

ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МОЛДОВЫ

БИОХИМИЯ

*Методические указания
к лабораторному практикуму*



КИШИНЭУ
2010

ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МОЛДОВЫ
Факультет технологии и менеджмента
в пищевой промышленности

Кафедра энологии

БИОХИМИЯ

*Методические указания
к лабораторному практикуму*

КИШИНЭУ
ТУМ
2010

В методических указаниях кратко изложены теоретические положения, касающиеся строения и роли важнейших органических соединений в процессах жизнедеятельности. Приведены методики определения и исследования нуклеиновых кислот, аминокислот, белков, ферментов, углеводов, витаминов, липидов, а также контрольные вопросы к работам и тесты для оценки знаний студентов.

Методические указания представляют собой руководство для выполнения практических работ по биохимии студентами факультета технологии и менеджмента в пищевой промышленности, очной и заочной формы обучения по специальностям 541.1. «Tehnologia și Menagementul Alimentației Publice»; 541.2. «Tehnologia Produselor Alimentare»; 541.3. «Tehnologia Vinului și a Produselor obținute prin Fermentare»; 552.2. «Biotehnologii Industriale».

Авторы: ст.преп., др. биол. наук Дан Згардан
преп. асистент Лариса Некула
преп. асистент Надежда Ботезату
инженер Юлия Санду

Ответ. ред.: доц., др. биол. наук Анатолий Бэлэнуцэ
Рецензент: доц., др. биол. наук Алёна Глижин (USM)
Редактор: Т. Младина

Bun de tipar V. 05.10
Hârtie ofset. Tipar RISO
Coli de tipar 5,5

Formatul hârtiei 60×84 1/16
Tirajul 100 ex.
Comanda nr.

UTM, 2004, Chișinău, bd. Ștefan cel Mare, 168.
Secția Redactare și Editare a UTM
2068, Chișinău, str. Studenților, 9/9

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории

Общие сведения. Запрещается вход в лабораторию в верхней одежде. Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятно возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение со стеклом. Химическая посуда в большинстве случаев – тонкостенная и хрупкая, поэтому при небрежном обращении с ней ее можно разбить и порезаться. Посуду следует держать в руках осторожно, не сжимая сильно пальцами. Химическую посуду нельзя резко ставить на стол. В случае пореза стеклом нужно вначале осмотреть ранку и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть пораненное место, смазать йодом и заклеить лейкопластырем или завязать бинтом.

Обращение с реактивами. Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу. Наливать или насыпать реактивы следует только над столом. Не следует оставлять открытыми банки с реактивами. Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой. Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, а затем собрать песок дощечкой. Облитое место необходимо обмыть раствором соды и вытереть тряпкой. При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин, дихлорэтан и др.) нельзя определять вещества по запаху, так как может произойти отравление их парами. Наполнение пипеток растворами веществ проводят

только при помощи груши, так как при набирании этих веществ ртом они могут попасть в ротовую полость и вызвать ожоги или даже отравление. В случае попадания на кожу концентрированных кислот облитое место нужно вначале обмыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно вначале обмыть разбавленным раствором кислоты, а затем водой.

Обращение с нагревательными приборами. На практических занятиях по биохимии часто приходится пользоваться спиртовками. Зажигать спиртовку нужно только спичкой. Нельзя нагревать вещества в толстостенной посуде. В пробирке можно нагревать только небольшие количества вещества, жидкость должна занимать не более 1/3 объема пробирки. Отверстие пробирки при нагревании в ней жидкости следует направлять в сторону от себя и рядом находящихся людей. Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с веществом следует слегка прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки. Нельзя нагревать пробирку долго в одной точке, так как теплопроводность стекла низкая, жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки. Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней. После нагревания следует сразу погасить спиртовку, накрыв пламя фарфоровым колпачком. Работа с водяной баней осуществляется только под тягой. Перегоревшие электроплитки нужно сразу же выключить, вынув вилку из штепсельной розетки. При неосторожной работе могут быть ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцевокислого калия.

I. Нуклеиновые кислоты

Лабораторная работа №1

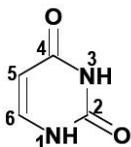
Гидролиз нуклеопротеинов

Задачи лабораторной работы

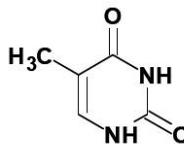
1. Провести гидролиз рибонуклеопротеидов (РНП) дрожжей.
2. Определить продукты гидролиза – компоненты РНП с помощью качественных реакций.
3. Обобщить и закрепить знания учащихся о компонентах РНП.

Большая часть нуклеиновых кислот в клетках встречается в виде комплексов с основными белками. Такие комплексы называют *нуклеопротеидами*. Для изучения компонентов нуклеопротеидов удобно использовать растительный объект – пекарские дрожжи, содержащие рибонуклеопротеиды (РНП). В результате кислотного гидролиза РНП распадаются на составляющие их компоненты: пуриновые и пиримидиновые основания; рибозу; фосфорную кислоту; пептиды.

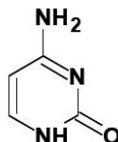
Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры с молекулярной массой от 25 тыс. до 1 млн. и более. Они являются важнейшими информационными молекулами, хранящими, копирующими и передающими сведения о признаках организма. Химический состав нуклеиновых кислот (представлен на рис. 1-3 и в табл. 1).



урацил
(2,4-диоксопиримидин)

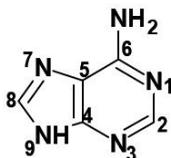


тимин
(2,4-диоксо-5-метилпиримидин)



цитозин (2-оксо-4-аминопиримидин)

Рис. 1. Азотистые основания – производные пиримидина

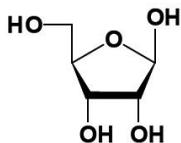


аденин (6-аминопурин)

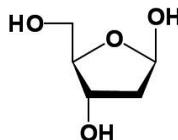


гуанин (2-амино-6-оксопурин)

Рис. 2. Азотистые основания – производные пурина



рибоза
(β -D-рибофураноза)



дезоксирибоза
(β -2'-дезоксид-рибофураноза)

Рис. 3. Углеводные компоненты

Азотистые основания образуют с рибозой (дезоксирибозой) нуклеозиды (К - гликозиды). При этом пиримидиновые основания соединяются с углеводом N₁-атомом, а пуриновые N₉-атомом. Углевод соединяется с основанием за счёт ОН-группы у С₁-атома (см. рис.4).

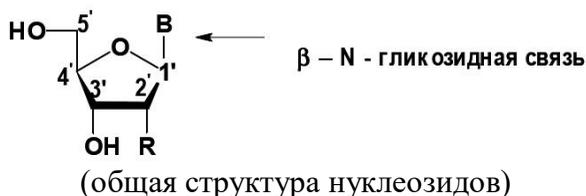


Рис. 4. R = OH – рибонуклеозид; R = H – дезоксирибонуклеозид; В - гетероциклическое основание.

Нуклеозиды устойчивы к гидролизу в слабощелочной среде, однако в кислой среде они подвергаются расщеплению по β - N -гликозидной связи. При этом нуклеозиды, в состав которых входят пуриновые основания, гидролизуются легче, чем пиримидиновые нуклеозиды.

Этерификация фосфорной кислотой спиртового гидроксила при С₃- или С₅-атомах в остатке дезоксирибозы или рибозы приводит к образованию фосфатов нуклеозидов, которые принято называть нуклеотидами (см. рис.5).

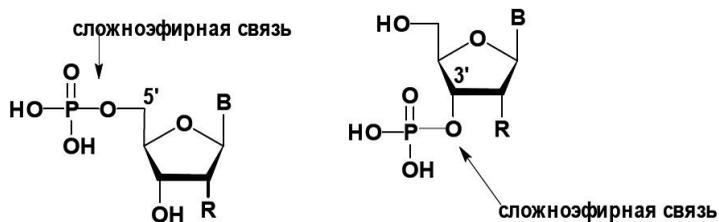


Рис. 5. Общая структура моонуклеотидов (R = OH – рибонуклеотид; R = H - дезоксирибонуклеотид)

За счёт фосфатного остатка нуклеотиды проявляют свойства двухосновной кислоты и в физиологических условиях при рН ~ 7 находятся в ионизированном состоянии.

Полинуклеотиды (нуклеиновые кислоты) содержат в своём составе более 20 нуклеозидов. В полинуклеотидных цепях нуклеозидные звенья связаны через фосфатную группу. Она образует две сложноэфирные связи с С₃ предыдущего и с С₅ последующего нуклеотидных звеньев. Каркас цепи состоит из чередующихся фосфатных и углеводных остатков. При этом азотистые основания являются «боковыми» группами, присоединенными к углеводным остаткам (см. рис. 6).

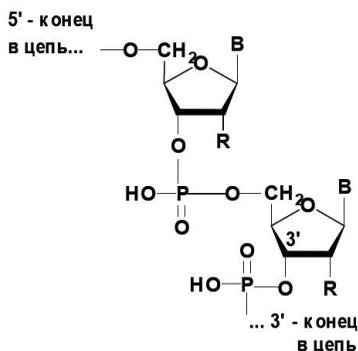


Рис. 6. Полинуклеотидная цепь

Таблица 1. Сходство и различие в химическом составе нуклеиновых кислот

ДНК	РНК
(дезоксирибонуклеиновая кислота)	(рибонуклеиновая кислота)
Азотистое основание	
Аденин	Аденин
Гуанин	Гуанин
Цитозин	Цитозин
Тимин	Урацил
Углеводный компонент	
Дезоксирибоза	Рибоза

ДНК в основном содержится в ядрах клеток, а РНК находится в рибосомах и в протоплазме клеток. Молекулы РНК различаются по функциям (транспортная, матричная, рибосомная).

Структурная организация нуклеиновых кислот. Под первичной структурой нуклеиновых кислот понимают определенную последовательность расположения мононуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК и РНК.

У растений, животных и человека молекула ДНК в отличие от РНК имеет более сложную пространственную организацию полинуклеотидной цепи. Так, двухцепочную правозакрученную спираль, состоящую из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных цепей, относят ко вторичной структуре ДНК. В ней пуриновые и пиримидиновые основания направлены внутрь двойной спирали, а углеводно-фосфатные группы расположены снаружи спирали. Азотистые основания аденин и тимин, гуанин и цитозин, принадлежащие двум цепям,

соединяются за счёт водородных связей и образуют комплементарные пары оснований (см. рис. 7):



Рис. 7. Водородные связи молекул ДНК

Основания, располагающиеся внутри спирали, прочно упакованы и не контактируют с водой. Вода контактирует лишь с ОН - группами углевода и фосфатными группами.

В большинстве случаев нуклеиновые кислоты функционируют в биосистемах в виде комплексов с белками (протеинами). Эти комплексы, образованные благодаря высокоспецифичным взаимодействиям между соответствующими полипептидными и полинуклеотидными цепями, называют нуклеопротеинами.

Для изучения химического состава нуклеопротеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей. С помощью качественных реакций

обнаруживают продукты гидролиза – белки, азотистые основания, а также рибозу (дезоксирибозу) и фосфорную кислоту.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) NaOH (10% - ный раствор).
- 2) CuSO₄ (1% - ный раствор).
- 3) Аммиак (концентрированный раствор).
- 4) AgNO₃ (2% - ный раствор).
- 5) Дифениламинный реактив (1% - ный раствор). 1 г дифениламина растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 2,75 мл концентрированной H₂SO₄ и доводят ледяной уксусной кислотой до 100 мл.
- 6) Молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл концентрированной HNO₃).
- 7) Дистиллированная вода.
- 8) Лакмусовая бумага.
- 9) Круглодонная колба с обратным холодильником.
- 10) Воронка с фильтром.
- 11) Мерный цилиндр.
- 12) Водяная баня.
- 13) Гидролизат дрожжей.

Опыт 1. Получение гидролизата дрожжей

Ход эксперимента. 2,5 г дрожжей помещают в круглодонную колбу, добавляют 20 мл 10% - ного раствора H₂SO₄. Затем колбу соединяют с обратным холодильником (стеклянная трубка длиной 20-30 см). Гидролиз дрожжей проводят при нагревании в течение 1 часа с момента закипания жидкости. После охлаждения

гидролизат фильтруют и с ним проводят качественные реакции).

В пробирку помещают 1 г свежих пекарских дрожжей, наливают 8 мл 10 % раствора H_2SO_4 . Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлен обратный холодильник (стеклянная трубка длиной 20-30 см), и ставят на водяную баню на 35 минут. Гидролизат после охлаждения отфильтровывают и используют для проведения качественных реакций.

Опыт 2. Биуретовая реакция на белки

Ход эксперимента. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% - ного раствора NaOH до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу), затем 2 капли 1% - ного раствора $CuSO_4$. Появляется сине-фиолетовая окраска.

Опыт 3. Серебряная проба на основания

Ход эксперимента. К 10 каплям гидролизата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции (по лакмусу), затем добавляют 10 капель 2% - ного раствора $AgNO_3$. Через несколько минут образуется светло-коричневый осадок солей пуриновых оснований (содержимое пробирки при стоянии перемешивать не надо).

Опыт 4. Реакция Троммера на углеводный компонент

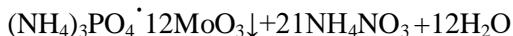
Ход эксперимента. Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с рибозой - зеленое. К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель

1% - ного раствора дифениламинового реактива и кипятят на водяной бане 15 минут. Появляется синезеленое окрашивание.

К 0,5 мл гидролизата дрожжей добавляют 1 мл 30 % р-ра NaOH и 3 капли 7% раствора CuSO₄. Пробирку нагревают до кипения. Происходит окисление рибозы и выпадает желтый осадок CuOH или красный осадок Cu₂O в результате восстановления Cu²⁺ до Cu⁺.

Опыт 5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Принцип метода. Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовоокислого аммония:



Ход эксперимента. К 10 каплям гидролизата прибавляют 20 капель молибденового реактива и осторожно кипятят несколько минут на водяной бане. В присутствии фосфорной кислоты наблюдается окрашивание раствора в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения.

Оформление работы. Результаты работы представляют в виде таблицы:

№	Название этапа работы	Условия реакции (реактивы, t°C, время, уравнение реакции)	Наблюдаемые эффекты	Вывод
1				

Контрольные тесты

1. Какие из предложенных соединений входят в состав ДНК:

- а) цитозин, гуанин, рибоза, урацил;
- б) дезоксирибоза, тимин, гуанин, урацил; в) аденин, дезоксирибоза, гуанин, тимин;
- г) гуанин, цитозин, рибоза, аденин; д) урацил, рибоза, тимин, аденин?

2. Какие из предложенных соединений входят в состав РНК:

- а) рибоза, тимин, урацил, аденин; б) урацил, аденин, дезоксирибоза, рибоза;
- в) урацил, аденин, тимин, рибоза; г) дезоксирибоза, тимин, рибоза, аденин;
- д) аденин, урацил, тимин, рибоза?

3. Какие из предложенных соединений вступают во взаимодействие с дифениламиновым реактивом:

- а) тимин, рибоза, урацил, аденин;
- б) гуанин, дезоксирибоза, урацил, тимин;
- в) аденин, гуанин, урацил, рибоза?

