химический состав живых организмов. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах»

1. Какие вещества называются нуклеопротеидами?
2. Каким образом связываются полимерные цепи нуклеопротеидов?
3. Какую роль играют нуклеопротеиды в биохимических процессах обмена веществ?
4. Какие способы выделения нуклеопротеидов существуют и на чем они основаны?
5. При помощи каких связей соединены нуклеотиды в нуклеиновой кислоте?
6. Что является структурной единицей нуклеиновых кислот и что входит ее состав?
7. Какие основания и сахара входят в состав нуклеотидов?
8. При помощи каких связей соединены друг с другом основание и сахар, сахар и фосфорная кислота в нуклеотиде?
9. Какие нуклеиновые кислоты входят в состав живых организмов? Каков их химический состав?
10. При помощи каких качественных реакций обнаруживают продукты гидролитического распада нуклеопротеидов: белки и пептиды; пуриновые основания; пентозы; фосфорную кислоту?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Ферменты» по разделам «Обмен веществ и энергии. Функциональная биохимия. Биологическая ценность пищевого сырья»

1. Каков механизм действия ферментов?
2. Что такое активный центр фермента?
3. Как влияет изменение температуры на скорость ферментативного катализа?
4. Механизм действия высоких и низких температур на ферменты?
5. В каком случае говорят об абсолютной, а в каком об относительной специфичности действия ферментов?
6. Чем обусловлена термолабильность ферментов?
7. На чем основано влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативного катализа?
8. От каких факторов зависит скорость ферментативного катализа?
9. Из каких составных частей состоит сложный фермент? Простетические группы и коферменты.
10. Какое значение рН оптимально для действия амилазы?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Витамины» по разделам «Обмен веществ и энергии. Функциональная биохимия. Биологическая ценность пищевого сырья»

1. Какими реакциями можно открыть витамин В₁?

2. Какой реакцией можно открыть рибофлавин?
3. Какой реакцией можно открыть витамин РР?
4. Какой реакцией можно открыть витамин В₆?
5. Какими реакциями можно открыть витамин А?
6. Какими реакциями можно открыть витамин Д?
7. Какими реакциями можно открыть витамин С?
8. Какими реакциями можно открыть витамин Е?
9. Какими реакциями можно открыть витамин К?
10. Какую биологическую роль выполняет витамин Д?
11. Какую биологическую роль выполняет витамин А?
12. Какую биологическую роль выполняет витамин Е?
13. Какую биологическую роль выполняет витамин К?
14. Какую биологическую роль выполняет витамин В₁?
15. Какую биологическую роль выполняет витамин В₂?
16. Какую биологическую роль выполняет витамин РР?
17. Какую биологическую роль выполняет витамин В₆?
18. Какую биологическую роль выполняет витамин С?
19. Как определить содержание витамина С в продуктах?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Количественное определение пировиноградной кислоты» по разделам «Обмен веществ и энергии. Функциональная биохимия. Биологическая ценность пищевого сырья»

1. При обменах каких веществ в организме и в результате каких процессов образуется ПВК?
2. Что образуется из ПВК при анаэробном распаде углеводов?
3. Что образуется из ПВК при аэробном распаде углеводов?
4. На чем основаны реакции определения ПВК в биологических жидкостях?

Контрольные вопросы к лабораторной работе «Липиды. Определение насыщенности жиров» по разделам «Обмен веществ и энергии. Функциональная биохимия. Биологическая ценность пищевого сырья»

1. Какие константы характеризуют химический состав жиров?
2. Что характеризует йодное число и как его определяют?
3. Что характеризует эфирное число и как его определяют?
4. Что характеризует кислотное число и как его определяют?
5. Что характеризует число омыления и как его определяют?
6. Какой химический состав имеют жиры рыб?

Тестовые задания

Тестовые задания к разделам «Химический состав живых организмов. Общая характеристика и биологическая роль основных групп веществ, содержащихся в живых организмах»

1. Белки обладают ...
 - 1) амфотерными свойствами;
 - 2) основными свойствами;
 - 3) кислотными свойствами.

2. Аминокислоты, которые не могут синтезироваться организмом из других соединений, поэтому они обязательно должны поступать извне, называются...
 - 1) заменимыми;
 - 2) незаменимыми;
 - 3) полузаменимыми.

3. К незаменимой для человеческого организма аминокислоте относится...
 - 1) аргинин;
 - 2) пролин;
 - 3) триптофан;

- 4) серин.
4. В изоэлектрической точке белок является ...
- 1) катионом;
 - 2) анионом;
 - 3) электронейтральным.
5. В состав белков входят ...
- 1) 20 аминокислот;
 - 2) 18 аминокислот;
 - 3) 22 аминокислоты;
 - 4) 25 аминокислот.
6. Природные аминокислоты являются ...
- 1) α – аминокислотами;
 - 2) β – аминокислотами;
 - 3) γ – аминокислотами.
7. Белки наименее устойчивы в ...
- 1) анионном состоянии;
 - 2) катионной форме;
 - 3) изоэлектрическом состоянии.
8. Водородная связь обеспечивает образование следующей структуры белков...
- 1) первичной;
 - 2) вторичной;
 - 3) третичной;
 - 4) четвертичной.
9. В поддержании третичной структуры особое значение имеет...
- 1) водородная связь;
 - 2) пептидная связь;
 - 3) дисульфидная связь;
 - 4) электростатические взаимодействия.
10. Глобулы и фибриллы – это формы существования...
- 1) первичной структуры белка;
 - 2) вторичной структуры белка;
 - 3) третичной структуры белка;
 - 4) четвертичной структуры белка.
11. Глобулярные белки...
- 1) не растворяются в воде;
 - 2) растворяются в воде;
 - 3) имеют на поверхности много гидрофобных радикалов.
12. Изоэлектрическая точка белка – это...
- 1) рН среды, при котором молекула белка не перемещается в электрическом поле;
 - 2) рН среды, при котором молекула белка в электрическом поле движется к катоду;
 - 3) рН среды, при котором молекула белка в электрическом поле движется к аноду.
13. Пептидная связь обеспечивает образование следующей структуры белков...

- 1) первичной;
- 2) вторичной;
- 3) третичной;
- 4) четвертичной.

14. Четвертичная структура белков представляет собой...

- 1) объединение нескольких субъединиц, каждая из которых имеет все три уровня организации белковой молекулы;
- 2) спиралевидное образование нескольких субъединиц;
- 3) кольцевидное образование нескольких субъединиц.

15. Оболочкой, предохраняющей молекулу белка от склеивания и выпадения в осадок, является...

- 1) гидрофильная;
- 2) гидрофобная;
- 3) гидратная.

16. Высаливание – это...

- 1) необратимое осаждение белков;
- 2) обратимое осаждение белков;
- 3) равновесное осаждение белков;
- 4) неравновесное осаждение белков.

17. Природным денатурирующим агентом белков в человеческом организме является...

- 1) температура;
- 2) соляная кислота;
- 3) мочевины;
- 4) сульфат бария.

18. Наиболее сильным высаливающим эффектом в растворах белков обладают...

- 1) сульфаты;
- 2) хлориды;
- 3) нитраты;
- 4) роданиды.

19. Белки, полученные высаливанием, после удаления соли...

- 1) сохраняют нативные биологические свойства и функции;
- 2) теряют свои природные свойства и функции;
- 3) приобретают новые свойства и функции.

20. Гемоглобин является...

- 1) хромопротеидом;
- 2) нуклеопротеидом;
- 3) гликопротеидом.

21. Нуклеопротеиды – это...

- 1) соединения азотистого основания с рибозой;
- 2) сложные белки, состоящие из белка и нуклеиновых кислот;
- 3) последовательное соединение моноклеотидов.

22. Простетическая группа является...

- 1) белковой частью молекулы;
- 2) небелковой частью молекулы;

- 3) функциональной группой;
- 4) асимметрической группой.

23. При денатурации происходит разрушение белка до...

- 1) третичной структуры;
- 2) вторичной структуры;
- 3) первичной структуры;
- 4) аминокислотных остатков.

24. Углеводы – это...

- 1) альдегиды и кетоны многоатомных спиртов;
- 2) продукты конденсации альдегидов и кетонов;
- 3) продукты конденсации спиртов и альдегидов;
- 4) полиоксиальдегиды и полиоксикетоны.

25. Углеводы входят в состав...

- 1) нуклеиновых кислот;
- 2) ферментов;
- 3) нейтральных жиров;
- 4) простых белков.

26. Количество атомов углерода, которое могут содержать моносахариды, равно...

- 1) двум;
- 2) трем;
- 3) десяти;
- 4) двенадцати.

27. К полисахаридам относится...

- 1) целлобиоза;
- 2) амилоза;
- 3) лактоза;
- 4) манноза.

28. К гетерополисахаридам относится...

- 1) клетчатка;
- 2) сахароза;
- 3) гепарин;
- 4) гликоген.

29. К олигосахаридам относится...

- 1) лактоза;
- 2) фруктоза;
- 3) галактоза;
- 4) глюкоза.

30. Нуклеиновые кислоты состоят из...

- 1) азотистых оснований, рибозы или дезоксирибозы, фосфорной кислоты;
- 2) азотистых оснований, глюкозы или дезоксиглюкозы, фосфорной кислоты;
- 3) пуриновых и пиримидиновых оснований, фосфорной кислоты;
- 4) пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы или дезоксирибозы.

31. Функции т-РНК состоят в...

- 1) транскрипции на ДНК;
- 2) передаче информации о структуре белка;
- 3) переносе аминокислот в рибосомы;
- 4) образовании каркаса, к которому прикрепляются белки.

32. Функции м-РНК состоят в...

- 1) переносе аминокислот на рибосому;
- 2) передаче информации о структуре белка;
- 3) образовании комплекса с белком в рибосомах;
- 4) узнавании соответствующей аминокислоты.

33. Функции ДНК состоят в...

- 1) трансляции с помощью м-РНК;
- 2) передаче информации о последовательности соединения аминокислот в белке;
- 3) транскрипции с помощью т-РНК;
- 4) переносе нужных аминокислот в рибосомы.

*Тестовые задания к разделам «Обмен веществ и энергии. Функциональная биохимия.
Биологическая ценность пищевого сырья»*

1. Дополнительная группа фермента, прочно связанная с его белковой частью, называется...

- 1) кофактор;
- 2) кофермент;
- 3) холофермент;
- 4) апофермент;
- 5) простетическая группа.

2. Ферменты денатурируют при температуре...

- 1) 0°C;
- 2) 80–100°C;
- 3) 20–30°C;
- 4) 30–40°C.

3. Ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием АТФ, относятся к классу...

- 1) лиазы;
- 2) лигазы;
- 3) оксидоредуктазы;
- 4) трансферазы.

4. Оптимальной для действия большинства ферментов является температура...

- 1) 50–60°C;
- 2) 15–20°C;
- 3) 80–100°C;
- 4) 35–40°C.

5. Участок молекулы фермента, ответственный одновременно и за присоединение вещества, подвергающегося ферментативному действию, и за осуществление ферментативного катализа, называется...

- 1) гидрофобный центр;
- 2) каталитический центр;
- 3) активный центр;
- 4) адсорбционный центр;
- 5) аллостерический центр.

6. Большинство ферментов проявляют максимальную активность при рН...

- 1) кислом, рН=1,5–2,0;
- 2) щелочном, рН=8,0–9,0;
- 3) близком к нейтральному;
- 4) только при рН=7,0.

7. Ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос группы, относятся к классу...

- 1) оксидоредуктаз;
- 2) лиаз;
- 3) изомераз;
- 4) трансфераз.

8. Для ферментов, обладающих абсолютной специфичностью, характерно...

- 1) превращение одного единственного субстрата;
- 2) превращение группы субстратов с одинаковым типом связей;
- 3) превращение стереоизомеров одного типа.

9. Ферменты...

- 1) ускоряют скорость протекания химической реакции;
- 2) расходуются в процессе реакции;
- 3) термостабильны;
- 4) активность фермента регулируется.

10. Ферментативная активность зависит в основном от следующих факторов...

- 1) концентрации фермента, субстратов и кофакторов;
- 2) температуры и рН;
- 3) присутствия ингибиторов.

11. Кофактор, прочно связанный с белковой частью фермента, называется...

- 1) апоферментом;
- 2) коферментом;
- 3) простетической группой.

12. К особенностям ферментативного катализа относится...

- 1) способность катализировать любую реакцию с высокой скоростью;
- 2) способность катализировать только данную конкретную реакцию с высокой скоростью;
- 3) способность катализировать данную реакцию с высокой скоростью, а все другие реакции с низкой скоростью.

13. В ходе ферментативного катализа при образовании фермент-субстратного комплекса...

- 1) изменяется конформация субстрата;
- 2) образуются нековалентные связи между субстратом и ферментом;
- 3) сближаются функциональные группы, участвующие в катализе;
- 4) изменяется порядок соединения аминокислот.

14. Изменение активности ферментов при отклонении от температурного оптимума связано с...

- 1) изменением скорости теплового движения молекул;
- 2) изменением структуры белковой молекулы в результате изменения степени протонирования ионогенных группировок $-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$;
- 3) инактивацией фермента.

15. Критерий, положенный в основу классификации ферментов, – это...

- 1) химическое строение фермента;
- 2) тип кофактора;
- 3) тип катализируемой реакции.

16. Разложение крахмала при пищеварении происходит...

- 1) под действием амилазы при $pH = 2$;
- 2) под действием протеазы при $pH = 6$;
- 3) под действием амилазы при $pH = 7$;
- 4) в желудке под действием амилазы до декстринов.

17. Липидами называются...

- 1) природные неполярные соединения, нерастворимые в неполярных органических растворителях;
- 2) природные неполярные соединения различного строения, растворимые в неполярных органических растворителях;
- 3) природные полярные соединения различного строения, растворимые в неполярных органических растворителях;
- 4) природные полярные соединения различного строения, нерастворимые в неполярных органических растворителях.

18. Простые липиды – это ...

- 1) сложные эфиры глицерина и трех молекул высших жирных кислот;
- 2) сложные эфиры циклических спиртов и высших жирных кислот;
- 3) сложные эфиры высших одноатомных длинноцепочечных спиртов и высокомолекулярных жирных кислот;
- 4) сложные эфиры глицерина и жирных кислот разных видов.

19. К сложным липидам относится...

- 1) стерины;
- 2) гликолипиды;
- 3) триглицериды;
- 4) воска.

20. Фосфолипиды подразделяются на...

- 1) глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды;
- 2) этиленгликольфосфолипиды и ацетилхолинфосфолипиды;
- 3) этаноламинфосфолипиды и диацилфосфолипиды;
- 4) инозитфосфолипиды и сфингофосфолипиды.

21. Гликолипиды являются производными...

- 1) сфингозина, содержащими фосфорную кислоту;
- 2) глицерина, содержащими углеводный остаток;
- 3) этиленгликоля, содержащими углеводный остаток;
- 4) сфингозина, жирной кислоты и углевода.

22. Воска – сложные эфиры...

- 1) низкомолекулярных спиртов и высших жирных кислот;
- 2) высших многоатомных спиртов и высших жирных кислот;
- 3) высших одноатомных спиртов и высших жирных кислот;
- 4) низкомолекулярных одноатомных спиртов и высших жирных кислот.

23. При гидролизе нейтральных жиров получают...

- 1) глицерин и мыла жирных кислот;
- 2) глицерин и жирные кислоты;
- 3) соли глицерина и соли жирных кислот;
- 4) соли глицерина и жирные кислоты.

24. Витамины – это...

- 1) высокомолекулярные органические вещества;
- 2) производные аминов;
- 3) низкомолекулярные органические вещества;
- 4) высокомолекулярные и низкомолекулярные органические вещества;
- 5) низкомолекулярные неорганические вещества.

25. Витамины...

- 1) могут входить в состав ферментов;
- 2) участвуют в биохимических процессах;
- 3) синтезируются только в растениях;
- 4) могут превращаться в провитамины.

26. Витаминоподобные вещества...

- 1) блокируют действие витаминов;
- 2) усиливают действие витаминов;
- 3) могут выполнять функции витаминов;
- 4) могут синтезироваться из витаминов;
- 5) могут превращаться в витамины.

27. Провитамины...

- 1) усиливают биохимическую активность витаминов;
- 2) являются предшественниками витаминов;
- 3) синтезируются в организме из витаминов;
- 4) понижают биохимическую активность витаминов;
- 5) ускоряют синтез витаминов в организме.

28. Авитаминоз – это...

- 1) избыток витаминов;
- 2) недостаток витаминов;
- 3) отсутствие какого-либо витамина;
- 4) блокирование витамина определёнными веществами;
- 5) непереносимость организмом некоторых витаминов.

29. К водорастворимым витаминам относится...

- 1) рибофлавин;
- 2) ретинол;
- 3) витамин Е;
- 4) витамин F.

30. Витамин, влияющий на обмен кальция и фосфора в организме, – это...

- 1) витамин А;
- 2) витамин С;
- 3) витамин Е;
- 4) витамин D.

31. Жирорастворимые витамины – это витамины...

- 1) А, Д₂, В₂, К;
- 2) А, Д₃, Е, К;
- 3) С, В₁, В₂, Е;
- 4) А, Е, Д, В₃.

32. Гликолиз – это...

- 1) анаэробный распад глюкозы с образованием молочной кислоты;
- 2) анаэробный распад глюкозы с образованием этилового спирта;
- 3) распад жирных кислот;
- 4) синтез стеридов.

33. С функционированием цепи дыхательных ферментов сопряжен тип фосфорилирования...

- 1) окислительное фосфорилирование;
- 2) фосфорилирование белковых молекул;
- 3) хемосинтетическое фосфорилирование;
- 4) субстратное фосфорилирование.

34. Биологическое окисление – это ...

- 1) совокупность окислительно-восстановительных реакций, протекающих под действием оксидоредуктаз;
- 2) процесс превращения исходных пищевых веществ в белки, жиры, углеводы;
- 3) процесс декарбоксилирования субстрата до СО₂;
- 4) процесс образования их уксусной кислоты изолимонной кислоты;
- 5) процесс гидролитического распада исходных пищевых полимеров до составляющих их мономеров.

35. Окислительное фосфорилирование – это процесс...

- 1) образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии квантов солнечного света;
- 2) образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии распада химической связи;
- 3) свободного окисления, энергия при этом рассеивается в виде тепла;
- 4) фосфорилирования белковых молекул с помощью ферментов протеинкиназ;
- 5) образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата за счет энергии, высвобождающейся при тканевом дыхании.

36. Субстратное фосфорилирование – это...

- 1) преобразование энергии тканевого дыхания в энергию фосфатных связей АТФ;
- 2) преобразование энергии квантов света в энергию фосфатных связей АТФ;
- 3) фосфорилирования белковых молекул с помощью ферментов протеинкиназ;
- 4) фосфорилирование циклических нуклеотидов;
- 5) образование макроэргических связей АТФ на уровне субстрата.

37. При гликолизе в анаэробных условиях на 1 молекулу глюкозы образуется _____ молекул АТФ.

- 1) 3;
- 2) 6;
- 3) 8;
- 4) 2;
- 5) 10.

3.2. Задания для оценивания результатов обучения в виде умений (У) и навыков (владений) (В)

Выполнение лабораторных работ

Лабораторная работа. Введение в лабораторный практикум. Техника безопасности.

Лабораторная работа. Физико-химические свойства белков.

Лабораторная работа. Качественные реакции на белки.

Лабораторная работа. Нуклеопротеиды.

Лабораторная работа. Ферменты.

Лабораторная работа. Витамины.

Лабораторная работа. Количественное определение пировиноградной кислоты.

Лабораторная работа. Липиды. Определение насыщенности жиров.

4. Перечень вопросов к промежуточной аттестации

1. Химический состав живых организмов.
2. Функции белков в живых организмах. Содержание в органах и тканях.
3. Аминокислотный состав белков.
4. Первичная структура белка.
5. Вторичная структура белка.
6. Третичная структура белка.
7. Четвертичная структура белка.
8. Свойства белков.
9. Простые белки.
10. Сложные белки.
11. Ферменты, их состав и структура. Простетические группы и коферменты.
12. Механизм ферментативного катализа.
13. Свойства ферментов как биологических катализаторов: влияние температуры, pH и окислительно-восстановительного потенциала на активность ферментов; влияние активаторов и ингибиторов; специфичность действия ферментов.
14. Номенклатура и классификация ферментов.
15. Витамины. Их биологическая роль. Связь витаминов и ферментов. Классификация витаминов.
16. Биологическая роль водорастворимых витаминов. Состав, строение, содержание в пищевом сырье различного происхождения.
17. Биологическая роль жирорастворимых витаминов. Состав, строение, содержание в пищевом сырье различного происхождения.
18. Простые липиды. Состав, строение, содержание в тканях.
19. Сложные липиды. Фосфолипиды и гликолипиды. Состав, строение, содержание в тканях.
20. Гомополисахариды. Строение. Представители.
21. Гетерополисахариды. Строение. Представители.
22. Состав, элементарное строение и типы нуклеиновых кислот.
23. Первичная структура ДНК и РНК.
24. Вторичная структура ДНК и РНК.
25. Третичная структура нуклеиновых кислот.
26. Содержание воды в органах и тканях живых организмов. Биологическая роль и функции воды в живых организмах.
27. Содержание минеральных веществ в органах и тканях живых организмов. Биологическая роль и функции минеральных веществ в живых организмах.
28. Обмен веществ как важнейшая особенность живой материи. Понятие об основном и промежуточном обмене.
29. АТФ и ее роль в биоэнергетике организма.
30. Механизм биологического окисления. Тканевое или клеточное дыхание.

31. Дыхательная цепь. Окислительное фосфорилирование.
32. Субстратное окисление и субстратное фосфорилирование.
33. Гликолиз и гликогенолиз. Ферменты, участвующие в этих процессах.
34. ЦТК. Ферменты, участвующие в этих процессах
35. Энергетический баланс анаэробного и аэробного распада углеводов. Образование АТФ.
36. . Фотосинтез углеводов в растениях.
37. Окислительное дезаминирование. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
38. Декарбоксилирование аминокислот. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
39. Переаминирование или трансаминирование аминокислот. Витамины и ферменты, участвующие в реакциях.
40. Биосинтез белка. Его основные этапы и локализация в клетке.
41. Конечные продукты обмена белков. Пути обезвреживания аммиака.
42. Биосинтез мочевины.
43. Окисление глицерина. Образование и использование ацетилкоэнзима. Ферменты, участвующие в превращениях.
44. Окисление ВЖК.
45. Синтез простых и сложных липидов.
46. Взаимосвязь между различными типами обменов веществ.
47. Состав и строение белков мышечной ткани.
48. Биохимическая сущность процессов сокращения и расслабления мышц. Посмертные изменения мышечной ткани. Автолиз.
49. Азотистые экстрактивные вещества мышечной ткани. Значение для характеристики сырья.
50. Соединительная ткань, ее состав и строение.
51. Роль, строение и состав костной и хрящевой ткани.
52. Роль, строение и состав жировой ткани. Гидролитический и окислительный процесс в жировой ткани.
53. Виды порчи жиров. Предотвращение порчи жиров. Антиокислители.
54. Биологическая ценность белков. Баланс азота и азотистое равновесие.
55. Биохимические изменения белков, липидов, витаминов в ходе технологических процессов.

5. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций

По дисциплине предусмотрены следующие формы контроля качества подготовки:

- текущий (осуществление контроля за всеми видами аудиторной и внеаудиторной деятельности обучающегося с целью получения первичной информации о ходе усвоения отдельных элементов содержания дисциплины);
- промежуточный (оценивается уровень и качество подготовки по конкретным разделам дисциплины).
- контроль самостоятельной работы студента.

Результаты текущего и промежуточного контроля качества выполнения студентом запланированных видов деятельности по усвоению учебной дисциплины являются показателем качества работы обучающегося за время изучения дисциплины.

Итоговый контроль проводится в форме промежуточной аттестации – экзамена.

Текущий контроль успеваемости предусматривает оценивание хода освоения дисциплины, промежуточная аттестация обучающихся – оценивание результатов обучения по дисциплине, в том числе посредством испытания в форме экзамена.

Оценивание знаний, умений и навыков по учебной дисциплине «Биохимия» осуществляется посредством использования следующих видов оценочных средств:

- устные опросы;

- индивидуальные устные опросы по разделам (модулям) дисциплины (промежуточный контроль знаний);
- решение заданий в тестовой форме;
- выполнение и защита лабораторных работ;
- экзамен.

Опросы

Устные опросы проводятся во время лабораторных занятий и при проведении промежуточного контроля знаний по разделам (модулям) дисциплины.

Вопросы опроса, проводимого во время лабораторных занятий, не должны выходить за рамки объявленной для данного занятия темы. Устные опросы необходимо строить так, чтобы вовлечь в тему обсуждения максимальное количество обучающихся в группе, проводить параллели с уже пройденным учебным материалом данной дисциплины и смежными курсами, находить удачные примеры из современной действительности, что увеличивает эффективность усвоения материала на ассоциациях. Основные вопросы для устного опроса доводятся до сведения студентов на предыдущем лабораторном занятии.

Индивидуальные устные блиц-опросы (по форме «вопрос-ответ») по разделам (модулям) дисциплины проводятся с целью определения степени усвоения теоретического материала и понятийного аппарата по всему разделу (модулю) дисциплины. Примерный перечень вопросов для индивидуального устного блиц-опроса представлены в рабочей программе дисциплины и доводятся до сведения студентов до начала курса.

При оценке опросов анализу подлежит точность формулировок, связность изложения материала, обоснованность суждений, опора на методические материалы.

Решение заданий в тестовой форме

Проводится периодически в течение изучения дисциплины. Каждому студенту отводится на тестирование по 1 минуте на каждое задание. Оценка результатов тестирования производится преподавателем, результат выдается немедленно по окончании теста, преподаватель комментирует правильные ответы. До окончания теста студент может еще раз просмотреть все свои ответы на задания и при необходимости внести коррективы. При прохождении тестирования пользоваться конспектами лекций, учебниками, и иными материалами не разрешено.

Выполнение и защита лабораторных работ

Лабораторные работы проводятся в рамках тем (разделов), наиболее значимых в формировании практических (профессиональных) компетенций. Они выполняются индивидуально каждым обучающимся на основе разработанных методических указаний с использованием специального оборудования, аппаратуры и химических реактивов. На каждую лабораторную работу выделяется определенное количество часов, прописанное в рабочей программе дисциплины, в пределах которого обучающийся обязан ее выполнить. Лабораторные работы являются средством применения и реализации полученных обучающимся теоретических знаний, умений и навыков в ходе выполнения учебно-практической исследовательской задачи, связанной с получением конкретного значимого результата с помощью реальных средств деятельности. При выполнении лабораторных работ выявляются способности обучающегося получать новые знания в процессе практической деятельности, обобщать, систематизировать и фиксировать их.

Защита лабораторной работы проводится индивидуально каждым обучающимся после ее выполнения на основе письменного отчета при условии полного соблюдения требований к его оформлению. Защита работы проводится в виде опроса, который позволяет оценить умение и владение обучающегося излагать суть поставленной задачи, самостоятельно применять стандартные методы решения поставленной задачи с использованием имеющейся лабораторной базы, проводить анализ полученного результата работы.

Экзамен

Промежуточная аттестация по дисциплине «Биохимия» завершает изучение курса и проходит в виде экзамена. Экзамен проводится согласно расписанию зачетно-экзаменационной сессии. До экзамена не допускаются студенты, не сдавшие хотя бы одну из текущих аттестаций (индивидуальный устный блиц-опрос по разделу дисциплины), а также не выполнившие лабораторные работы и не защитившие их, представившие отчеты по выполненным лабораторным работам.. Экзамен может быть выставлен автоматически по результатам текущего и промежуточного контроля знаний и достижений, продемонстрированных студентом на практических занятиях, при условии успешного выполнения самостоятельной работы. Фамилии студентов, получивших экзамен автоматически, объявляются в день проведения экзамена до начала промежуточной аттестации.

До начала экзамена все студенты группы размещаются в аудитории по одному человеку за столом. Экзамен принимает лектор. Время подготовки ответа при сдаче экзамена в устной форме должно составлять не менее 30 минут (по желанию обучающегося ответ может быть досрочным). Время ответа – не более 15 минут.

Проведение экзамена состоит из двух этапов:

1. Ответ на теоретические вопросы билета.
2. Ответ на дополнительные вопросы преподавателя по курсу дисциплины.

По итогам всех этапов и результатам текущей успеваемости выставляется итоговая отметка.

Преподаватель вправе повысить получившееся значение, основываясь на результатах текущей успеваемости студента и его работы на практических занятиях. Таким образом, оценка знаний студента на экзамене носит комплексный характер и определяется его:

- ответом на экзамене;
- оценкой самостоятельной работы;
- оценками, полученными обучающимися по итогам лабораторных занятий, решением тестовых заданий, опросов и т.д.

Основой для определения оценки служит уровень усвоения обучающимися материала, предусмотренного рабочей программой. Результаты прохождения экзамена объявляются всей группе.

В случае неудовлетворительного результата испытания назначается день и время повторного (по графику ликвидации задолженностей). Присутствие посторонних лиц в ходе проведения аттестационных испытаний без разрешения ректора или проректора не допускается (за исключением работников университета, выполняющих контролирующие функции в соответствии со своими должностными обязанностями). В случае отсутствия ведущего преподавателя аттестационные испытания проводятся преподавателем, назначенным письменным распоряжением декана факультета.