4. Какие из предложенных соединений вступают во взаимодействие с щелочным раствором нитрата серебра:

- а) тимин, урацил, аденин, дезоксирибоза;
- б) гуанин, рибоза, дезоксирибоза, тимин;
- в) рибоза, цитозин, гуанин, урацил?

5. Две полинуклеотидные «спирали» молекулы ДНК связаны между собой:

- а) пептидными связями; б) гликозидными связями;
- в) фосфодиэфирными связями; г) водородными связями.

6. Участок молекулы ДНК содержит 2400 нуклеотидов, среди которых 300 адениловых.

Определите, сколько нуклеотидов с цитозином содержит данный фрагмент.

а) 300; б) 600; в) 900; г) 1800.

7. Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) аденин; б) гуанин; в) цитозин; г) урацил.

8. Участок ДНК содержит 720 нуклеотидов с аденином и тиминем (48% от общего количества нуклеотидов). Определите общее количество нуклеотидов с гуанином в данном участке ДНК.

а) 195; б) 390; в) 720; г) 360.

9. Средняя молекулярная масса одного нуклеотида составляет 300. Определите молекулярную массу гена, кодирующего полипептид из 470 аминокислот.

II. Аминокислоты и белки

Лабораторная работа №2

Определение содержания аммиака по методу Конвея-Байрна

Задачи лабораторной работы

1. Освоить методику количественного определения аммиачного азота в вине.
2. Изучить метаболизм аммиака в растениях.
3. Дать краткую характеристику азотистых веществ, содержащихся в растениях.

Азот играет исключительно важную роль в жизни растений. Азот входит в состав белков, являющихся главной составной частью цитоплазмы и ядра клеток, в состав нуклеиновых кислот, хлорофилла, ферментов, фосфатидов, большинства витаминов и

других органических азотистых соединений, которые играют важную роль в процессах обмена веществ в растениях. Для биосинтеза азотистых веществ растения и микроорганизмы используют неорганический азот, человек и животные используют для биосинтеза азотистых веществ только органический азот.

Растения, грибы, животные и человек не усваивают атмосферный азот. Этой способностью обладают некоторые прокариотные микроорганизмы: анаэробные бактерии рода *Clostridium*, аэробные бактерии рода *Azotobacter*, цианобактерии (сине-зеленые водоросли), способные к фотосинтезу, и симбиотические азотфиксирующие бактерии рода *Rhizobium* и *Bacillus*, живущие в клубеньках корней бобовых растений. Процесс перехода атмосферного азота в аммиачный – это процесс ферментативного восстановления. Аммиачный азот используется, в свою очередь, для синтеза аминокислот и других азотсодержащих органических веществ.

Основным источником азота для растений являются соли азотной кислоты (нитраты и нитриты) и соли аммония. В естественных условиях питание растений азотом происходит путем потребления ими аниона NO_3^- и катиона NH_4^+ , находящихся в почвенном растворе и в обменно-поглощенном почвенными коллоидами состоянии.

Нитраты в почву вносятся органическими или минеральными удобрениями, а также образуются при окислении аммиака двумя группами нитрифицирующих бактерий *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. *Nitrosomonas* окисляет аммиак: $\text{NH}_3 + 1\frac{1}{2} \text{O}_2 = (\text{NO}_2^-) + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$; *Nitrobacter* окисляют нитрит: $(\text{NO}_2^-) + \frac{1}{2} \text{O}_2 = \text{NO}_3^-$. Аммиачный азот из почвы происходит либо из химических удобрений, либо из остатков органических

веществ в процессе их распада при участии гнилостных бактерий из рода *Bacillus* и *Clostridium*. Этот процесс называется аммонификацией.

Поступившие в растения минеральные формы азота проходят сложный цикл превращения, в конечном итоге включаясь в состав органических азотистых соединений — аминокислот, амидов и, наконец, белка. Синтез органических азотистых соединений происходит через аммиак, образованием его завершается и их распад. Аммиак, по выражению академика Д. Н. Прянишникова, «...есть альфа и омега в обмене азотистых веществ у растений».

Нитратный азот не может непосредственно использоваться растениями для синтеза аминокислот. Нитраты в растениях подвергаются сначала ступенчатому — через нитрит, гипонитрит и гидроксилламин — ферментативному восстановлению до аммиака: $\text{HNO}_3 \rightarrow \text{HNO}_2 \rightarrow (\text{HNO})_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$.

Восстановление нитратов происходит с участием ферментов, содержащих микроэлементы — молибден, медь, железо и марганец, — и требует затрат энергии, аккумулируемой в растениях при фотосинтезе и окислении углеводов. Восстановление нитратов в растениях осуществляется по мере использования образующегося аммиака на синтез органических азотистых соединений.

В растительных организмах аммиак также образуется в результате распада аминокислот: при дезаминировании, декарбоксилировании, трансаминировании.

Свободный аммиак не накапливается в растениях, так как является клеточным ядом. Живые организмы обладают большими возможностями для связывания, детоксикации и запасаания аммиака. Аммиак

откладывается в растительных клетках в виде солей органических кислот, амидов дикарбоксильных аминокислот и в виде мочевины. Все эти соединения являются резервами аммиачного азота в растениях.

Растения, богатые свободными органическими кислотами (щавель, ревень, бегония и др.) имеют особенность фиксировать аммиак в виде солей (щавелевокислый аммоний, яблочнокислый аммоний, лимоннокислый аммоний, фумаровокислый аммоний и т.д.)

Самым важным способом детоксикации и накопления аммиака является его фиксирование в форме амидов, в частности глутаминовой и аспарагиновой кислот. Аммиачный азот, поступивший в растение и образовавшийся при восстановлении нитратов, в первую очередь присоединяется к кетокислоте (щавелево-уксусной, кето-глутаровой или фумаровой), образуя аспарагиновую и глутаминовую аминокислоты. Реакция образования этих амидов протекает с расходом АТФ (см. рис. 8):

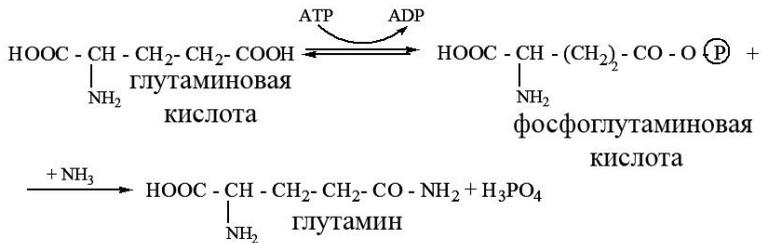


Рис. 8. Образование глутамина

Амиды глутамин и аспарагин безвредны и используются для синтеза белка в тканях растений. При ферментативном гидролизе они переходят в кислоту (см. рис. 9).

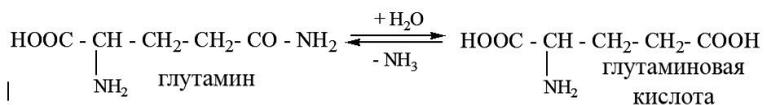


Рис. 9. Ферментативный гидролиз глутамина

Классическими исследованиями Д.Н. Прянишникова установлено, что в результате образования амидов происходит обезвреживание аммиака, который может накапливаться в растениях при дезаминировании аминокислот или обильном аммиачном питании при недостатке углеводов.

При недостатке углеводов и, следовательно, органических кетокислот (особенно при прорастании семян, имеющих малый запас углеводов, например сахарной свеклы) избыточное поступление аммиачного азота в растения может оказать отрицательное действие. В этом случае аммиачный азот не успевает использоваться на синтез аминокислот и накапливается в тканях, вызывая «аммиачное отравление» растений. Те растения, в посевном материале которых содержится много углеводов (например, крахмала у картофеля), быстро усваивают поступающий аммиачный азот и хорошо отзываются на внесение аммиачных удобрений.

Преобразование молекулярного аммиака в мочевины свойственно грибам, дрожжам, высшим растениям, но встречается чаще у животных. Фиксирование аммиака в форме мочевины называется *циклом мочевины*, или *орнитиновым циклом*. Мочевина в растительных организмах играет биохимическую роль, подобную амидам (глутамину, аспарагину), т.е. фиксирует азот в организме в нетоксичной форме.

Значение анализа. Во всех растениях, а также в пищевом сырье и продуктах в значительных количествах содержатся разнообразные азотистые вещества. К ним относятся белки, полипептиды, аминокислоты, амиды, алкалоиды, некоторые витамины, а также такие продукты азотистого обмена, как аспарагин, глютамин, мочевина и аммиак (соли аммония). Последний является сильным клеточным ядом и накапливается в растениях в небольших количествах. Повышенные количества аммиачного азота ухудшают вкусовые качества вин, соков, компотов и других пищевых продуктов.

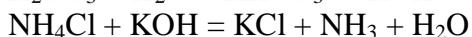
Принцип метода. При добавлении щелочей к исследуемым растворам, содержащим соли аммония, выделяется аммиак, который количественно улавливается 0.02 н раствором серной кислоты, взятым в избытке. Оттитровав гидроксидом натрия избыток кислоты, поглотившей аммиак, можно рассчитать ее количество, необходимое для нейтрализации этого аммиака.

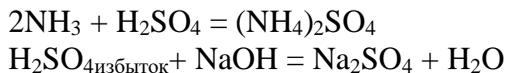
Сильные щелочи одновременно с разложением солей аммония частично омыляют и содержащиеся в исследуемых объектах амиды.



Образующийся при этом аммиак может исказить результаты анализа. Для того чтобы омыление амидов не происходило, вместо щелочи к исследуемой жидкости добавляют насыщенный раствор K_2CO_3 , который в результате гидролиза создаёт относительно слабощелочную среду, в которой амиды не расщепляются.

Химизм процесса:





Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Четыре чашки Конвея.
- 2) Две пипетки Мора на 5 см^3 .
- 3) Градуированная пипетка на 5 см^3 .
- 4) Четыре колбы Эрленмейера на 100 см^3 .
- 5) $0.02 \text{ н } \text{H}_2\text{SO}_4$.
- 6) $0.02 \text{ н } \text{NaOH}$.
- 7) Насыщенный раствор карбоната калия (K_2CO_3).
- 8) Смешанный индикатор (метилрот-метиленовый голубой): 0.2 г. метилрота и 0.012 г. метиленового голубого растворяют в 60 см^3 спирта и доводят водой до 100 см^3 .

Ход эксперимента

Во внутреннюю чашки Конвея I (см. рис 10.) наливают 5 см^3 0.02 н раствора серной кислоты. В наружную камеру II наливают 5 см^3 испытуемой жидкости.

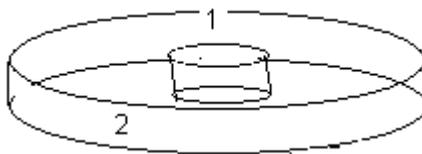


Рис. 10. Чашка Конвея

Чашку накрывают приблизительно на $9/10$ хорошо шлифованной стеклянной пластиной. Через отверстие, оставшееся открытым, с помощью градуированной пипетки вливают 3 см^3 насыщенного раствора карбоната калия. Чашку накрывают полностью и осторожным покачиванием смешивают раствор

карбоната калия с испытуемой жидкостью. Прибор помещают в термостат и выдерживают там 1 час при 50-55°C. Затем его извлекают из термостата, открывая крышку, количественно переносят раствор кислоты из чашечки I в колбу Эрленмейера и титруют 0.02 н гидроксидом натрия в присутствии индикатора фенофталеина.

Для уменьшения вероятности появления ошибок определение проводят параллельно в двух чашках Конвея.

Одновременно в двух других чашках проводят контрольный опыт, в котором вместо исследуемой жидкости берут дистиллированную воду. Количество аммиачного азота рассчитывают для 1 дм³ исследуемой жидкости по формуле:

$$X = \frac{(V_{\text{контр}} - V_{\text{раб}}) \times K \times 0.28 \times 1000}{V},$$

где:

$V_{\text{контр}}$ – объем 0.02 н раствора гидроксида натрия, используемого на титрование в контрольном опыте;

$V_{\text{раб}}$ – объем 0.02 н раствора гидроксида натрия, используемого на титрование в рабочем опыте;

K – поправочный коэффициент щелочи;

0.28 – количество мг аммиачного азота, эквивалентное 1 см³ 0.02 н раствора гидроксида натрия;

V – объем анализируемой пробы, см³.

Контрольные вопросы

- 1) Какие правила техники безопасности следует соблюдать при определении аммиачного азота?
- 2) Какие виды азотистых веществ содержатся в растениях?

- 3) Опишите химизм образования амидов в растениях.
- 4) Какие химические реакции происходят при определении аммиака?
- 5) Какова методика определения аммиака?
- 6) Проанализируйте и обоснуйте формулу для расчета содержания аммиака в 1 дм³ жидкости.

Лабораторная работа №3

Потенциометрическое титрование формольных производных α -аминокислот

Задачи лабораторной работы

1. Овладеть методикой определения количественного содержания аминного азота в вине.
2. Обобщить и закрепить знания студентов о строении и функциях аминокислот.
3. Изучить химические свойства аминокислот.

Гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно amino- и карбоксильную группы, называются аминокислотами. В зависимости от положения аминогруппы в углеродной цепи по отношению к карбоксилу различают α -, β -, γ -аминокислоты. У α -аминокислот аминная и карбоксильная группы связаны одним и тем же атомом углерода, у β -аминокислот аминная группа разделена от карбоксильной группы одним атомом углерода, у γ -аминокислот аминная группа разделена от карбоксильной группы двумя атомами углерода и т.д. В настоящее время известно около 220 аминокислот, однако только лишь 20 α -аминокислот могут входить в состав белков и называются протеиногенными (см. приложение 1). Общая формула α -аминокислот следующая (см. рис. 11) :

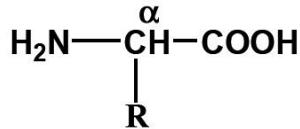


Рис. 11. Общая формула α -аминокислот

Помимо этих аминокислот, называемых *стандартными*, в некоторых белках присутствуют специфические *нестандартные* аминокислоты, являющиеся производными стандартных. В последнее время к стандартным аминокислотам иногда причисляют *селеноцистеин* (Sec) и *пирролизин* (Pyl).

Одновременное присутствие в молекулах α -аминокислот аминной и карбоксильной групп обуславливает их способность вступать в реакции поликонденсации, которые приводят к образованию пептидных (амидных) связей между мономерными звеньями. В результате такой реакции образуются биоорганические полимеры - белки (протеины). Они содержат свыше 100 аминокислотных остатков и имеют молекулярную массу от 10000 до нескольких миллионов. Чередование аминокислотных остатков в молекуле белка неповторимо и строго специфично. Специфичность белков определяется аминокислотным составом и аминокислотной последовательностью.

Химические свойства аминокислот. Обладая амфотерными свойствами (рис. 12), α -аминокислоты могут реагировать как амины (рис.13-15) и как карбоновые кислоты (рис.16-17).



Рис. 12. Амфотерные свойства α -аминокислот

Благодаря аминогруппе, они могут реагировать с минеральными кислотами, вступать в специфическую реакцию с HNO_2 (см. рис. 13), HCl (см. рис. 14), реагировать с альдегидами и редуцирующими сахарами.



Рис. 13. Реакция α -аминокислоты с HNO_2

В результате последней реакции выделяется азот. Эта реакция лежит в основе количественного определения аминокислот по методу Ван Слайка (учитывается количество выделившегося азота).

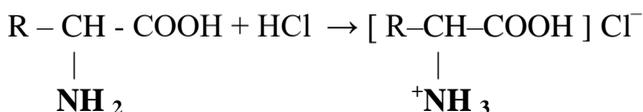


Рис. 14. Реакция α -аминокислоты с HCl

В результате взаимодействия аминокислот с альдегидами (сахарами) (см. рис. 15) образуются темноокрашенные продукты – *меланоидины*.

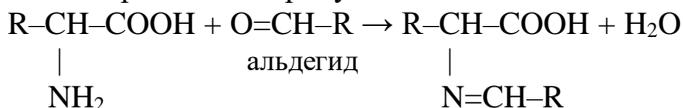


Рис. 15. Реакция α -аминокислоты с альдегидом

Карбоксильная группа аминокислот реагирует со щелочами (см. рис. 16) и спиртами (см. рис. 17), образуя соли и эфиры.

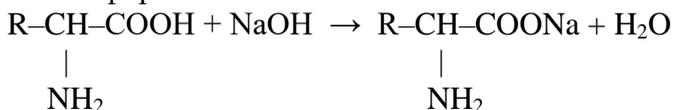


Рис. 16. Реакция α -аминокислоты с щелочью

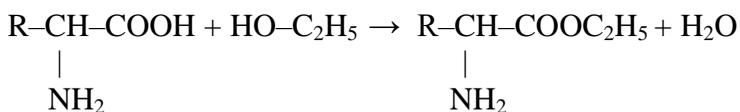


Рис. 17. Реакция α-аминокислоты со спиртом

Соединение отдельных аминокислот в молекуле белка осуществляется при помощи пептидной связи так, что аминная группа одной аминокислоты соединяется с карбоксильной группой другой аминокислоты. Связи между субъединицами образуются путём удаления молекулы воды (*конденсация*) (см. рис. 18). Для образования связей необходима энергия. Связи разрываются в результате присоединения молекулы воды (*гидролиз*).

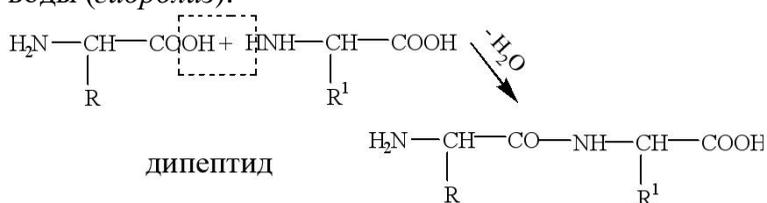


Рис. 18. Пептидная связь

Аминокислоты, содержащиеся в пищевом сырье, могут подвергаться окислительному дезаминированию и последующему декарбоксилированию и омылению. Эти реакции протекают при различных технологических операциях в присутствии кислорода, перекисей, хининов и других окислителей. В результате реакции образуются альдегиды (см. рис. 19), придающие готовым продуктам характерный, часто специфический аромат.

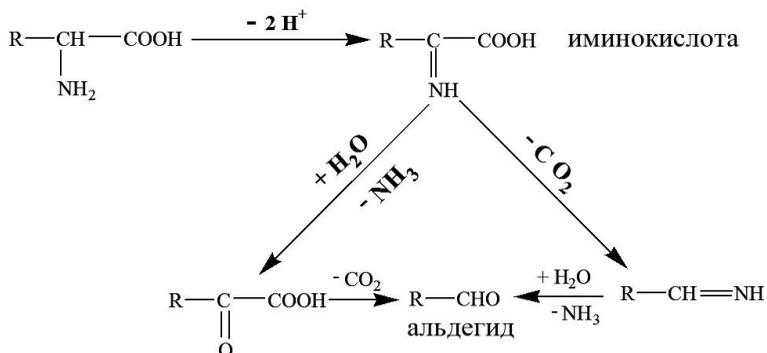


Рис. 19. Образование альдегидов

Значение анализа. В растительном и животном сырье и продуктах их переработки всегда содержится некоторое количество аминокислот в свободном состоянии, а иногда это количество может быть значительным. Так, в виноградном сусле, соке и вине аминокислоты составляют свыше половины всех азотистых соединений. В процессе жизнедеятельности растений, а также при переработке пищевого сырья, из аминокислот образуется ряд соединений, определяющих вкус, цвет и запах продуктов. Производными аминокислот также являются такие соединения, как меланины, меланоидины, сивушные масла и др.

Принцип метода. α -аминокислоты реагируют с формальдегидом, образуя метиленаминокислоты (формольные производные) (см. рис. 20).

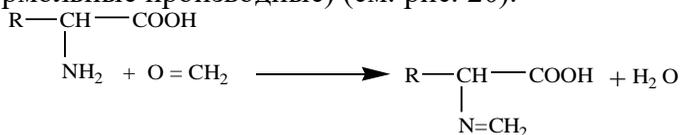


Рис. 20. Реакция α -аминокислоты с формальдегидом

При этом аминогруппы теряют свои основные свойства, свободные же карбоксильные группы титруются едкой щелочью (см. рис. 21).



Рис. 21. Титрование карбоксильной группы α -аминокислоты

Условно считают, что количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминогрупп (верно, в основном, для моноаминокарбоновых аминокислот). Чтобы ввести поправку для аминодикарбоновых аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой и др.), раствор предварительно нейтрализуют до рН = 6.8.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Потенциометр.
- 2) Магнитная мешалка.
- 3) Стаканчик на 100 см³.
- 4) Бюретка на 25 см³.
- 5) Мерный цилиндр на 25 см³.
- 6) Пипетка Мора на 10, 20 см³.
- 7) 0.1 н раствор NaOH.
- 8) Формольная смесь (20 см³ 40% формалина и 1 см³ фенолфталеина титруются с раствором 0.1 н NaOH до рН = 6.8).
- 9) Пробы вина или сока.

Ход эксперимента

Титрование производится с помощью потенциометра. Для титрования используется каломельный и стеклянный электроды (должны находиться 5 мин в дистиллированной воде или буферном растворе). Предварительно прибор нагревается 30 мин.

Перед определением электроды должны быть тщательно промыты дистиллированной водой и высушены фильтровальной бумагой. В стаканчик вливают 20 см³ исследуемого материала (вино, сок), помещают магнитную мешалку, погружают электроды в вино или сок, оттитровывают щелочью до рН = 6.8. Титрование осуществляется следующим образом:

- Измеряют рН исследуемого раствора.
- Включают магнитную мешалку.
- Исследуемый раствор титруют 0.1 н раствором NaOH со скоростью 5-7 капель в секунду с одновременным наблюдением за показанием прибора.
- Когда рН достигает значения 6.8, титрование завершают. В стаканчик с помощью мерного цилиндра доливают 10 см³ формольной смеси.
- Бюретку заполняют щелочью (количество затраченной при этом щелочи при титровании исследуемого раствора до рН = 6.8 не учитывают).
- Содержимое титруют описанным способом до рН = 9.1.

Титрование повторяется 3-4 раза. Для определения количества аминного азота принимается во внимание число кубических сантиметров щелочи, необходимой для титрования после доливания формольной смеси. 1 см³ 0.1 н щелочи соответствует 1.4 мг аминного азота.

Количество аминного азота пересчитывается в мг на 1 дм³ исследуемой жидкости.

$$X = \frac{V_{\text{р-ра щелочи}} \times 1.4 \times K_{\text{щелочи}} \times 1000}{V_{\text{вина}}},$$

где **K** – поправочный коэффициент щелочи.

Контрольные вопросы и тесты

- 1) Какие функциональные группы входят в состав аминокислот?
- 2) На какие классы и по каким признакам делятся аминокислоты?
- 3) Какие вы знаете "незаменимые" аминокислоты? Почему они так называются?
- 4) Какими химическими свойствами обладают аминокислоты?
- 5) Опишите методику определения количественного содержания аминного азота в исследуемой жидкости.
- 6) Какие правила техники безопасности следует соблюдать при выполнении данной лабораторной работы?
- 7) Что является мономером белка?
а) глюкоза; б) фосфорная кислота; в) аминокислота;
г) нуклеотид; д) глицерин.
- 8) Сколько типов стандартных аминокислот входят в состав белков?
а) 4; б) 20; в) 64; г) 100; д) 220.
9. Выберите термин, который не вписывается в данный контекст:
а) пролин; б) треонин; в) метионин; г) лизин; д) гуанин.

Лабораторная работа №4

Цветные реакции на аминокислоты и белки

Задачи лабораторной работы

1. Доказать наличие пептидной связи в растворах белков.
2. Провести качественные реакции на аминокислоты.
3. Определить наличие некоторых аминокислот в составе белков.

При взаимодействии белка с некоторыми реактивами образуются окрашенные продукты - белки дают цветные реакции, что зависит от наличия в белковой молекуле той или иной аминокислоты или определенной химической группировки. Этими реакциями можно обнаружить в исследуемом веществе присутствие белков или отдельных аминокислот (тирозина, триптофана, цистеина и др.)

Существуют два типа цветных реакций:

- универсальные - биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки);
- специфические - только на определенные аминокислоты в составе белка или в растворах отдельных аминокислот, например, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин), ксантопротеиновая реакция (на ароматические аминокислоты) и др.

Бесцветные реакции протекают при гидролизе белков с кислотами, основаниями и ферментами. При гидролизе белковые вещества распадаются на более простые соединения, образуя в итоге смесь α -аминокислот.

При кислотном гидролизе белковый раствор нагревается 10-12ч с 10% раствором HCl или 20% H₂SO₄. Белки распадаются до аминокислот, но исчезает полностью триптофан.

Щелочной гидролиз осуществляется при нагреве в течении 10-12 ч с 10% NaOH или Ba(OH)₂. Триптофан не распадается, но исчезают три другие аминокислоты: аргинин, цитруллин, гистидин.

С биологической точки зрения более значимыми являются процессы ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз осуществляется с помощью ферментов при температуре до 20-40°C и при почти нейтральном рН. В этом случае не распадается ни одна аминокислота. Ферментативный гидролиз протекает в пищевом животном, в растительной клетке плодов, овощей, в винограде и винах. Например, при переработке винограда гидролиз протекает по схеме: белки→пептоны→полипептиды→аминокислоты.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Обезжиренное молоко или раствор 0.5 г казеина в 100 см³ 1%-ной щелочи.
- 2) Раствор яичного белка. Белок одного яйца отделяют от желтка, смешивают с 0.5 дм³ дистиллированной воды и тщательно взбалтывают.
- 3) Желатин (1%-ный раствор).
- 4) CuSO₄ (1 и 6% - ные растворы).
- 5) NaOH(10 и 20% - ные растворы).
- 6) Концентрированная HNO₃.
- 7) Концентрированная H₂SO₄.
- 8) Ледяная уксусная кислота.

- 9) Аммиак (20%-ный раствор) или NaOH(30%-ный раствор).
- 10) Реактив Миллона.
- 11) Нингидрин (0,5% - ный водный раствор).
- 12) Реактив Фоля (к 5% - ному раствору $Pb(CH_3COO)_2$ прибавляют равный объем 30% - ного раствора NaOH до растворения образовавшегося осадка).
- 12) α -Нафтол (0,2% - ный спиртовой раствор).
- 13) NaBrO (гипобромид натрия).
- 14) Мочевина (40% - ный водный раствор).
- 15) Сульфаниловая кислота (1% - ный раствор в 5% - ном растворе HCl).
- 16) $NaNO_2$ (0,5% - ный раствор).
- 17) Na_2CO_3 (10% - ный раствор).
- 18) Глиоксиловая кислота.
- 19) о-Фталевый диальдегид (водный раствор).
- 20) Пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 2 мл.
- 21) Растворы аминокислот.

Универсальные реакции

Опыт 1. Биуретовая реакция

Принцип метода. Биуретовая реакция (см. рис. 22) обусловлена наличием в белке пептидных (-NHCO-) связей, которые в щелочной среде образуют с серноокислой медью окрашенные комплексы.

Опыт 2. Нингидриновая реакция

Принцип метода. Белки и свободные α -аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином (см. рис. 23). Реакция обусловлена наличием аминогрупп в α -положении.

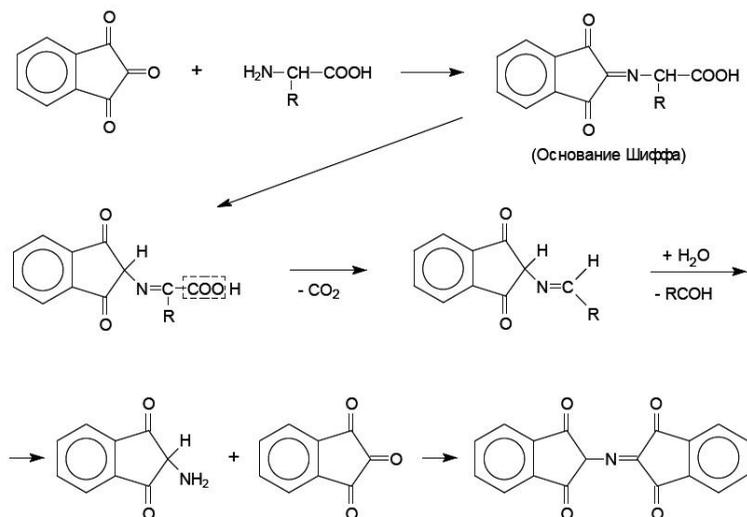


Рис. 23. Нингидриновая реакция

Ход эксперимента. К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель 0,5% - ного водного раствора нингидрина и кипятят 1 - 2 минуты. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Специфические реакции

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция

Принцип метода. При нагревании с концентрированной азотной кислотой растворы белка дают желтое окрашивание при наличии в белках циклических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана) вследствие образования нитропроизводных этих аминокислот (см. рис. 24). В щелочной среде вследствие образования натриевой соли окраска усиливается и переходит в оранжевую. Своё название реакция получила от греческого слова "ксантос", что означает желтый.

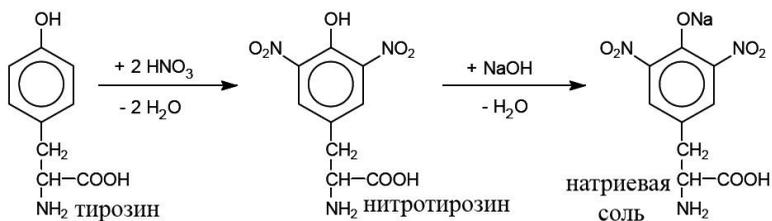


Рис. 24. Ксантопротеиновая реакция

Ход эксперимента. К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли концентрированной HNO₃ и осторожно нагревают до кипения. После охлаждения в пробирку добавляют 10 - 15 капель 20% - ного раствора NaOH и наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 4. Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу

Принцип метода. Реакция характерна для серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина и метионина) (см. рис. 25). Серу можно обнаружить благодаря ее свойству давать с солями свинца черный осадок сернистого свинца.