Инвалиды и лица с ограниченными возможностями здоровья, допускаются на аттестационные испытания в сопровождении ассистентов-сопровождающих.

КАМЧАТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра «Экология и природопользование»

БИОХИМИЯ

*Лабораторный
практикум для обучающихся
очной и заочной форм обучения*

Петропавловск-Камчатский
2021

Рецензент:
Чмыхалова В.Б.
к.б.н., доцент, зав.кафедрой ТПП
ФГБОУ ВО «КамчатГТУ»

Ступникова Наталья Андреевна

Биохимия: Лабораторный практикум для обучающихся очной и заочной форм обучения. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2021. – 134 с.

Лабораторный практикум составлен в соответствии с требованиями к освоению основных образовательных программ подготовки бакалавров федеральных образовательных стандартов высшего образования. Содержит лабораторные работы, способствующие формированию у обучающихся общепрофессиональных компетенций.

Учебно-методическое пособие рассмотрено и утверждено на заседании учебно-методического совета КамчатГТУ (протокол №4 от 01.12.2021 г.)

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Указания к выполнению лабораторных работ... ..	5
Качественные реакции на белки.....	6
Физико-химические свойства белков.....	17
Разделение белковых аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге.....	23
Методы количественного определения белка.....	31
Ферменты.....	42
Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)	51
Выделение α - и β -амилаз из солода и определение их активности.....	55
Нуклеопротеиды	62
Гликопротеиды.....	69
Углеводы.....	73
Количественное определение глюкозы в биологических жидкостях	79
Анаэробное окисление углеводов	84
Витамины.....	91
Количественное определение гликогена и молочной кислоты в тканях мяса, рыбы	105
Обмен белков. Определение активности протеаз (по методу Ансона).....	113
Количественное определение пировиноградной кислоты	118
Липиды. Определение насыщенности жиров.....	123
Определение активности липазы клещевины... ..	131
Литература.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторный практикум включает в себя лабораторные работы, которые охватывают основные разделы изучаемого теоретического курса, как статической, так и динамической биохимии: простые и сложные белки, ферменты, липиды, витамины, углеводы и продукты их расщепления в организмах.

Цель лабораторного практикума – ознакомить студентов с основными методами, применяемыми в биохимии, а также с проведением работ, включающих элементы исследования. При проведении учебно-исследовательских работ студенты получают индивидуальные задания. В конце работы полученные результаты сводятся в таблицу и анализируются.

Практикум составлен таким образом, чтобы показать значение биохимических процессов и развить у студентов навыки самостоятельной работы. Поэтому перед каждой работой дается краткая теоретическая часть по существу вопроса, необходимая для понимания эксперимента, приведены формулы и реакции.

Лабораторные работы по изучению активности ферментов белкового, углеводного и липидного обменов являются исследовательскими, так как для их проведения преподавателю предоставляется возможность перед началом работы выдать студентам индивидуальные задания с учетом их направления подготовки, используя при этом различные виды биологических материалов, а также различные критерии оценки химического состава и ферментативной активности.

По окончании курса студент должен знать биологическую роль, пищевое значение, строение и свойства химических соединений, входящих в состав живых организмов и основные процессы обмена, лежащие в основе жизнедеятельности и овладеть основными методами химического анализа биологического материала: качественное обнаружение и количественное определение белков, аминокислот, витаминов и др. соединений.

При изучении курса студент должен овладеть навыками обнаружения в биологических объектах белков, углеводов, липидов и витаминов, знать методы исследования свойств и определения активности ферментов.

УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Перед выполнением работы необходимо внимательно ознакомиться с методикой её проведения и предположить ожидаемый результат, вытекающий из теоретического обоснования химизма реакции или процесса.

Выполнение работ знакомит студента с методами качественных и количественных исследований сырья и готовой продукции, с основами биотехнологии, дополняет и закрепляет теоретический материал наиболее сложных разделов изучаемой дисциплины.

В начале раздела и перед работой излагаются краткие теоретические обоснования по химии, биологической роли и метаболизму органических веществ. К каждой работе дано описание химической реакции или процесса, ожидаемый результат и практическое значение.

Выполняемую работу обязательно записать в тетрадь с указанием названия, цели работы, задания, схемы исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод.

Контрольные вопросы, приведенные в учебном пособии к каждой лабораторной работе, очерчивают минимум знаний, необходимых для защиты выполненной и оформленной работы.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить качественные реакции, используемые для обнаружения белков и определения их аминокислотного состава.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести биуретовую реакцию.
- 2.2. Провести нингидриновую реакцию.
- 2.3. Провести ксантопротеиновую реакцию.
- 2.4. Провести реакцию на аргинин.
- 2.5. Провести реакцию на тирозин.
- 2.6. Провести реакцию на серосодержащие аминокислоты.
- 2.7. Провести определение неизвестного вещества в исследуемом растворе.
- 2.8. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

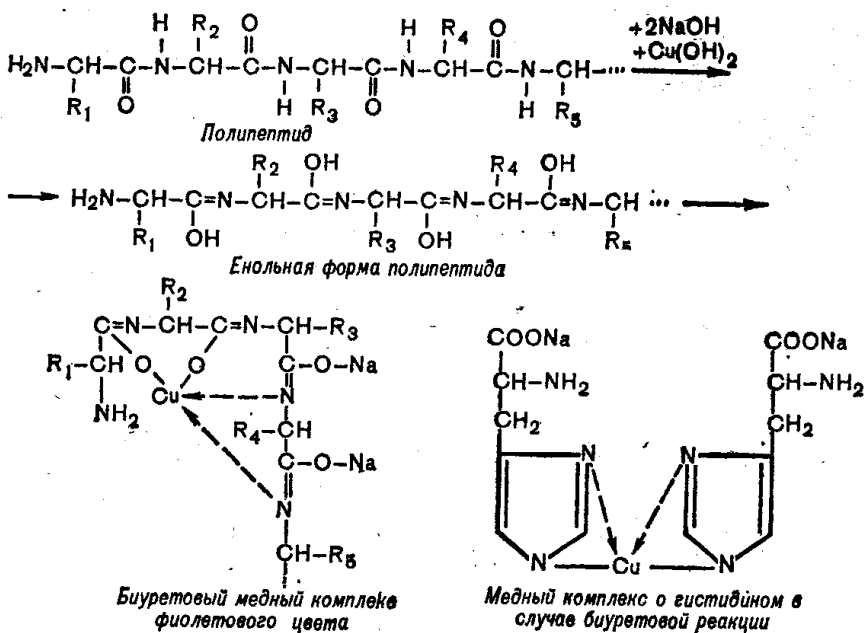
Белки – это высокомолекулярные органические соединения, состоящие из остатков аминокислот, которые связаны друг с другом при помощи пептидных связей. В состав белков входят 18–20 различных аминокислот. Одни из них организм может синтезировать самостоятельно – это заменимые аминокислоты. Другие, незаменимые, в организме синтезироваться не могут и должны поступать с пищей. Все аминокислоты, входящие в состав белков являются α -аминокислотами, т.к. только аминогруппа, стоящая в α -положении, способна образовывать пептидную связь. Все α -аминокислоты, за исключением глицина, имеют ассиметричный углеродный атом и поэтому являются оптически активными соединениями. Они способны вращать плоскость поляризованного луча или вправо, или влево. Первые называются правовращающие и обозначаются знаком +, вторые – левовращающие (-). Кроме этого, аминокислоты образуют два ряда стереоизомеров – L и D. В состав живых организмов входят L(-) аминокислоты.

Для обнаружения белка применяют цветные реакции. Они делятся на два типа: общие или универсальные и специфические. К универсальным реакциям относятся биуретовая (на пептидную связь) и нингидриновая (на α -аминокислоты). При помощи их можно открыть любой белок. К специфическим относятся реак-

ции на отдельные аминокислоты. Это реакции на функциональные группы радикалов аминокислот, входящих в состав белков. При их помощи можно открыть только тот белок, в состав которого они входят.

Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях, растворах и установить аминокислотный состав различных природных белков. Эти реакции применяются как для качественного, так и для количественного определения белка и содержащихся в нем аминокислот.

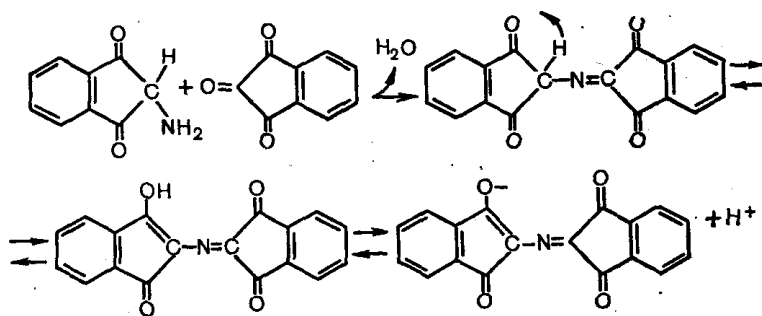
Биуретовая реакция (Пиотровского) открывает пептидную связь ($-\text{CO}-\text{NH}-$) в белке. В щелочной среде раствор белка, взаимодействуя с ионами меди, приобретает сине-фиолетовый цвет. Продукты неполного гидролиза белка – пептоны, дают розовое окрашивание. Биуретовая реакция схематически протекает следующим образом:



Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей. Пептидные связи могут

существовать в двух формах: кето- форме и енольной. В щелочной среде они переходят в енольную форму. При прибавлении ионов меди образуется биуретовый комплекс в результате соединения меди с пептидной группировкой белка. Окраска биуретового комплекса зависит от количества пептидных связей, концентрации белка и количества ионов меди в растворе. Она изменяется от синей до красной с преобладанием фиолетовой.

Нингидриновая реакция характерна для аминогрупп, находящихся в α -положении и входящих в состав белков, а также полипептидов и свободных аминокислот. В результате взаимодействия α -аминокислоты с нингидрином образуется шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден. Образовавшийся аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образовавшееся соединение превращается в окрашенную енольную форму, получившее название «сине-фиолетовый комплекс Руэмана».



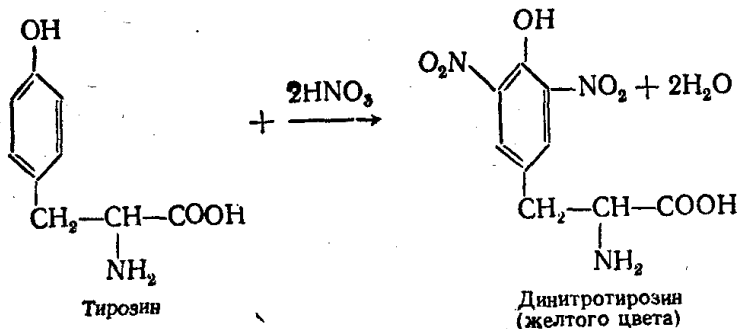
Сине-фиолетовый комплекс Руэмана

В присутствии органических растворителей (спирта или ацетона) образовавшееся шиффово основание не распадается, поскольку в соединении нет воды. Конденсируясь с нингидрином, оно содержит в своем составе радикал исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску: голубую, красную, синюю, фиолетовую, а в присутствии аминокислоты пролина – желтую.

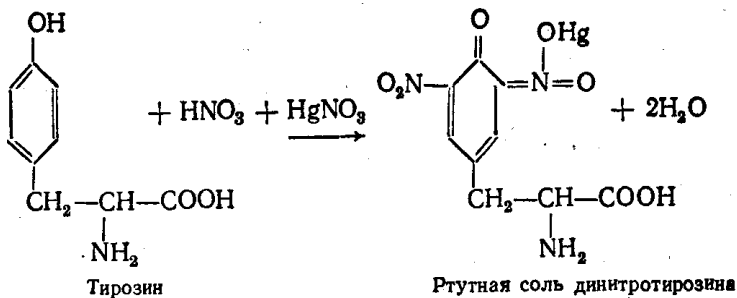
К специфическим реакциям относятся реакции Мульдера, Миллона, Сакагучи, Фоля и др.

Ксантопротеиновая реакция (Мульдера) происходит только при наличии в белке ароматических аминокислот (тирозин, фени-

лаланин, триптофан). Реакция обусловлена образованием нитропроизводных циклических аминокислот. При добавлении к таким белкам концентрированной азотной кислоты протекает реакция нитрования с образованием окрашенных в желтый цвет нитросоединений. При добавлении щелочи желтая окраска переходит в оранжевую, т.к. в щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, имеющие оранжевый цвет.



С белками, содержащими тирозин, идет также реакция Миллона. Реактив Миллона представляет собой смесь нитратов (HgNO_3) и нитритов (HgNO_2) ртути (I), растворенных в концентрированной азотной кислоте. При добавлении к раствору белка реактива Миллона его компоненты взаимодействуют с фенольным ядром тирозина. При этом образуется осадок ртутной соли динитротирозина, окрашенный в кроваво-красный цвет. Химизм реакции можно представить в следующем виде:



К раствору белка не следует добавлять избыток реактива Миллона, т.к. он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопро-

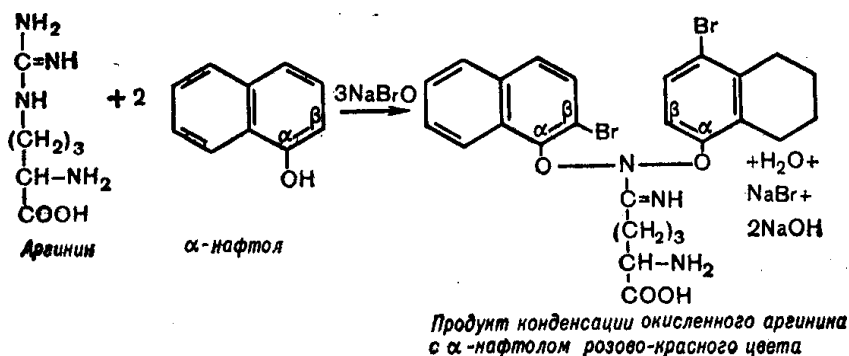
теиновая реакция), маскирующее реакцию Миллона. Для ускорения появления окраски раствор можно подогреть.

Реакция Сакагучи идет с белками, которые содержат аргинин. В присутствии щелочи образуется розово-красное окрашивание с α -нафтолом. Аргинин имеет гуанидиновую группировку ($\text{NH}_2\text{-C}\overset{\text{NH}}{\parallel}\text{-NH-}$), которая в присутствии α -нафтола окисляется ги-

NH

побромидом в щелочной среде, в результате чего образуется продукт конденсации розово-красного цвета.

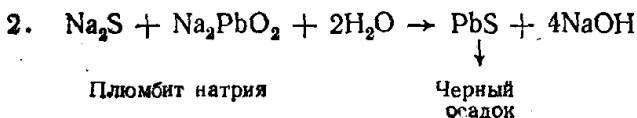
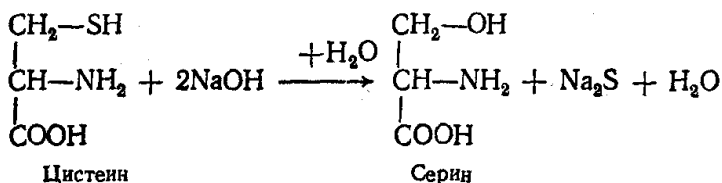
Химизм реакции следующий:



Белки, содержащие сульфгидрильные группы ($-\text{SH}$) можно обнаружить при помощи нитропруссидной реакции и реакции Фоля. Предварительно проводят щелочной гидролиз белка, при котором отщепляется сульфидная группа, которую обнаруживают при помощи тех или иных реактивов. При проведении нитропруссидной реакции сульфидную группу открывают нитропруссидом натрия. В результате его взаимодействия с ионом серы окраска раствора изменяется на красно-фиолетовую.

При проведении реакции Фоля действуют плюмбитом натрия (Na_2PbO_2), который образуется в результате взаимодействия ацетата свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и гидроксида натрия NaOH , в результате чего образуется черный нерастворимый осадок сульфида свинца. Химизм реакции следующий:

1.



Метионин, хотя и содержит серу, этой реакции не дает, т.к. сера в нем прочно связана с метильной группой, а не с водородом.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Биуретовая реакция (Пиотровского).

Берут 5 пробирок: в одну добавляют 5 капель разбавленного яичного белка, во вторую – 5 капель раствора желатина, в третью – 5 капель растительного альбумина, в четвертую – 5 капель раствора казеина и в пятую – 5 капель любой аминокислоты. В каждую пробирку прибавляют 5 капель 10% раствора NaOH и 2 капли 1% раствора сульфата меди. Все пробирки тщательно перемешивают. Наблюдают за изменением окраски в пробирках и отмечают, какой цвет появился в каждой из них. Фиолетовый цвет свидетельствует о наличии пептидных связей в белковых молекулах. *Внимание!* В пробирки нельзя добавлять избыток сульфата меди, т.к. синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

4.2. Нингидриновая реакция.

Берут 5 пробирок и в каждую из них аналогично предыдущему опыту добавляют по 5 капель разбавленного яичного белка, желатина, растительного альбумина, казеина и любой аминокислоты. В каждую из пробирок прибавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 минуты. Наблюдают за изменением окраски и отмечают, какой цвет и почему появился в каж-

дой из пробирок. При протекании реакции в пробирке сначала появляется розово-фиолетовое окрашивание, которое постепенно синее, т.к. образуется сине-фиолетовый комплекс Руэмана, свидетельствующий о наличии в растворе α -аминокислот.

4.3. Ксанпротеиновая реакция (Мульдера).

Берут пять пробирок и в первую наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую 5 капель раствора тирозина, в третью 5 капель раствора желатина, в четвертую 5 капель растительного альбумина и в пятую 5 капель раствора казеина. Затем во все пробирки добавляют по 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. Наблюдают за изменением окраски и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из пробирок. Появление осадка желтого цвета свидетельствует о присутствии циклических аминокислот. После охлаждения в каждую пробирку добавляют приблизительно 10–15 капель 20% раствора щелочи NaOH. Желтое окрашивание растворов переходит в оранжевое, вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

После окончания опыта делают вывод, какие из взятых для опыта веществ содержат циклические аминокислоты, а какие не содержат.

4.4. Реакция на тирозин (Миллона).

Берут шесть пробирок и наливают в первую 5 капель раствора яичного белка, во вторую 5 капель раствора тирозина, в третью 5 капель раствора желатина, в четвертую 5 капель растительного альбумина, в пятую 5 капель раствора казеина и в шестую 5 капель 0,1% раствора фенола. В каждую пробирку приливают по 3 капли реактива Миллона (раствор ртути в азотной кислоте) и осторожно нагревают. Появление осадка кроваво-красного окрашивания, которое дает ртутная соль динитротирозина свидетельствует о наличии циклических аминокислот. Наблюдают за изменением окраски в каждой из пробирок. Отмечают, какой цвет появился в каждой из них. Делают вывод, какие из белков содержат, а какие не содержат циклические аминокислоты.

4.5. Реакция на аргинин (Сакагучи).

Берут пять пробирок и наливают в первую 10 капель раствора яичного белка, во вторую 10 капель 0,01% раствора аргинина, в

третью 10 капель раствора желатина, в четвертую 10 капель растительного альбумина и в пятую 10 капель раствора казеина. Во все пробирки добавляют по 10 капель 10% раствора NaOH и по несколько капель 0,2% спиртового раствора α -нафтола. Хорошо перемешивают и прибавляют по 5 капель гипобромита натрия (NaBrO). Опять быстро перемешивают и (*немедленно!*) добавляют 8–10 капель 40% раствора мочевины для стабилизации быстро-развивающегося розово-красного окрашивания. Наблюдают за изменением окраски в каждой из пробирок и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из них. Делают вывод, какие из белков содержат, а какие не содержат аминокислоту аргинин.

4.6. Реакция на аминокислоты, содержащие серу.

4.6.1. Реакция Фоля.

Берут пять пробирок и в первую наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую 5 капель 0,02% раствора цистеина, в третью 5 капель раствора желатина, в четвертую 5 капель растительного альбумина и в пятую 5 капель раствора казеина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30% раствора NaOH и по 1 капле 5% раствора ацетата свинца. Интенсивно кипятят и дают постоять 1–2 минуты. Наблюдают за изменением окраски в каждой из пробирок и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из них. Делают вывод, в состав каких белков входят серосодержащие аминокислоты.

4.6.2. Нитропруссидная реакция.

Берут пять пробирок и в первую наливают 5 капель раствора яичного белка, во вторую 5 капель 0,02% раствора цистеина, в третью 5 капель раствора желатина, в четвертую 5 капель растительного альбумина и в пятую 5 капель раствора казеина. В каждую пробирку добавляют 5 капель 20% раствора щелочи, интенсивно кипятят, охлаждают и приливают 3 капли свежеприготовленного 5% раствора нитропрусида натрия. Наблюдают за изменением окраски в каждой из пробирок и отмечают, какой цвет и почему появился в каждой из них. Делают вывод, в состав каких белков входят серосодержащие аминокислоты.

И в первом, и во втором опыте интенсивность окрашивания зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Результаты всех цветных реакций на белки и аминокислоты вносят в таблицу 1.

Таблица 1

Качественные реакции на белки

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Биуретовая реакция		
Яичный белок		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Аминокислота		
Нингидриновая реакция		
Яичный белок		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Аминокислота		
Ксантопротеиновая реакция		
Яичный белок		
Тирозин		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Реакция Миллона		
Яичный белок		
Тирозин		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Фенол		
Реакция Сакагучи		
Яичный белок		
Аргинин		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Реакция Фоля		
Яичный белок		

Цистеин		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		
Нитропруссидная реакция		
Яичный белок		
Цистеин		
Желатин		
Растительный альбумин		
Казеин		

4.7. Контрольное определение.

С контрольным раствором последовательно проводят все изученные реакции на белки и аминокислоты. На основании полученных результатов делается вывод о присутствии в растворе того или иного белка или аминокислоты. Результаты контрольного определения оформляются в виде таблицы 2.

Таблица 2

Результаты контрольного определения

№ п/п	Название реакции	Используемые реактивы	Окраска продукта	Чем обусловлена реакция

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, уравнениями протекания реакций, экспериментальными данными и выводами. Выводы включают в себя заключение об аминокислотном составе белков и о возможности их обнаружения цветными реакциями.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какие вещества называются белками?
- 6.2. Чем обусловлены цветные реакции на белки?
- 6.3. Как соединяются аминокислоты в молекуле белка и за счет каких групп? Соедините Ала, Цис, Сер.
- 6.4. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.

6.5. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.

6.6. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?

6.7. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.

6.8. Назовите аминокислоты, имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.

6.9. Что вы можете сказать об аминокислотном составе белков, если с раствором одного из них реакции Миллона и ксантопротеиновая положительны, а с раствором другого отрицательны.

6.10. Как с помощью цветных реакций обнаружить в белке аргинин?

6.11. Назовите аминокислоты, содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.

6.12. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?

6.13. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α -аминокислот и почему?

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить физико-химические свойства белков.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Определить изоэлектрическую точку белка.
- 2.2. Провести разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания.
- 2.3. Провести осаждение белков при нагревании
- 2.4. Провести осаждение белков солями тяжелых металлов.
- 2.5. Провести осаждение белков минеральными кислотами.
- 2.6. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Белки являются высокомолекулярными соединениями, т.к. в их состав входят сотни и тысячи атомов. Например, чистый β -лактоглобулин имеет следующий элементарный состав: $C_{1864}H_{3012}O_{576}N_{418}S_{21}$. Все белки в зависимости от их строения делятся на две группы – фибриллярные и глобулярные. Фибриллярные белки имеют форму тончайших нитей. Они входят в состав мышц (миозин), сухожилий (коллаген, эластин), кожи, шерсти и т.д. Большинство из них не растворимы в воде. Глобулярные белки имеют округлую форму. К ним относятся альбумины, глобулины, гемоглобин и т.д. Они растворяются в воде и солевых растворах.

Белки состоят их аминокислот и поэтому обладают амфотерными свойствами. При растворении белков в воде ион водорода, появляющийся в результате диссоциации карбоксильной группы, присоединяется к аминогруппе. Поэтому белковые молекулы несут как положительные, так и отрицательные заряды. Величина заряда определяется количеством ионогенных групп. При определенном значении pH суммарный электрический заряд молекулы белка становится равным нулю. Такое значение pH называется изоэлектрической точкой (pI). В изоэлектрической точке растворы белков имеют минимальную устойчивость, т.к. они лишены основного стабилизирующего фактора – заряда и поэтому легко выпадают в осадок. Определить изоэлектрическую точку белка можно, определив pH, при котором раствор белка имеет наи-

большее помутнение. У большинства белков изоэлектрическая точка лежит в слабокислой среде.

Растворение белка объясняется его гидратацией, т.е. образованием водной оболочки из ориентированных молекул воды. При этом образуются коллоидные растворы. Такие растворы являются неустойчивыми. При добавлении к ним каких-нибудь водоотнимающих веществ, (концентрированных растворов солей, спирта, и т.д.) гидратация уменьшается, и, следовательно, уменьшается и растворимость белка. Белок выпадает в осадок. Процесс выпадения белка в осадок под действием водоотнимающих средств называется высаливанием. При высаливании происходит дигидратация белковых молекул.

На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, заряд катиона и аниона соли и т.д. Поэтому различные белки высаливаются при различной концентрации одних и тех же солей. Этим пользуются для разделения белков на различные фракции. Так, глобулины, имеющие большую относительную массу, чем альбумины, осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а альбумины – его насыщенным раствором. Осаждение белков различными солями зависит от их дегидратирующей способности, в частности, хлорид натрия осаждает белки слабее, чем сульфат аммония. Высаливание белков является обратимым процессом, т.е. при высаливании способность белков к растворению не теряется. При прибавлении достаточного количества воды белок снова может раствориться.

Денатурация белка, в отличие от высаливания, является необратимым процессом. При денатурации происходит разрушение третичной и частично вторичной структуры белковой молекулы в результате разрыва водородных связей. При денатурации в той или иной мере происходит изменение формы и размеров молекулы, изменение реактивности некоторых химических групп, уменьшение растворимости, уменьшение или полная потеря специфической биологической активности, изменение удельной оптической активности. При денатурации изменяется строение поверхностного слоя белковых частиц, в результате чего на поверхность выходят гидрофобные (не растворимые в воде) группы.

Денатурацию вызывают различные физические (нагревание, действие ультрафиолетовых лучей и т.д.) и химические (соли тяжелых металлов, минеральные и органические кислоты и т.д.)

факторы. Соли тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) вызывают денатурацию белков даже в очень малых концентрациях. Взаимодействуя с белками, ионы тяжелых металлов адсорбируются на них, образуя соединения, растворимые в избытке солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но не растворимые в воде.

Концентрированные минеральные кислоты тоже вызывают денатурацию белковых молекул. Происходит образование комплексных солей белка с кислотами (за исключением фосфорной кислоты). В избытке всех минеральных кислот (исключая азотную) выпавший осадок белка растворится.

Денатурированные частицы белка способны к агрегации и выпадению в осадок, но коагуляция является вторичным процессом по отношению к денатурации, поэтому денатурация белка не всегда сопровождается выпадением осадка. Так, если проводить нагревание сильно подкисленных или подщелоченных растворов белка, осадок не образуется. Это объясняется тем, что на молекулах белка появляются одноименные заряды (+ или -), которые препятствуют объединению частиц в агрегаты. Заряд на поверхности белковых молекул является одним из основных стабилизирующих факторов.

Для количественного осаждения белка необходимо устранить два фактора стабилизации коллоидных частиц: разрушить их защитную водную оболочку и снять электрический заряд. Для этого белок денатурируют нагреванием в изоэлектрической точке.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Определение изоэлектрической точки белка.

Готовят буферные растворы с определенным значением pH. Для этого в шесть сухих пробирок наливают реактивы в количествах, указанных в таблице 1. Во все пробирки прибавляют по 0,2 мл раствора казеина в растворе ацетата натрия (0,2М CH_3COONa). Все пробирки тщательно перемешивают. Через 5–10 мин наблюдают помутнение растворов и определяют его интенсивность. Наибольшее помутнение в результате выпадения осадка белка будет наблюдаться в той пробирке, где pH соответствует изоэлектрической точке (pI) казеина. Результаты работы оформляют в виде таблицы 3 и делают вывод.

Приготовление буферных растворов

№ пробирки	Состав раствора (мл)		pH раствора	Степень помутнения
	2М CH ₃ COOH	H ₂ O		
1	1,6	0,4	3,8	
2	0,8	1,2	4,1	
3	0,4	1,6	4,4	
4	0,2	1,8	4,7	
5	0,1	1,9	5,0	
6	0,06	1,94	5,3	

4.2. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания.

Яичный белок состоит из нескольких белков, отличающихся друг от друга по растворимости. При помощи метода высаливания из него можно выделить альбумины и глобулины.

4.2.1. К 20 каплям неразбавленного яичного белка добавляют сухую соль хлорида натрия до насыщения раствора, т.е. до того момента, когда соль перестанет растворяться. Выпадает белый аморфный осадок глобулинов. Через 10–12 минут произойдет их полное осаждение. После этого осадок отфильтровывают через бумажный фильтр. Пробирку с фильтратом кипятят или проводят с ее содержимым биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка, а положительная – на его присутствие. Делают вывод о наличии белка в фильтрате.