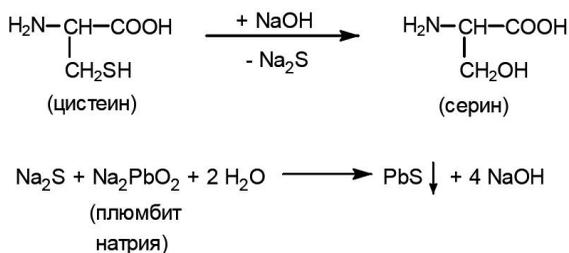


Рис.25. Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу

Ход эксперимента. К 5 каплям исследуемого раствора прибавляют 5 капель реактива Фолья. Содержимое пробирки доводят до кипения. Изменение цвета раствора наступает через 1 - 2 минуты после охлаждения реакционной смеси.

Опыт 5. Реакция на тирозин

Принцип метода. Тирозин дает красное окрашивание раствора при взаимодействии с реактивом Миллона (см. рис. 26).

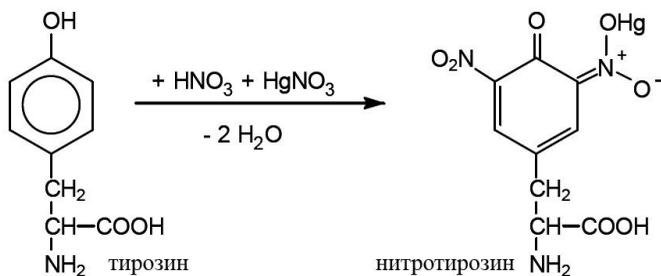


Рис. 26. Реакция на тирозин

Ход эксперимента. К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают, наблюдая за изменением цвета раствора.

Опыт 6. Реакция на аргинин

Принцип метода. Реакция обусловлена присутствием в молекуле аминокислоты аргинина гуанидиновой группировки (см. рис. 27). В щелочном растворе в присутствии гипохлорита натрия гуанидиновая группа аргинина окисляется. Окисленный продукт, соединяясь с α -нафтолом, образует продукт конденсации розово-красного цвета.

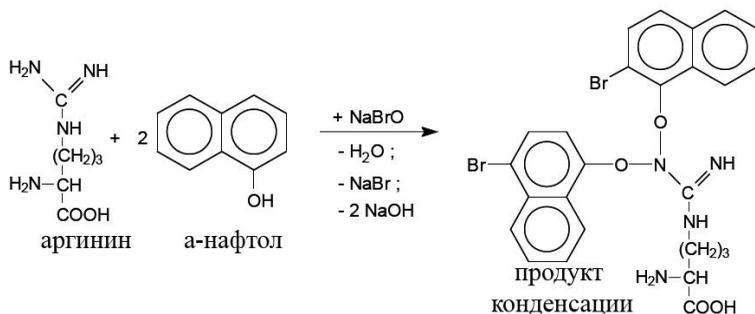


Рис. 27. Реакция на аргинин

Ход эксперимента. К 10 каплям исследуемого раствора добавляют 10 капель 10% - ного раствора NaOH и 3 капли 0,2% - ного спиртового раствора о-нафтола. Содержимое пробирки перемешивают. Затем добавляют 10 капель раствора гипобромида натрия (NaBrO) и вновь перемешивают. Для стабилизации развивающегося красного окрашивания быстро добавляют 5 капель 40% - ного раствора мочевины.

Опыт 7. Реакция на глицин

Принцип метода. Глицин дает ярко-зеленое окрашивание раствора при взаимодействии с о-фталевым диальдегидом в щелочном растворе (см. рис. 28).

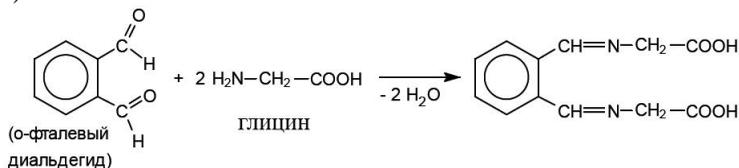


Рис. 28. Реакция на глицин

Ход эксперимента. К 10 каплям исследуемого раствора прибавляют 10%-ный раствор NaOH до pH = 8 (по лакмусу). Затем приливают 2-3 капли водного раствора о-фталевого диальдегида.

Оформление работы. Результаты занятия оформляют в виде таблицы:

№	Название реакции	Принцип реакции	Условия реакции	Наблюдаемые эффекты
1				

Контрольные вопросы

- 1) Опишите химизм наиболее значимых цветных реакций на белки.
- 2) Как осуществить кислотный и щелочный гидролиз?
- 3) Как протекает ферментативный гидролиз?
- 4) Какие из предложенных аминокислот вступают в ксантопротеиновую реакцию?
 - а) Ile; Val; Met; Phe; Trp; б) Lys; Pro; Phe; Gln; Tyr; в) Tyr; Phe; Pro; His; Arg;
 - г) Thr; Ser; His; Phe; Trp; д) Trp; Pro; Ala; Val; Phe;
- 5) Какие аминокислоты вступают в реакцию с реактивом Фоля?
 - а) Cys; Thr; Met; Val; Arg; б) Gly; Ala; Met; Leu; Cys;
 - в) Asp; Val; Cys; Thr; Met;
 - г) Glu; Met; Pro; His; Gys; д) Gys; Ile; Met; Ala; Gly.
- 6) Какие из предложенных аминокислот вступают в реакцию с реактивом Милона?

Gly; Val; Ile; Tyr; Pro.
- 7) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента а-нафтол?

Glu; Asp; Ala; Met; Arg.

Лабораторная работа №5

Выделение и анализ простых белков

Задачи лабораторной работы

1. Выделить альбуминовую и проламиновою фракции протеинов.
2. Изучить физические свойства протеинов.
3. Углубить и расширить представления студентов о функциях запасных белков и их биологической значимости для живых организмов.

Белки играют исключительно важную роль в жизнедеятельности любого живого организма. Основная масса протоплазмы живых клеток состоит из белков. Белки являются материальной основой жизни и участвуют во всех важнейших процессах, протекающих в живом организме.

Белковые вещества представляют собой высокомолекулярные биополимеры, первичная структура которых образована полипептидными цепочками, построенными из различных α -аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Молекулярный вес белков может достигать нескольких миллионов.

Строение белковой молекулы. Различают четыре уровня структуры, или организации белковой молекулы: первичная, вторичная, третичная, четвертичная.

Первичной (линейной) структурой белковой молекулы называется последовательность, в которой

отдельные аминокислоты соединяются в полипептидной цепочке.

Вторичная (спиралевидная) структура белковой молекулы образуется благодаря водородным связям, возникающим между отдельными частями длинной полипептидной цепи.

Третичной структурой называют способ упаковки спиралевидной полипептидной цепочки в пространстве. При образовании третичной структуры важную роль играют дисульфидные связи (-S-S-), образующиеся при окислении сульфгидрильных групп остатков цистеина.

По форме белковой молекулы, сложившейся на третьем уровне организации, различают белки глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки – растворимые вещества с компактной структурой. По форме они приближаются к шару. Фибриллярные – имеют нитевидную форму. Они обычно нерастворимы.

Четвертичную структуру представляет ассоциация нескольких отдельных полипептидных цепей. Ее создают водородные связи, электростатическое взаимодействие, гидрофобные и другие виды связи. Она характерна для некоторых белков (гемоглобин).

Классификация белков. По степени сложности все белки делят на две большие группы – протеины и протеиды.

Протеинами, или простыми белками, называют белки, в состав которых входят только остатки аминокислот. В состав протеидов кроме остатков аминокислот входят группы небелковой природы – простетические группы, например, липиды (липопротеиды), углеводы (гликопротеиды), нуклеиновые кислоты (нуклеопротеиды).

Протеины, в свою очередь, делят еще на четыре группы, основываясь на характере их растворимости:

Альбумины – белки, растворимые в воде (белок куриного яйца – овальбумин).

Глобулины – белки, растворимые в водных растворах различных солей, например в растворе хлорида натрия. Глобулины составляют большую часть белка многих семян, особенно у бобовых растений и масличных культур (горох – легумин; фасоль – фазеолин).

Проламины – белки, растворимые в этиловом спирте (группа белков, характерная для семян злаков, пшеница – глиадин; кукуруза – зеин).

Глютелины – белки, растворимые в растворах щелочей (кукуруза – глютелин; пшеница – глютеин).

Свойства белков. Свойства белков в первую очередь зависят от аминокислотного состава, от взаимного расположения аминокислот, а также от структуры белковой молекулы, элементарного состава и многих других факторов.

Однако все белки имеют ряд общих характерных свойств. Так же как и аминокислоты, белки являются амфотерными соединениями. Для них характерна изоэлектрическая точка – величина рН, при которой белок как кислота и как основание имеет наименьшую степень диссоциации. При набухании белки образуют коллоидные растворы – студни и гели. Белки являются очень чувствительными веществами к действию физических, химических и биологических факторов, воздействие которых может привести, например, к денатурации белка. Денатурация белков – сложное явление, в основе которого лежит изменение вторичной, третичной и четвертичной структуры белковой молекулы.

В технологических процессах чаще всего встречается тепловая денатурация (например, при сушке зерна, выпечке хлеба). Химический состав белка при денатурации не изменяется, но могут сильно изменяться все свойства белка – физические, химические и биологические.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Измельченное зерно или мука.
- 2) Насыщенный раствор хлорида натрия.
- 3) Раствор этилового спирта $\omega(C_2H_5OH) = 7\%$.
- 4) Раствор белка.

Опыт 1. Проба на альбумины

В колбу берут 2 г испытуемого материала, добавляют 2 см³ воды и содержимое перемешивают, колбу ставят в термостат при 30°-35°С на 3 мин. В течение первых 2 мин. содержимое пробирки периодически перемешивают. Через 3 мин. надосадочную жидкость, содержащую альбумины, отфильтровывают. Часть фильтрата (1-2 см) используют для биуретовой реакции на белок (см. лабораторную работу № 4), а к другой части фильтрата добавляют примерно равный объем насыщенного раствора хлорида натрия. При этом раствор мутнеет, т.к. альбумины в присутствии солей теряют растворимость.

Опыт 2. Проба на проламины

В пробирку берут 1 г исследуемого материала и 1 см³ раствора этилового спирта. Экстракцию белков ведут при 30°-35°С, в течение 2 мин. при

периодическом перемешивании. Через 2 минуты надосадочную жидкость отфильтровывают и в части фильтрата обнаруживают белок по биуретовой реакции. Оставшуюся часть фильтрата разбавляют водой в 2 раза. При этом концентрация спирта резко падает и спирторастворимые белки – проламины – теряют растворимость. Раствор мутнеет.

Опыт 3. Свертывание белка при нагревании

В опыте используют белковые растворы, полученные в опыте №1. В пробирку вносят 5 см³ испытуемого материала, в который погружают термометр. Затем ее ставят в стакан с теплой водой и начинают постепенно нагревать. Замечают температуру, при которой появилась муть, в дальнейшем превращающаяся в хлопьевидный осадок. Для проведения цветных реакций готовят мучную суспензию в соотношении 1:5 и разливают ее по 1-2 см в пробирки.

Контрольные вопросы

- 1) Что такое белки?
- 2) Каковы физиологические функции белков в живой клетке?
- 3) Как устроена белковая молекула?
- 4) Какие виды связей обнаружены в белковых молекулах?
- 5) Какие виды пространственной организации белковой молекулы вы знаете?
- 6) Какими физико-химическими свойствами обладают белки?
- 7) По каким критериям проводят классификацию белков?

- 8) Как можно обнаружить наличие белка в неизвестном объекте?
- 9) Третичная структура белка образуется благодаря взаимодействию радикалов аминокислоты:
а) валина; б) лейцина; в) изолейцина; г) цистеина.
- 10) Какие функции выполняют белки в клетке?
А. Каталитическая. Б. Хранение и передача генетической информации. В. Структурная.
Г. Энергетическая. Д. Двигательная. Е. Транспортная.
- 11) Выберите термин, который не подходит к данному контексту:
а) альбумины; б) коллаген; в) кератин;
г) глюкоза; д) глобины.

III. Ферменты, коферменты и витамины

Лабораторная работа №6

Определение активности фермента сахаразы

Задачи лабораторной работы

1. Определить содержание инвертного сахара в исследуемом материале.
2. Определить активность сахаразы в вине.
3. Обобщить и закрепить знания студентов о ферментах.

Ферменты или энзимы - это белки, которые катализируют химические реакции, происходящие в живых системах. Ферменты широко используют в пищевой промышленности. Для рационального применения важно знать их структуру и свойства.

В зависимости от характера катализируемой реакции ферменты делятся на 6 классов (см. табл. 2).

Таблица 2. Классы ферментов и типы катализируемых ими реакций

Класс ферментов	Тип реакции
1	2
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные процессы, лежащие в основе биологического окисления
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов с одной молекулы на другую
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление химических связей с образованием в молекуле двойных связей или негидролитическое расщепление двойных связей в результате присоединения различных групп по месту её разрыва
Изомеразы	Взаимопревращения различных изомеров (цис-транс изомеризация, перемещение двойных связей и фосфатных групп по углеродной цепи)
Лигазы (синтетазы)	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений с использованием энергии распада аденозинтрифосфорной кислоты

В природе существуют как простые (однокомпонентные), так и сложные (двухкомпонентные) ферменты. Двухкомпонентные ферменты (*холоферменты*) состоят из белковой (*апофермент*) и небелковой части (*кофактор*). Большинство гидролитических ферментов относятся к простым белкам, а ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные и другие процессы, обычно принадлежат к числу сложных белков (оксидоредуктазы, трансферазы, лиазы, изомеразы, лигазы).

В зависимости от прочности связи с апоферментом, кофакторы классифицируются на коферменты (легко отделяющиеся от белковой части фермента) и простетические группы (не отделяющиеся). Соединение

белковой и небелковой части ферментов осуществляется при помощи ковалентных, водородных или ионных связей.

Кофакторы обладают следующими качествами:

- 1) участвуют в катализе;
- 2) участвуют в формировании связи между ферментом и субстратом;
- 3) стабилизируют апофермент;
- 4) не отвечают за специфичность и тип реакции;
- 5) молекулярный вес у них сравнительно невелик, и они термостабильны;

По химическому составу кофакторы делят на 4 группы:

- 1) производные нуклеотидов (NAD, NADP);
- 2) производные витаминов (тиаминпирофосфат, FAD, CoA и др.);
- 3) металлы и их производные (Fe, Zn, Cu, Mo);
- 4) другие структуры (глутатион).

Часть фермента, в которой непосредственно происходит катализ, называется *активным центром* фермента. У монокомпонентных ферментов активный центр представляет собой совокупность радикалов определенных аминокислот. У двухкомпонентных ферментов (см. рис. 29) в активный центр входит и кофактор.

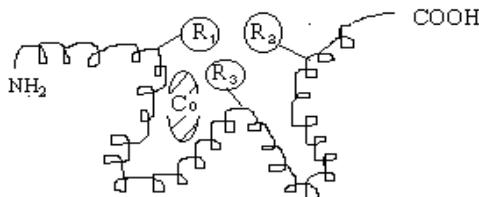


Рис. 29. Активный центр двухкомпонентного фермента: R_1 , R_2 , R_3 -радикалы аминокислот, Co-кофактор

Вещество, на которое действует фермент, называется *субстратом*. Во всех ферментативных реакциях молекула субстрата входит в активный центр фермента и образует с ним промежуточное соединение (фермент – субстратный комплекс), которое нестабильно и распадается с образованием свободного фермента и продуктов реакции. Структура активного центра фермента (E) соответствует, как замок ключу, (см. рис. 30) структуре субстрата (S).

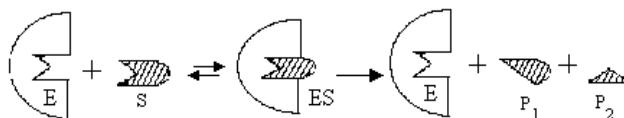


Рис. 30. Взаимодействие фермента с субстратом и образование продуктов реакции P_1 и P_2

Значение анализа. В природе широко распространены *карбогидразы* (*гликозидазы*) – ферменты, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов, приводя к появлению двух более мелких молекул углеводов (см. рис. 31). Эти ферменты встречаются в клетках почти всех живых организмов. К гликозидазам относится фермент β -фруктозидаза, который расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу, действуя на β -фруктофуранозидную связь в сахарозе. Этот фермент имеет и второе название – *инвертаза*, – так как катализирует инверсию сахарозы.

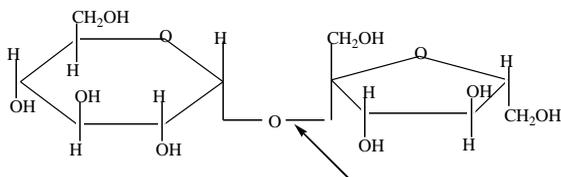


Рис. 31. Место действия инвертазы

Инвертаза широко распространена в растениях, содержится в дрожжах, плесневых грибах и бактериях, а также в винограде, сусле и вине. Вместе с мальтазой инвертаза играет важную роль в пищевой промышленности. Эти ферменты имеют большое значение для хлебопекарного и бродильного производств: катализируя гидролиз сахарозы и мальтозы, они подготавливают их для сбраживания.

Дрожжи с низкой инвертазной активностью малопригодны для хлебопекарного и бродильного производств. Поэтому изучение активности этих ферментов весьма важно.

Принцип метода. Активность инвертазы определяется по количеству инвертного сахара, образовавшегося при гидролизе определенного количества сахарозы под действием инвертазы при температуре 25°C в течение 24 часов. Количество инвертного сахара определяют по методу Бертрана.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Две конические колбы на 100 см^3 .
- 2) Две мерные колбы на 200 см^3 .
- 3) Мерные цилиндры на 25 см^3 .
- 4) Воронка Шотта №3.

- 5) Одна колба Бунзена на 500 см³.
- 6) Пипетка на 10 см³.
- 7) Сахароза – 10%-ный раствор.
- 8) Ацетатный буфер с pH = 4.7.
- 9) Реактив Фелинга №1.
- 10) Реактив Фелинга №2.
- 11) Железоаммонийные квасцы.
- 12) 0.05 н раствор KMnO₄.
- 13) Пробы первичного сырья (вино, сок).

Ход эксперимента

Пробы по 10 см³ вина или сока (сусла) вносят в две конические колбы на 100 см³. Содержимое одной колбы кипятят в течение 3 мин для инактивации фермента. Оно является контрольным. После этого во все колбы доливают по 5 см³ 10 %-ного раствора сахарозы, по 10 см³ ацетатного буфера. Колбы с содержимым плотно закрывают пробками и оставляют на 24 ч при температуре 25°C (в термостате). По истечении этого срока колбы вынимают и содержимое их (кроме контрольной) кипятят 3 мин. для инактивации фермента. Затем содержимое всех колб переносят в мерные колбы на 200 см³ (количественно), доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. Из каждой колбы цилиндром берут по 10 см³ раствора, переносят его в конические колбы на 100 см³ и определяют в них редуцирующие сахара по методу Бертрана.

В каждую подготовленную пробу добавляют мензурками по 10 см³ растворов реактивов Фелинга №1 и №2. Колбы нагревают до кипения и кипятят 3 мин. При этом инвертный сахар реагирует с реактивом Фелинга с образованием окиси меди – Cu₂O. При

смешивании реактивов Фелинга №1 и №2 и последующем нагревании происходят следующие реакции (см. рис. 32):

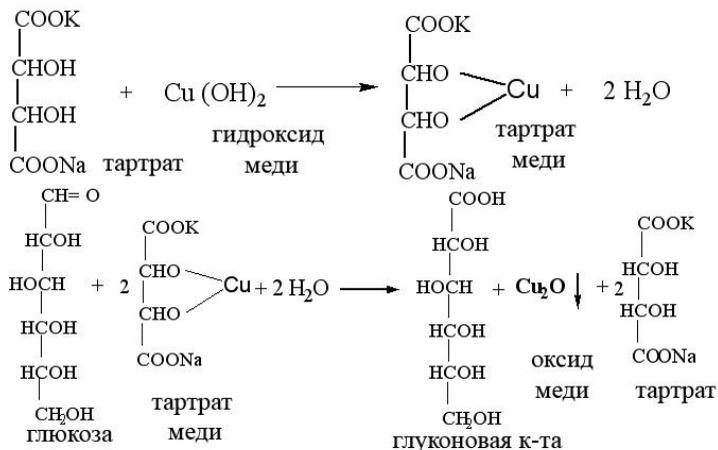
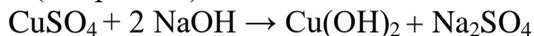


Рис. 32. Реакция глюкозы с тартратом меди и образование оксида меди красного цвета

Так как реактив Фелинга является щелочным реактивом, то в его присутствии фруктоза может превратиться в альдозу (глюкозу или маннозу), которые реагируют с реактивом Фелинга (см. рис. 33).

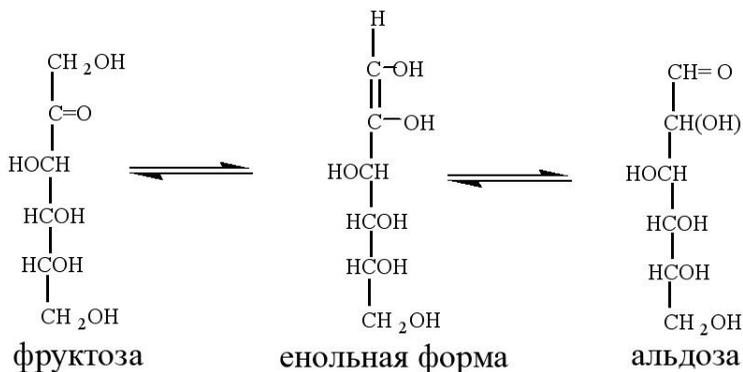


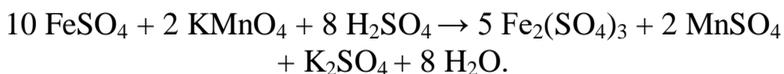
Рис. 33. Превращение фруктозы в альдозу (глюкозу или маннозу) в присутствии реактива Фелинга

Для определения количества закиси меди поступают следующим образом. К колбе Бунзена присоединяют воронку Шотта, в которую помещают волокнистый асбест слоем примерно в 0.5 см. Подключают вакуумный насос. Содержимое первой колбы после остывания до 50-60°С переносят в воронку Шотта, фильтруют и промывают, наблюдая, чтобы осадок закиси меди постоянно находился под слоем жидкости во избежание контакта с кислородом воздуха. В колбу немедленно добавляют 20-30 см³ теплой дистиллированной воды, которую используют для промывания осадка, соблюдая те же предосторожности. После 5-6-кратного промывания колбы и осадка насос отключают, а осадок оставляют на воронке под слоем 4-5 мм воды. В ту же колбу Эрленмейера вливают мензуркой 10 см³ железоаммонийных квасцов и содержимое взбалтывают для растворения частичек осадка закиси меди, приставших к стенке колбы. Из воронки отсасывают остатки воды и быстро присоединяют воронку к другой чистой колбе Бунзена.

После этого в воронку с осадком переливают из колбы раствор железоаммонийных квасцов. Полученную кашицу из раствора, осадка и волокнистого асбеста тщательно перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения осадка закиси меди (полного исчезновения красных и черных точек). Происходит следующая реакция:



Затем подключают вакуумный насос и раствор отсасывают. Колбу и воронку 5-6 раз промывают теплой водой до исчезновения в каплях фильтрата кислой реакции (по лакмусу или универсальному индикатору). Воронку снимают и переносят на первую колбу Бунзена, предварительно вылив её содержимое. Фильтрат во второй колбе Бунзена титруют 0.05 н раствором марганцевокислого калия до появления розового окрашивания от добавления одной избыточной его капли.



Так же поступают и с рабочей пробой.

В соответствии с приведенными уравнениями реакций, 1 см³ 0.05 н раствора KMnO₄ эквивалентен 3.18 мг меди.

Количество инвертного сахара в мг определяют по таблице Бертрана (см. прил. 2), показывающей, какому количеству инвертного сахара соответствует то или иное количество меди.

Активность сахаразы A_c можно выразить в «ферментных единицах» на 1 дм³ вина (сусла). Для этого найденное по таблице Бертрана количество инвертного сахара (см. прил. 2) пересчитывают на содержание его во всем объеме мерной колбы (200 см³)

и, умножив на 0.95, определяют количество сахарозы (в мг), подвергшейся гидролизу. Подставляя это значение в расчетную формулу, находят активность инвертазы.

$$A_c = \frac{P \times 1000 \times 1000}{342 \times t \times v},$$

где: **P** – масса сахарозы, подвергшейся инверсии, мг;

342 – молекулярная масса сахарозы;

t – время инверсии;

V – объем вина (сусла), см³;

1000 – мкг;

1000 – вычисление на 1 дм³.

Так как не всегда имеется возможность проводить ферментацию точно 24 ч, необходимо отмечать время начала и время окончания ферментации с точностью до 5 мин, подставляя затем в формулу найденное число минут.

Контрольные вопросы

- 1) Что представляют собой ферменты?
- 2) В чем заключается каталитическая функция ферментов?
- 3) Из чего состоят ферменты?
- 4) Что представляют собой углеводы, на какие классы они делятся?
- 5) Каковы функции углеводов в живой клетке?
- 6) На какие классы делятся моносахариды? Какие функциональные группы они содержат?
- 7) На какие классы делятся дисахариды? Что лежит в основе этой классификации?
- 8) На проявлении каких свойств основан метод количественного анализа сахаров по Бертрану?

- 9) Что такое инверсия? Под влиянием чего она может происходить?
- 10) Что называют инвертным сахаром?
- 11) Охарактеризуйте фермент сахаразу.
- 12) Опишите методику определения активности сахаразы.
- 13) Обоснуйте расчетную формулу для определения активности сахаразы.
- 14) Какие правила безопасности следует соблюдать при определении активности сахаразы?

Лабораторная работа №7

Определение активности фермента полифенолоксидаза

Задачи лабораторной работы

1. Освоить методику определения активности полифенолоксидазы в растительном материале.
2. Обобщить и закрепить знания студентов о классе оксидоредуктаз.
3. Углубить и расширить представления студентов о анаэробных дегидрогеназах и их биологической значимости.

Оксидоредуктазы – самый важный класс ферментов для пищевой промышленности, катализирующих окислительно – восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Так как биологическое окисление в основном протекает путём дегидрирования, то и ферменты, катализирующие эти процессы, получили название дегидрогеназ (см. рис. 34).

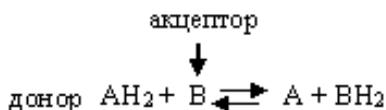
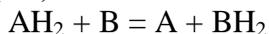


Рис. 34. Катализ окислительно-восстановительных реакций

Дегидрогеназы делятся на 2 группы:

1) Анаэробные дегидрогеназы $\text{V} \neq \text{O}_2$, которые переносят водород с окисляемого субстрата на другой (но не на кислород).



2) Аэробные дегидрогеназы $\text{V} = \text{O}_2$, которые переносят водород с окисляемого субстрата на другой субстрат или на кислород воздуха.



Аэробные дегидрогеназы, для которых акцептором водорода может служить только кислород воздуха, получили название оксидаз.

Одним из ферментов, относящихся к группе оксидаз, является полифенолоксидаза, содержащаяся в грибах и высших растениях, в том числе и в винограде, фруктах. Полифенолоксидаза – это содержащий медь (0,2 – 0,3%) белок с различной молекулярной массой (например, 34500 – в грибах, 144 тыс. – в чайном листе). Этот фермент катализирует реакцию окисления моно- и полифенолов с образованием соответствующих хинонов, причём акцептором водорода служит молекулярный кислород (см. рис. 35).

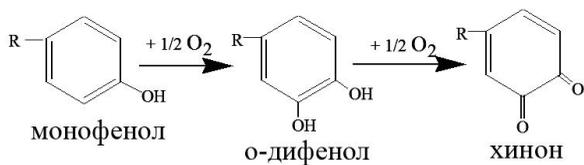


Рис. 35. Окисление моно- и полифенолов

Полифенолоксидаза окисляет дубильные вещества чайного листа, обуславливает цвет ржаного хлеба. Её действием объясняется почернение плодов и овощей при сушке.

У животных и человека, окисляя аминокислоту тирозин, полифенолоксидаза участвует в образовании меланинов – пигментов кожи, волос, радужной оболочки глаза.

Полифенолоксидаза играет большую роль в дыхании растений. Согласно теории В.Палладина, система полифенол-хинон является промежуточным звеном при окислении различных органических соединений в процессе дыхания растений (см. рис. 36).

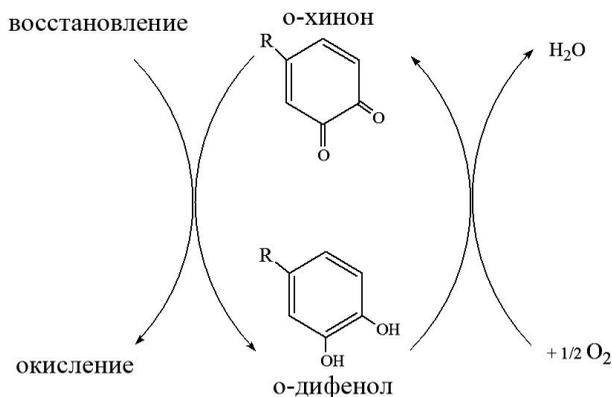


Рис. 36. Участие полифенолоксидазы в процессе дыхания

Таким образом, небольшое количество полифенола и соответствующего хинона может быть многократно подвергнуто переменному окислению и восстановлению.

Значение анализа. Система полифенолоксидазы, полифенолов и соответствующих хинонов может окислять аскорбиновую кислоту в пищевом сырье. Это обстоятельство следует учитывать при переработке плодов, овощей и винограда, содержащих аскорбиновую кислоту. Для инактивации полифенолоксидазы и избежания образования хинонов их следует во многих случаях подвергать бланшированию (краткосрочной термической обработке) или обработать диоксидом серы (SO_2). В пищевой промышленности диоксид серы используется как консервант и обозначается на упаковке под кодом E220. Использование сульфитов в пищевой промышленности достаточно распространено; они добавляются во фруктовые соки и вина, сухофрукты, жареный картофель, маринованные продукты и т.д.

Принцип метода. Метод определения полифенолоксидазы основан на способности её окислять пирокатехин до ортохинона. Последний окисляет аскорбиновую кислоту (см. рис. 37). При этом методе определяют активность полифенолоксидазы только в первые две минуты действия на субстрат.