4.2.2. К 20 каплям неразбавленного яичного белка добавляют 20 капель насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором выпадает осадок яичного глобулина. Через 5–10 минут осадок отфильтровывают. В фильтрате остается яичный альбумин. Для его высаливания к фильтрату прибавляют сухую соль сульфата аммония до полного насыщения раствора. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают, а фильтрат или кипятят, или проводят с ним биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка. Делают вывод о высаливающей способности хлорида натрия и сульфата аммония.

4.3. Осаждение белков при нагревании в разных средах.

Берут 5 пробирок и в каждую наливают по 0,5 мл раствора разбавленного яичного белка. Затем в первую пробирку добавляют 1–2 капли 1% уксусной кислоты, во вторую 2–3 капли 10% раствора уксусной кислоты, в третью 1–2 капли 1% раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, в четвертую 1–2 капли 10% раствора гидроксида натрия, а пятую оставляют без изменения. Все пять пробирок нагревают на водяной бане. Наблюдают за изменениями, которые в них происходят. Определяют, в каких пробирках и в какой последовательности происходит помутнение. Результаты опыта и выводы записывают в таблицу 4.

Таблица 4

Результаты осаждения белков при нагревании в разных средах

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Слабокислая (1% CH_3COOH)		
2	Кислая (10% CH_3COOH)		
3	Слабокислая (1% $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaCl}$)		
4	Щелочная (10% NaOH)		
5	Нейтральная		

4.4. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Берут три пробирки, в каждую из них наливают по 5 капель раствора яичного белка и добавляют: в первую 2 капли 5% раствора сульфата меди, во вторую 2 капли 5% раствора нитрата серебра, в третью 2 капли 5% раствора ацетата свинца. Наблюдают образование осадка во всех пробирках. Затем в каждую из пробирок добавляют избыток реактива: в первую 8–10 капель сульфата меди, во вторую 8–10 капель нитрата серебра, в третью 8–10 капель ацетата свинца. В двух пробирках наблюдают растворение осадка. Делают вывод о том, в избытке каких солей осадок растворяется.

4.5. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами.

Берут две пробирки. В одну наливают 10 капель концентрированной азотной кислоты, а в другую – серной. Наклоняют пробирки под углом около 45° и осторожно по стенке сначала в одну, а затем в другую наливают по 10 капель белка. Пробирки ставят вертикально, не допуская перемешивания жидкостей. На границе двух слоев наблюдают помутнение в виде кольца белого цвета. В каждую пробирку добавляют избыток соответствующей кислоты. Наблюдают растворение осадка в избытке серной кислоты.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, экспериментальных данных, таблиц и выводов.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белки в растворе?

6.2. Каковы общие принципы осаждения белка из раствора?

6.3. Каким способом можно осадить белки из раствора, не вызывая их денатурации?

6.4. Как отделить глобулины от альбуминов в растворе яичного белка?

6.5. Что такое изоэлектрическая точка белка и изоэлектрическое состояние белка?

6.6. Какие вещества вызывают денатурацию?

6.7. Почему белки при нагревании в изоэлектрической точке быстро выпадают в осадок и не выпадают при нагревании в сильно кислой и сильно щелочной среде?

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить хроматографический метод разделения и определения белковых аминокислот.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести разметку и маркировку хроматографической бумаги.
- 2.2. Нанести растворы на хроматографическую бумагу.
- 2.3. Приготовить растворитель.
- 2.4. Провести разгонку аминокислот.
- 2.5. Провести проявление хроматограммы.
- 2.6. Определить коэффициенты подвижности аминокислот.
- 2.7. Провести идентификацию аминокислот.
- 2.8. Провести количественное определение аминокислот в смеси.
- 2.9. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Хроматография является эффективным методом для решения одной из важнейших задач биохимии – разделения и идентификации химических соединений (белков, аминокислот, жирных кислот, моно- и дисахаридов и др.). Метод предложен в 1903 г. профессором Воронежского университета М.С. Цветом для разделения растительных пигментов.

В настоящее время известно большое число различных видов хроматографии (распределительная, адсорбционная, ионообменная, на молекулярных ситах) и различных приемов их применения (на бумаге, колоночная, тонкослойная, газовая). Современные разновидности хроматографии, различающиеся по технике выполнения позволяют быстро разделить отдельные компоненты из небольшого количества сложной смеси.

Принцип распределительной хроматографии состоит в том, что вещества помещают в систему, которая содержит два физически различных компонента- подвижную и неподвижную фазы. Неподвижную (стационарную) фазу называют сорбентом. Если

сорбентом служит жидкость, удерживаемая каким-либо твердым телом, то это тело называют носителем или матрицей. Подвижную фазу называют растворителем или проявителем; компоненты разделяемой смеси – растворенными веществами. В варианте распределительной хроматографии на бумаге носителем служит целлюлоза в виде листов хроматографической бумаги. Неподвижной фазой служат пары воды, насыщающие лист этой бумаги при данных условиях. В качестве подвижной фазы применяют насыщенный водой органический растворитель, который, двигаясь по бумаге, растворяет и увлекает за собой нанесенный образец.

Распределительная хроматография основана на том, что растворенное вещество распределяется между подвижной и неподвижной фазами. Этот процесс называется распределением и количественно описывается коэффициентом распределения, представляющим собой отношение концентраций растворенного вещества в каждой из двух фаз. Рассчитывают этот коэффициент по следующей формуле:

$$Kp = \frac{m_{II}}{m_I} \cdot \left(\frac{I}{R_f} - I \right),$$

где m_I – масса подвижной фазы;

m_{II} – масса неподвижной фазы;

R_f – коэффициент подвижности (скорости перемещения зоны компонента).

По мере движения растворителя происходит множество микроскопических актов распределения каждого из исследуемых компонентов между подвижной и неподвижной фазами, в результате чего вещества с разными коэффициентами распределения оказываются на различном расстоянии от старта.

Коэффициентом R_f (подвижности) называют отношение расстояния от места нанесения исследуемого вещества до середины пятна (а) к расстоянию, от места нанесения вещества до фронта растворителя (в):

$$R_f = a/v.$$

Каждое из разделяемых веществ имеет свой R_f . Этот коэффициент может быть использован для идентификации (определения) компонентов исследуемой смеси, но воспроизводимость его

зависит от условий опыта (температура, сорт бумаги, чистота растворителя, однотипность процедур и др.).

Существуют различные виды хроматографии на бумаге: нисходящая (растворитель движется по бумаге сверху вниз), восходящая (растворитель движется по бумаге снизу вверх), круговая (движение растворителя происходит от центра круга к периферии) и др. В учебных целях наиболее удобна круговая (радиальная) хроматография.

Все операции с хроматографической бумагой прделывают тщательно вымытыми перед работой руками или в чистых резиновых перчатках. Надписи на бумаге делают простым карандашом.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Разметка и маркировка хроматографической бумаги.

Из хроматографической бумаги вырезают квадрат со стороной на 0,5 см больше диаметра используемой для работы чашки Петри (рис. 1).

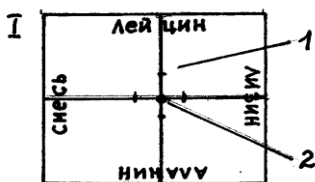


Рис. 1. Хроматография аминокислот:
I) общий вид радиальной хроматограммы;
II) схема хроматографической камеры

Двумя перпендикулярными линиями, проведенными карандашом через центр, квадрат делят на четыре сектора. По краю каждого сектора делают простым карандашом надпись о наносимом веществе.

На взаимно перпендикулярных прямых, отступив от центра 1,5 см к краю каждой стороны квадрата, сделать карандашом метки (1). Это будет место для нанесения пробы (стартовая линия).

4.2. Нанесение растворов.

В отмеченные точки микропипеткой наносят растворы аминокислот (в соответствии с надписью) или смесь в объеме 0,002–

0,01 мл. Нанесение осуществляют прикосновением острого конца заполненной микропипетки к бумаге в отмеченную точку и быстрым ее поднятием. При этом на бумаге должно оставаться пятно диаметром не более 3–4 мм. После полного подсыхания пятна операцию повторяют. Так поступают до тех пор, пока весь раствор из микропипетки не будет перенесен на отмеченную точку (стартовую линию).

В центре хроматограммы просверливают отверстие (2) и в него вставляют фитилек (трубочку, скрученную из хроматографической бумаги). Фитилек (3) должен плотно прилегать к краям отверстия, высота его должна быть несколько меньше, чем внутренняя высота камеры.

4.3. Подготовка растворителя.

В колбу объемом 100 мл приливают бутанол, уксусную кислоту и воду в соотношении 12:3:5 и тщательно перемешивают. Полученный раствор наливают в одну из половинок чашки Петри по 15–20 мл, приготовленного для разделения смеси аминокислот.

4.4. Разгонка аминокислот.

Хроматограмму укладывают на половинку чашки так, чтобы фитилек располагался в центре и касался ее дна. Для уменьшения испарения растворителя хроматограмму накрывают второй половиной чашки, добиваясь совмещения краев чашек.

Насыщенный неподвижной фазой растворитель по фитильку непрерывно поступает к центру хроматограммы и, двигаясь к краям, растворяет нанесенные аминокислоты и увлекает их за собой. При этом каждая из аминокислот движется по слою бумаги с определенной скоростью, что обусловлено коэффициентом распределения. Скорость аминокислот неодинакова, так как зависит от степени их растворения в неподвижной и подвижной фазе растворителя. Аминокислоты с полярными незаряженными, отрицательно и положительно заряженными (гидрофильными) радикалами движутся медленно, вместе с водой, некоторые чуть впереди воды. Аминокислоты с неполярными, гидрофобными радикалами перемещаются быстрее, так как вода, продвигаясь по бумаге, выталкивает их, а бутилово-уксусная фракция увлекает за собой. Скорость перемещения аминокислот одновременно зависит от величины и объема радикала.

После того как растворитель дойдет почти до краев чашки, хроматограмму снимают, удаляют фитилек, простым карандашом проводят линию между сухой и мокрыми зонами бумаги (отмечают границу фронта растворителя) и высушивают в вытяжном шкафу.

4.5. Проявление хроматограммы.

Хроматограмму смачивают в налитом в ванночку растворе с массовой концентрацией нингидрина в ацетоне 1%, вновь высушивают в вытяжном шкафу и помещают для развития окраски пятен аминокислот на 1,5–2 мин в сушильный шкаф при температуре 100°C или прогревают над плиткой до полного развития окраски комплексов аминокислот с нингидрином.

4.6. Определение коэффициента подвижности аминокислот.

Описывают кратко принцип метода бумажной хроматографии, определяют R_f аминокислот-метчиков и аминокислот смеси, идентифицируют аминокислоты смеси, хроматограмму зарисовывают. Замеряют расстояние, пройденное каждой аминокислотой от точки старта до середины пятна (а), и расстояние, пройденное растворителем в данном секторе (в). По формуле рассчитывают коэффициент подвижности:

$$R_f = a/v.$$

4.7. Проведение идентификации аминокислот.

Идентификация аминокислот, содержащихся в смеси, осуществляется по совпадению их позиций с позицией аминокислот-метчиков на хроматограмме, по совпадению коэффициентов подвижности и по однородности окраски пятен.

R_f для аминокислот при разделении на бумаге растворителем, состоящим из бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 12:3:5 приведены в таблице 5.

Таблица 5

Коэффициенты подвижности аминокислот (R_f)

Аминокислоты	R_f	Аминокислоты	R_f	Аминокислоты	R_f

Цистеин	0,08	Оксипролин	0,22	Тирозин	0,45
Гистидин	0,11	Глицин	0,23	Триптофан	0,50
Лизин	0,12	Аспарагино- вая	0,23	Метионин	0,50
Аспарагин	0,12	Треонин	0,26	Валин	0,51
Глутамин	0,17	Глутамино- вая	0,28	Фенилаланин	0,60
Аргинин	0,15	Аланин	0,30	Изолейцин	0,67
Серин	0,22	Пролин	0,34	Лейцин	0,70

4.8. Количественное определение аминокислот в смеси.

Хроматографический метод позволяет произвести и количественное определение аминокислот в смеси. Для этого пятна аминокислот смеси и аминокислот-метчиков обводят карандашом, нумеруют, вырезают, делают в них надрезы и помещают в пробирки с соответствующим пятну номером.

Затем в пробирки наливают по 3 мл насыщенного сульфатом меди раствора с объемной концентрацией этанола 80%, содержащее в пробирках перемешивают и ставят в темное место на 30 мин (каждые 10 мин содержимое пробирок перемешивают). Окраска с бумаги переходит в раствор этанола с образованием медных производных сине-фиолетового Руэмана, окрашенных в красный цвет. Оптическую плотность окрашенных растворов аминокислот-метчиков и аминокислот смеси измеряют при 540 нм (зеленный светофильтр) на фотоэлектроколориметре против насыщенного сульфатом меди раствора с объемной концентрацией этанола 80%. Массовую концентрацию каждой аминокислоты в смеси рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \cdot v \cdot D_{sp}}{D_{ce} \cdot v_i},$$

где X – массовая концентрация аминокислоты в исследуемой смеси, мг/мл;

C – массовая концентрация аминокислоты-метчика (свидетеля), мг/мл;

v – объем нанесенного на хроматограмму раствора аминокислоты-метчика, мл;

V_I – объем нанесенного на хроматограмму раствора исследуемой смеси, мл;

D_{np} – оптическая плотность раствора с пятна аминокислоты смеси;

D_{cv} – оптическая плотность раствора с пятна аминокислоты метчика.

Результаты расчетов по количественному составу аминокислот смеси записывают и делают окончательный вывод по всей работе.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, принципа хроматографического метода, экспериментальной части, выводов. В экспериментальной части отражаются этапы проведения работы с кратким их описанием, проводятся расчеты коэффициентов распределения аминокислот и содержания аминокислот в смеси, делаются выводы.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. Дайте общую характеристику метода хроматографии и ее роль в биохимии.

6.2. Какие основные виды хроматографии существуют?

6.3. В чем состоит сущность принципа хроматографии?

6.4. Назовите разновидности метода хроматографии на бумаге и чем они отличаются.

6.5. Каковы основные этапы радиальной хроматографии на бумаге?

6.6. Какова техника разметки и маркировки хроматографической бумаги?

6.7. Техника нанесения растворов в точки старта.

6.8. Состав и техника приготовления растворителя для «разгонки» аминокислот на бумаге.

6.9. От чего зависит скорость движения аминокислот в процессе хроматографии?

6.10. Как рассчитывается коэффициент подвижности (R_f) и что он характеризует?

6.11. Что такое «идентификация аминокислот» и как её проводят.

6.12. Каковы основные этапы количественного определения аминокислот методом хроматографии на бумаге?

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить методы количественного определения белка.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Определить массовую долю общего азота по Кьельдалю.

2.2. Определить массовую долю белкового азота методом Кьельдаля.

2.3. Определить количественное содержание белка с биуретовым реактивом.

2.4. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В настоящее время используют более десяти методов для определения массы белка в биологическом материале и продуктах питания, которые можно разделить на 3 группы: химические, физические и физико-химические (фотоколориметрические).

Из химических наиболее часто применяют метод формольного титрования, метод кислотного титрования и универсальный – метод Кьельдаля, основанный на количественном определении азота в исследуемом биологическом материале или пищевом продукте.

Из колориметрических методов наиболее распространены количественное определение белка на основе биуретовой реакции и метод Лоури (основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией), метод Бредфорда (основан на связывании белком красителя кумасси бриллиантового синего).

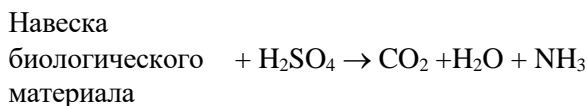
Среди физических методов наибольшее распространение получили рефрактометрический метод (по показателю преломления света раствором белка); спектрофотометрический метод (по поглощению в ультрафиолетовой области спектра); полярографический метод (по кривым зависимости между силой тока и напряжением, приложенным к системе, содержащей белок).

Азот биологических объектов делят на общий, белковый и небелковый. Общий – это весь азот органических и минеральных соединений, содержащийся в биологическом объекте – целом ор-

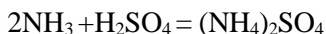
ганизме, молоке, зернах растений, плодах и фруктах, яйцах птиц, мышцах, крови и т.п.

Белковый – это азот, входящий в состав белков. Небелковый – это азот, оставшийся в растворе после удаления белков. В составе небелкового азота различают: аминный (азот свободных аминокислот), амидный (азот аспарагина и глутамин), аммиачный азот, азот оснований, нитратный и нитритный азот.

Метод определения азота в биологических объектах и продуктах питания предложен Кьельдалем в 1883 году и до настоящего времени остается, по сравнению с другими методами, наиболее точным. Этим методом определяют отрицательно заряженный трехвалентный азот органических и минеральных соединений. Принцип метода Кьельдаля состоит в том, что навеску анализируемого материала кипятят с концентрированной серной кислотой. При этом углерод органических веществ окисляется до диоксида углерода, водород – до воды; азот (отрицательно заряженный трехвалентный) превращается в аммиак.



Образующиеся при минерализации диоксид углерода и вода улетучиваются, а аммиак вступает в реакцию с серной кислотой, взятой в избытке, образует сульфат аммония.



Минерализованную пробу затем подщелачивают, аммиак отгоняют в раствор кислоты, где определяют титрованием.

Азот нитратов и нитритов, ядер гетероциклических соединений в ходе этого процесса в аммонийную соль не превращается.

Метод определения белка с биуретовым реактивом основан на реакции, образующей в щелочной среде окрашенные в фиолетовый цвет комплексы пептидных связей с ионами меди (II). Он известен в двух модификациях: макрометод и микрометод. Макрометод (макроопределение) применяют в случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (1–10 мг/мл); микрометод позволяет определить в 4 мл щелочного рас-

твора 0,1–2 мг белка. На окраску, даваемую белками, оказывают влияние соли аммония, сахара, глицерин и др. Ниже приведено описание макрометода.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Определение общего азота по Кьельдалю

4.1.1. Минерализация. Материал для исследования взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0002 г и вносят, не касаясь краев, на дно колбы Кьельдаля (рис. 2) проба для анализа должна содержать 10–20 мг азота.

Исходя из этого отвешивают: сухой растительный материал – 300–500 мг, сухой животный материал – 100–200 мг, кровь, органы и ткани животных – 0,5–1,0 г, молоко – 2–4 г, молочная сыворотка – 10–20 г. В колбу добавляют 5–10 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84), 5–7 крупинок сульфата меди (катализатор), 2–4 г сульфата калия или натрия (для повышения температуры кипения) и содержимое перемешивают круговым движением. Затем колбу ставят в наклонном положении на нагревательный прибор, помещенный в вытяжном шкафу, и закрывают ее отверстие стеклянной полый втулкой (специальный воздушный холодильник). Для уменьшения вспенивания и ускорения минерализации сразу же после начала нагрева в колбу осторожно добавляют 2–3 мл пероксида водорода. В процессе сжигания пероксид водорода добавляется еще 2–3 раза, но перед этим колбу снимают с огня и выдерживают при комнатной температуре 3–5 мин.

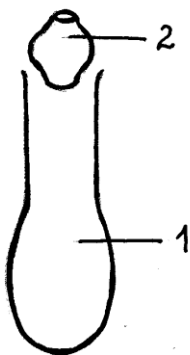


Рис. 2. Колба Кьельдаля(1)
и воздушный холодильник (2)

Минерализацию считают законченной, если содержимое колбы остается прозрачным при кипячении 10–15 мин после очередного добавления пероксида водорода.

Параллельно с опытной ставят контрольную пробу с теми же реактивами, но без исследуемого материала.

4.1.2. Отгонка аммиака. Эту часть работы выполняют в отгонном аппарате (рис. 3), состоящем из перегонной колбы 1, насадки Кьельдаля 2, воронки со стеклянной трубкой 3, холодильника 4, трубки с шариком для предохранения от всасывания жидкости 5, приемного стакана или колбы 6.

По окончании минерализации колбу Кьельдаля с содержимым оставляют при комнатной температуре для охлаждения и собирают аппарат для отгонки аммиака. Затем в приемный стакан (или колбу) вносят 25 мл раствора с массовой концентрацией борной кислоты 4% или 20 мл раствора с концентрацией серной кислоты 0,05 моль/л (или соляной с концентрацией 0,1 моль/л), 3–5 капель смешанного индикатора (имеет резкий переход цвета при pH 5,4 от сине-фиолетового в кислой среде к зеленому в щелочной) и ставят его так, чтобы нижний конец трубки, присоеди-

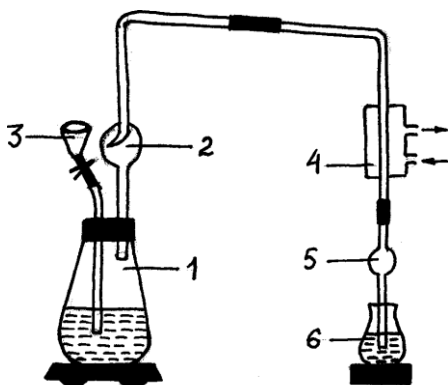


Рис. 3. Аппарат для отгонки аммиака

ненной к холодильнику, был погружен в раствор кислоты приемной колбы.

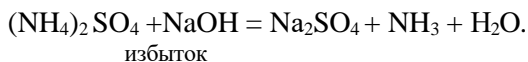
Охлажденный минерализат разбавляют в 2–3 раза водой и из колбы Кьельдаля переносят в перегонную колбу. Колбу Кьельдаля ополаскивают 3–4 раза порциями воды по 20–30 мл, смыв выливают в пере-

гонную колбу. При ополаскивании учитывают, чтобы общий объем жидкости в перегонной колбе составлял около 1/3 ее вместимости. В перегонную колбу вносят 3–5 капель индикатора Таширо, бросают несколько кусочков пемзы или короткие стеклянные трубочки для равномерного кипения и ставят на нагревательный прибор. Все части отгонного аппарата соединяют герметически, через воронку приливают к содержимому перегонной колбы раствор с массовой долей гидроксида натрия 40% до сильно щелоч-

ной реакции. При этом содержимое колбы окрасится в зеленый цвет. Нужный объем добавляемой щелочи можно предварительно рассчитать по реакции нейтрализации.

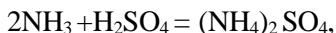
Включают холодильник и, нагревая содержимое перегонной колбы до кипения, отгоняют аммиак. Конец отгонки аммиака определяют по отсутствию изменения цвета красной лакмусовой бумажки при нанесении на нее капли жидкости, вытекающей из холодильника после отсоединения от него трубки с шариком. Первую проверку на полноту отгонки аммиака проводят через 10–15 мин после полного прогревания каплеуловителя. Обычно отгонку заканчивают после увеличения в приемной колбе объема жидкости в 2,5–3 раза от первоначального. По такой же методике производят отгонку содержимого контрольной колбы. Реакции второго этапа можно записать в виде следующих уравнений:

1. В перегонной колбе

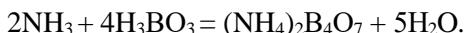


2. В приемной колбе

а) при улавливании отгоняемого аммиака раствором серной кислоты



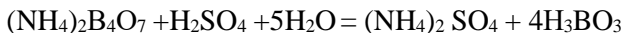
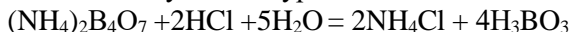
б) при улавливании отгоняемого аммиака раствором борной кислоты



Образовавшийся тетраборат аммония при гидролизе дает щелочную реакцию и содержимое приемной колбы окрашивается в зеленый цвет.

4.1.3. Титрование и расчет. После окончания отгонки аммиака холодильник приподнимают так, чтобы свободный конец трубки с шариком находился над поверхностью жидкости приемной колбы и трубку изнутри и снаружи ополаскивают дистиллированной водой. Содержимое приемной колбы (погон) титруют раствором кислоты или щелочи, что зависит от соединения, применяемого для поглощения аммиака. При отгонке аммиака в раствор борной кислоты погон титруют раствором с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной кислоты 0,05 моль/л) до четкого перехода зеленого цвета в сине-фиолетовый (промежуточ-

ная окраска сероватого тона). Реакции, происходящие при титровании, можно описать следующими уравнениями:



Из приведенных уравнений легко рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной кислоты 0,05 моль/л) соответствует 0,0014 г азота.

Массовую долю азота в исследуемом материале ($X, \%$) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,0014 \cdot 100}{m},$$

где a – объем раствора с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной кислоты с концентрацией 0,05 моль/л), израсходованной на титрование опытной пробы, мл;

b – объем раствора той же кислоты, израсходованной на титрование контрольной пробы, мл;

T – титр примененного для опыта раствора соляной (серной) кислоты;

m – масса исследуемого вещества, г.

При отгонке аммиака в раствор серной (соляной) кислоты погон титруют раствором с концентрацией гидроксида натрия (реже калия) 0,1 моль/л до четкого перехода сине-фиолетового цвета в зеленый. В этом случае оттитровывают избыток раствора с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной – 0,05 моль/л) взятого для поглощения аммиака. Массовую долю азота в исследуемом материале рассчитывают по приведенной выше формуле с той лишь разницей, что обозначения « a », « b » и « T » относятся не к кислоте, а к щелочи.

Умножая полученную массовую долю азота на 6,25 (фактор пересчета азота в белок), находят содержание в исследуемом материале «сырого» белка. «Сырым» белок в этом случае называют потому, что при расчете исходят не из белкового азота, а из всего азота биологического объекта (или пищевого продукта), определенного методом Кьельдаля.

4.2. Определение белкового азота методом Кьельдаля

Из анализируемого материала экстрагируют небелковый азот. Для чего навеску измельченного материала, взятую в соответствии с предыдущей работой, помещают в химический стакан вместимостью 50 мл и заливают 20 мл дистиллированной воды (высушенный материал перед добавлением воды смачивают несколькими каплями этанола). Содержимое размешивают стеклянной палочкой и оставляют ее в стакане до конца экстракции небелкового азота. Стакан ставят на нагретую до 40-50 °С водяную баню и, перемешивая содержимое каждые 10 мин, выдерживают 30 мин. При этом растворимые в воде азотистые соединения переходят в экстракт. Охлаждают до комнатной температуры, приливают равный объем раствора с концентрацией трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 10%, перемешивают и оставляют на 30–40 мин. ТХУ осаждает из экстракта белки, оставляя в нем небелковые азотистые соединения. Затем фильтруют через плотный беззольный фильтр. Стакан и осадок на фильтре промывают трижды порциями раствора с массовой долей ТХУ 5%. Затем фильтр вместе с осадком переносят в колбу Кьельдаля, добавляют туда 10 мл концентрированной серной кислоты, 5–7 кристаллов сульфата меди, 4 г сульфата калия или натрия. Одновременно с опытом ставят контроль с теми же реактивами и таким же, как в опыте фильтром, но без исследуемого материала.

Минерализацию, отгонку аммиака, титрование и расчет проводят так же, как в предыдущей работе.

Определение белкового азота в молоке имеет некоторые особенности. Во взвешенный с точностью до 0,0002 г химический стаканчик вместимостью 50 мл вносят 2–4 мл молока и еще раз взвешивают до такой же точности. Оба результата записывают. Приливают 20 мл раствора с концентрацией ТХУ 15%, перемешивают, выдерживают 30–40 мин и фильтруют через беззольный фильтр. Стакан и осадок на фильтре трижды промывают порциями раствора с концентрацией ТХУ 5% (раствор ТХУ вначале наливают в стакан и, тщательно ополоснув его, смыв переносят на фильтр, смачивая все его участки). Далее методика работы аналогична описанной выше.

По разности между общим азотом и белковым азотом данного биологического объекта (или пищевого продукта) находят мас-

совую долю небелкового азота, определяемого методом Кьельдаля.

Массовую долю белка в исследуемом материале можно вычислить умножением массовой доли белкового азота на фактор пересчета азота в белок (белковый коэффициент). Последний определяют делением 100 на массовую долю азота в химически чистом белке, выделенном из конкретного биологического материала (молока, сыворотки, крови, мышц, яиц, зерна пшеницы, гороха, клубней картофеля, моркови, ягод и т.д.)

Массовые доли азота в белках некоторых биологических объектов и факторы пересчета азота в белок (белковые коэффициенты) приведены в таблице 6.

Таблица 6

Массовая доля белка в биологических объектах

Наименование	Массовая доля азота в белке, %	Фактор пересчета (белковый коэффициент)
Белки молока в целом	15,65	6,38
Белки животных организмов (кроме коллагена)	16,00	6,25
Белки зерна риса	16,80	5,95
Белки зерна овса и ржи	17,15	5,83
Белки зерна сои	17,51	5,71
Белки зерна пшеницы и ячменя	17,54	5,70
Коллаген (животный белок)	17,79	5,62
Белки зерна арахиса	18,31	5,46
Белки семян подсолнечника, льна и хлопчатника	18,88	5,30

4.3. Определение белка с биуретовым реактивом

Исследование начинают с построения калибровочного графика. Для чего готовят стандартный раствор белка (альбумина, глобулина, казеина или другого белка), содержащий 10 мг белка в 1 мл. Из стандартного раствора казеина (или другого белка) гото-

взяты в соответствии с таблицей 7 ряд растворов белка известной концентрации.