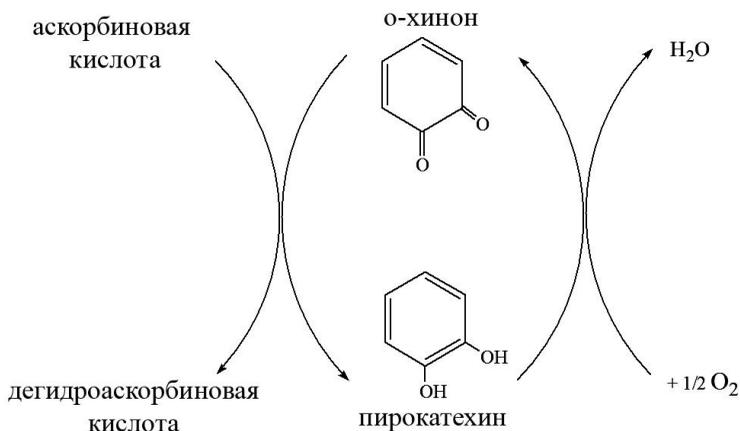


Рис. 37. Окисление аскорбиновой кислоты

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Две конические колбы на 100 см³.
- 2) Ступка с пестиком.
- 3) Химическая воронка.
- 4) Мерная колба на 50 см³.
- 5) Пипетки Мора на 5 см³ и 10 см³.
- 6) Четыре градуированные пипетки на 2 или 5 см³.
- 7) Субстрат: аскорбиновая кислота.
- 8) 0.02 н раствор пирокатехина (2.2 г в литре).
- 9) 10 %-ный раствор фосфорной кислоты (орто- или мета-).
- 10) 0.02 н раствор йода.
- 11) 1 %-ный раствор крахмала.
- 12) Буферная смесь.
- 13) Растительный материал (яблоки, картофель, виноград).
- 14) Технические весы.

Ход эксперимента

Вытяжку фермента из растительного материала готовят следующим образом: на технических весах взвешивают (с точностью по 0,01 г) 5 г растительного материала. Навеску переносят в фарфоровую ступку и тщательно растирают.

Затем содержимое ступки количественно переносят на тканевый фильтр, отфильтровывают в мерную колбу на 50 см³, три раза промывают небольшими порциями воды и доводят до метки. Содержимое колбы взбалтывают. В две колбы отмеривают по 5 см³ фильтрата и в каждую колбу добавляют по 10 см³ воды. Одну колбу нагревают до кипения и кипятят 2 мин для инактивации фермента (контроль). Затем содержимое контрольной и опытной колб, а также добавляемых реактивов, доводят до 25°C. В каждую из них добавляют по 5 см³ буферной смеси с рН 6,8, по 2 см³ раствора пирокатехина и в той же последовательности по 5 см³ раствора аскорбиновой кислоты. Колбы встряхивают в течении 2 мин. с момента прибавления аскорбиновой кислоты в последнюю колбу. Затем в той же последовательности, что и аскорбиновую кислоту, в каждую колбу добавляют по 1 см³ фосфорной кислоты и титруют йодом в присутствии крахмала.

Так как 1 см³ 0,02 н йода эквивалентен 1,76 мг, т.е. 10 микромолям аскорбиновой кислоты, то активность полифенолоксидазы, отнесенная к 1 г растительного сырья, выражая в «ферментных единицах», вычисляют по формуле:

$$A_{PFO} = \frac{(V_c - V_1) \times 10 \times 10}{5 \times 2} = (V_c - V_1) \times 10,$$

где: V_c – объем 0,02 н раствора йода, см^3 , пошедшего на титрование 5 см^3 контрольного раствора;
 V_1 – объем 0,02 н раствора йода, см^3 , пошедшего на титрование 5 см^3 рабочего раствора;
10 – количество аскорбиновой кислоты, мкм;
10 – степень растворимости пробы;
5 – объем фильтрата, см^3 ;
2 – продолжительность действия фермента, мин.

Контрольные вопросы

- 1) Дайте характеристику оксидоредуктазам.
- 2) Охарактеризуйте фермент полифенолоксидазу.
- 3) Может ли полифенолоксидаза окислять аскорбиновую кислоту при отсутствии полифенолов?
- 4) Опишите метод определения активности полифенолоксидазы и его химизм.
- 5) Почему в качестве субстрата используется аскорбиновая кислота, а не полифенолы.
- 6) Обоснуйте расчетную формулу для определения активности полифенолоксидазы.
- 7) Какие правила безопасности следует соблюдать при определении активности полифенолоксидазы?
- 8) Оксидоредуктазы катализируют:
 - а) гидролитический распад химических связей;
 - б) негидролитический распад химических связей;
 - в) образование новых химических связей;
 - г) реакции изомеризации;
 - д) окислительно-восстановительные реакции.

Лабораторная работа №8

Количественное определение восстановленного глутатиона

Задачи лабораторной работы

1. Освоить методику определения содержания глутатиона в растительном сырье.
2. Определение качества дрожжей.
3. Обобщить и закрепить знания студентов о изменениях, происходящих в углеводном и белковом комплексах зерна при прорастании.

Общая характеристика глутатиона.

Глутатион – трипептид, построенный из остатков трех аминокислот: глутаминовой кислоты, цистеина и глицина (см. рис. 38).

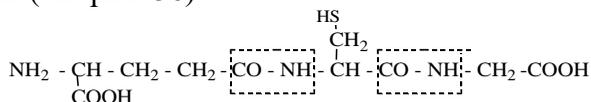


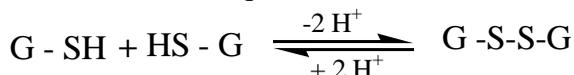
Рис. 38. Структурная формула восстановленного глутатиона

Глутатион чрезвычайно широко распространен в природе, он содержится во всех живых клетках, но не накапливается в больших количествах. Повышенное содержание глутатиона обнаружено в зародыше пшеничного зерна и в дрожжах, особенно старых.

Благодаря наличию сульфгидрильной группы, глутатион может существовать в двух формах: восстановленной (G-SH) и окисленной (G-S-S-G), состоящий из двух молекул восстановленного глутатиона, соединенных дисульфидной (-S-S-) связью, которая образовалась в результате отнятия от каждой

SH-группы по одному водороду. Восстановление окисленного глутатиона происходит за счет источников водорода, вырабатываемых в процессе обмена веществ в организме.

Обе эти формы легко превращаются одна в другую в соответствии с реакцией



Глутатион – сильный внутриклеточный восстановитель и его основная функция состоит в том, чтобы защитить SH-группы белков от окисления и тем самым сохранить биологическую функцию белков. Глутатион выполняет специфическую роль при восстановлении пероксида водорода и аскорбиновой кислоты, служит небелковой группой отдельных ферментов, играет определенную роль в транспорте аминокислот через мембрану клеток.

Взаимопревращения окисленной и восстановленной форм глутатиона в организме происходят в присутствии дегидроаскорбиновой кислоты и катализируются ферментом глутатионредуктаза.

Благодаря способности подвергаться ферментативному окислению и восстановлению, глутатион играет в регулировании окислительно-восстановительных процессов в протоплазме роль переносчика водорода.

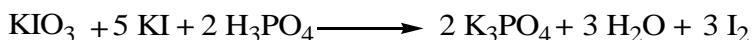
Целый ряд протеолитических ферментов растительного происхождения, в активном центре которых находится SH-группа (*тиоловые ферменты*), активируются восстановленным глутатионом. Активирующее действие глутатиона связано с тем, что он является восстановителем и очень легко окисляется.

Значение анализа. Глутатион может выступать в качестве кофермента при действии катепсинов, папаина и других протеолитических ферментов. Активизирующиеся протеолитические ферменты проросшего зерна гидролизуют белки с образованием полипептидов и аминокислот. В результате повышается растворимость белков в воде, снижается содержание собственно белков и, соответственно, увеличивается количество небелковых азотистых соединений и свободных аминокислот. Этими особенностями и определяется изменение технологических и, в первую очередь, хлебопекарных свойств зерна. Клейковина пшеницы теряет упругость, становится слабой, липкой, а затем полностью разрушается. Изменение свойств клейковины при прорастании влечет за собой изменение свойств теста.

Таким образом, содержание восстановленного глутатиона резко повышается в процессе прорастания зерна и старения дрожжей. Так, на четвертый день прорастания ячменя содержание глутатиона повышается в 2,5 раза. Одной из наиболее характерных особенностей прорастающего зерна является повышение содержания глутатиона, которое часто обнаруживается еще до появления внешних признаков прорастания.

В хлебопечении для предотвращения разрушения клейковины восстановленный глутатион окисляется дегидроаскорбиновой кислотой.

Принцип метода. Определение глутатиона основано на окислении SH-групп йодноватокислым калием (калий йодат), но при этом могут окисляться и другие соединения:





Добавляя определенное количество йода, окисляют им восстановительный глутатион, а избыток йода определяют титрованием. Для получения устойчивых растворов йода применяют йодноватокислый калий и титрование ведут в присутствии K_1 (калий йодид) в кислой среде.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Испытуемый материал – дрожжи.
- 2) Метафосфорная кислота 5%-ная.
- 3) Раствор йодистого калия (калий йодид) 1,5%-ный.
- 4) Раствор крахмала 1%-ный.
- 5) Раствор 0,001 н йодноватокислого калия KIO_3 (калий йодат).
- 6) Фарфоровая ступка.
- 7) Микробюретка или бюретка на 10 см^3 .
- 8) Конические колбы на 100 см^3 .
- 9) Мерная колба на 50 см^3 .
- 10) Пипетки на 1, 5, 10 см^3 .
- 11) Бумажные складчатые фильтры.

Ход эксперимента

Навеску дрожжей в 2 г растирают в фарфоровой ступке с 5 см^3 5%-ного раствора метафосфорной кислоты. Растертую массу переносят в колбу и водой доводят объем до 50 см^3 . После 5-минутного настаивания содержимое колбы взбалтывают в течение 2-3 минут и фильтруют через складчатый фильтр. Для определения глутатиона берут 5 см^3 фильтрата, добавляют 1 см^3 1,5%-ного раствора йодистого калия и

5 капель 1%-ного раствора крахмала и проводят титрование из микробюретки с помощью 0,001 н раствора КЮ₃ до появления синего окрашивания.

Содержимое глутатиона выражают в мг или % на воздушно сухое вещество испытуемого материала по формуле:

$$X = \frac{A \times 0.307 \times C \times 100 \times 1000}{P \times b \times 1000},$$

где **X** – количество глутатиона, мг;

0,307 – коэффициент пересчета на глутатион, так как 1 см³ раствора КЮ₃ эквивалентен 0,307 мг восстановленного глутатиона;

P – навеска дрожжей, г;

C – конечный объем дрожжевой суспензии, см³;

b – количество см³ фильтрата, взятого на титрование;

100 – пересчет на 100 г продукта;

1000 – пересчет г в мг;

A – количество 0,001 н раствора КЮ₃, пошедшего на титрование, см³.

Контрольные вопросы и тесты

- 1) Расскажите о строении глутатиона и его участии в обмене веществ.
- 2) Каков принцип метода определения содержания глутатиона.
- 3) Какое практическое значение имеет анализ восстановленного глутатиона.
- 4) Какие ферменты активированы восстановленным глутатионом? Опишите механизм этого процесса.
- 5) Ферменты:

а) это биологические катализаторы; б) синтезируются на рибосоме; в) состоят из белка; г) состоят из белка и витамина; д) состоят из белка и железа.

б) Ферменты:

а) простые; б) сложные; в) изменяются в химических реакциях; г) специфичные; д) универсальные.

7) NADPH⁺:

а) кофактор; б) фенол; в) структурный белок; г) гексоза.

8) Часть фермента, в которой непосредственно происходит катализ:

а) аллостерический центр; б) активный центр;

в) кофактор.

9) Кофакторы:

а) производные нуклеотидов; б) производные витаминов; в) углеводы; г) металлы; д) жирные кислоты.

Лабораторная работа №9

Качественные реакции на витамины

Задачи лабораторной работы

1. Проведение качественных реакций на водорастворимые витамины.
2. Проведение качественных реакций на жирорастворимые витамины.
3. Углубить и расширить представления студентов о структуре, функциях витаминов и их биологической значимости для живых организмов.

Витамины – это незаменимые пищевые факторы, которые обеспечивают адекватную скорость протекания биохимических и физиологических процессов. Подавляющее большинство витаминов не синтезируется

в организме человека и животных. Поэтому основным их источником является пища. Так, при недостаточном поступлении витаминов в организм или при нарушениях их всасывания развивается авитаминоз. Многие расстройства обмена веществ при авитаминозах обусловлены нарушениями деятельности или активности ферментных систем, поскольку многие витамины входят в состав коферментов или простетических групп.

Классификация витаминов. По мере открытия отдельных витаминов их обозначали буквами латинского алфавита и называли в зависимости от их биологического действия. Например, витамин Е – токоферол (от латинского *токос* – деторождение, *ферро* – несущий). Наряду с буквенной классификацией применяется классификация витаминов, разделяющих их на две группы по признаку растворимости в воде или в жирах.

Витамины, растворимые в воде

Витамин В₁ (тиамин); Витамин В₂ (рибофлавин)

Витамин В₃ (пантотеновая кислота)

Витамин В₅ (никотинамид, никотиновая кислота)

Витамин В₆ (пиридоксин, пиридоксамин, пиридоксаль)

Витамин В₁₂ (цианкобальтамин); Витамин В₁₅

(пангамовая кислота)

Витамин В_с (фолиевая кислота)

Витамин С (аскорбиновая кислота); Витамин Н (биотин)

Витамины, растворимые в жирах

Витамин А (ретинол)

Витамин Д (эргокальциферол, холекальциферол)

Витамин Е (α - токоферол, β - токоферол, γ - токоферол)

Витамин К (филлохинон, менахинон)

Коферментная функция витаминов. В начале 20 века при изучении процессов окислительного

распада углеводов исследователям впервые удалось выделить в кристаллическом состоянии кофермент *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу*. Было установлено, что в его состав входит никотинамид. Впоследствии оказалось, что амид никотиновой кислоты является компонентом коферментов ряда ферментативных систем, участвующих во многих окислительно-восстановительных реакциях организма. Позднее был открыт ряд коферментов, содержащих в своем составе те или иные витамины. Анализ структуры коферментов позволил выделить в них два функциональных участка, один из которых отвечает за связь с апоферментом, а другой принимает непосредственное участие в каталитическом акте. Как правило, активная форма витаминов принимает участие именно в катализе. Подавляющее число витаминов, входящих в состав коферментов, растворимы в воде (см. приложение 3).

Краткая характеристика некоторых витаминов. *Витамин В₁ (тиамин)* был открыт К. Фуком в 1912 г. Он достаточно широко распространен как в растительных, так и в микробных клетках. Особенно много тиамин в зерновых культурах и дрожжах. В основе формулы витамина В₁ находятся тиазол и пиримидин, соединенные друг с другом метиленовой группой. Биохимическая функция витамина В₁ определяется его участием в окислительно-восстановительном катализе. Коферментная форма витамина В₁ (тиаминпирофосфат), связанная с соответствующими апоферментами, образует тиаминовые ферменты, участвующие в углеводном обмене. Недостаток тиамин в организме приводит к нарушениям водного обмена, функций кроветворения, а

также к патологии нервной, сердечно-сосудистой и пищеварительной систем.