Таблица 7

Разведение стандартного раствора белка

№ пробы	Объем стандартного раствора белка, мл	Объем воды, мл	Масса белка в пробе, мг	Оптическая плотность раствора
1	–	1,0	Контроль	
2	0,2	0,8	2	
3	0,4	0,6	4	
4	0,6	0,4	6	
5	0,8	0,2	8	
6	1,0	–	10	

Берут еще три пробирки и наливают в них исследуемый раствор белка: в первую – 1,0 мл, во вторую – 0,5 мл и в третью – 0,25 мл. Затем во вторую и третью пробирки добавляют соответственно 0,5 и 0,75 мл воды (объем содержимого в каждой пробирке должен быть одинаковым и составлять на данном этапе 1 мл). Таким образом, во второй и третьей пробирках получают раствор исследуемого белка, разведенный соответственно в 2 и 4 раза. Эти разведения учитывают при расчете.

В контрольную пробирку, к пробам с известной концентрацией белка, пробам исследуемого раствора белка приливают по 4 мл биуретового реактива (4 мл реактива на 1–10 мг белка). Содержимое каждой пробирки перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин для развития окраски.

Оптическую плотность растворов (экстинкцию) измеряют на фотоколориметре при 540 нм против контроля (проба № 1).

Результаты, полученные для растворов белка известной концентрации, отображают графически, откладывая по оси ординат величину оптической плотности, а по оси абсцисс – массу белка, соответствующую этой величине.

Закон Бера-Бугера-Ламберта гласит: прямая зависимость между концентрацией вещества и его оптической плотностью сохраняется в строго определенных параметрах концентраций. Для построения графика необходимо иметь усредненные данные экс-

тинкций трех повторностей колориметрирования стандартных растворов. Соединив полученные точки прямой линией, получим калибровочный график. По калибровочному графику определяют массу белка в анализируемых пробах. На основании полученных данных рассчитывают массовую концентрацию белка в исследуемом растворе (учесть разведения).

Однако содержание белка в сырье или продукте чаще обозначают в процентах. Для пересчета полученных результатов (мг/мл) в проценты, необходимо знать массу сырья или продукта и растворителя взятых для экстрагирования белка. Например, взято 2 г пшеничной муки и тщательно размешано в 10 мл дистиллированной воды, провели экстракцию альбуминов, а затем их количественно определили по биуретовой реакции. Полученный результат – 8,2 мг/мл. Содержание альбуминов пшеничной муки определяется по формуле:

$$C = \frac{8,2 \cdot V \cdot 100}{1000 \cdot m} ,$$

где V – объем экстракта альбуминов муки;

m – масса навески муки;

1000 – коэффициент пересчета мг на г;

100 – коэффициент пересчета на 100 г муки.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, экспериментальной части и выводов. В экспериментальной части отражаются этапы проведения работы с кратким их описанием, проводятся расчеты массовой доли белка в анализируемом образце и делаются выводы. Градуировочный график для определения белка с биуретовым реактивом прикладываются к отчету.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Перечислите группы методов количественного определения белков.
- 6.2. Общая характеристика метода Кьельдаля и его этапов.
- 6.3. Техника проведения минерализации, и её химизм.
- 6.4. Техника и химизм отгонки аммиака.

6.5. Техника и химизм титрования. Расчет массы белка.

6.6. Назовите физические методы количественного определения белка и расскажите на чем они основаны.

6.7. Какие Вы знаете фотоколориметрические (физико-химические) методы количественного определения белков? На чем они основаны?

6.8. Какие Вы знаете колориметрические (физико-химические) методы количественного определения белков? На чем они основаны?

6.9. Техника приготовления основного и стандартного растворов белка.

6.10. Техника проведения биуретовой реакции со стандартными и исследуемыми растворами белков.

6.11. Принцип и техника построения калибровочного графика. Минимум повторностей для построения калибровочного графика.

6.12. Методика и техника определения количества белка в исследуемом сырье или продукте колориметрическим методом.

6.13. Закон Бера-Бугера-Ламберта, его практическое значение для построения калибровочного графика и количественного определения белка в сырье или продукте по калибровочному графику.

ФЕРМЕНТЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить свойства ферментов как биологических катализаторов.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Изучить влияние температуры на активность ферментов.

2.2. Изучить влияние реакции среды на активность ферментов и определить оптимум рН для амилазы слюны.

2.3. Изучить влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны.

2.4. Изучить специфичность действия ферментов.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Ферменты (энзимы) – это специфические белки, выполняющие в организмах роль биологических катализаторов. Они увеличивают скорость протекания реакций, но, как и небелковые катализаторы, не могут вызывать реакции, невозможные по термодинамическим условиям. Ферменты могут быть как простыми, так и сложными белками. Простыми белками являются большинство гидролитических ферментов (пепсин, трипсин, уреазы и др.). Большинство ферментов остальных классов – это сложные белки.

Фермент, который является сложным белком, состоит из белка и небелковой части – простетической группы. Белковая часть термолабильна, она называется апоферментом. Простетическая группа, в отличие от белковой части, термостабильна. Иногда связь белка с простетической группой очень непрочная и фермент легко диссоциирует на белковую и небелковую часть. Небелковая часть фермента, которая легко отделяется и может существовать самостоятельно, называется коферментом или коэнзимом.

Механизм действия ферментов объясняется теорией гомогенного катализа. Фермент вступает во взаимодействие с субстратом с образованием фермент-субстратного комплекса, который, в свою очередь, взаимодействует дальше, при этом фермент отделяется и затем вступает во взаимодействие с новым субстратом. Таким образом, фермент катализирует реакцию между двумя субстратами, а сам при этом не расходуется. Если же в состав фермента входит кофермент, фермент катализирует реакцию не между двумя субстратами, а между субстратом и коферментом. Ко-

фермент является связующим звеном между двумя ферментами. Особенностью многих ферментов является обратимость их действия, т.е. один и тот же фермент может катализировать как прямую, так и обратную реакцию.

Особое значение при катализе играет активный центр фермента. Активный центр – это часть молекулы ферментативного белка, к которому присоединяется субстрат. Он образован остатками аминокислот, в него могут также входить ионы металлов, витамины и др. Активный центр состоит из ряда функциональных групп, определенным образом ориентированных в пространстве. Поэтому активный центр фермента может взаимодействовать только с определенным субстратом, который может к нему присоединиться.

Ферменты как биологические катализаторы обладают рядом общих свойств, важнейшими из которых является высокая активность и специфичность действия. Все ферменты проводят катализ в очень мягких условиях и обладают очень высокой активностью. Так, за 1 мин 1 молекула пепсина расщепляет тысячу молекул казеина, уреазы – 46 тысяч молекул мочевины, а каталазы – 5 миллионов молекул перекиси водорода.

Ферменты обладают специфичностью действия, т.к. каждый из них катализирует лишь определенные химические реакции. Различают абсолютную и относительную специфичность действия. Ферменты, обладающие относительной специфичностью действия, катализируют реакции у близких по строению веществ, действуя на определенный тип связи. К ним относятся ферменты желудочно-кишечного тракта: пепсин, трипсин и др. Ферменты, обладающие абсолютной специфичностью, действуют на один определенный субстрат. Так, мальтаза расщепляет мальтозы, но не оказывает никакого действия на сахарозу.

Поскольку ферменты являются белками, на их активность влияет температура – они термолабильны, рН среды, наличие различных химических веществ и т.д. Следовательно, скорость ферментативного катализа зависит от многих факторов: температуры, рН среды, концентрации субстрата и фермента и т.д.

Одним из важнейших факторов, от которого зависит активность фермента, является температура. С изменением температуры активность фермента изменяется. Каждый фермент имеет свой температурный оптимум. У большинства ферментов тепло-

кровных животных он лежит в интервале 37–40 °С. Повышение температуры выше 70°С приводит к потере активности фермента. Фермент необратимо инактивируется вследствие денатурации белка. Понижение температуры, как и повышение, приводит к сначала к уменьшению, а потом и полной потере активности фермента. Но при низких температурах ферменты не разрушаются, поэтому при последующем повышении температуры их активность восстанавливается (обратимая инактивация).

Подавляющее большинство ферментов теплокровных животных при 0°С прекращают свою деятельность, т.е. теряют свою активность. В отличие от них ферменты хладнокровных животных, в частности рыб, при такой температуре имеют достаточно высокую активность. Потеря их активности происходит при гораздо более низкой температуре. Наибольшую устойчивость к действию низких температур проявляет фермент липаза, который вызывает гидролиз простых липидов (триглицеридов). Он теряет свою активность при температуре -25°С.

Активность ферментов меняется в зависимости от реакции среды. Для каждого фермента существуют оптимальные значения рН, при котором он проявляет максимальную активность. Так, для пепсина оптимальное значение рН = 1,5–2,5, в то время как трипсин при таких условиях полностью теряет способность гидролизовать белки. Оптимум его действия наступает при рН = 8–9. Влияние рН на скорость ферментативного катализа, так же, как и влияние температуры, связано с их белковой природой.

На скорость ферментативного катализа влияет также присутствие определенных веществ, которые могут и увеличивать активность фермента (активаторы), и уменьшать ее (ингибиторы или парализаторы). Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуя его образованию (активаторы) или блокированию (ингибиторы). Одно и то же вещество для одного фермента может быть активатором, а для другого – ингибитором. Ферменты могут находиться как в активной форме, так и в неактивной. Неактивная форма называется профермент (зимоген), в нем присутствует парализатор, блокирующий активный центр.

Изучение влияния различных факторов на скорость ферментативного катализа проводят, используя ферменты слюны: амилазу и мальтазу. Действие ферментов выявляют либо по исчезнове-

нию субстрата, либо по появлению продуктов его расщепления. Амилаза катализирует гидролиз гликозидной связи крахмала и гликогена, расщепляя их сначала до декстринов, а затем до мальтозы. Крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины в зависимости от размера дают разное окрашивание – от фиолетового до красно-бурого. Мальтоза с йодом окрашивания не дает. Мальтаза расщепляет мальтозу до глюкозы, имеющую альдегидную группировку, по реакции на которую она может быть обнаружена.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Влияние температуры на активность ферментов.

Берут две пробирки и в каждую наливают по 5 капель слюны и по 20 капель дистиллированной воды. Одну пробирку ставят на водяную баню, нагревают до кипения и кипятят 3–4 минуты, другую оставляют без кипячения. В обе пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала, тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре. Через 5 минут содержимое каждой пробирки делят на две части. С одной частью проводят реакцию с йодом на крахмал, а с другой – реакцию Фелинга. Для этого к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива Фелинга, ставят на водяную баню, нагревают до кипения и кипятят 1 минуту. Если в растворе присутствует глюкоза, появляется красное окрашивание вследствие образования закиси меди. Результаты опыта записывают в таблицу 8 и делают выводы.

Таблица 8

Термоллабильность ферментов

Материал исследования	Субстрат	Контрольные реакции		Чем обусловлена реакция
		На крахмал с йодом	На сахар (реакция Фелинга)	
Свежая слюна	крахмал	Реакция положительная или отрицательная		
Прокипяченная слюна	крахмал			

4.2. Влияние температуры на скорость ферментативного катализа.

Берут четыре пробирки и наливают в них по 10 капель 0,5% раствора крахмала (субстрата). Затем первую пробирку ставят в снег (лед), вторую оставляют при комнатной температуре (15–20°C), третью ставят в термостат при температуре 45°C, четвертую – в водяную баню при температуре 75°C. В четыре другие пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1 капле 0,1% раствора йода. Через 5 минут в пробирки с крахмалом добавляют по 10 капель слюны, разведенной в 10 раз (1 капля слюны и 9 капель воды), хорошо перемешивают и оставляют стоять при той же температуре (0°, 15–20°, 45° и 75°C).

Через 5 минут после того как в пробирки добавили слюну, из каждой из них берут по 1–2 капли жидкости и вносят в заготовленные пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрасится в синий цвет, реакцию повторяют через 5 минут со вновь приготовленными пробирками с раствором йода, а затем еще через 5 мин.

Различная окраска при реакции с йодом, а, следовательно, разная степень гидролиза крахмала обусловлена разной скоростью ферментативного катализа при разных температурных условиях опыта. В работе важно уловить нужный момент для йодной пробы, так как при длительном гидролизе полное расщепление крахмала может произойти и при низких температурах опыта. Результаты работы оформляются в виде таблицы 9 и делаются выводы.

Таблица 9

Влияние температуры на действие фермента

Температура, °С	Окраска крахмала с йодом через определенное время, мин			
	5	10	15	20
0°				
15–20°				
45°				
75°				

4.3. Влияние рН среды на активность амилазы.

В семь пробирок наливают растворы 0,2М двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1М лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице 10. Получают буферные растворы с рН от 5,5 до 8.

Таблица 10

Получение буферных растворов с различной рН

№ пробирки	Кол-во 0,2 М Na_2HPO_4 (мл)	Кол-во 0,1М лимонной кислоты (мл)	рН среды	Кол-во капель 0,5% крахмала	Кол-во капель слюны	Окрашивание в реакции с йодом
1.	0,58	0,42	5,6	10	10	
2.	0,63	0,37	6,0	10	10	
3.	0,69	0,31	6,4	10	10	
4.	0,77	0,23	6,8	10	10	
5.	0,87	0,13	7,2	10	10	
6.	0,94	0,06	7,6	10	10	
7.	0,97	0,03	8,0	10	10	

В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и по 2 капли слюны, разведенной в 10 раз. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат при температуре 37°C. Через 5 минут из четвертой пробирки (рН в ней должно быть наиболее оптимально для действия амилазы) берут контрольную пробу для реакции с йодом. Если получают синее окрашивание, пробу повторяют через 5 минут. Когда в пробе будет получено красное или желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по 1 капле 0,1% раствора йода, их содержимое перемешивают и фиксируют окраску. Оптимум рН для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (при реакции с раствором йода получается красная или желтая окраска). Результаты работы оформляются в виде таблицы (табл. 4.3) и делаются выводы.

4.4. Влияние активаторов и ингибиторов (парализаторов) на активность амилазы.

Берут три пробирки и наливают: в первую – 10 капель дистиллированной воды, во вторую – 8 капель дистиллированной во-

ды и 2 капли 1% раствора хлорида натрия, в третью – 8 капель дистиллированной воды и 2 капли 1% раствора медного купороса. В каждую пробирку добавляют по 10 капель слюны, разведенной в 5 раз (2 капли слюны и 8 капель воды) и по 10 капель 0,5% раствора крахмала. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре.

В три другие пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1 капле 0,1% раствора йода. Через 5 минут из каждой пробирки, в которой проводят опыт, отбирают по 2–3 капли содержимого и переносят с пробирки с йодом. Если во всех пробирках жидкость окрасится в синий цвет, реакцию повторяют еще через 5 минут со вновь приготовленными пробирками с раствором йода, а затем еще через 5 мин. Различная окраска при реакции с йодом, а, следовательно, разная степень гидролиза крахмала обусловлена разной скоростью ферментативного катализа при добавлении различных веществ. Результаты работы оформляются в виде таблицы 11 и делаются выводы.

Таблица 11

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ пробирки	Фермент	субстрат	Время действия ферментов	Окраска жидкости после добавления йода в присутствии:		
				CuSO ₄	NaCl	вода
1	Амилаза слюны	крахмал	5			
2	Амилаза слюны	крахмал	10			
3	Амилаза слюны	крахмал	15			

4.5. Специфичность действия ферментов.

Берут две пробирки и в каждую из них наливают по 10 капель 0,5% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 5 капель разведенной в 5 раз слюны (содержат амилазу), а во вторую – 5 капель вытяжки из дрожжей (содержит сахаразу). Содержимое обеих пробирок хорошо перемешивают и оставляют при комнатной температуре или ставят в термостат при температуре

37–40°C. В две другие пробирки наливают по 10 капель 0,5% раствора сахарозы, затем в одну из них добавляют 5 капель вытяжки из дрожжей, а во вторую – 5 капель разведенной в 5 раз слюны и оставляют при тех же условиях, что и пробирки с крахмалом.

Через 5 минут в первые две пробирки (с крахмалом) добавляют по 1 капле 0,1% раствора йода и отмечают окрашивание. С содержимым двух других пробирок (с сахарозой) проводят реакцию Фелинга. Для этого к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива Фелинга, нагревают пробирку до кипения, кипятят 1 минуту и наблюдают за изменением окраски.

При анализе полученных результатов следует помнить, что сахароза не имеет свободных полуацетальных гидроксильных групп и реакции восстановления не дает, в то время как продукты ее гидролиза (глюкоза и фруктоза) обладают восстанавливающей способностью. Результаты работы оформляются в виде таблицы 12. В столбцах «Реакция...» указывается положительная она или отрицательная на основании цвета раствора или осадка.

Таблица 12

Специфичность действия ферментов

№ опыта	Фермент	Субстрат	Контрольные реакции	
			Реакция с йодом на присутствие исходных продуктов	Реакция Фелинга на присутствие продуктов распада
1	Амилаза (слюна)	крахмал		
2	Сахараза (вытяжка из дрожжей)	крахмал		
3	Амилаза (слюна)	сахароза		
4	Сахараза (вытяжка из дрожжей)	сахароза		

Под таблицей написать реакцию гидролиза сахарозы ферментом (сахаразой) дрожжей на глюкозу и фруктозу и сделать выводы о специфичности действия ферментов.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, формулами, уравнениями протекания реакций, экспериментальными данными и выводами. Результаты опытов оформляются в виде таблиц. Выводы включают в себя заключение о свойствах ферментов как биологических катализаторов.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Каков механизм действия ферментов?
- 6.2. Что такое активный центр фермента?
- 6.3. Как влияет изменение температуры на скорость ферментативного катализа?
- 6.4. Механизм действия высоких и низких температур на ферменты?
- 6.5. В каком случае говорят об абсолютной, а в каком об относительной специфичности действия ферментов?
- 6.6. Чем обусловлена термолабильность ферментов?
- 6.7. На чем основано влияние активаторов и ингибиторов на скорость ферментативного катализа?
- 6.8. От каких факторов зависит скорость ферментативного катализа?
- 6.9. Из каких составных частей состоит сложный фермент? Простетические группы и коферменты.
- 6.10. Какое значение рН оптимально для действия амилазы?

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ (ПО А.Н. БАХУ И А.И. ОПАРИНУ)

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Ознакомиться с методом определения активности каталазы.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Приготовить анализируемый образец.

2.2. Провести титрование пероксида водорода перманганатом калия.

2.3. Провести расчет активности каталазы.

2.4. Сделать вывод и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Оксидоредуктазы – класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения.

Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД⁺, НАДФ, ФАД и ФМН, у некоторых флавиновых – кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталазы) – H₂O₂ (пероксид водорода).

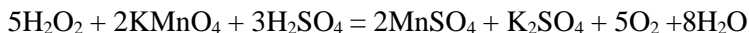
Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротеины).

Каталаза (КФ 1.11.1.6) относится к гемопротеинам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород: $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты образующие и обезвреживающие H₂O₂ находятся в пероксисомах – органеллах, покрытых мембраной. Главными потребителями H₂O₂ являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов [2H] на H₂O₂, восстанавливая его до 2

H₂O. Молекулы пероксида водорода, неустойчивые пероксидами, обезвреживаются каталазой.

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H₂O₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. *Приготовление анализируемого образца.*

2–3 г сырого картофеля (или другого свежего растительного материала) тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклом. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике скальпеля CaCO₃ до прекращения выделения пузырьков CO₂. В процессе растирания в ступку добавляют небольшими порциями 40–50 мл воды. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять 10–15 мин и после перемешивания фильтруют.

4.2. *Проведение титрования пероксида водорода перманганатом калия.*

Берут две конические колбочки вместимостью 150–200 мл и вносят в них по 20 мл полученного фильтрата. Содержимое одной колбы кипятят в течение 1 мин и охлаждают до комнатной температуры (контроль). Другая колба опытная содержит активный фермент. К содержимому опытной и контрольной колб приливают по 20 мл воды и по 3 мл раствора с массовой долей H₂O₂ 1%. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По окончании инкубации в обе колбы добавляют по 5 мл раствора с массовой долей серной

кислоты 10%, перемешивают и избыток H_2O_2 в каждой колбе оттитровывают раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л до образования розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

4.3. Расчет активности каталазы

Активность каталазы выражают в мкмоль пероксида водорода, расщепившегося под действием фермента в расчете на 1 г исследуемого материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. Вычисление ведут по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 20 \cdot 30} ,$$

где X – активность каталазы, Е/г;

$(a - b)$ – разность между объемами раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л, пошедшего на титрование контрольной (a) и опытной (b) проб, мл;

T – титр примененного для титрования раствора перманганата калия;

50 – коэффициент пересчета на мкмоль H_2O_2 ;

100 – общий объем приготовленного экстракта;

m – масса взятого для анализа материала, г;

20 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл;

30 – время инкубации, мин.

Сделать вывод об активности каталазы.

Активность каталазы можно определить и по объему кислорода, выделившегося после прибавления к исследуемому объекту H_2O_2 . Этот принцип используют для определения активности каталазы в молоке, выражаемую каталазным числом, представляющим собой объем кислорода (мл) выделившийся за 2 часа при 25°C из добавленных к 15 мл молока 5 мг раствора с массовой долей H_2O_2 1%. Молоко, полученное от здоровых животных, выделяет 0,7–2,5 мл кислорода, т.е. каталазное число натурального молока составляет не более 2,5. Молоко, полученное от больных животных (мастит и др.), и молозиво имеют повышенные каталазные числа, достигающие до 15.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, уравнения протекающей реакции, экспериментальными данными и выводом. Вывод включают в себя заключение об активности каталазы как биологического катализатора.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Основные пути окисления субстратов в клетке.
- 6.2. Характеристика строения и действия НАД⁺- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
- 6.3. Характеристика строения и действия ФАД-зависимых дегидрогеназ.
- 6.4. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы.
- 6.5. Характеристика строения и действия пероксидаз и каталаз.
- 6.6. Характеристика строения и действия цитохромов.
- 6.7. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
- 6.8. Метод определения активности каталазы.

ВЫДЕЛЕНИЕ α - И β - АМИЛАЗ ИЗ СОЛОДА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Ознакомиться с методами определения активности амилаз солодовой вытяжки.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Приготовить солодовую вытяжку.
- 2.2. Выделить α -амилазу из солодовой вытяжки.
- 2.3. Выделить β -амилазу из солодовой вытяжки.
- 2.4. Провести определение и рассчитать активности α - и β -амилазы солода по массе гидролизованного крахмала.
- 2.5. Провести определение активности амилаз по Вольгемуту.
- 2.6. Сделать вывод и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В солоде (проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя и других злаковых растений) содержатся активные α - и β - амилазы. Они хорошо растворяются в воде, поэтому их можно получить в виде водной вытяжки.

Выделение α - и β -амилазы из солодовой водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и pH среды. При нагревании солодовой вытяжки до 70°C β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. Оптимум действия β -амилазы проявляется при pH 4,8, однако α -амилаза при таких значениях pH теряет свою активность, а при понижении до pH 3,3 – денатурирует.

Действие амилаз на крахмал можно установить либо по убыли крахмала, либо по накоплению продуктов его распада – сахара.

Метод определения активности амилаз по массе расщепленного крахмала получил название колориметрического.

Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывают по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по окончании опыта нерасщепленным крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. При проведении опыта продолжительность инкубации и

объем раствора ферментного препарата устанавливают такими, чтобы в опытных пробирках (содержащих фермент) не произошел полный гидролиз крахмала.

Данный метод позволяет установить специфичность и активность совместного действия амилаз на крахмал. α -Амилаза (КФ 3.2.1.1.) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи без определенного порядка. В результате образуются декстрины и незначительное количество мальтозы. β -Амилаза (КФ 3.2.1.2.) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи, последовательно отщепляя молекулы мальтозы с нередуцирующих концов цепочек.

Наиболее эффективно гидролиз осуществляется под действием комплекса амилаз, содержащихся в вытяжке из солода.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Приготовление солодовой вытяжки

20 г измельченного солода растирают в ступке с небольшим количеством воды до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 2 часа (можно поставить в холодильник на ночь). По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течении 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Центрифугат используют в качестве источника амилазы.

4.2. Выделение α -амилазы.

В пробирку вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике ножа порошок ацетата кальция и пробирку выдерживают в течении 15 мин на водяной бане, нагретой до 68°C (в период нагревания температура воды не должна подниматься выше 70°C и опускаться ниже 66°C). Затем содержимое пробирки охлаждают холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

4.3. Выделение β -амилазы.

В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл раствора с концентрацией соляной кислоты равной 0,1 моль/л (рН полученной смеси должен быть 3,3). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на снег или лед (можно в морозильную камеру холодильника). В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде к содержимому колбы добавляют 2 мл раствора с концентрацией гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) 0,15 моль/л для того, чтобы рН довести до 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

4.4. Определение активности амилаз солода (по массе гидролизованного крахмала)

Для проведения опыта берут 6 пробирок, одна из них контрольная. Пробирки заполняют в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Определение активности амилаз солода

№ пробы	Компоненты, мл	Пробирки					
		1	2	3	4	5	6
1.	Вытяжка из солода	–	0,1	0,2	–	–	–
2.	α -Амилаза	–	–	–	0,2	0,4	–
3.	β -Амилаза	–	–	–	–	–	1,0
4.	Вода	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	–
5.	Буфер, рН 5,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6.	Крахмал, 2%	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Разбавление, R	–	10	5	5	2,5	2,4

Содержимое в пробирках перемешивают и ставят в термостат при 37–38 °С на 30 мин. Такая постановка опыта позволяет одновременно определить суммарную активность амилаз в солодовой вытяжке (α - и β -амилаз вместе), активность α -амилазы и активность β -амилазы. По окончании времени инкубации пробирки из

термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л и по 3 капли водного раствора йода; содержимое перемешать.

Пробирки с содержимым, окрашенным в желтые тона, убирают. Пробирки с содержимым, окрашенным в синие, фиолетовые или красные тона оставляют для дальнейшей работы (если после добавления раствора йода все пробирки с одним и тем же ферментным препаратом будут окрашены в желтый цвет, то опыт следует повторить, взяв этот ферментный препарат в меньшем количестве).

Берут мерные колбы вместимостью 50 мл, нумеруют их соответственно номерам, оставленных для дальнейшей работы пробирок. В каждую колбу вносят 30–40 мл воды, 0,5 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л, 10 капель водного раствора йода и 0,5 мл смеси из пробирки в соответствии с номером колбы. Непосредственно перед отбором смеси содержимое пробирки перемешивают. Содержимое колбы доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют на фотоколориметре при длине волны 620 нм против воды.

Активность амилаз выражают в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин. Расчет производят следующим образом:

– определяют массу расщепленного крахмала по формуле:

$$m = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot C$$

где m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг;

E_k – оптическая плотность контрольного раствора;

E_o – оптическая плотность опытного раствора;

C – масса внесенного крахмала, мг (3 мл раствора с массовой долей крахмала 2% содержат 60 мг крахмала);

– полученный результат умножают на разбавление (см. таблицу 12), т.е. приводят к 1 мл исходной ферментной вытяжки и затем делят на время инкубации (30 мин), что позволяет выразить активность амилазы в мг расщепленного крахмала 1 мл ферментной вытяжки за 1 мин.

Зная методику приготовления вытяжки из биологического объекта, можно легко рассчитать активность амилазы в мг рас-

щепленного крахмала на 1 г биологического материала за 1 мин по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \cdot 60 \cdot V}{E_k \cdot V_1 \cdot m \cdot 30},$$

где A – активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1г солода (или другого материала) за 1мин;

E_k – оптическая плотность контрольного раствора;

E_o – оптическая плотность опытного раствора;

60 – масса взятого для анализа крахмала, мг (в 3 мл 2 % раствора содержится 60 мг крахмала);

V – общий объем солодовой вытяжки, полученной из солода (100 мл);

V_1 – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, мл;

30 – время инкубации, мин;

m – масса солода, взятого для приготовления солодовой вытяжки.

При расчете активности β -амилазы в числитель необходимо ввести число 2,4, которое учитывает все разведения солодовой вытяжки, сделанные при выделении β -амилазы.

4.5. Определение активности амилаз по Вольгемуту

Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

В штатив устанавливают и нумеруют 7 пробирок и в каждую вносят по 1 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл вытяжки из солода, тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После этого в каждую пробирку вносят по 2 мл раствора с массовой долей крахмала 1% и содержимое перемешивают встряхиванием. Все пробирки помещают в термостат при 37–38°C на 30 мин. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10% (для остановки реакции) и по 3 капли водного раствора йода. Результат опыта вносят в таблице 14, обозначая окраску первыми буквами образовавшегося цвета раствора.

Таблица 14

Окраска проб с йодом после инкубации

	Номера пробирок и доля солодовой вытяжки в содержимом, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Окраска раствора							

Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (желтое окрашивание с йодом) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число). Допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала произошел в 1, 2, 3 и 4 пробирках, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке 4, в которой доля солодовой вытяжки составляет 1/16 мл. Пересчитав объем расщепленного крахмала на 1 мл солодовой вытяжки, получим число 32. Это означает, что 1 мл неразбавленной солодовой вытяжки в таких же условиях может расщепить 32 мл раствора с массовой долей крахмала 1%, т.е. амилазное число составляет 32.