Витамин В₂ (рибофлавин) впервые был выделен из молока и получен в кристаллическом состоянии Р. Куном в 1933 г. Витамин В₂ в значительных количествах находится в печени, молоке, яйцах, дрожжах и зерновых культурах. Рибофлавин состоит из изоаллоксазина и спирта рибитол. Активные формы витамина В₂ (флавиномононуклеотид и флавинадениндинуклеотид) являются коферментами около 30 ферментов. В составе ферментов они играют немаловажную роль в процессах тканевого дыхания, а также переноса электронов и протонов. Недостаток витамина В₂ приводит к приостановке роста организма и к мышечной слабости.

Витамин В₅ (РР) (никотинамид, никотиновая кислота) был открыт в 1937 г. Никотиновая кислота в отличие от никотинамида является его провитамином, т. е. предшественником, и в организме легко может превращаться в собственно витамин В₅. Никотинамид осуществляет биохимические функции в составе коферментов никотинамидадениндинуклеотида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата, которые являются составной частью окислительно-восстановительных ферментов – *дегидрогеназ*. Они катализируют более 100 биохимических реакций, к числу которых относятся реакции окисления спиртов в альдегиды и кетоны, альдегидов и кетонов в соответствующие карбоновые кислоты, аминов в имины с последующим образованием окиссоединений и др. Кроме того, активные формы витамина В₅ принимают участие в регулировании ряда жизненно важных биохимических процессов, например цикла Кребса.

Дефицит витамина В₅ приводит к развитию пеллагры, которая проявляется в виде различных дерматитов.

Витамин В₆ (пиридоксин, пиридоксамин, пиридоксаль) был открыт П. Дьерди в 1934 г. Спустя четыре года он был выделен в кристаллическом состоянии. Различают три индивидуальных вещества, обладающих свойствами витамина В₆. К ним относятся пиридоксамин, пиридоксаль и пиридоксин. Все три формы легко превращаются друг в друга, однако наибольшую биологическую значимость имеет фосфорилированная форма пиридоксаля. Основная функция витамина В₆ заключается в том, что он в составе различных ферментов принимает участие в метаболизме аминокислот. Его активная форма (пиридоксальфосфат) является коферментом более 50 ферментов аминокислотного обмена. Кроме того, витамин В₆ влияет на активность ряда ферментов углеводного и липидного обмена. Недостаток витамина В₆ в организме прежде всего приводит к возникновению кожных заболеваний и нарушению центральной нервной системы.

Витамин А (ретинол) был открыт в 1916 г. Н. Друммондом. Ретинол представляет собой непредельный одноатомный спирт, состоящий из β – иононового кольца, а также боковой цепи, содержащей два остатка изопрена и первичную спиртовую группу: Биохимическая основа действия витамина А связана с его влиянием на проницаемость клеточных мембран. Хорошо известно, что ретинол играет важную роль в фотохимических процессах зрения и является необходимым витамином для нормального эмбрионального развития.

Витамин А содержится только в животных продуктах, таких как печень, рыбий жир, сливочное

масло и др. В растительной пище содержатся только каротиноиды, которые под влиянием фермента каротиказы превращаются в витамин А. Недостаток витамина А прежде всего приводит к нарушению процесса зрения, одним из проявлений которого является снижение способности глаз к темновой адаптации.

Витамины группы D (эргокальциферол, холекальциферол). Витамин D₂ был получен в 1932 г. А. Виндаусом при облучении эргостерина, выделенного из дрожжей. Через четыре года из рыбьего жира было получено вещество, которое впоследствии было названо витамином D₃. При этом его предшественником являлся не эргостерин, а холестерин. Витамины группы D имеют сходное строение и свойства. Провитамины группы D широко распространены в природе. Особенно много их в печени рыб и животных. Другими продуктами, содержащими в большом количестве витамины D, являются сливочное масло, яйца и молоко. Основная биохимическая функция витаминов группы D обусловлена поддержанием физиологической концентрации кальция в крови. Несбалансированная по кальцию и фосфору пища, недостаток солнечного воздействия, а также дефицит витамина D в рационе питания приводят к замедлению процессов минерализации и нарушению костеобразования у детей (рахит). Авитаминоз у взрослых приводит к развитию остеопороза вследствие удаления кальция из костной ткани. Напротив, гипervитаминоз D приводит к избыточному отложению кальция на стенках сосудов, в почках и легких.

Витамины группы E (токоферолы) были открыты в 1922 г. Г. Эвансом и А. Бишом. Известно три витамина группы E, отличающихся по степени

метилования хроманового ядра и биологической активности: α – токоферол, β – токоферол, γ – токоферол. Наибольшей биологической активностью обладает α – токоферол: Витамины группы Е в большом количестве содержатся в растительных и животных маслах, пшенице, моркови, яйцах и молоке. Механизм действия витамина Е прежде всего связан с его антиоксидантными свойствами. Предотвращая процесс пероксидного окисления липидов, этот витамин поддерживает целостность биологических мембран, структурным компонентом которых он является. Кроме того, имеются данные об участии витамина Е в синтезе гема – простетической группы ряда гемопroteинов. Установлена связь между витамином Е и селеном. Повышение содержания селена в пище сокращает потребность организма в витамине Е. Дефицит витамина Е является причиной дегенерации спинного мозга и легочной дистрофии. Кроме того, недостаток токоферола приводит к нарушениям эмбриогенеза.

Витамины группы К (фитохинон, менахинон) были открыты в 1939 г. Витамины K_1 (фитохинон) и K_2 (менахинон) являются производными 2-метил-1,4-нафтохинона, в котором в третьем положении водород замещен на спирт фитол или на изопреноидную цепь. Витамин K_2 существует в нескольких формах, в зависимости от длины изопреноидной цепи. Кроме природных витаминов K_1 и K_2 , ряд активных производных нафтохинона получены методом химического синтеза. Так, викасол является искусственно синтезированным аналогом витамина K_1 . Он обладает биологической активностью последнего. Витамин К является одним из составляющих системы регулирования свертывания крови. Количества витамина К, поступающего с пищей и синтезируемого

микрофлорой кишечника, достаточно для предотвращения авитаминоза у здорового человека. Дефицит витамина К наблюдается при нарушении всасывания жиров в кишечнике, а также при заболеваниях печени и желчного пузыря.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Диазореактив (5 капель 1% - ного раствора сульфаниловой кислоты в 2% - ном растворе HCl + 5 капель раствора NaNO₂).
- 2) Na₂CO₃ (10% - ный раствор).
- 3) Концентрированная HCl.
- 4) Цинковая пыль.
- 5) Концентрированная CH₃COOH.
- 6) Cu(CH₃COO)₂ (2% - ный раствор).
- 7) FeCl₃ (1% - ный раствор).
- 8) Пробирки.
- 9) Пипетки.
- 10) Водяная баня.
- 11) Растворы витаминов В₁, В₂, В₅, В₆.
- 12) Концентрированная H₂SO₄.
- 13) Анилиновый реактив (анилин в концентрированной HCl (15:1)).
- 14) Концентрированная HNO₃.
- 15) Цистеин(0,025% - ный раствор).
- 16) NaOH (10% - ный раствор).
- 17) Витамин А (масляный раствор в хлороформе в соотношении 1:5).
- 18) Викасол (0,05% - ный раствор).

Качественные реакции на водорастворимые витамины

Опыт 1. Реакция на витамин В₁

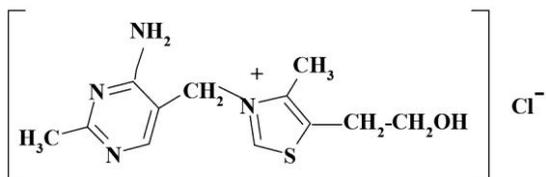


Рис. 39. Реакция на витамин В₁

Витамин В₁ дает красное или оранжевое окрашивание раствора при взаимодействии с диазореактивом в щелочной среде вследствие образования сложного комплексного соединения с диазобензо-сульфо кислотой.

Ход эксперимента. К 10 каплям диазореактива добавляют 2 - 4 капли витамина В₁ и 5 - 7 капель раствора К₂СО₃. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 2. Реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

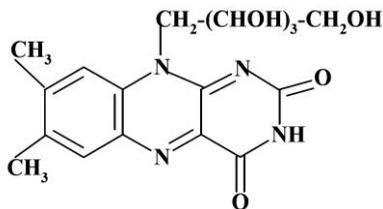


Рис. 40. Реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

Реакция на витамин В₂ основана на его способности легко восстанавливаться. Восстановление сопровождается первоначальным изменением желтой окраски раствора в розовую или красную с последующим обесцвечиванием.

Ход эксперимента. В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель НСl и немного цинковой пыли. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 3. Реакция на витамин В₅

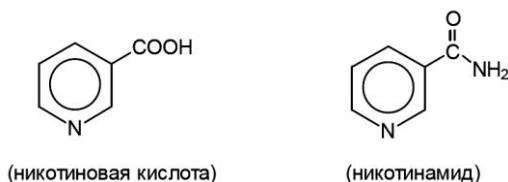


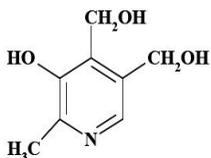
Рис. 41. Реакция на витамин В₅

Витамин В₅ при взаимодействии с $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в CH_3COOH дает синее окрашивание раствора в результате образования медной соли никотиновой кислоты.

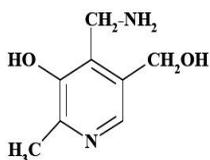
Ход эксперимента. В ампулу с 1% - ным раствором витамина В₅ добавляют 1 каплю концентрированной CH_3COOH , все перемешивают. Затем из ампулы в пробирку отмеряют 20 капель раствора и нагревают до кипения, при этом мутный раствор становится прозрачным. К нагретому раствору витамина В₅ добавляют 20 капель 2% - ного раствора $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и быстро охлаждают в токе холодной воды. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 4. Реакция на витамин В₆

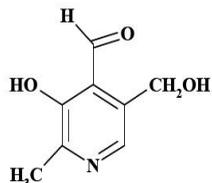
В₆ обладают производные пиридина:



(пиридоксин)



(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

Рис. 42. Реакция на витамин В₆

При взаимодействии витамина В₆ с раствором хлорида железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексной соли типа фенолята железа.

Ход эксперимента. К 5 каплям раствора витамина В₆ приливают равное количество раствора FeCl₃ и перемешивают. Наблюдают окрашивание раствора.

Качественные реакции на жирорастворимые витамины

Опыт 5. Реакция на витамин А

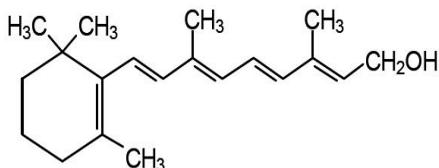


Рис. 43. Реакция на витамин А

При взаимодействии хлороформного раствора витамина А с концентрированной серной кислотой развивается красно-бурое окрашивание смеси в результате образования комплекса из нескольких молекул витамина А.

Ход эксперимента. На сухом стекле смешивают 6 капель раствора витамина А в хлороформе с одной каплей концентрированной H_2SO_4 . Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 6. Реакция на витамин D

Известно два сходных по строению и свойствам витамина группы D: витамин D_2 (эргокальциферол) и D_3 (холикальциферол).

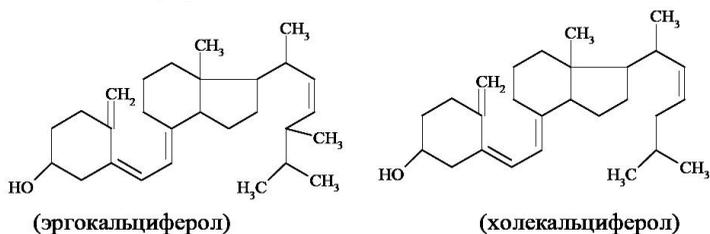


Рис. 44. Реакция на витамин D

При нагревании хлороформного раствора витамина D со смесью анилина и концентрированной соляной кислоты раствор окрашивается в красный цвет.

Ход эксперимента. В сухую пробирку к 1 - 2 каплям витамина D в хлороформе вносят 1 каплю анилинового раствора. После перемешивания и нагревания наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 7. Реакция на витамин Е

Известны три витамина группы Е, отличающихся по степени метилирования хроманового ядра и биологической активности: α -токоферол, β -токоферол, γ -токоферол. Наибольшей биологической активностью обладает α -токоферол.

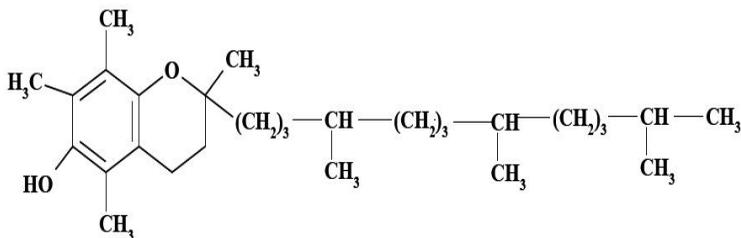


Рис. 45. Реакция на витамин Е

При взаимодействии витамина Е с азотной кислотой наблюдается желтое окрашивание раствора.

Ход эксперимента. В сухую пробирку вносят 3 капли раствора витамина Е, осторожно по стенке пробирки добавляют 6 капель концентрированной HNO_3 , пробирку слегка встряхивают. После расслаивания образующейся эмульсии наблюдают окрашивание верхнего маслянистого слоя продуктом окисления токоферола.

Опыт 8. Реакция на витамин К

Известны два природных витамина группы К: витамин K_1 (филлохинон) и K_2 (менахинон).

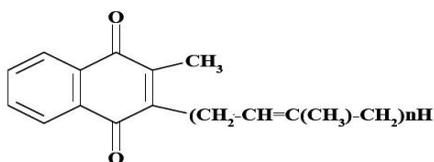
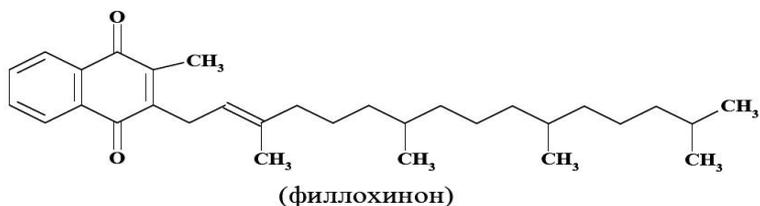


Рис. 46. Реакция на витамин К

Кроме природных витаминов К₁ и К₂, ряд активных производных нафтохинона получены методом химического синтеза. Так, викасол (см. рис. 47) является искусственно синтезированным аналогом витамина К₁.

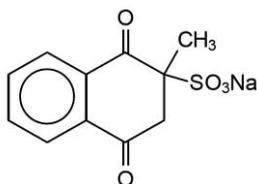


Рис. 47. Викасол

Он обладает биологической активностью последнего.

При взаимодействии викасола со щелочным раствором цистеина появляется лимонно-желтое окрашивание раствора.