При определении амилазной активности молока кратность разведения уменьшают в 8–10 раз, время инкубации увеличивают до 60 мин, для исследования применяют раствор с массовой долей крахмала 0,1%.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, экспериментальными данными, расчетами и выводом.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какие ферменты содержатся в солоде и как их можно выделить?
- 6.2. Техника выделения α -амилазы. На чем она основана?
- 6.3. Метод выделения β -амилазы, на чем он основан?
- 6.4. Специфичность действия и активность α -амилазы.
- 6.5. Специфичность действия и активность β -амилазы.
- 6.6. Принцип колориметрического метода определения активности амилаз? Что положено в основу?
- 6.7. Расчет активности и характеристика полученных результатов.
- 6.8. Принцип метода определения активности амилазы по Вольгемуту.
- 6.9. Техника получения разведений раствора амилаз.
- 6.10. Как определить максимальное разбавление амилазы, осуществившей полный гидролиз крахмала?
- 6.11. Расчет активности амилазы по Вольгемуту.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить состав нуклеопротеидов.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Выделить нуклеопротеиды из дрожжей.

2.2. Провести гидролиз нуклеопротеидов.

2.3. Определить продукты гидролиза при помощи качественных реакций на:

- белки и пептиды;
- пуриновые основания;
- пентозы;
- фосфорную кислоту.

2.4. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

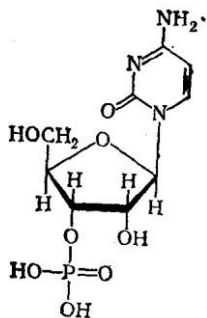
Нуклеопротеиды – это сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты. Белковым компонентом в нуклеопротеидах чаще всего являются основные белки – гистоны или протамины. Они обладают основными свойствами, т.к. в них содержится много основных аминокислот – лизина и аргинина.

Нуклеиновые кислоты являются сложными биополимерами, структурной единицей которых является нуклеотид. В состав нуклеотида входит пуриновое или пиримидиновое основание, пентоза (рибоза или дезоксирибоза) и остаток фосфорной кислоты. В нуклеиновых кислотах встречаются два пуриновых основания – аденин и гуанин и три пиримидиновых – тимин, цитозин и урацил.

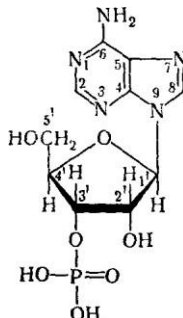
Основания связаны с пентозой при помощи N-гликозидной связи, которая образуется между 1'-углеродным атомом пентозы и атомом азота пуринового (N⁹) или пиримидинового (N¹) основания. Соединение, в состав которого входит пуриновое или пиримидиновое основание и сахар (пентоза) называется нуклеозидом. Фосфорная кислота присоединяется к 3'-углеродному атому пентозы в результате образования эфирной связи.

Нуклеотиды соединяются друг с другом тоже при помощи эфирной связи и образуют полинуклеотид. Эфирная связь возни-

кает между остатком фосфорной кислоты одного нуклеотида и 5'-углеродным атомом пентозы другого нуклеотида.



Цитидин-3'-фосфат



Аденозин-3'-фосфат

В состав живых организмов входят два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК). В состав ДНК входят 4 основания (аденин, гуанин, тимин и цитозин), сахар – дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты. В состав РНК входят тоже 4 основания (аденин, гуанин, урацил и цитозин), сахар – рибоза и остаток фосфорной кислоты.

Если белок связан с ДНК, образуется дезоксирибонуклеопротеид (ДРНП), если с РНК – рибонуклеопротеид (РНП). В ДРНП и РНП нуклеиновые кислоты и белки связаны друг с другом в основном ионными связями, которые образуются между гуанидиновой группы аргинина или свободной аминогруппой лизина со структурными элементами фосфорной кислоты нуклеиновых кислот. Нуклеиновая кислота и белок в нуклеопротеиде взаимно стабилизируют друг друга, что значительно повышается их устойчивость к денатурации.

Выделение нуклеопротеидов из биологического материала можно осуществлять различными методами: экстракцией водой или слабыми и средними растворами щелочей и солей с последующим осаждением нуклеопротеидов уксусной кислотой, ультрацентрифугированием, гельфильтрацией и др. При применении любого из них сначала надо разрушить клеточную оболочку. Для этого материал, взятый для исследования, гомогенизируют.

Все нуклеопротеиды можно подвергнуть гидролитическому распаду, при котором происходит последовательный разрыв сна-

чала эфирных, а затем гликозидных связей. Сначала нуклеопро- теиды распадаются на простые белки и нуклеиновые кислоты. Затем белки могут подвергнуться гидролизу до пептонов, пепти- дов и даже до аминокислот. Нуклеиновые кислоты расщепляются с образованием нуклеотидов, которые затем подвергаются даль- нейшему гидролизу с образованием пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. Схема гидролитического распада представлена на рисунке 4.

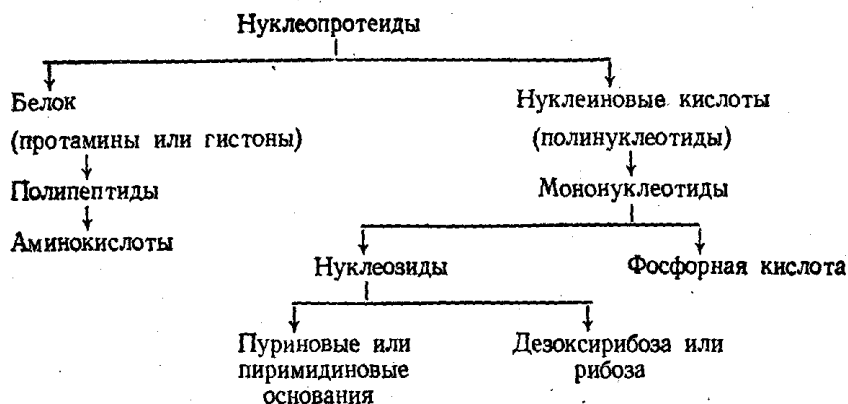


Рис. 4. Схема распада нуклеопро- теидов

При мягком гидролизе происходит сравнительно неглубокий распад белка. Пиримидиновые нуклеотиды при таком гидролизе не распадаются, а пуриновые распадаются с образованием пури-новых оснований (аденин и гуанин), рибозы и фосфорной кисло- ты. Проводя гидролиз при определенных условиях, можно после- доовательно выделить различные промежуточные продукты гид-ролитического распада нуклеопро-теидов и определить их при по- мощи качественных реакций.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Выделение рибонуклеопро- теидов.

Для получения рибонуклеопро-теидов 10 г дрожжей помеща- ют в ступку. Добавляют туда 4 мл водно-эфирной смеси (1:1) и перемешивают. Затем прибавляют 5 г кварцевого песка и тща-

тельно растирают, приливая небольшими порциями 50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия (NaOH). Полученную массу растирают не менее 15 мин, после чего суспензию фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют. Полученный осадок выбрасывают, а весь фильтрат (центрифугат) собирают. Помещают его в стакан и понемногу прибавляют 10% раствор уксусной кислоты (около 5–6 мл). После каждого прибавления лакмусовой бумажкой проверяют реакцию среды. Кислоту добавляют до тех пор, пока среда не станет слабо кислой. В этих условиях нуклеопротеиды выпадают в осадок. Полученную суспензию центрифугируют, фильтрат сливают и отделяют осадок нуклеопротеидов.

4.2. Гидролиз нуклеопротеидов.

Полученный осадок нуклеопротеидов переносят в колбу для гидролиза и добавляют туда 20 мл 10% серной кислоты. Колбу закрывают пробкой, к которой подсоединен обратный воздушный холодильник и нагревают (слабо кипятят) на водяной кипящей бане (или на сетке) в течение 1 часа. После этого гидролизат отфильтровывают и проводят с ним качественные реакции на наличие продуктов гидролиза.

4.3. Определение белков и пептидов.

При проведении гидролиза при условиях, указанных в пункте 4.2, белки подвергаются ему лишь частично и расщепляются только до пептидов. Белки и пептиды в гидролизате обнаруживают с помощью биуретовой реакции. Для этого берут пробирку и вносят в нее 10 капель полученного раствора гидролизата, прибавляют 10 капель 10% раствора NaOH и 2 капли 1% раствора сульфата меди (CuSO₄). Все тщательно перемешивают, наблюдают за изменением цвета (появляется розовая или розово-фиолетовая окраска) и делают выводы.

4.4. Открытие пуриновых оснований.

В пробирку наливают 10 капель гидролизата и осторожно, по каплям, добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу, а затем вносят 8–10 капель аммиачного раствора нитрата серебра. Через несколько минут выпадает хлопьевидный светло-коричневый осадок солей пуриновых оснований.

4.5. Открытие пентоз.

Обнаружение пентоз основано на их дегидратации концентрированными кислотами с образованием фурфурола, который дает с тимолом (реакция Молиша), α -нафтолом и орцином окрашенные соединения. *Внимание!* Эти реакции проводят только в сухих пробирках. Рибозу и дезоксирибозу можно открыть реакцией с дифениламином, который с рибозой дает зеленое окрашивание, а с дезоксирибозой – синее.

4.5.1. Реакция Молиша. В пробирку наливают 10 капель гидролизата, добавляют 2–3 капли 1% спиртового раствора тимола и хорошо перемешивают. Затем осторожно, по стенке пробирки, наслаивая, приливают 10–15 капель концентрированной серной кислоты. Появляется красное окрашивание, которое наиболее хорошо выражено на границе раздела жидкостей.

4.5.2. В пробирку наливают 10 капель гидролизата, добавляют 1–2 капли 0,1% раствора α -нафтола и хорошо перемешивают. Затем осторожно, по стенке пробирки, приливают 10–15 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе раздела двух фаз появляется фиолетовое окрашивание.

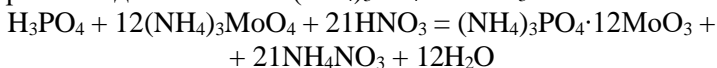
4.5.3. В пробирку наливают 10 капель гидролизата, добавляют 10–15 капель орцина и 15–20 капель концентрированной соляной кислоты. Смесь нагревают до кипения и наблюдают появление окрашивания (зеленого или розово-красного).

4.5.4. Открытие рибозы и дезоксирибозы.

В пробирку наливают 5 капель гидролизата, добавляют 15–20 капель 1% раствора дифениламина и кипятят на водяной бане. Через 15–20 минут кипения в пробирке появляется сине-зеленое окрашивание.

4.6. Обнаружение фосфорной кислоты.

4.6.1. В пробирку наливают 10 капель гидролизата, добавляют 20 капель раствора молибдата аммония в азотной кислоте и кипятят на водяной бане. Жидкость в пробирке приобретает лимонно-желтый цвет. Пробирку достают из бани и сразу же охлаждают под струей холодной воды. Образуется желтый осадок фосфоромолибдата аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.



4.6.2. В пробирку наливают 10 капель гидролизата и постепенно добавляют концентрированный раствор аммиака до появления резкого запаха, а затем 10 капель магниальной смеси. Образуется кристаллический осадок фосфата магний-аммония $MgNH_4PO_4$.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, экспериментальных данных, таблиц и выводов. Все полученные экспериментальные данные сводятся в таблицу 15.

Таблица 15

Изучение продуктов гидролиза нуклеопротеидов

№ п/п	Название реакции	Материал исследования	Используемые реактивы	Эффект реакции	Чем обусловлена реакция

Приводится схема гидролиза нуклеопротеидов и делается вывод об их составе.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какие вещества называются нуклеопротеидами?
- 6.2. Каким образом связываются полимерные цепи нуклеопротеидов?
- 6.3. Какую роль играют нуклеопротеиды в биохимических процессах обмена веществ?
- 6.4. Какие способы выделения нуклеопротеидов существуют и на чем они основаны?
- 6.5. Каковы продукты гидролитического распада нуклеопротеидов?
- 6.6. При помощи каких связей соединены нуклеотиды в нуклеиновой кислоте?
- 6.7. Что является структурной единицей нуклеиновых кислот и что входит ее состав?
- 6.8. Какие основания входят в состав нуклеотидов?
- 6.9. Какие сахара входят в состав нуклеотидов?

6.10. При помощи каких связей соединены друг с другом основание и сахар, сахар и фосфорная кислота в нуклеотиде?

6.11. Какие нуклеиновые кислоты входят в состав живых организмов? Каков их химический состав?

6.12. При помощи каких качественных реакций обнаруживают продукты гидролитического распада нуклеопротеидов:

- белки и пептиды;
- пуриновые основания;
- пентозы;
- фосфорную кислоту?

ГЛИКОПРОТЕИДЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить состав и строение гликопротеидов.

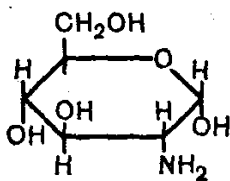
2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Выделить муцин из слюны.
- 2.2. Провести реакции, доказывающие присутствие углеводного компонента в муцине.
- 2.3. Провести реакции, доказывающие присутствие белкового компонента в муцине.
- 2.4. Открыть углеводный компонент в яичном белке.

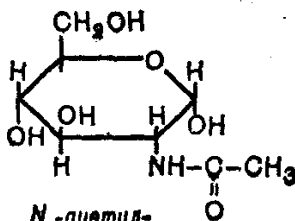
3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Гликопротеиды (гликопротеиды) – это сложные белки, простетической группой которых являются углеводы. Углеводный компонент может содержать нейтральные сахара, аминсахара, уроновые кислоты и некоторые другие соединения. У некоторых гликопротеидов углеводная часть непрочно связана с белком и легко от него отделяется. Простетические группы некоторых гликопротеидов могут встречаться в тканях и в свободном состоянии. К ним относятся мукополисахариды.

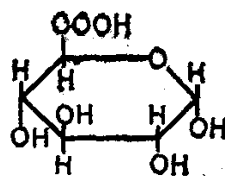
В состав мукополисахаридов помимо гексоз могут входить гексозамины (глюкозамин, галактозамин), гексуриновые (чаще всего глюкуроновая) кислоты, уксусная и серная кислоты и другие вещества.



D-глюкозамин



N-ацетил-
глюкозамин



Глюкуроновая
кислота

В зависимости от состава различают кислые и нейтральные мукополисахариды. К кислым относятся гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты и гепарин.

Молекула гиалуроновой кислоты построена из остатков глюконовой кислоты и ацетилглюкозамина. Гиалуроновая кислота входит в состав соединительной ткани, роговицы глаза, стекловидного тела, сердечных клапанов. Хондроитинсерная кислота содержится в хрящевой и соединительной ткани, гепарин – в ткани печени и легких.

В состав нейтральных мукополисахаридов входят нейтральные сахара (галактоза, манноза, L-фукоза), сиаловые кислоты. Нейтральные мукополисахариды входят в состав слизистых секретов – слюны, желудочного сока, содержатся в плазме крови, в гормонах и т.д.

Гликопротеиды, в состав которых входят мукополисахариды, получили название мукопротеидов. К ним относятся муцины, входящие в состав многих тканей и особенно в большом количестве встречающиеся в хрящах, костной и соединительной ткани, слюне и т.д. Гликопротеиды нерастворимы в воде, хорошо растворимы в щелочах и осаждаются при подкислении.

3. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.

4.1. Выделение муцина из слюны.

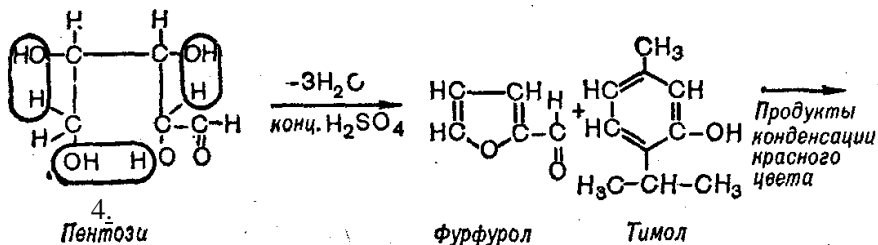
В пробирку собирают 1–2 мл слюны. Затем по каплям (*под тягой!*) приливают 10–20 мл концентрированной уксусной кислоты. При этом выпадает осадок муцина. Жидкость осторожно сливают из пробирки, а последнюю ее порцию вместе со сгустком муцина переносят на фильтр. Сгусток слегка подсушивают фильтровальной бумагой и переносят в чашку Петри или на часовое стекло.

4.2. Открытие углеводного компонента в муцине.

4.2.1. Реакция Молиша. Реакция Молиша является качественной реакцией на пентозу. Для ее проведения часть сгустка муцина переносят в пробирку. Добавляют к нему 1% спиртовой раствор тимола в количестве, приблизительно равном 1/3 объема муцина и тщательно перемешивают. Затем осторожно по стенке прибавляют концентрированную серную кислоту в объеме в 8–10 раз, превышающем затраченный объем тимола и несколько раз хорошо встряхивают пробирку. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации фурфурола с тимолом, который

имеет красный цвет. *Внимание!* Эту реакцию проводят только в сухой пробирке.

Химизм этой реакции следующий. При взаимодействии концентрированной серной кислотой с гексозами или пентозами происходит их дегидратация. При этом из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол, которые дают с тимолом продукт конденсации красного цвета:



4.2.2. Реакция с α -нафтолом. Реакция с α -нафтолом является качественной реакцией на углеводы. Часть сгустка муцина переносят в пробирку. Добавляют к нему приблизительно двукратный объем 0,2% спиртового раствора α -нафтола, 20 капель концентрированной серной кислоты и хорошо перемешивают. Появление розово-фиолетового окрашивания говорит о присутствии в муцине углеводов. *Внимание!* Эту реакцию проводят только в сухой пробирке.

4.3. Определение в муцине белкового компонента.

Белки в муцине обнаруживают с помощью биуретовой реакции. Для этого берут пробирку и переносят в нее часть сгустка муцина, прибавляют равный объем 10% раствора NaOH и в пять раз меньше 1% раствора сульфата меди (CuSO_4). Все тщательно перемешивают и наблюдают за изменением цвета (появляется сине-фиолетовая окраска).

4.4. Открытие углеводного компонента в яичном белке.

Открытие углеводного компонента в яичном белке, также, как и его открытие в муцине, проводится с помощью реакции Молиша и с помощью α -нафтола (см. пункты 4.2.1 и 4.2.2).

Для этого в две пробирки наливают по 10 капель 10% раствора яичного белка. Затем в одну добавляют 2–3 капли 1% спирто-

вого раствора тимола, а в другую 1–2 капли 0,1% раствора α -нафтола. Содержимое обеих пробирок хорошо перемешивают и затем в каждую из них осторожно, по стенке, нашлаивая, приливают по 10–15 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе раздела двух фаз в первой пробирке появляется красное окрашивание, а во второй – фиолетовое.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, уравнений реакции, экспериментальной части и выводов.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какой состав имеют гликопротеиды?
- 6.2. Что входит в состав простетической группы гликопротеидов?
- 6.3. Какую роль играют гликопротеиды в организме?
- 6.4. Какая реакция является качественной на пептозу и каков её химизм?
- 6.5. Какая реакция является качественной реакцией на углеводы?
- 6.6. Какие ткани в живых организмах содержат большое количество гликопротеидов?

УГЛЕВОДЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить реакционные способности моно- ди- и полисахаридов.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести цветную реакцию на углеводы с α -нафтолом.
- 2.2. Выполнить качественные реакции на альдегидную группу.
- 2.3. Выполнить реакцию Селиванова на кетозы.
- 2.4. Сравнить реакционную способность восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов.
- 2.5. Провести для крахмала ферментативный гидролиз и реакцию с йодом.
- 2.6. Сделать вывод о реакционной способности моно-, ди- и полисахаридов.
- 2.7. Составить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводы, или сахара представляет собой самый распространенный на Земле класс органических соединений. В химическом отношении углеводы являются многоатомными альдегидо- и кетоспиртами. Все углеводы делят на две большие группы: моносахариды и полисахариды.

Моносахариды хорошо растворимы в воде, не гидролизуются. Наиболее важными представителями моноз являются глюкоза (альдоза) и фруктоза (кетоза) с общей формулой $C_6H_{12}O_6$. Химически активны. Для моноз наиболее важными являются реакции по карбонильной группе, в которой они вступают в открытой ценной форме.

К реакциям окисления относятся реакции с солями меди(II) и серебра(I) в щелочной среде, в которых глюкоза и фруктоза выступают в роли восстановителей. Эти реакции известны как качественные на альдегидную группу. Фруктоза, в отличие от кетонов, дает реакцию «серебряного зеркала», но здесь нет противоречия. В щелочной среде окисление кетоз протекает с образованием

промежуточных продуктов окисления, содержащих альдегидную группу. В отличие от альдегидов глюкоза не вступает в цветную реакцию с фуксинсернистой кислотой.

Для кетоз показательной является реакция Селиванова с резорцином. По карбонильной группе идут реакции с синильной кислотой, гидразином, гидроксилмином, водородом. По спиртовым гидроксилам полу-ацетатной формы идут реакции с образованием гликозидов, простых и сложных эфиров, сахаратов меди.

Явление мутаротации характерно для растворов всех моносахаридов.

Дисахариды (сахароподобные) простейшие представители полисахаридов.

Растворимы в воде, при гидролизе дают 2 молекулы моносахаридов. Общая формула $C_{12}H_{22}O_{11}$. В зависимости от строения дисахаридов, наличия или отсутствия у них свободного полуацетального гидроксила различают восстанавливающие и невосстанавливающие дисахариды.

К восстанавливающим относятся лактоза, мальтоза; к невосстанавливающим – сахароза. За счет свободного полуацетального гидроксила лактоза(мальтоза) может переходить в открытую карбонильную форму и проявлять восстановительные свойства подобно глюкозе. Невосстанавливающие дисахариды существуют только в циклической форме и не способны быть восстановителями. Сахароза, как любой дисахарид, легко гидролизуеться в кислой среде образованием D-глюкозы и D-фруктозы.

В отличие от сахарозы продукты ее гидролиза способны к мутаротации, к окислительно-восстановительным реакциям.

Полисахариды (несахароподобные) являются природными полимерными соединениями с общей формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$. Важнейшие представители – крахмал и клетчатка. Мономером для построения цепей этих полисахаридов служит D-глюкоза, но у крахмала она присутствует в α -форме, у клетчатки – в β -форме.

Цепи у крахмала разветвленные, у клетчатки – нет, и звенья повернуты у последней под углом 90° друг по отношению к другу. По гидроксильным группам полимерные цепи клетчатки соединяются поперечными водородными связями, что придаст волокнам особую прочность. Для крахмала известны две реакции: с

йодом (протекает с образованием неустойчивого окрашенного комплекса) и реакция гидролиза.

Для клетчатки наиболее типичными являются реакции, протекающие с участием трех свободных гидроксильных групп в каждой мономерной единице. Гидролиз протекает в более жестких условиях, чем для крахмала. Конечный продукт гидролиза – та же D-глюкоза, промежуточный – деллобиоза.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Цветная реакция на углеводы с α -нафтолом

В одну пробирку внесли 3 мл воды и 5 капель 0,5%-ного раствора глюкозы, а в другую – 3 мл йода и примерно 0,25 чайной ложки тертого сырого картофеля. В каждую пробирку добавить по 5 капель свежеприготовленного 10% раствора α -нафтола. Небольшое помутнение раствора объясняется выпадением α -нафтола. Из пипетки по стенке осторожно прилить 2 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы она опустилась дно, не смешиваясь с водным слоем. На границе слоев появляется красно-фиолетовое кольцо, свидетельствующее о присутствии в растворе углевода. Окраска принадлежит сульфированному продукту конденсации α -нафтола с моносахаридом.

4.2. Взаимодействие моносахаридов с солями меди (II) в щелочной среде.

В две пробирки поместить по 1 мл 0,5%-ных растворов глюкозы и фруктозы и по 10 капель 0,2 н. раствора NaOH. К полученным смесям добавить по 2 капли 0,2 н. раствора CuSO_4 , и по 12 капель воды. Образующийся вначале голубоватый осадок гидроксида меди (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2$ мгновенно растворяется с образованием прозрачного раствора сахарата меди, имеющего слабо синюю окраску.

При осторожном нагревании щелочных растворов сахаратов меди в обеих пробирках первоначально происходит окрашивание растворов в оранжево-желтый цвет за счет образования гидроксида меди (I) CuOH ; более длительное нагревание приводит к выпадению красного осадка оксида меди (I) Cu_2O .

Выделяющийся при восстановлении гидроксида меди (II) кислород идет на окисление моносахарида. Окисление в щелочной среде моносахаридов протекает с разрывом углеродной цепи и приводит к образованию смеси продуктов окисления.

4.3. Реакция «серебряного зеркала»

В чистой, обезжиренной пробирке смешать 1 мл 0,2N раствора азотнокислого серебра AgNO_3 с 2 мл 2 н. раствора едкого натра NaOH и по каплям прибавлять 2 н. раствора аммиака до полного растворения осадка гидроксида серебра AgOH . К полученному раствору комплексной соли $[\text{Ag}(\text{NO}_3)_2]\text{OH}$ прибавить 1 мл 0,5%-ного раствора глюкозы и слегка нагреть в пламени спиртовки. Металлическое серебро выделяется на стенках пробирки в виде блестящего зеркального налета.

Какую роль выполняет глюкоза в этой реакции?

4.4. Восстановление аммиачного раствора окиси серебра фруктозой

В условиях опыта 3 провести реакцию «серебряного зеркала» для фруктозы (кетозы).

Вспомним, что эта реакция является качественной на альдегиды. Кетоны в эту реакцию не вступают.

Чем объяснить, что окисление оксидов серебра в щелочной среде служит качественной реакцией на все моносахариды (альдозы, кетозы)?

Составить уравнение реакции окисления фруктозы в условиях опыта.

4.5. Реакция с фуксинсернистой кислотой для глюкозы

В две пробирки налить по 2 мл бесцветную насыщенного раствора фуксинсернистой кислоты. В одну пробирку добавить 2 мл 40%-ного раствора формалина, в другую – 2 мл 0,5%-ного раствора глюкозы. В пробирке с формальдегидом через некоторое время появляется интенсивная розово-фиолетовая окраска (выделяется свободный фуксин).

Появляется ли аналогичное окрашивание в пробирке с глюкозой?

Все ли качественные реакции на альдегидную группу присущи и альдозам?

4.6. Реакция Селиванова на кетозы

Смешать в пробирке 1 мл 0,3%-ного раствора фруктозы с 2 мл реактива Селиванова (0,05 г резорцина растворить в 100 мл HCl 1:1). Содержимое пробирки нагреть до начала кипения. Жидкость постепенно окрашивается в красный цвет за счет образования продуктов конденсации резорцина с фруктозой.

4.7. Взаимодействие дисахаридов с солями меди в щелочной среде

В условиях опыта 2 провести взаимодействие 0,5%-ных растворов лактозы и сахарозы с солями меди (II).

Почему изменение окраски растворов при нагревании происходит только в одной пробирке (какой)?

Составьте уравнение протекающих реакций и свяжите результаты опыта со спецификой поведения восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов.

4.8. Кислотный гидролиз сахарозы

В пробирку поместить 1 мл 1%-ного раствора сахарозы, 1 мл 2Н раствора соляной кислоты и 3 мл воды. Содержимое пробирки нагревать на кипящей водяной бане в течение 30–40 мин. Половину раствора затем отлить в другую пробирку, добавить к ней несколько капель 2 н. раствора NaOH (до появления щелочной реакции на лакмус) и 1 мл 0,2 н. раствора CuSO_4 . При нагревании появляется оранжево-желтое окрашивание, доказывающее образование глюкозы в продуктах гидролиза сахарозы. К оставшейся части гидролизованного раствора сахарозы (первая пробирка) добавить 2 мл реактива Селиванова и нагреть до кипения.

Почему возникает розовое окрашивание раствора? Составить уравнение гидролиза сахарозы.

4.9. Ферментативный гидролиз крахмала

К 2 мл крахмального клейстера (2%-ный раствор) добавить такое же количество слюны и стеклянной палочкой перемешивать раствор в течение двух минут. В пробирку с гидролиза том крах-

мала добавить 2 мл 2 н. раствора NaOH и 1 мл 0,2 н. раствора CuSO_4 . О чем свидетельствует появление желтого окрашивания при нагревании раствора гидролизата? Написать уравнение ферментативного гидролиза крахмала до мальтозы. Обладают ли крахмал и мальтоза восстанавливающими свойствами?

4.10. Реакция крахмала с йодом

К 2 мл крахмальной клейстера (2%-ный раствор) добавить 1 мл 0,01 н. водного раствора йода. Появляется характерное синее окрашивание раствора. Нагреть раствор до кипения и охладить. Какие изменения претерпевает окраска раствора в процессе нагрева и охлаждения и почему?

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, экспериментальной части, описания наблюдаемых изменений и ответов на вопросы.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

- 6.1. Классификация углеводов. Важнейшие представители.
- 6.2. Моносахариды: строение, D и L-ряды, α и β -формы.
- 6.3. Какие функциональные группы характерны для моносахаридов и какими реакциями можно подтвердить их присутствие?
- 6.4. Какие качественные реакции альдегидов характерны для моносахаридов?
- 6.5. Как объяснить наличие реакции «серебряного зеркала» у кетоз?
- 6.6. Какой реакцией можно обнаружить присутствие кетоз в растворе?
- 6.7. Чем определяется деление дисахаридов на восстанавливающие и невосстанавливающие? Важнейшие представители.
- 6.8. Какое явление носит название «явление мутаротации». Будет ли мутаротировать мальтоза, лактоза, сахароза и продукты их гидролиза?
- 6.9. Как протекает гидролиз полисахаридов в зависимости от условий проведения реакции?
- 6.10. В чем сходство и различие крахмала и клетчатки?

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить содержание глюкозы в биологических жидкостях.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Приготовить мышечный экстракт.
- 2.2. Получить безбелковый фильтрат.
- 2.3. Провести количественное определение глюкозы фотоэлектроколориметрическим методом.
- 2.4. Рассчитать содержание глюкозы в мышечном экстракте.
- 2.5. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводы входят в состав практически всех живых организмов. Они играют важнейшую роль в обмене веществ и выполняют разнообразные функции. При этом их содержание и функции у разных организмов различны. В наибольших количествах углеводы содержатся у растений (до 80% от сухой массы), поскольку в растительных организмах основной их функцией является пластическая или строительная.

В организме человека и животных углеводы содержатся в значительно меньших количествах, чем у растений (не более 2% от сухой массы), т.к. основной их функцией является энергетическая. Энергия, выделяющаяся при расщеплении углеводов, аккумулируется в макроэргических связях АТФ и обеспечивает все процессы жизнедеятельности организмов. Углеводы также являются исходными продуктами для синтеза других органических соединений. Из промежуточных продуктов их расщепления, таких как 3-фосфоглицериновый альдегид, пировиноградная кислота (ПВК), ацетилКоА в организмах могут образовываться компоненты липидов (глицерин и высшие жирные кислоты), белков (заменимые аминокислоты) и нуклеиновых кислот (пентозы).

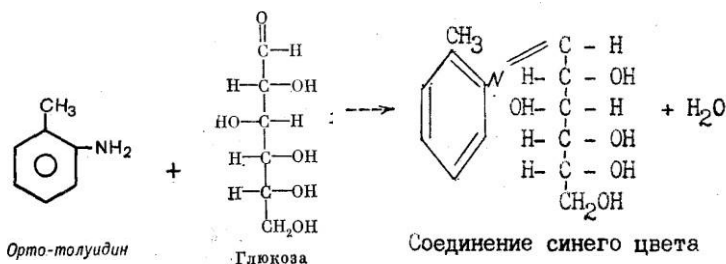
Организм человека и животных не способен синтезировать углеводы из органических веществ и получает их в готовом виде с различными пищевыми продуктами, главным образом растительного происхождения. Углеводы, поступившие в организм,

подвергаются перевариванию в желудочно-кишечном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов, в основном в виде глюкозы. Током крови она разносится по всему телу и все клетки, органы и ткани черпают из нее глюкозу для покрытия своих энергетических потребностей.

Несмотря на постоянное потребление глюкозы из крови тканями и поступление из кишечника после приёма пищи, ее содержание в крови постоянно и колеблется в пределах 3,3–5,5 ммоль/л (60–100 мг/л). Эта постоянство поддерживается в результате сложных механизмов регуляции, которые находятся под контролем центральной нервной системы. Важнейшую роль в этой системе играют гормоны. Так, адреналин и глюкагон повышают содержание глюкозы в крови, а инсулин понижает ее.

Для количественного определения глюкозы в биологических жидкостях применяют фотоэлектроколориметрический метод. Он основан на определении степени интенсивности окрашивания раствора, образующегося при взаимодействии глюкозы с ортотолуидиновым реактивом. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы. При помощи этого метода глюкозу можно определить только при отсутствии белков, поэтому их предварительно осаждают 5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХК).

Этот метод является специфичным и точным. Он даёт возможность определять истинную глюкозу, так как другие редуцирующие вещества (глюкуроновая кислота, аскорбиновая кислота и др.) с ортотолуидиновым реактивом окрашивания не дают. Взаимодействие глюкозы с орто-толуидином выражается следующей реакцией:



4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Приготовление мышечного экстракта.

На технических весах взвешивают 10 г мышечной ткани свежей рыбы или мяса и помещают в охлажденную, стоящую на льду ступку. Отмеряют 50 мл охлажденного 0,04 М раствора никотинамида и заливают им взятую навеску. Затем мышцы измельчают ножницами, добавляют кварцевый песок, растирают в ступке до получения гомогенной массы и экстрагируют 30–40 минут. После этого полученный экстракт переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут. Полученный экстракт используют в качестве исходного материала для определения глюкозы.

4.2. Получение безбелкового фильтрата.

В микропипетку набирают 0,5 мл полученного экстракта или другого биологического раствора (например, крови или мочи), вносят его в центрифужную пробирку и добавляют 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты (работают *осторожно* – это едкое вещество). При наличии белка раствор мутнеет. Содержимое пробирки перемешивают, переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотах в минуту в течение 5 минут. Белок при этом осаждается. Безбелковый фильтрат (он должен быть прозрачным) сливают и используют его для последующего анализа.

4.3. Количественное определение глюкозы.

4.3.1. Определение оптической плотности глюкозы в полученном фильтрате.

В микропипетку набирают 0,2 мл полученного фильтрата и переносят его в высокую тонкостенную *сухую* пробирку и добавляют 2 мл ортотолуидинового реактива (раствор о-толуидина в уксусной кислоте). Работают *осторожно*, под тягой, т.к. о-толуидин является ядовитым веществом. Пробирку закрывают алюминиевой фольгой и помещают ее точно на 8 минут в кипящую водяную баню, следя за тем, чтобы вода все время кипела. После чего достают пробирку из водяной бани и быстро охлаждают в токе холодной воды до 20°C. Ее содержимое переносят в кювету на 1 см и фотометрируют при длине волны 630 нм против

раствора сравнения. Полученные данные записывают в таблицу 16.

Таблица 16

Результаты фотометрирования калибровочных растворов

№ про- бирки	Фильтрат, (мл)	Калибровочный раствор, (мл)	Реактив, (мл)	Д (оптиче- ская плот- ность)
1	0,20	–	2,00	
2	–	0,20	2,00	

Раствор сравнения готовят, смешивая 0,2 мл раствора трихлоруксусной кислоты и 2 мл ортотолуидинового реактива, но в качестве его обычно используют воду. Это связано с тем, что в ТХК не содержится даже следов глюкозы, поэтому окраска с ортотолуидиновым реактивом не развивается. Для получения точных данных измерение должно быть проведено не позже 30 минут после охлаждения пробирок!

4.3.2. Определение оптической плотности глюкозы в калибровочном растворе.

Готовят калибровочный раствор глюкозы с концентрацией 10 ммоль/л. Для этого к 0,2 мл эталонного раствора глюкозы (концентрация 25 ммоль/л) прибавляют 0,3 мл дистиллированной воды. Определение оптической плотности полученного раствора ведут аналогично определению оптической плотности глюкозы в полученном фильтрате (пункт 4.3.1) и параллельно ему. Эталон и раствор сравнения не центрифугируют. Пробу и калибровочный раствор можно отмерять одной и той же микропипеткой. Результат определения записывают в таблицу 1.

При повышенных концентрациях глюкозы, особенно при анализе мочи, пробу необходимо разводить в 2 и даже в 10 раз дистиллированной водой. Дальнейший ход работы остаётся без изменений, а результаты анализа умножают на число разведений.

4.4. Определение содержания глюкозы.

Содержание глюкозы рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \cdot 10,$$

где X – содержание глюкозы, ммоль/л;
 A – оптическая плотность пробы;
 B – оптическая плотность эталона;
10 – концентрация глюкозы в калибровочном растворе, ммоль/л.

Для определения содержания глюкозы в миллиграммах используют следующее отношение: ммоль/л = 0,0555 мг/100 мл.

При нормальных и повышенных концентрациях глюкозы ошибка определения составляет около $\pm 2\%$, а при пониженных ее концентрациях ошибка составляет около $\pm 7-8\%$.

Для достижения правильных результатов необходимо строго соблюдать постоянство условий нагревания. Растворы должны нагреваться в одинаковых пробирках, иначе нагревание будет не равномерным. В случае необходимости объём пробы, а также объём всех других растворов можно увеличить вдвое.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, уравнений протекающих реакций, экспериментальных данных, расчетов и выводов.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какие функции выполняют углеводы в организме?
- 6.2. Каким образом поступают углеводы в живые организмы?
- 6.3. С помощью какого реактива удаляются белки из биологических жидкостей перед определением сахара?
- 6.4. Какой метод положен в основу определения глюкозы в биологических жидкостях?
- 6.5. Почему определение глюкозы ортотолуидиновым методом является точным?

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить процесс анаэробного окисления углеводов.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести определение интенсивности брожения.
- 2.2. Провести реакции, обнаруживающей этанол.
- 2.3. Провести реакции, доказывающие присутствие углекислого газа.
- 2.4. Сформулировать вывод и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основным источником энергии для клеток животных, растений и многих бактерий, является окисление глюкозы, протекающее в две стадии: анаэробную и аэробную.

Анаэробная стадия окисления глюкозы в клетках человека и животных получила название *гликолиз*. Гликолиз является первым, а в анаэробных условиях основным процессом катаболизма глюкозы, освобождающаяся при этом энергия аккумулируется в молекулах АТФ (рис. 5). Гликолиз протекает в цитоплазме, состоит из 10 реакций и условно делится на три фазы.

Первая – активирование глюкозы (пусковая реакция) и подготовка к расщеплению на две фосфотриозы; расщепление фруктозо-1,6-дифосфата и изомеризация дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат.

Вторая – окисление двух молекул глицеральдегид-3-фосфата до двух молекул пирувата и аккумуляция освобождающейся энергии в сопряженном процессе субстратного фосфорилирования АДФ с образованием АТФ.

Третья – в анаэробных условиях, для поддержания процесса, НАД⁺ выполняет роль кофермента-переносчика пары водорода от глицеральдегид-3-фосфата на пируват, обеспечивая клетку энергией.

Значение гликолиза особенно велико для тканей с ограниченным доступом кислорода и испытывающих периодически резкое возрастание потребления АТФ.

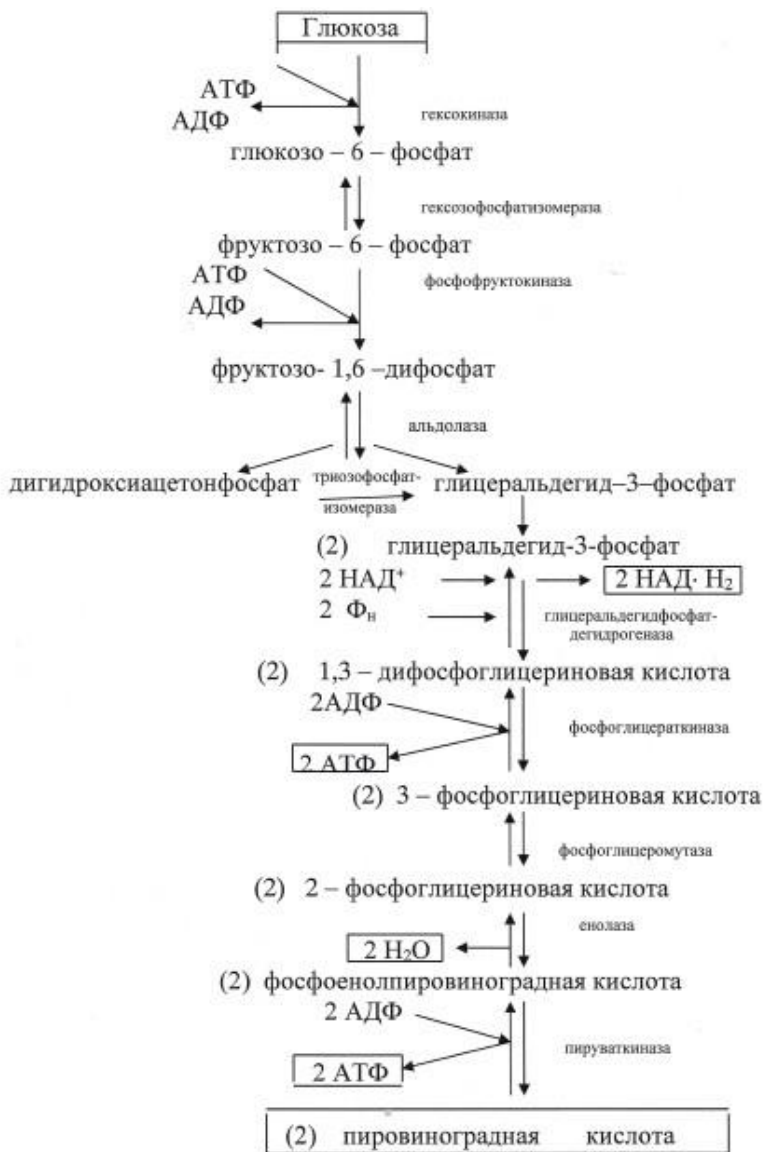


Рис. 5. Схема гликолиза

В рамках помещены исходные субстраты и конечные продукты гликолиза. Цифрами в скобках обозначено число молекул

Гликолиз может начинаться либо с фосфорилирования глюкозы, либо с фосфорилиза гликогена (или крахмала в растениях). В скелетных мышцах оба пути выражены в равной степени, а в мышце сердца и головном мозге преобладает фосфорилирование глюкозы.

Брожение – это окисление органических веществ, в том числе и углеводов, различными микроорганизмами в анаэробных условиях с целью получения энергии. Брожение происходит в окружающей среде, в пищевых продуктах. В отраслях пищевой промышленности чаще всего используется молочнокислое и спиртовое брожение. В данных видах брожения окислению подвергается глюкоза, и их химизм до образования пировиноградной кислоты совпадает с гликолизом.

Молочнокислое брожение – это процесс получения энергии молочнокислыми бактериями. По характеру различают два вида молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное, которые осуществляются соответствующими группами молочнокислых бактерий. Гомоферментативные (однотипнобродящие бактерии), в процессе брожения образуют в основном молочную кислоту и очень мало побочных продуктов. Они окисляют углеводы молока по пути гликолиза в анаэробных условиях, где пируват служит акцептором водорода от НАД·Н₂ и восстанавливается в конечный продукт брожения – лактат. Суммарное уравнение этого типа брожения можно записать так:



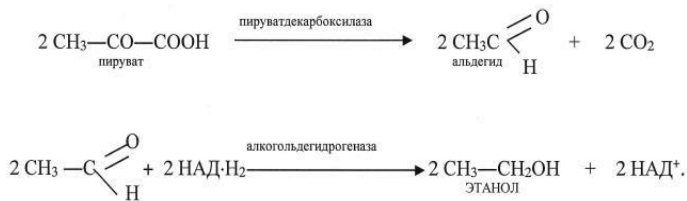
Лактат, накапливаясь до рН 4,8-4,6, вызывает скисание молока. Этот процесс лежит в основе квашения капусты, огурцов, помидор и других продуктов растительного происхождения, силосования кормов для животных. Образующийся лактат предотвращает развитие гнилостных бактерий, плесневых грибов, т.е. служит консервантом.

Гетероферментативные бактерии (разнотипнобродящие) – наряду с молочной кислотой образуют значительное количество других веществ: этанола, СО₂, уксусной кислоты. Окисление углеводов молока гетероферментативными молочнокислыми бактериями осуществляется своеобразной ферментативной системой в которой нет фермента альдолазы, но есть ферменты пентозо-

фосфатного цикла и других типов брожения. После фосфорилирования гексоза окисляется дегидрогеназой и декарбоксилируется, превращаясь в пентозофосфат. Последний расщепляется на глицеральдегид-3-фосфат и ацетилфосфат. Глицеральдегид-3-фосфат, как и у гомоферментативных молочнокислых бактерий, окисляется до пирувата, который затем восстанавливается в лактат, а НАД·Н₂ окисляется в НАД⁺. Ацетилфосфат дефосфорилируется и превращается в ацетат (уксусную кислоту), частично восстанавливается (через уксусный альдегид) в этанол. Таким образом, конечными акцепторами водорода в этом типе брожения служат пируват и уксусный альдегид.

Культуры гетероферментативных молочнокислых бактерий используют в производстве кефира, кумыса, курунги, мацони и других продуктов.

Спиртовое брожение осуществляется клетками дрожжевых грибов для получения энергии в анаэробных условиях. Большинство дрожжей сбраживает моносахариды, а именно глюкозу по пути гликолиза до образования пирувата. В анаэробных условиях, фермент дрожжей пируватдекарбоксилаза, превращает пируват в уксусный альдегид. Последний восстанавливается ферментом алкогольдегидрогеназой в этанол с окислением НАД·Н₂:

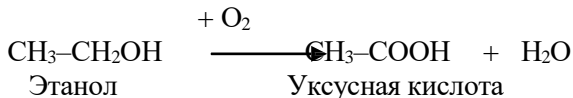


Суммарное уравнение спиртового брожения:



Пропионовокислые бактерии сбраживают углеводы до пропионовой, уксусной кислот и углекислого газа. Одна молекула пирувата окисляется до уксусной кислоты и СО₂ и две молекулы пирувата превращаются в пропионовую кислоту.

Уксуснокислые бактерии окисляют этанол и другие спирты до уксусной кислоты по реакции



Есть микроорганизмы осуществляющие маслянокислое, лимоннокислое и другие виды брожения. Многие брожения используются в пищевых технологиях и не менее важную роль они выполняют в природе.

Анаэробную стадию окисления глюкозы наиболее удобно изучать на спиртовом брожении, которое протекает по пути гликолиза. Процесс состоит из 12 реакций.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. *Определение интенсивности брожения.*

В ступку вносят 0,5–1 г дрожжей и растирают до однородной массы добавляя раствор с массовой долей сахарозы или глюкозы 5%. Содержимое из ступки переносят в трубку Эйнгорна (рис. 6), смывая несколько раз ступку и пестик 3–4 мл раствором сахаров так, чтобы запаянное колено было полностью заполнено смесью.

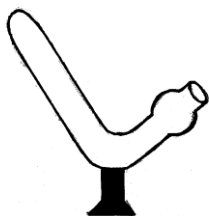


Рис. 6. Трубка Эйнгорна

Трубку помещают в термостат при 37–38°C на 2–3 часа. Интенсивность брожения учитывают каждые 15–30 мин по объему CO₂, который собирается в запаянном колене (в см³). Если брожение протекает интенсивно, то после каждого замера запаянное колено трубки Эйнгорна повторно заполняют той же бродящей смесью (смесь перемещают из расширенной части трубки в запаянное колено). После 4–5 замеров строят график интенсивности брожения. По оси ординат откладывают объем CO₂, по оси абсцисс – время замера (30, 60, 90, 120 и 150 мин от начала термостатирования).

4.2. Обнаружение этанола.

По окончании работы, отфильтровывают через складчатый фильтр 3–5 мл бродящей смеси в пробирку, добавляют 3–5 капель раствора Люголя и по каплям 10% раствор гидроксида натрия до обесцвечивания раствора. После этого пробирку с раствором нагревают на кипящей водяной бане. В зависимости от количества образовавшегося этанола через 3–5 мин появляется запах хлороформа.



4.3. Обнаружение углекислого газа.

После последнего замера прodelывают качественную реакцию на CO_2 . Для чего в бродильный прибор (не перемещая в нем смесь) приливают до краев раствор с массовой долей гидроксида натрия 10%, закрывают отверстие большим пальцем и содержимое хорошо перемешивают. При взаимодействии CO_2 со щелочью объем смеси уменьшается, создается вакуум и палец присасывается к отверстию.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, краткого описания хода выполняемых исследований, уравнения протекающих реакций, вывода.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. Биологическое окисление и его роль.
2. Стадии окисления глюкозы в клетках, место их локализации.
3. Характеристика анаэробной стадии окисления глюкозы.
4. Роль анаэробной стадии окисления глюкозы для животных, человека, растений и микроорганизмов.
5. Характеристика гомоферментативного молочнокислого брожения и его роли.
6. Характеристика гетероферментативного молочнокислого брожения и его роли.
7. Характеристика спиртового брожения и его роли.

8. Характеристика уксуснокислого брожения и его роли.
9. Характеристика химизма пропионовокислого брожения и его роли.
10. Использование брожения в пищевой промышленности.
11. Роль брожения в живой природе.

ВИТАМИНЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить качественные реакции витаминов и провести количественное определение некоторых из них.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Провести качественные реакции на жирорастворимые витамины:

- на витамин А (ретинол);
- на витамин Д (эргокальциферол, холикальциферол);
- на витамин Е (токотриенол)

2.2. Провести качественные реакции на водорастворимые витамины:

- витамин В₁ (тиамин);
- витамин В₂ (рибофлавин);
- витамин РР (никотиновая кислота и ее амид);
- витамин В₆ (пиридоксин)
- витамин С (аскорбиновая кислота).

2.3. Приготовить экстракт из растительного материала.

2.4. Определить содержание витамина С в исследуемом материале.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Витамины – это разнообразные по химическому строению низкомолекулярные органические вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности организма. Они являются необходимой составной частью пищи, т.к. в организме человека не синтезируются. Содержание витаминов в пище по сравнению с ее основными компонентами очень мало. При отсутствии в пище витаминов развиваются заболевания, которые носят общее название – авитаминозы, а при их недостаточном содержании – гиповитаминозы. Если содержание витаминов в пище велико, это тоже приводит к заболеваниям – гипervитаминозам. Суточная потребность в витаминах измеряется в милли- или микрограммах.

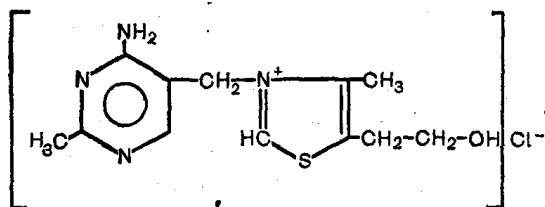
Витамины – это вещества, обеспечивающие нормальное протекание биохимических и физиологических процессов в организме. Поэтому они относятся к группе биологически

активных веществ (БАВ), которые влияют на обмен веществ. Это связано с тем, что водорастворимые витамины входят в состав сложных ферментов всех классов, кроме гидролаз, в качестве их простетических групп или коферментов. Следовательно, изменения в обмене веществ, происходящие при авитаминозах, являются результатом нарушения деятельности ферментативных систем. Роль жирорастворимых витаминов в процессе обмена веществ изучена в меньшей степени.

Все витамины, в зависимости от их отношения к воде, делятся на две группы: водорастворимые и жирорастворимые витамины. Все водорастворимые витамины, за исключением витамина С и Р, содержат в своем составе азот, поэтому их объединяют в комплекс витаминов группы В. Они обычно сопровождают друг друга в продуктах и обладают общим свойством – устойчивостью к нагреванию. В отличие от них, витамин С к нагреванию неустойчив. При нагревании он быстро разрушается, особенно в присутствии кислорода и солей тяжелых металлов.

К водорастворимым витаминам относятся витамины: В₁ – тиамин, В₂ – рибофлавин, РР (В₅) – никотиновая кислота и ее амид, В₆ – пиридоксин, В₃ – пантотеновая кислота, Н – биотин, В_с – фолиевая кислота, В₁₂ – цианкобаламин, В₁₅ – пангамовая кислота, С – аскорбиновая кислота, Р – рутин и некоторые другие.

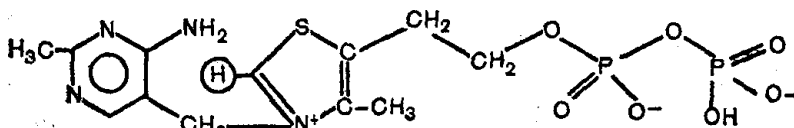
Витамин В₁ (тиамин) состоит из пиримидинового и тиазолового колец. В организме он входит в состав коферментов: ТПФ – тиаминпирофосфата и ТТФ – тиаминтрифосфата.



Тиамин (В₁)

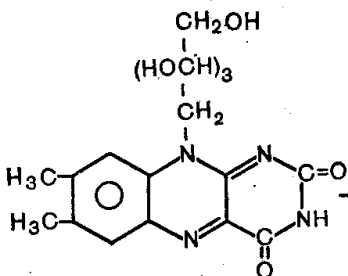
ТПФ является коферментом ферментов декарбоксилирования (декарбоксилаз) α-кетокислот, поэтому при его недостатке процессы декарбоксилирования будут нарушены. Это в первую очередь относится к декарбоксилированию пирови-

ноградной кислоты (ПВК) – важнейшего промежуточного продукта обмена углеводов.



Тиаминпирофосфат (ТПФ)

Витамин В₂ (рибофлавин) относится к группе естественных пигментов, известных под названием флавинов. Он представляет собой метилированное производное изоаллоксазина, к которому присоединен спирт рибитол. Его биологическое действие во многом определяет наличие активных двойных связей в циклической структуре рибофлавина. По месту двойных связей легко присоединяется водород, при этом рибофлавин, вещество желтого цвета, восстанавливается в бесцветное лейкосоединение.

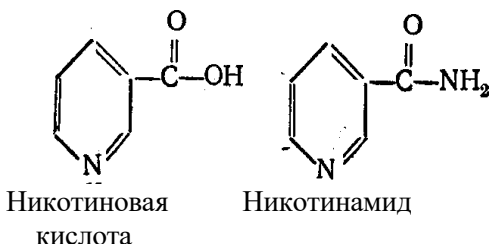


Рибофлавин (В₂)

Рибофлавин входит в состав коферментов аэробных (вторичных) дегидрогеназ – в состав флавинадениндинуклеотида (ФАД). Поэтому при недостатке рибофлавина происходит нарушение процесса биологического окисления органических веществ, в частности окисления β-оксикислот, (восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н₂) и др.

Витамин РР (никотиновая кислота и ее амид) является производным пиридина. Никотинамид входит в состав коферментов анаэробных (первичных) дегидрогеназ: никотинамидаденинди-

нуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ). Поэтому при недостатке витамина РР происходят нарушения процессов биологического окисления органических веществ, как тканевого дыхания, так и брожения.

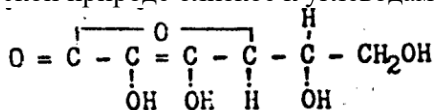


Витамин В₆ (пиридоксин). Пиридоксин – это общее название группы веществ, обладающих активностью витамина В₆: пиридоксола, пиридоксала и пиридоксамина. Все они являются производными пиридина.



В организме витамин В₆ играет большую роль в обмене белков и аминокислот. Он входит в состав коферментов ферментов трансаминирования (переаминирования) и поэтому участвует в процессах трансаминирования аминокислот (переносе аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту). Он также входит в состав декарбоксилаз некоторых аминокислот. Поэтому при недостатке витамина В₆ нарушается белковый обмен.

Витамин С (аскорбиновая кислота) – вещество по своей химической природе близкое к углеводам. Она очень неустойчива.



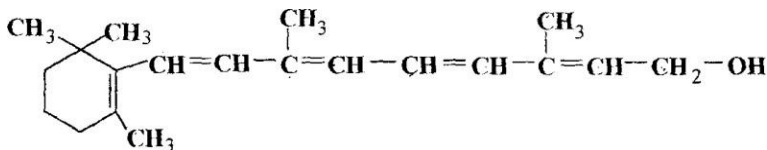
Аскорбиновая кислота

В живых организмах присутствует как в свободном, так и в связанном виде. Связанная с белком аскорбиновая кислота – аскорбиноген – обладает большей устойчивостью к окислителям, чем свободная кислота. Важнейшей особенностью аскорбиновой кислоты является ее способность к обратимому окислению (дегидрированию) с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. В живых организмах витамин С принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, в синтезе стероидных гормонов, в образовании тетрагидрофолиевой кислоты, в превращениях аминокислот (тирозина и фенилаланина) и др. Это говорит о том, что биологическая роль аскорбиновой кислоты многообразна.

К жирорастворимым витаминам относятся витамины: А (ретинол), Д (эргокальциферол, холикальциферол), Е (токоферол), К (филлохинон), Q (убихинон), F (комплекс ненасыщенных жирных кислот – линолевой, линоленовой и арахидоновой).

Витамин А – ретинол. Выделены два вещества, обладающих активностью витамина А: витамин А₁ – из печени морских рыб и витамин А₂ – из печени пресноводных рыб. Витамин А₂ отличается от витамина А₁ наличием дополнительной двойной связи в кольце (между 3 и 4 углеродными атомами).

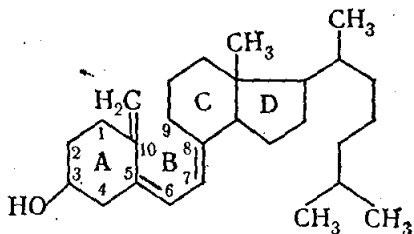
Биологически активный витамин А содержится только в животных продуктах. В растениях содержатся пигменты, которые являются провитаминами витамина А. В животных организмах под влиянием фермента каротинокиназы они превращаются в витамин А. К ним относится каротин – желтый пигмент растений. Витамин А в организме принимает участие в образовании зрительного пурпура – родопсина. Кроме этого он поддерживает стабильность клеточных мембран.



Ретинол (А₁)

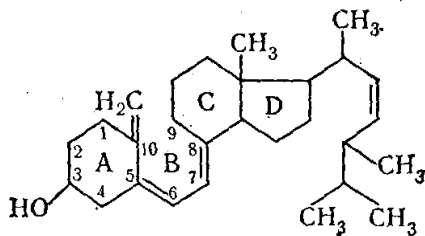
Витамин Д является производным циклопентанпергидрофенантрена. Выделено несколько веществ, обладающих активностью витамина Д. Наиболее распространены витамин Д₂ – эрго-

кальциферол и витамин Д₃ – холекальциферол.



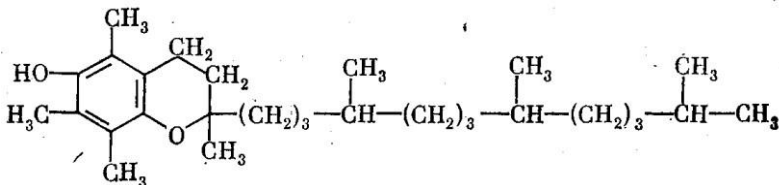
Эргокальциферол

Биологически активный витамин Д содержится только в животных продуктах. Провитамином витамина Д₂ является эргостерол. Он содержится в грибах и дрожжах. Провитамином витамина Д₃ является холестерол, он содержится в коже. Провитамины превращаются в витамины при облучении их ультрафиолетовыми лучами. Витамин Д в живых организмах участвует в процессе костеобразования, т.к. влияет на обмен кальция и фосфора, а также на группу ферментов, осуществляющих всасывание кальция. При его недостатке кости становятся мягкими и искривляются.



Холекальциферол

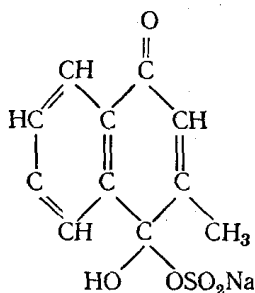
Витамин Е (токоферол) существует в виде нескольких изомеров α-, β- и γ-токоферолов. Они отличаются друг от друга порядком расположения метильных групп в бензольном ядре.



α-токоферол

При недостатке витамина Е нарушаются процессы размножения, наступает бесплодие. Витамин Е участвует также в регулировании окислительных процессов в организме, принимая участие в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с окислительным фосфорилированием. Кроме этого он является прекрасным природным антиокислителем и стабилизирует витамин А.

Витамин К – филохинон является производным нафтохинона. Существует два природных вещества, обладающих активностью витамина К – К₁ и К₂. В живых организмах витамин К входит в состав протетической группы ферментов, участвующих в биосинтезе протромбина. Он участвует также в регуляции процессов фосфорилирования. Искусственно синтезирован викасол, являющийся производным витамина К₃ (метилбензохинона), обладающий свойствами витамина К.



Викасол

Для обнаружения витаминов в различных веществах применяют качественные реакции. Они основаны на цветных реакциях, характерных для группировок, входящих в витамины.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Качественные реакции на витамин А (ретинол).

4.1.1. Реакция с серной кислотой (Друммонда).

В сухую пробирку вносят 3 капли рыбьего жира в хлороформе (1 каплю рыбьего жира растворяют в 4–5 каплях хлороформа) и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появ-

ляется красно-фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в красно-бурое.

4.1.2. Реакция с сульфатом железа.

В пробирку вносят 1–2 капли рыбьего жира или 0,05% раствора витамина А в хлороформе, прибавляют 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Если эту реакцию проводить с каротинами, окраска раствора будет зеленоватая.

4.2. Качественные реакции на витамин Д (эргокальциферол, холикальциферол).

4.2.1. Реакция с анилином.

В сухую пробирку вносят 2–3 капли рыбьего жира или 1 каплю витамина Д, добавляют 2–4 капли раствора брома в хлороформе (с соотношением 1:60) и хорошо перемешивают. В присутствии витамина Д раствор в пробирке постепенно приобретает зеленовато-голубое окрашивание.

4.2.2. Анилиновая проба.

В сухую пробирку вносят 10 капель рыбьего жира в хлороформе (2 капли рыбьего жира растворяют в 8–10 каплях хлороформа) и прибавляют при постоянном помешивании 10 капель смеси анилина с концентрированной соляной кислотой (15:1). Ставят на водяную баню, осторожно нагревают при постоянном помешивании до кипения и кипятят не более 30 секунд. При наличии витамина Д желтая эмульсия приобретает сначала зеленый, а затем красный цвет.

4.3. Качественные реакции на витамин Е (токоферол).

4.3.1. Реакция с хлоридом железа (III).

В сухую пробирку вносят 4–5 капель 0,1% спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1% раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают. Раствор в пробирке приобретает красный цвет в результате окисления α -токоферола хлоридом железа (III) в α -токоферилхинон.

4.3.2. Реакция с концентрированной азотной кислотой.

В сухую пробирку вносят 4–5 капель 0,1% спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 10 капель концентрированной

азотной кислоты и тщательно перемешивают. Образуется эмульсия, которая при стоянии расслаивается. При этом ее верхний слой приобретает желтовато-красную или красную окраску, в результате окисления α -токоферола в α -токоферилхинон.

4.4. Качественные реакции на витамин К (викасол).

4.4.1. Реакция со щелочным раствором цистеина.

В пробирку вносят 5 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли 0,02% раствора цистеина, 2 капли 10% раствора гидроксида натрия и тщательно перемешивают. Раствор в пробирке приобретает лимонно-желтый цвет.

4.4.2. Реакция с анилином.

В пробирку вносят 10 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 5 капель раствора анилина и перемешивают. Раствор в пробирке приобретает красный цвет.

4.5. Качественные реакции на витамин В₁ (тиамин).

4.5.1. Диазореакция.

В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

В пробирку вносят 5 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% раствора нитрита натрия – получают диазореактив. Добавляют к нему 1–2 капли 5% раствора тиамина или тиаминхлорида и 5–7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. Раствор в пробирке окрашивается в оранжево-красный цвет. Если раствор бикарбоната прибавлять осторожно по стенке пробирки (наклонив ее), образуется оранжево-красное кольцо на границе раздела двух жидкостей.

4.5.2. Реакция окисления.

В щелочной среде тиамин окисляется гексоцианоферратом (III) калия в тиохром, который при ультрафиолетовом облучении имеет сине-голубую флюоресценцию.

В пробирку вносят 1–2 капли 5% раствора тиамина или тиаминхлорида, прибавляют 5–10 капель 10% раствора гидроксида натрия, 1–2 капли гексоцианоферрата (III) калия и тщательно перемешивают. Пробирку нагревают на водяной бане, при этом вследствие образования тиохрома раствор окрашивается в желтый цвет. Раствор охлаждают, добавляют 1 мл изобутилового спирта и интенсивно взбалтывают не менее 1 мин. После этого

дают раствору отстояться, и верхний спиртовой слой переносят при помощи пипетки в другую пробирку. Рассматривают его в флюороскопе при ультрафиолетовом облучении и наблюдают синне-голубую флюоресценцию.

4.6. Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин).

В пробирку вносят 10 капель 0,005% раствора витамина В₂, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. В результате взаимодействия цинка с кислотой происходит интенсивное выделение водорода. Жидкость в пробирке постепенно розовеет, а затем обесцвечивается. Происходящая реакция обусловлена восстановлением рибофлавина выделяющимся водородом сначала в красный родофлавин, а затем в бесцветный лейкофлавин.

4.7. Качественная реакция на витамин РР (никотиновая кислота и ее амид).

Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, плохо растворимый в воде.

В пробирку вносят 10 капель 1% раствора витамина РР и нагревают до кипения, при этом если раствор был мутным, он станет прозрачным. К нагретому раствору витамина прибавляют 10 капель 2% раствора ацетата меди и снова нагревают до кипения. После чего пробирку сразу же охлаждают под струей холодной воды. На дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

4.8. Качественная реакция на витамин В₆ (пиридоксин).

Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

В пробирку вносят 10 капель 1% раствора В₆, добавляют 10 капель 1% раствора хлорного железа и хорошо перемешивают. Раствор в пробирке окрашивается в красный цвет.

4.9. Качественные реакции на витамин С (аскорбиновую кислоту).

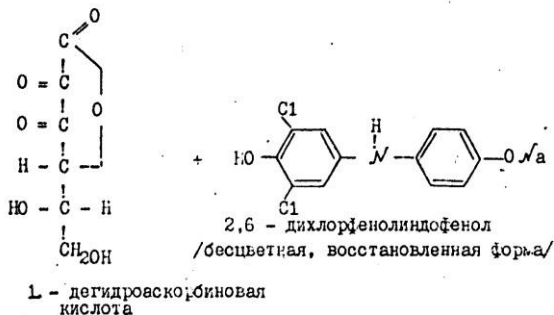
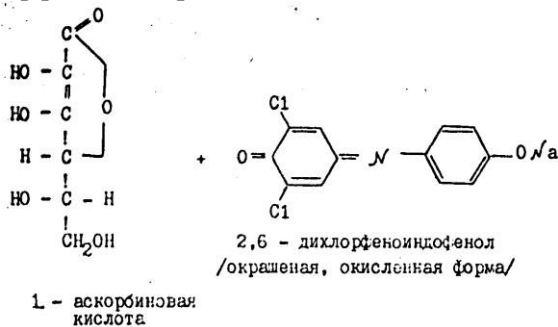
Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции и восстанавливать различные вещества.

4.9.1. Реакция с метиленовой синью.

В пробирку вносят 10 капель 0,002% раствора аскорбиновой кислоты, добавляют 10 капель 0,01% раствора метиленовой сини, хорошо перемешивают, закрывают пробкой для предохранения от попадания в пробирку кислорода воздуха и помещают в термостат при температуре 37–40°C. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини в бесцветную лейкоформу и образования дегидроаскорбиновой кислоты.

4.9.2. Реакция с 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

В пробирку вносят 10 капель 0,002% раствора аскорбиновой кислоты, добавляют 10 капель 0,02% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и перемешивают. Раствор в пробирке обесцвечивается в результате восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола.



4.9.3. Реакция с гексоцианоферратом (III) калия.

В пробирку вносят 10 капель 0,002% раствора аскорбиновой кислоты, добавляют 2 капли 5% раствора гидроксида калия, 2 капли 5% раствора гексоцианоферрата (III) калия и быстро перемешивают. Затем прибавляют 6–8 капель 10% раствора соляной кислоты и 1–2 капли раствора хлорида железа. Выпадает сине-зеленый осадок берлинской лазури.

4.10. Количественное определение витамина С.

Содержание витамина С в исследуемом материале определяют титриметрическим методом с помощью титрованного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Этим методом определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты. Для того, чтобы витамин С не разрушался в процессе опыта, титрование ведут в кислой среде.

4.10.1. Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

2,6-дихлорфенолиндофенол не отвечает требованиям, предъявляемым к исходным веществам, поэтому раствор точной концентрации по его навеске приготовить нельзя. Готовят раствор приблизительной концентрации (0,001 н.) и устанавливают его титр. Для этого 2 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл 2% раствора серной кислоты, 5 мл полученного раствора вносят в колбу для титрования и титруют его 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания. Определяют объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование.

Затем берут такой же объем аскорбиновой кислоты (5 мл), добавляют в него несколько кристаллов (не более 0,1 г) и оксида калия, 5 капель 1% раствора крахмала и титруют из другой пробирочки 0,001 н раствором иодата калия. Титрование ведут до появления едва заметного синего окрашивания и определяют пошедший на него объем иодата калия.

Поскольку титруются одинаковые объемы аскорбиновой кислоты, количества, пошедших на титрование иодата калия и 2,6-дихлорфенолиндофенола, эквивалентны друг другу. Так как 1 мл 0,001 н. раствора иодата калия эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты, титр раствора 2,6-

дихлорфенол-индофенола (в миллиграммах аскорбиновой кислоты) будет равен:

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

где V_1 – объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование, мл;

V_2 – объем иодата калия, пошедший на титрование, мл.

4.10.2. Приготовление экстракта из растительного материала.

Материал для исследования (картофель, морковь, капуста, шиповник и т.д.) нарезают мелкими кусочками. Взвешивают 10 г и переносят в ступку, где его растирают с небольшим количеством кварцевого песка, понемногу добавляя 5% раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Полученную массу переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5% раствором HCl, которую сливают в ту же мерную колбу. Всего должно быть израсходовано около 40–50 мл HCl. После этого содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют.

4.10.3. Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте.

В коническую колбу на 50 мл мерной пипеткой вносят 10 мл полученного экстракта и титруют из микробюретки раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабой розовой окраски. Определяют объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование. Титрование проводят не менее 3 раз. После чего определяют средний объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, который используют для расчета содержания витамина С.

Количество витамина С в вычисляют по формуле:

$$C = \frac{100 \cdot T \cdot V \cdot V_1}{a \cdot V_2},$$

где С – содержание аскорбиновой кислоты, в миллиграммах на 100 г исследуемого продукта;

T – титр 2,6-дихлорфенолиндофенола в миллиграммах аскорбиновой кислоты;

V – общий объем приготовленного экстракта, мл;

a – масса материала взятого на исследование, г;
 V_1 – объем 2, 6-дихлорфенолиндофенола, затраченный на титрование, мл;
 V_2 – объем экстракта, взятого на титрование, мл.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, формулами, уравнениями протекания реакций, экспериментальными данными, расчетами и выводами. Выводы включают в себя заключение о возможности обнаружения витаминов качественными реакциями и о содержании витамина С в различных продуктах.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

- 6.1. Какими реакциями можно открыть витамин В₁?
- 6.2. Какой реакцией можно открыть рибофлавин?
- 6.3. Какой реакцией можно открыть витамин РР?
- 6.4. Какой реакцией можно открыть витамин В₆?
- 6.5. Какими реакциями можно открыть витамин А?
- 6.6. Какими реакциями можно открыть витамин Д?
- 6.7. Какими реакциями можно открыть витамин С?
- 6.8. Какими реакциями можно открыть витамин Е?
- 6.9. Какими реакциями можно открыть витамин К?
- 6.10. Какую биологическую роль выполняет витамин Д?
- 6.11. Какую биологическую роль выполняет витамин А?
- 6.12. Какую биологическую роль выполняет витамин Е?
- 6.13. Какую биологическую роль выполняет витамин К?
- 6.14. Какую биологическую роль выполняет витамин В₁?
- 6.15. Какую биологическую роль выполняет витамин В₂?
- 6.16. Какую биологическую роль выполняет витамин РР?
- 6.17. Какую биологическую роль выполняет витамин В₆?
- 6.18. Какую биологическую роль выполняет витамин С?
- 6.19. Как определить содержание витамина С в продуктах?

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА И МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ТКАНЯХ МЯСА, РЫБЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить содержание гликогена и молочной кислоты в тканях мяса, рыбы.

2. ЗАДАНИЕ

2.1. Приготовить мышечный экстракт.

2.2. Определить фотоэлектроколориметрическим методом содержание гликогена в полученном экстракте.

2.2.1. Приготовить калибровочные растворы.

2.2.2. На фотоэлектроколориметре определить оптическую плотность.

2.2.3. Рассчитать содержание гликогена в мышечном экстракте.

2.3. Провести качественные реакции на молочную кислоту.

2.4. Определить фотоэлектроколориметрическим методом содержание молочной кислоты в мышцах.

2.4.1. Приготовить калибровочные растворы.

2.4.2. На фотоэлектроколориметре определить оптическую плотность.

2.4.3. Рассчитать содержание молочной кислоты в мышечном экстракте.

2.5. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для осуществления жизнедеятельности любого организма нужна энергия. Клетки гетеротрофных организмов получают ее в результате реакций окисления (дегидрирования) различных органических веществ. Важнейшими из них являются гликоген и глюкоза, т.к. для их окисления требуются наименьшие затраты энергии. При этом организм получает не только необходимую ему энергию, но различные промежуточные продукты, на основе которых могут синтезироваться разнообразные органические вещества.

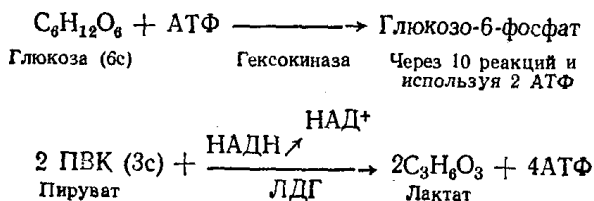
Гликоген (животный крахмал) – это вещество с общей формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$. Это внутриклеточный, осмотически неактив-

ный резервный полисахарид, способный к быстрому обратимому превращению в глюкозу. Гликоген присутствует в клетках животных организмов, главным образом в клетках печени и мышц. Он образуется из глюкозы. Основным местом его синтеза является печень. Процесс синтеза гликогена называется гликогенезом, процесс распада – гликогенолизом.

Распад углеводов в организме может протекать двумя путями: дихотомический распад (непрямое окисление) и апотомический распад (прямое окисление) с образованием пентоз и НАДФ · Н(Н⁺). Дихотомический распад предназначен для освобождения энергии, а апотомический используется для синтеза веществ, где строительным материалом служат НАДФ · Н(Н⁺) и пентозы.

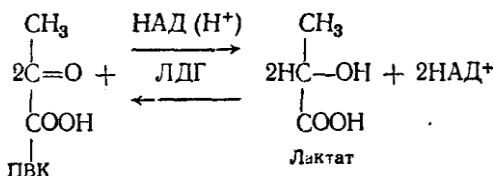
Дихотомический распад может проходить в анаэробных и аэробных условиях. Анаэробный распад углеводов может начинаться как с распада гликогена (гликогенолиз), так и с распада глюкозы (гликолиз). При гликогенолизе от гликогена под воздействием фосфорилазы и затрате одной молекулы АТФ, отщепляется глюкозо-1-фосфат, которая под воздействием фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат. Все дальнейшие превращения аналогичны превращениям гликолиза.

Конечным акцептором водорода и в одном и в другом процессе является пировиноградная кислота (ПВК), а конечным продуктом – молочная кислота. Реакции гликолиза и гликогенолиза идут в цитоплазме клеток (в частности, мышечных) и не связаны ни с какими клеточными структурами. Схематично их можно представить в следующем виде:



При анаэробном распаде освобождается только небольшая часть энергии, запасенная в молекуле глюкозы. В результате процесса субстратного фосфорилирования эта энергия аккумулируется в макроэргических связях АТФ. Акцептором водорода в процессе окисления служит пировиноградная кислота (ПВК), кото-

рая в анаэробных условиях при участии фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и восстановленного ранее НАДН (Н⁺) восстанавливается до молочной кислоты:



При гликолизе на каждую отщепившуюся молекулу глюкозы образуется 4 молекулы АТФ, но две молекулы затрачиваются, и чистый выход составляет 2 молекулы АТФ. Гликолиз и гликогенолиз дают возможность выполнять работу в условиях недостаточного снабжения тканей и органов кислородом (в условиях гипоксии). Молочная кислота, образующаяся в мышцах при усиленной работе, поступает в кровь и переносится в печень и сердце, где она интенсивно окисляется.

Начальные этапы аэробного и анаэробного распада углеводов (глюкозы и гликогена) сходны. Расхождения между ними начинаются на этапе образования ПВК.

В аэробных условиях ПВК подвергается дальнейшему окислению. Под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса в состав которого входят тиаминпирофосфат (ТПФ), амид липоевой кислоты, коэнзимА (КоASH), НАД, а также ионы магния, ПВК в результате процесса окислительного декарбоксилирования превращается в ацетил-КоА, который поступает в цикл Кребса и окисляется там (в виде лимонной кислоты, которая образуется в результате конденсации ацетилКоА и шавелевоуксусной кислоты) до CO₂ и H₂O.

Аэробный дихотомический распад является главным источником энергии для клетки. При окислении одной молекулы глюкозы образуется 40 молекул АТФ, две молекулы затрачиваются на начальных этапах превращений, и чистый выход составляет 38 молекул АТФ. При этом основное количество энергии образуется в результате процессов окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи. Ферменты цикла Кребса и ферменты дыхательной цепи локализованы в митохондриях.

После гибели организма кислород перестают поступать в органы и ткани. Распад углеводов при этом продолжается, но происходит он в строго анаэробных условиях. Количество гликогена в мышцах постепенно уменьшается, а количество молочной кислоты увеличивается.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. *Приготовление мышечного экстракта.*

На технических весах взвешивают 10 г мышечной ткани свежей рыбы или мяса и помещают в охлажденную, стоящую на льду ступку. Отмеряют 50 мл охлажденного 0,04 М раствора никотинамида и заливают им взятую навеску. Затем мышцы измельчают ножницами, добавляют кварцевый песок, растирают в ступке до получения гомогенной массы и экстрагируют 30–40 минут. После этого полученный экстракт переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут. Полученный экстракт используют в качестве исходного материала для определения гликогена и молочной кислоты.

4.2. *Определение содержания гликогена в полученном экстракте.*

4.2.1. *Приготовление калибровочных растворов.*

Берут 5 пробирок. В три из них для построения стандартной кривой наливают раствор глюкозы: в первую 50 мкг, во вторую 100 мкг и в третью – 200 мкг. В четвертую наливают 0,5 мл полученного экстракта. В оставшуюся пробирку для контроля на реактивы наливают 0,5 мл воды. Во все пробирки при помощи мерной пипетки добавляют по 5 мл антронового реактива. Добавление реактива следует проводить быстро, так, чтобы струя реактива попадала в центр проб. Для этого используют пипетку с широким носиком.

Смеси в пробирках *сразу же после добавления реактива* очень быстро и тщательно перемешивают и помещают на 10–15 мин в водяную баню комнатной температуры, а затем переносят на 15 мин в кипящую водяную баню. При нагревании пробирок следят, чтобы в них не попадала вода, т.к. при ее попадании раствор мутнеет и это мешает колориметрированию. По окончании

нагревания пробирки быстро охлаждают в проточной воде и оставляют в темном месте на 30 минут.

4.2.2. Определение оптической плотности.

Окрашенные растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кювете толщиной 0,5 см, при длине волны 620 нм (красный светофильтр), против раствора сравнения. Для каждого раствора определяют оптическую плотность и полученные значения записывают в таблицу 17.

Таблица 17

Зависимость между концентрацией глюкозы и оптической плотностью раствора

Содержание глюкозы (мкг)	50	100	200	Мышечный экстракт
Оптическая плотность				

4.2.3. Расчет содержания гликогена.

На основании полученных данных строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию глюкозы, а на оси ординат – оптическую плотность.

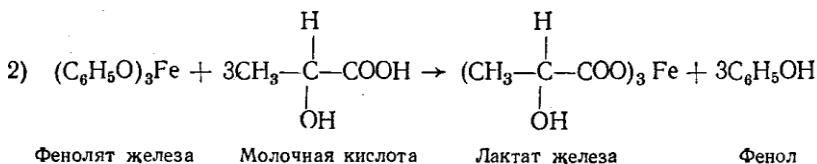
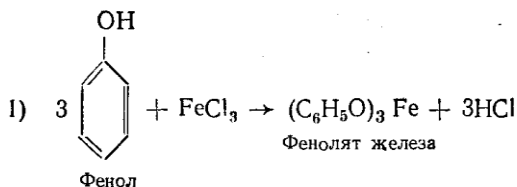
Расчет содержания глюкозы проводят по стандартной кривой, которую строят для каждой серии определений.

Для пересчета на содержание гликогена полученное количество глюкозы умножают на коэффициент пересчета, равный 0,9. Его получают следующим образом: молекулярная массы глюкозного остатка в гликогене равна 162,1, молекулярная масса глюкозы – 180,1. Разделив 162,1 на 180,1, получаем 0,9.

4.3. Проведение качественной реакции на молочную кислоту.

В пробирку наливают 20 капель 1% раствора фенола и 2 капли 1% раствора хлорного железа до появления фиолетового цвета (реактив Уффельманна) и по каплям добавляют 15 капель полученного мышечного экстракта. Если в нем присутствует молочная кислота, фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую. Для сравнения проводят реакцию Уффельманна с раствором молочной кислоты и наблюдают появление желто-зеленого окрашивания.

Изменение окраски вызвано тем, что молочная кислота в присутствии фенолята железа (реактив Уффельманна), окрашенного в фиолетовый цвет, образует лактат железа желто-зеленого цвета. Химизм реакции следующий:



4.4. Количественное определение молочной кислоты.

4.2.1. Приготовление калибровочных растворов.

Берут пять пробирок и в три из них для построения стандартной кривой наливают раствор молочной кислоты: в первую – 5 мкг, во вторую – 10 мкг и в третью – 15 мкг. В четвертую наливают 0,2 мл полученного мышечного экстракта. В пятую пробирку для контроля на реактивы наливают 0,5 мл воды. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл 20% CuSO_4 и дистиллированной водой доводят объем жидкости в них до 5 мл. Затем добавляют по 0,5 г гидроксида кальция, тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

Через 30 мин содержимое всех пробирок центрифугируют. Из каждой из них отбирают по 0,5 мл прозрачного центрифугата и переносят его в сухие чистые пробирки, стоящие в ледяной воде. Затем медленно, при постоянном встряхивании, добавляют в каждую по 3 мл 2н H_2SO_4 . После этого пробирки переносят на 5 мин в кипящую водяную баню, а затем охлаждают до комнатной температуры (20°C) и добавляют по 2 капли (0,05 мл) щелочного раствора параоксидифенила.

Содержимое пробирок осторожно перемешивают и ставят на 30 мин в термостат или водяную баню с температурой 30°C , а за-

тем на 90 сек (!) в кипящую водяную баню, после чего охлаждают. Появляется розовое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации молочной кислоты.

4.2.2. Определение оптической плотности.

Полученные растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кювете толщиной 0,5 см, при длине волны 640 нм, против раствора сравнения. Для каждого раствора определяют оптическую плотность. Полученные значения записывают в таблицу 18.

Таблица 18

Зависимость между концентрацией молочной кислоты и оптической плотностью раствора

Содержание молочной кислоты (мкг)	5	10	15	Мышечный экстракт
Оптическая плотность				

4.2.3. Расчет содержания молочной кислоты.

На основании полученных данных строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию молочной кислоты, а на оси ординат – оптическую плотность. По нему определяют содержание молочной кислоты в мышечном экстракте.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, построением калибровочных графиков для определения глюкозы и молочной кислоты, расчетной части, выводов.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. Какими путями может протекать распад углеводов в организме?

6.2. До образования какого продукта пути аэробного и анаэробного расщепления углеводов в организме совпадают?

6.3. Что является конечным акцептором водорода при аэробном расщеплении гликогена?

6.4. Что является конечным акцептором водорода при анаэробном расщеплении гликогена в организме?

6.5. Какие конечные продукты образуются при анаэробном расщеплении углеводов в организме?

6.6. Какие конечные продукты образуются при аэробном расщеплении углеводов в организме?

6.7. Где в клетке протекает анаэробное расщепление углеводов?

6.8. В каких клеточных структурах протекает аэробное окисление углеводов?

6.9. В каких органах и тканях содержание гликогена наиболее велико и почему?

6.10. Из какого соединения в животных организмах синтезируется гликоген и где это происходит?

6.11. Какой энергетический эффект анаэробного и аэробного расщепления углеводов?

ОБМЕН БЕЛКОВ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ (ПО МЕТОДУ АНСОНА)

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить протеолитическую активность по количеству продукта гидролиза белков.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Приготовить эталонные растворы и построить градуировочный график.
- 2.2. Приготовить ферментный раствор.
- 2.3. Определить активность протеаз.
- 2.4. Провести расчет протеолитической активности.
- 2.5. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Гидролиз белков в организме идет постоянно как в процессе пищеварения (гидролиз белков пищевых продуктов), так и в процессе жизнедеятельности клеток (гидролиз устаревших или «изношенных» белков, а также запасных белков семян, зерен злаковых, клубней и других органов возрождения растений) протеазами. Конечными продуктами гидролиза белков являются аминокислоты.

Метод определения активности протеаз основан на определении тирозина (или тирозинсодержащих пептидов), освобождающихся при гидролизе раствора стандартного белка (гемоглобина, казеина, альбумина) протеазами (пептидгидролазами). Оставшийся нерасщепленный белок осаждают раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и фильтруют, а белок, подвергшийся гидролизу пропорционально содержанию тирозина, определяют колориметрически реакцией Фолина. Полученные величины оптической плотности подставляют в формулу и рассчитывают протеолитическую активность ферментного препарата.

Протеолитическая активность характеризует способность ферментов катализировать расщепление белка до пептидов и аминокислот и выражается числом единиц протеазы в 1 г очищенного препарата.

За единицу протеолитической активности принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С превращает в неосажденные трихлоруксусной кислотой продукты гидролиза казеината натрия в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина (1 мкмоль тирозина составляет 0,181 мг).

Данный метод позволяет определить активность протеаз грибного и бактериального происхождения при рН среды: кислые 2,5 и 5,5, нейтральные 7,2 и щелочные 9,5.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Приготовление эталонных растворов и построение градуировочного графика.

В 1 л 0,2 н. раствора соляной кислоты растворяют 181,2 мг тирозина (основной раствор). Из основного раствора готовят эталонные (разбавленные) растворы. Для этого в мерные колбы на 50 мл основной раствор тирозина вносят в количествах, указанных в таблице 4. Объем в колбах доводят до метки 0,2 н. раствором соляной кислоты.

В 7 пробирок вносят по 1 мл раствора тирозина разной концентрации, добавляют в них по 5 мл 0,5 М карбоната натрия и 1 мл раствора Фолина. В контрольном опыте вместо раствора тирозина берут 1 мл дистиллированной воды. Через 20 минут растворы колориметрируют при 670 нм, данные заносят в таблицу 19 и строят градуировочный график.

Таблица 19

Результаты определения оптической плотности

№ п/п	Кол-во основного раствора, мл	Концентрация тирозина, мкмоль/ мл	Оптическая плотность
1	1,0	0,02	
2	2,0	0,04	
3	4,0	0,08	
4	5,0	0,10	
5	7,5	0,15	
6	10,0	0,20	
7	15,0	0,30	

Для этого на оси абсцисс откладывают количество тирозина C (в мкмоль/мл), на оси ординат – соответствующее значение оптической плотности D . Тирозиновый эквивалент (ТЭ) определяют из соотношения:

$$TЭ = \frac{D}{C},$$

где D – оптическая плотность;

C – содержание тирозина в 1 мл раствора, мкмоль.

4.2. Приготовление ферментного раствора.

0,1–1,0 г исследуемого препарата растирают стеклянной палочкой в стаканчике на 50 мл с небольшим количеством буферного раствора с рН 5,5. Затем содержимое стаканчика количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят этим же буферным раствором до метки.

Из полученного раствора путем разведения готовят рабочий раствор до необходимой концентрации фермента. Разведение должно быть подобрано так, чтобы в реакционной среде был избыток субстрата, а измеряемые оптические плотности при колориметрировании в кювете с рабочей гранью 10 мм находились в пределах от 0,1 до 0,75.

4.3. Определение активности протеаз.

В пробирку на 20 мл наливают 2 мл 2%- ного раствора казеината натрия, помещают ее в термостат при 30 °С и через 5–10 минут добавляют 2 мл ферментной вытяжки, перемешивают и выдерживают при 30°С 30 минут. Казеинат при этом частично гидролизует. Для инактивации действия ферментов в пробирку прибавляют 4 мл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты, встряхивают и оставляют пробирку еще на 20 минут при 30°С. После этого содержимое пробирки фильтруют или центрифугируют. В сухую пробирку вносят 1 мл фильтрата, 5мл 0,5 М раствора карбоната натрия, перемешивают, приливают 1 мл реактива Фолина. Через 20 минут определяют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при 670 нм в кювете толщиной 10 мм в сравнении с контрольной пробой. Для получения контрольной пробы 2 мл разведенного ферментного раствора прили-

вают к 4 мл 0,3 М раствора ТХУ, выдерживают в термостате при 30 °С 10 мин, а затем к раствору добавляют 2 мл субстрата. После перемешивания пробирку выдерживают 20 минут при 30°С, фильтруют и отбирают 1 мл субстрата в сухую пробирку. Туда же вносят 5 мл раствора карбоната натрия и 1 мл реактива Фолина. Полученный раствор используют в качестве сравнения при замерах.

4.4. Расчет протеолитической активности

Протеолитическую активность (E_p) препарата (в ед/г) определяют по формуле:

$$E_p = \frac{D \cdot 4}{TЭ \cdot 10 \cdot a} \cdot 1000,$$

где E_p – протеолитическая активность, ед/г;

D – оптическая плотность;

4 – отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления трихлоруксусной кислоты;

$TЭ$ – тирозиновый эквивалент;

10 – время гидролиза, мин;

a – количество ферментного препарата в пробе, мг;

1000 – пересчет в ед/г.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, порядка выполнения работы, построением калибровочного графика для определения содержания тирозина, расчетной части, вывода.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

1. К какому классу и подклассу ферментов относятся протеазы?
2. Специфичность действия протеаз.
3. Промежуточные и конечные продукты гидролиза белков под действием протеаз.
4. Где протекает гидролиз белков в живых организмах и роль этих процессов.
5. Принцип метода Ансона определения активности протеаз.
6. Последовательность определения активности протеаз по Ансону.

7. Расчет протеолитической активности ферментов по Ансону.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

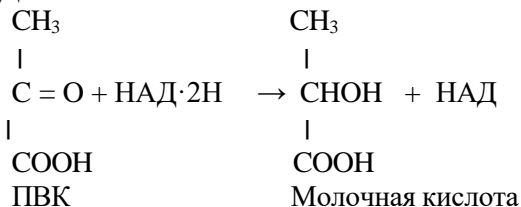
Определить содержание пировиноградной кислоты (ПВК) в биологических жидкостях.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Приготовить мышечный экстракт.
- 2.2. Получить безбелковый фильтрат.
- 2.3. Приготовить калибровочные растворы.
- 2.4. На фотоэлектроколориметре определить оптическую плотность полученных растворов.
- 2.5. Построить калибровочный график и определить содержание пировиноградной кислоты.
- 2.7. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

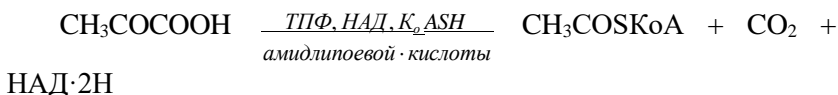
Пировиноградная кислота (ПВК) является одним из важнейших промежуточных продуктов углеводного обмена. До стадии образования ПВК анаэробный и аэробный пути распада углеводов совпадают. В анаэробных условиях ПВК является конечным акцептором водорода. Под воздействием фермента лактатдегидрогеназы ПВК взаимодействует с восстановленной формой НАД (НАД·2H), образовавшегося на этапе превращения 3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту. При этом образуется молочная кислота и окисленная форма НАД.



В аэробных условиях ПВК под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса (ТПФ, амидлипоевой кислоты, CoASH , НАД, Mg^{+2}) подвергается окислительному декарбоксилированию и пре-

вращается в ацетил-КоА, который поступает в цикл Кребса, где окисляется до CO_2 и H_2O :

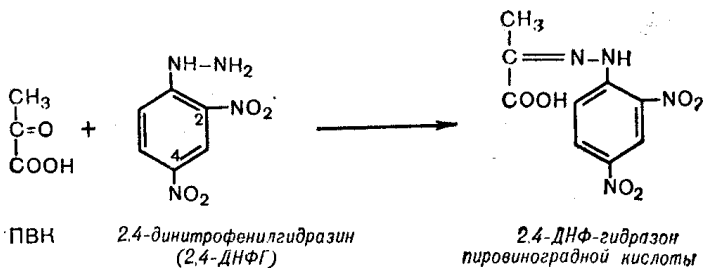
Под влиянием пируватдегидрогеназного комплекса в состав которого входят тиаминпирозинфосфат (ТПФ), амид липоевой кислоты, коэнзимА (КоASH), НАД, а также ионы магния, ПВК подвергается окислительному декарбоксилированию и превращается в ацетил-КоА. При этом образуется ацетил-КоА, двуокись углерода и восстановленная форма НАД (НАД·2Н):



Образовавшийся ацетил-КоА поступает в цикл Кребса и окисляется там (в виде лимонной кислоты, которая образуется в результате конденсации ацетилКоА и щавелевоуксусной кислоты) до CO_2 и H_2O . При этом выделяется энергия, которая аккумулируется в макроэргических связях АТФ.

Пировиноградная кислота является одним из веществ, через которые осуществляется взаимосвязь углеводного и липидного, углеводного и белкового обменов. В жировом обмене ПВК образуется при окислении глицерина. В белковом обмене ПВК образуется при процессе дезаминирования и переаминирования аланина. Поэтому содержание ПВК в биологических жидкостях практически всех живых организмов довольно высокое. Так у человека за сутки с мочой выделяется 114–284 мкмоль (10–25 мг) пировиноградной кислоты.

Определение содержания ПВК проводят фотоэлектроколориметрическим методом. Пировиноградная кислота реагирует с различными химическими веществами, при этом ряд образующихся продуктов – окрашенные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна содержанию ПВК. Так, пировиноградная кислота, взаимодействуя с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) в щелочной среде, образует 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты, который имеет желто-оранжевый цвет. Гидразоны других α -кетокислот (α -кетоглутаровой, щавелевоуксусной и др.) в щелочной среде нестойки и быстро разлагаются. Химизм реакции следующий:



Кроме 2,4-динитрофенилгидразина пировиноградная кислота взаимодействует в щелочной среде с салициловым альдегидом и образует вещество, которое имеет оранжевую окраску.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Приготовление мышечного экстракта.

Для анализа берут мышцы или какую-нибудь биологическую жидкость (кровь, моча). При работе с мышцами на технических весах взвешивают 1 г мышечной ткани свежей рыбы или мяса и помещают в охлажденную, стоящую на льду ступку. Отмеряют 5 мл охлажденного 0,04 М раствора никотинамида и заливают им взятую навеску. Затем мышцы измельчают ножницами, добавляют кварцевый песок, растирают в ступке до получения однородной массы и экстрагируют 30–40 минут. После этого полученный экстракт переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут. Полученный экстракт используют в качестве исходного материала для определения пировиноградной кислоты.

4.2. Получение безбелкового фильтра.

В микропипетку набирают 1 мл полученного экстракта или другого биологического раствора (например, крови или мочи), вносят его в центрифужную пробирку и добавляют 1 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты (работают *осторожно* – это едкое вещество). При наличии белка раствор мутнеет. Содержимое пробирки перемешивают, переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотах в минуту в течение 5 минут. Белок при этом осаждается. Надосадочную жидкость – безбелко-

вый фильтрат, используют для определения содержания ПВК. *Фильтрат должен быть прозрачным!*

4.3. Приготовление калибровочных растворов.

Берут 8 пробирок. В шесть из них при помощи микропипетки наливают соответственно по 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1 мл стандартного раствора пировиноградной кислоты, который содержит 50 мкг ПВК в 1 мл. В первые пять пробирок добавляют соответственно 0,9; 0,8; 0,6; 0,4 и 0,2 мл дистиллированной воды так, чтобы объем жидкости во всех пробирках стал равным 1 мл.

В седьмую пробирку наливают 1 мл полученного безбелкового фильтрата. В оставшуюся восьмую пробирку для контроля на реактивы наливают 1 мл воды. Во все восемь пробирок при помощи мерной пипетки приливают по 1 мл 2,5% спиртового раствора КОН и перемешивают одну минуту. Затем добавляют по 0,5 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина, опять хорошо перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре 15 минут.

4.4. Определение оптической плотности полученных растворов.

Полученные растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кювете толщиной 0,5 см, при длине волны 465 нм (синий светофильтр), против раствора сравнения. Определяют оптические плотности калибровочных растворов и исследуемого раствора. Полученные значения оптических плотностей записывают в таблицу 20.

Таблица 20

Соотношение между содержанием ПВК в растворе и его оптической плотностью

Количество стандартного раствора ПВК в мл	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Концентрация ПВК мкг/мл						
Оптическая плотность раствора						

4.5. Построение калибровочного графика и определение содержания пировиноградной кислоты.

Калибровочный график строят, указывая на оси ординат полученную оптическую плотность (среднее арифметическое из двух параллельных определений), а на оси абсцисс – соответствующее ей содержание пировиноградной кислоты, выраженное в микрограммах. По графику определяют содержание пировиноградной кислоты в исследуемом материале.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляют с указанием цели и задания. Результаты проведенных опытов излагаются сжато и в той же последовательности, как они представлены в задании. Калибровочный график выполняется на миллиметровой бумаге и подклеивается к отчету. Делаются выводы.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. При обменах каких веществ в организме и в результате каких процессов образуется ПВК?

6.2. Что образуется из ПВК при анаэробном распаде углеводов?

6.3. Что образуется из ПВК при аэробном распаде углеводов?

6.4. На чем основаны реакции определения ПВК в биологических жидкостях?

ЛИПИДЫ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАСЫЩЕННОСТИ ЖИРОВ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Научиться определять константы, характеризующие химический состав жиров.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести сравнение ненасыщенности различных жиров.
- 2.2. Определить йодное число рыбьего жира или масла.
- 2.3. Определить кислотное число жира или масла.
- 2.4. Определить число омыления жира или масла.
- 2.5. Определить эфирное число жира или масла.
- 2.6. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Липидами называются все органические вещества независимо от их строения, растворяющиеся в органических растворителях (эфире, хлороформе и др.). Чаще всего это производные высших жирных кислот и спиртов.

В зависимости от строения липиды подразделяются на простые и сложные. Молекулы простых липидов состоят только из остатков жирных кислот и спиртов. К ним относятся триглицериды (нейтральные жиры) и воска. Молекулы сложных липидов содержат остатки фосфорной кислоты (фосфолипиды или фосфотиды), моно- или олигосахаридов (гликолипиды). К липидам относят также некоторые вещества, которые не являются производными жирных кислот – стерины, убихиноны и др.

Липиды входят в состав клеточных мембран (фосфотиды), являются запасными питательными веществами, выполняют энергетическую функцию (триглицериды), являются растворителями многих биологически активных веществ, выполняют механическую функцию и т.д.

Нейтральные жиры (триглицериды) состоят из глицерина и остатков трех высших жирных одноосновных кислот:



где – R', R'' и R''' радикалы высших жирных одноосновных кислот.

В состав триглицеридов входят остатки насыщенных и ненасыщенных кислот преимущественно с четным количеством углеродных атомов, количество которых колеблется от 8 до 24.

Жиры наземных млекопитающих, в которых преобладают триглицериды насыщенных высших жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой) и мононенасыщенной олеиновой, являются при комнатной температуре твердыми веществами. Жиры рыб и морских млекопитающих, в состав которых входит значительное количество ненасыщенных жирных кислот – жидкие при комнатной температуре вещества. Так, в состав жиров рыб входят: 20–25% насыщенных жирных кислот, содержащих от 14 до 20 атомов углерода (преимущественно 16 и 18); 30–35% ненасыщенных жирных кислот с 16 и 18 атомами углерода и 40–45% ненасыщенных жирных кислот с 20 и 22 атомами углерода.

Для характеристики жиров, их состояния и качества, введены химические константы: кислотное число, эфирное число, число омыления и йодное число.

Кислотное число характеризует количество свободных кислот, содержащихся в 1 г жира. Эфирное число характеризует количество связанных кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует общее количество кислот, содержащихся в 1 г жира. Йодное число характеризует количество непредельных кислот в 100 г жира.

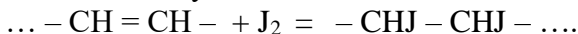
Наличие в составе жиров непредельных (ненасыщенных) жирных кислот определяет ненасыщенность жира. Степень ненасыщенности жира характеризуют йодным числом. Метод определения йодного числа основан на том, что для непредельных кислот характерны реакции присоединения по месту двойных связей. По месту разрыва каждой двойной связи присоединяются по два атома иода.

По двойным связями, кроме йода, могут реагировать и другие галогены (хлор и бром). Однако, для них характерны как реакции присоединения, так и реакции замещения. Поэтому они не только присоединяются по месту разрыва двойной связи, но и замещают атомы водорода в радикале. Йод же при определенных условиях реагирует с двойными связями, поэтому именно он используется для определения ненасыщенности жиров и масел.

Йодное число измеряется количеством граммов иода, которое присоединяется к 100 г жира. У жиров рыб оно колеблется от 104

до 193. Йодное число является одним из наиболее важных химических показателей для жиров и, в первую очередь, для рыбного жира и масел. Оно позволяет судить о степени ненасыщенности масла (жира), о его прогоркании, склонности к «высыханию» и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических жиров и масел. Понижение йодного числа указывает на снижение качества жира или масла.

Йодное число определяют на основе реакции присоединения йода по месту двойных связей:



При комнатной температуре йод реагирует с кислотами, входящими в состав жира, очень медленно; при нагревании присоединение йода идет неравномерно. Более интенсивно реагируют с непредельными кислотами жира соединения йода с другими галоидами (хлором, бромом). Поэтому были предложены методы определения йодного числа, в которых йод заменили его соединениями с галоидами. Гюбль предложил для определения йодного числа готовить раствор йода с сулемой ($\text{HgCl}_2 + 2\text{J}_2 = \text{HgJ}_2 + 2\text{JCl}$), Ганус применил раствор бромистого йода.

Полное насыщение двойных связей происходит только в том случае, если масса галоида на 60–100% выше теоретической.

Йодные числа некоторых жиров и масел представлены в таблице 21.

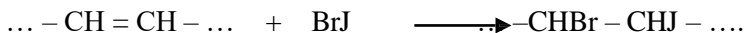
Таблица 21

Значения йодных чисел некоторых жиров и масел

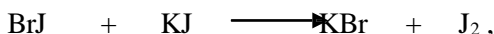
Вид жира или масла	Йодное число
Молочный жир	24÷45
Говяжий жир	32÷47
Свиной жир	46÷66
Китовый жир	108÷130
Жир печени трески	118÷186
Кокосовое масло	8÷12
Хлопковое масло	100÷116
Подсолнечное масло	119÷136

Льняное масло	175÷201
Бараний жир	31÷46
Конский жир	71÷86

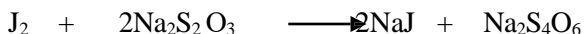
Жир выдерживают с избытком раствора бромистого йода в ледяной уксусной кислоте (раствор Гануса). При этом происходит присоединение йода по месту двойных связей жирных кислот:



После выдерживания избыток бромистого йода разлагают водным раствором йодида калия:



выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия:



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

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество жира (масла). При хранении жира происходит частичный гидролиз триглицеридов, что приводит к накоплению свободных жирных кислот, т.е. к возрастанию кислотности. Повышение кислотного числа указывает на снижение качества жира (масла).

Метод определения кислотного числа основан на том, что кислоты легко вступают в реакцию со щелочами (реакция нейтрализации). Свободные жирные кислоты, содержащиеся в жире или масле оттитровывают 0,1 н раствором гидроксида калия (KOH). Титрование ведут именно гидроксидом калия, а не натрия (NaOH) потому, что образующиеся в результате реакции калиевые соли растворимы лучше, чем натриевые.

Число омыления характеризует общее количество кислот, содержащееся в жире. Числом омыления называется количество

миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации всех, как свободных, так и связанных в форме триглицеридов, жирных кислот, содержащихся в 1 г жира (масла). У жиров рыб число омыления колеблется от 180 до 204.

Эфирное число характеризует содержание связанных (в виде эфиров) жирных кислот. Оно равно количеству миллиграммов КОН, необходимого для нейтрализации жирных кислот, образующихся при гидролизе в 1 г жира (масла). Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Сравнение ненасыщенности различных жиров.

Берут навески по 0,5 г различных жиров (рыбьего жира, свиного сала, коровьего масла, маргарина, подсолнечного масла). Помещают их в пробирки и в каждую из них добавляют по 3 мл хлороформа и хорошо перемешивают до полного растворения жира. После чего полученный в каждой пробирке раствор титруют из микробюретки 0,001н раствором йода в хлороформе до появления отчетливой розовой окраски и записывают объем раствора йода, пошедшего на насыщение каждого жира. Располагают жиры по убывающей степени насыщенности.

4.2. Определение йодного числа.

Берут точную навеску небольшого количества жира или (и) масла. Для этого, если жир жидкий, его помещают в склянку, в пробку которой вставлена пипетка, и все это взвешивают на аналитических весах. Затем при помощи пипетки 3–4 капли жира помещают в сухую коническую колбу емкостью 250 мл с пришлифованной стеклянной пробкой и снова взвешивают склянку с жиром, пробкой и пипеткой.

По разности масс определяют величину навески, взятой на исследование. Отмеривают 25 мл этилового спирта и переносят его в колбу с навеской. Содержимое колбы хорошо перемешивают для растворения жира (масла). Если навеска растворяется плохо, колбу ставят на водяную баню и немного нагревают. Параллельно ставят «слепой» (контрольный) опыт. Для этого берут вторую колбу и вносят в нее 25 мл этилового спирта.

В бюретку наливают 0,2 н спиртового раствора йода и из нее по 12,5 мл раствора переносят в каждую из колб. В каждую из них добавляют по 100 мл дистиллированной воды. Колбы закрывают пробкой и хорошо встряхивают в течении не менее 5 мин. Затем содержимое колб оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до появления слабо-желтого окрашивания. После чего прибавляют 1 мл раствора крахмала и титруют до исчезновения синего окрашивания. Записывают объемы тиосульфата натрия, которые пошли на титрование растворов каждой из колб.

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

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

где V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование контроля, мл;

V_2 – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедший на титрование опыта, мл;

0,0127 – титр тиосульфата натрия по йоду;

a – навеска жира (масла), г.

Для достоверного определения проводят несколько параллельных опытов и по каждому из которых рассчитывают величину йодного числа. Допускается расхождения лишь в десятых долях получаемых значений йодных чисел.

4.3. Определение кислотного числа.

Для определения кислотного числа 2–3 г жира или (и) масла взвешивают на аналитических весах, помещают в коническую колбу объемом 100 мл и добавляют в нее 10–15 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1) Для нейтрализации смеси спирта и эфира прибавляют 3–4 капли раствора фенолфталеина и по каплям добавляют 0,1 н спиртовой раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания.

После полного растворения навески жира (масла) в нейтральной спирто-эфирной смеси к ней прибавляют 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. спиртовым раствором КОН, до появления слабо-розового окрашивания. Окраска не

должна исчезать при взбалтывании в течение 0,5–1 мин. Определяют объем гидроксида калия, который пошел на титрование.

Кислотное число вычисляют по формуле:

$$\text{Кислотное число} = \frac{V \cdot T}{a},$$

где V – объем 0,1 н раствора КОН, израсходованный на титрование взятой навески, мл;

T – титр 0,1 н раствора КОН, мг/мл;

a – навеска жира (масла), г.

4.4. Определение числа омыления.

Берут две колбы объемом 50 мл и в одну вносят навеску жира (масла) взвешенную на аналитических весах массой 0,5 г, а в другую – 0,5 мл воды. В обе колбы при помощи мерной пипетки добавляют по 15 мл 0,5 н спиртового раствора гидроксида калия. Колбы закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками, длина которых должна быть не менее 70 см, ставят на кипящую водяную баню и нагревают при периодическом встряхивании в течение 30–40 мин. Жидкость в колбе должна кипеть слабо, так, чтобы верхняя часть обратного холодильника не нагревалась.

По окончании омыления определяют количество не связанной щелочи. Для этого в каждую колбу добавляют по 15–20 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н. раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Исходя из того, что в 1 мл 0,5 н. раствора гидроксида калия содержится 28 мг КОН, число омыления определяют по формуле:

$$\text{Число омыления} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 28}{a},$$

где V_1 – объем 0,5 н. раствора HCl, затраченный на титрование контроля (колба с водой), мл;

V_2 – объем 0,5 н. раствора HCl, затраченный на титрование опыта (колба с жиром), мл;

a – навеска жира (масла), г.

4.5. Определение эфирного числа.

Для определения эфирного числа нужно сначала определить число омыления (см. пункт 4.4) и кислотное число (см. пункт 4.3).

После чего находят разность между ними – это и будет эфирное число:

Эфирное число = число омыления – кислотное число.

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели и задания. Результаты проведенных опытов излагаются сжато и в той же последовательности, как они представлены в задании. Делаются выводы.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. Какие константы характеризуют химический состав жиров?

6.2. Что характеризует йодное число и как его определяют?

6.3. Что характеризует эфирное число и как его определяют?

6.4. Что характеризует кислотное число и как его определяют?

6.5. Что характеризует число омыления и как его определяют?

6.6. Какой химический состав имеют жиры рыб?

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ КЛЕЩЕВИНЫ

1. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить активность липазы клещевины.

2. ЗАДАНИЕ

- 2.1. Провести титрование.
- 2.2. Рассчитать активность липазы клещевины.
- 2.3. Сделать выводы и оформить отчет.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

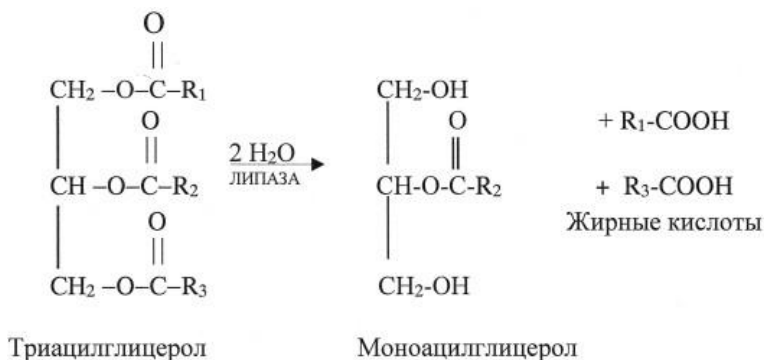
Обмен липидов во всех организмах, состоит из процессов синтеза (анаболизма) и распада (катаболизма), у животных есть ещё процессы переваривания и всасывания липидов. Катаболизм и переваривание липидов начинаются с гидролиза при участии липаз.

Переваривание липидов происходит главным образом в тонком отделе кишечника, где при участии ферментов – липаз, фосфолипаз, холестеролэстеразы – они расщепляют на свои составные части: ацилглицеролы – на глицерин и жирные кислоты, фосфолипиды – на глицерин, жирные кислоты, фосфорную кислоту и азотистое основание, стероиды – на холестерин и жирную кислоту.

Продукты гидролиза липидов поступают в клетки стенки кишечника, где из них синтезируются липиды данного организма. Часть липидов может всасываться в кишечнике в виде тончайшей эмульсии без предварительного гидролиза. Из клеток кишечника липиды переходят в лимфатическую систему и частично в кровь, а затем в печень и другие органы, где они подвергаются разнообразным превращениям.

В процессе переработки и хранения пищевого сырья могут создаваться условия, увеличивающие активность липаз. Например, перекачивание, встряхивание и пастеризация молока активизируют липазу; освобождающиеся при гидролизе триацилглицеролов молочного жира низкомолекулярные жирные кислоты (масляная, капроновая, каприловая) придают такому молоку и продуктам из него прогорклый вкус и запах. Хранение некоторых

видов муки и крупы, особенно содержащих много жира (пшено, овсяная мука и крупа), при повышенных температуре и влажности стимулирует гидролиз триглицеридов, что приводит к повышению кислотности продукта и его быстрому прогорканию. В семенах клещевины содержится значительное количество липазы. Этот фермент относится к классу гидролаз, подклассу эстераз, группы эстераз сложных эфиров карбоновых кислот (КФ 3.1.1.3). Липаза клещевины не растворяется в воде и проявляет активность в слабокислой среде при рН 4,8–5,0. Липазы легко и быстро отщепляют от молекулы триацилглицерола внешние остатки жирных кислот и в последнюю очередь – средний кислотный остаток:



4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

4.1. Проведение титрования

Берут две фарфоровые ступки (опыт и контроль). В опытной ступке тщательно растирают 1 г семени клещевины, очищенного от оболочки, и смешивают с 3 мл нейтрального масла, добавляют 2 мл буферного раствора с рН 4,7 и оставляют на 30 мин при комнатной температуре для гидролиза. После этого в ступку добавляют 30 мл смеси спирта с эфиром в соотношении 1:1 и несколько капель раствора фенолфталеина, и оттитровывают отщепившиеся жирные кислоты раствором гидроксида калия с концентрацией 0,1 моль/л до слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек.

В контрольной ступке тщательно растирают 1 г семени клещевины, добавляют 30 мл смеси спирта с эфиром, перемешивают, вносят 2 мл буферного раствора и 3 мл нейтрального масла, перемешивают и тут же добавляют 3–5 капель фенолфталеина и титруют раствором гидроксида калия с концентрацией 0,1 моль/л до слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек. Контрольную пробу не подвергают инкубации.

4.2. Расчет активности липазы клещевины

Разница в объеме израсходованного на титрование гидроксида калия в опыте и контроле показывает активность липазы. Результаты определения записать в таблицу 22.

Таблица 22

Определение активности липазы клещевины

Исследуемый материал, г	Объем КОН, пошедший на титрование, мл		Разница, мл
	Опытная проба	Контроль	

5. СОДЕРЖАНИЕ ОТЧЕТА

Отчет составляется с указанием цели, задания, краткого описания хода выполняемых исследований, включает полученные экспериментальные данные, расчет и вывод.

6. ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ

6.1. Из каких процессов состоит обмен липидов в организме животных, растений и микроорганизмов?

6.2. С какого процесса начинается катаболизм и переваривание липидов?

6.3. Охарактеризуйте липазы пищевого сырья, их влияние на качество продукции.

6.4. К какому классу, подклассу и группе относятся липазы?

6.5. Напишите реакции, катализируемые липазами.

6.6. Какова сущность метода определения активности липаз.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Биологическая химия: учеб. Пособие / Ю.Б. Филиппович [и др.]. – М.: Академия, 2005. – 256 с.

Дополнительная

2. Березовская В.А. Биохимия: лаб. практикум. – Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2005. – 83 с.

3. Рогожин В.В. Биохимия мышц и мяса: учеб. пособие. – СПб.: Гиорд, 2009. – 240 с.

4. Биологическая химия / под ред. Н. И. Ковалевской. – М.: Академия, 2009. – 256 с.