Ход эксперимента. В пробирку помещают 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора

цистеина и 1 каплю 10%-ного раствора NaOH. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Контрольные вопросы

1) Заполнить таблицу

№	Название витамина	Название коферментной формы	Тип катализируемой реакции	Примеры ферментов
1				

2) Микрофлора кишечника синтезирует витамин:

а) К; б) Е; в) Н; г) С.

3) Витамин D содержится в:

а) рыбьем жире; б) лесных ягодах; в) яичном желтке; г) смородине; д) молоке.

4) Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) В₁; б) В₂; в) С; г) Н; д) К.

5) Витамины выполняют функции:

а) каталитические; б) структурные; в) энергетические; г) транспортные; д) защитные.

б) Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) А; б) D; в) В₁₂; г) Е; д) К.

Лабораторная работа №10

Количественный метод определения витамина С

Задачи лабораторной работы

1. Научиться определять количество витамина С в пищевых продуктах методом титрования.
2. Освоить фотоколориметрический метод определения витамина С.
3. Определить содержание витамина С в исследуемом растительном материале.
4. Обобщить и закрепить знания студентов о химических свойствах и биологической значимости витамина С для живых организмов.

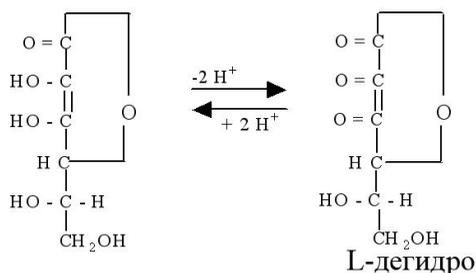
Краткая характеристика витамина С (аскорбиновой кислоты). Приступая к выполнению данной работы, следует изучить правила техники безопасности при работе с концентрированными растворами кислот.

Витамин С, или *аскорбиновая кислота* синтезируется растениями из галактозы и большинством животных из глюкозы, за исключением человека, приматов, морских свинок и некоторых других животных, которые получают её с пищей. Потребность человека в аскорбиновой кислоте 50-100 мг и более в сутки. Отсутствие или недостаток аскорбиновой кислоты в пище человека вызывает *цингу*. При этом заболевании наблюдается вялость, быстрая утомляемость, ослабление мышечного тонуса, боли в конечностях (особенно нижних), расшатывание и выпадение зубов; хрупкость кровеносных сосудов приводит к кровоточивости дёсен, кровоизлияниям в виде тёмно-красных пятен на коже.

Наиболее богаты аскорбиновой кислотой плоды киви, шиповника, красного перца, цитрусовых, чёрной смородины, лук, томаты, листовые овощи – салат и капуста.

Витамин С участвует в обмене ароматических аминокислот, пигментов и холестерина, в регулировании углеводного обмена, свёртываемости крови, регенерации тканей; повышает устойчивость организма к инфекциям, уменьшает сосудистую проницаемость, способствует накоплению в печени гликогена, обладает выраженными антиоксидантными свойствами.

Витамин С активно участвует в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в живой клетке. Такое участие обусловлено способностью аскорбиновой кислоты к обратимым взаимопревращениям, связанным с отщеплением или присоединением водорода (см. рис. 48).



L-аскорбиновая к-та аскорбиновая к-та

Рис. 48. Отщепление и присоединение водорода у аскорбиновой кислоты

В растениях семейства крестоцветных (капуста, редька, редиска и др.) наряду со свободной аскорбиновой кислотой содержится связанная форма, так называемый аскорбиноген (см. рис. 49).

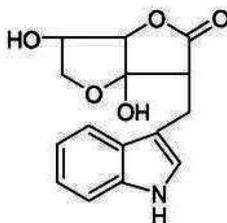


Рис. 53. Аскорбиноген

Это вещество в присутствии соляной кислоты легко гидролизуется с образованием свободной аскорбиновой кислоты. Гидролиз аскорбиногена происходит в пищеварительном тракте. По некоторым сведениям аскорбиноген присутствует и в других растениях.

Химические свойства аскорбиновой кислоты.

Хотя в молекуле аскорбиновой кислоты и отсутствует карбоксильная группа, она ведёт себя как типичная кислота, так как кислыми свойствами обладает энольный гидроксил при C₃. Поэтому с разбавленными щелочами аскорбиновая кислота образует соли (см. рис. 50).

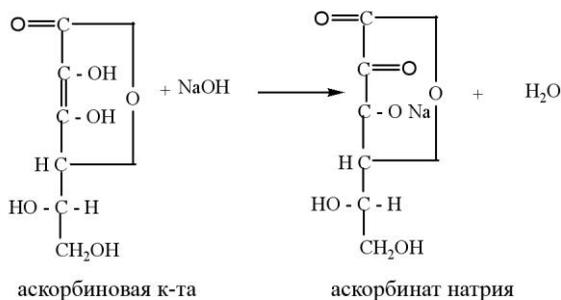


Рис. 50. Взаимодействие аскорбиновой кислоты с щелочью

Аскорбиновая кислота легко восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенол, йод и другие окислители (см. рис. 51).

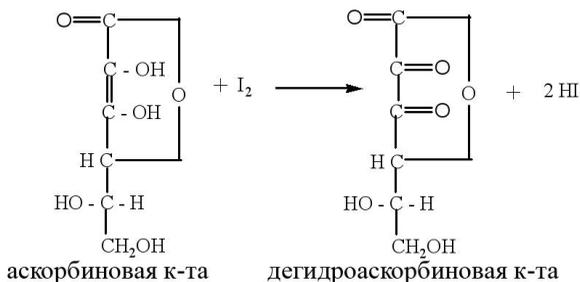


Рис. 51. Восстановление аскорбиновой кислоты йодом

В присутствии более сильных окислителей, особенно в нейтральной и щелочных средах, она разрушается с образованием щавелевой и треоновой кислот (рис. 52).

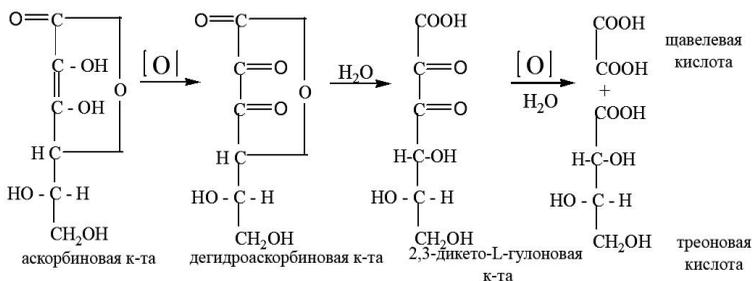


Рис. 52. Разрушение аскорбиновой кислоты в щелочной среде с образованием щавелевой и треоновой кислот

При варке пищи, а также при сушке и консервировании плодов и овощей, витамин С легко

разрушается. Его разрушение происходит в результате окисления, которое катализируется катионами тяжелых металлов и особенно сильно – ферментами класса оксидоредуктаз (аскорбатаоксидаза и полифенолоксидаза). Аскорбиновая кислота расходуется и при хранении пищевого сырья. Для определения её содержания в продуктах разработаны различные методы, один из которых и приводится ниже.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Фотоэлектроколориметр КФК-2.
- 2) Мерные колбы ёмкостью 100 см³.
- 3) Конические колбочки ёмкостью 50-100 см³.
- 4) Фарфоровая ступка.
- 5) Пипетки на 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 см³.
- 6) Технические весы.
- 7) Раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола.
- 8) Щавелевая кислота 1%-ная.
- 9) Кристаллы аскорбиновой кислоты.
- 10) Бумажный фильтр.
- 11) Пищевое сырье.

Опыт 1. Количественное определение аскорбиновой кислоты по методу Тильманса

Принцип метода. Метод основан на способности аскорбиновой кислоты окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолом до дегидроаскорбиновой кислоты. В щелочной среде 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет синюю окраску, в кислой - красную, а при восстановлении обесцвечивается.

Ход эксперимента. Взвешивают 1 г пищевых продуктов на технических весах. Навеску тщательно растирают в фарфоровой ступке с песком. К растертой массе прибавляют 9 мл 2 % раствора соляной кислоты. Через 10 минут содержимое перемешивают и фильтруют. Для количественного определения 3 мл фильтрата отмеряют в коническую колбу и титруют 0,0005 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, помещенным предварительно в бюретку, до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с. Отмеряют количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на титрование.

Расчет. Рассчитывают концентрацию аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г продукта), учитывая, что 1 мл 0,0005 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты. Сравнивают полученные данные с теоретическими по таблице (см. табл. 3).

**Таблица 3. Содержание витамина С
(в мг/100 г продукта)**

Наименование продукта	Количество аскорбиновой кислоты
Капуста белокачанная	30-40
Лук репчатый	2-10
Картофель лежалый	7-10
Яблоки: кислые	20-40
сладкие	5-17

Опыт 2. Фотоколориметрический метод определения аскорбиновой кислоты

Принцип метода. К исследуемому раствору аскорбиновой кислоты добавляют раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола и снижение интенсивности окраски последнего измеряют колориметрически.

Ход эксперимента. Навеску исследуемого продукта (5-10 г) заливают в фарфоровой ступке 1 %-ной щавелевой кислотой и растирают. Растительный материал переносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят объем экстракта до метки щавелевой кислотой. Содержимое колбы перемешивают и фильтруют через матерчатый фильтр в коническую колбу. В 10 см³ полученного фильтрата добавляют 6 см³ 2,6-дихлорфенолиндофенола. Раствор наливают в кюветы фотоэлектроколориметра и определяют оптическую плотность D_1 против дистиллированной воды при $\lambda = 540$ нм.

Для измерения окрашенности или мутности самого раствора в кюветы добавляют по одному кристаллику аскорбиновой кислоты (окраска индофенола пропадает), перемешивают и вновь измеряют оптическую плотность D_2 .

Искомую оптическую плотность исследуемого раствора находят из формулы:

$$D_x = D_1 - D_2.$$

По стандартной кривой находят содержание аскорбиновой кислоты, соответствующее D_x , и, учитывая фактор разведения, пересчитывают его на исходный продукт.

Для построения стандартной кривой 10 см³ раствора субстрата переносят в другую мерную колбу на 100 см³ и доводят щавелевой кислотой до метки

(концентрация аскорбиновой кислоты – 100 мкг/см^3). В шесть пробирок вместимостью 20 см^3 добавляют по 1 см^3 , 2 см^3 , 3 см^3 , 4 см^3 , 5 см^3 , 6 см^3 приготовленного раствора (что соответствует концентрации витамина С $16,6$; $33,2$; $50,0$; 100 мкг/см^3) и смешивают каждую с 10 см^3 свежеприготовленного забуферного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Измерив оптическую плотность образцов, строят кривую в координатах: оптическая плотность – содержание аскорбиновой кислоты, мкг/см^3 (см. рис. 53).

Пример:

$C, \text{ мкг/см}^3$	16.6	33.2	50	66.6	83.2	100
D	1.3	1.2	1	0.8	0.7	0.6

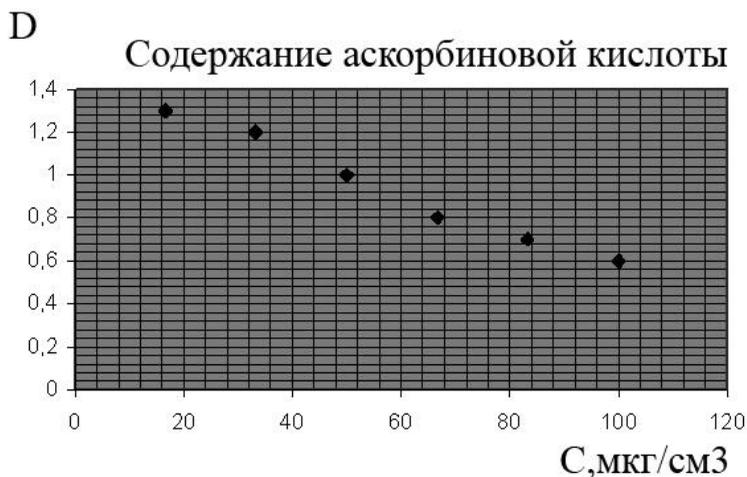


Рис. 53. Оптическая плотность – содержание аскорбиновой кислоты, мкг/см^3

Содержание витамина С (мг витамина С в 100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \times 100 \times 100}{a \times 1000},$$

где: **К** – содержание витамина С в мг;

a – масса пробы;

1000 – мг.

Контрольные вопросы

- 1) Каковы физиологические свойства аскорбиновой кислоты?
- 2) Опишите строение и химические свойства аскорбиновой кислоты.
- 3) В каких продуктах чаще всего встречается аскорбиновая кислота?
- 4) Охарактеризуйте принцип метода определения аскорбиновой кислоты.
- 5) Опишите методику фотоколориметрического определения аскорбиновой кислоты.
- 6) Какие правила техники безопасности следует соблюдать при количественном определении аскорбиновой кислоты.

IV. Углеводы

Лабораторная работа №11

Качественные реакции на углеводы

Задачи лабораторной работы

1. Провести качественные реакции на углеводы.
2. Отличить восстанавливающие моносахариды от дисахаридов.

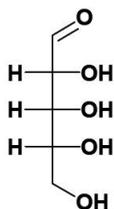
3. Обобщить и закрепить знания учащихся о функциях углеводов, их биологической значимости для живых организмов.

Краткая характеристика углеводов.

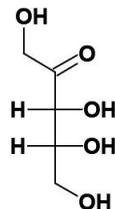
Органические соединения, имеющие общую молекулярную формулу $C_x(H_2O)_y$, называют углеводами. По способности к гидролизу их делят на моносахариды (монозы), дисахариды (биозы) и полисахариды (гликаны).

Моносахариды не подвергаются гидролизу с образованием более простых углеводов в отличие от дисахаридов и полисахаридов.

Моносахариды содержат в своём составе карбонильную (альдегидную или кетонную) и несколько гидроксильных групп. Моносахариды, содержащие альдегидную группу, называются альдозами, а кетонную (обычно в положении 2) - кетозами. Наиболее распространёнными в природе являются пентозы и гексозы (см. рис. 54, 55).



альдопентоза (D-рибоза)



кетопентоза (D-рибулоза)

Рис. 54. Пентозы

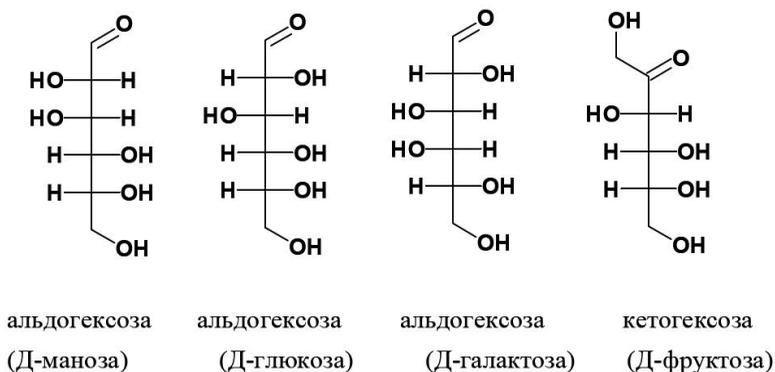


Рис. 55. Гексозы

В кристаллическом состоянии моносахариды существуют в циклической пираноподобной или фураноподобной форме. В растворах имеют место взаимные превращения открытой и циклической форм (см. рис. 56).

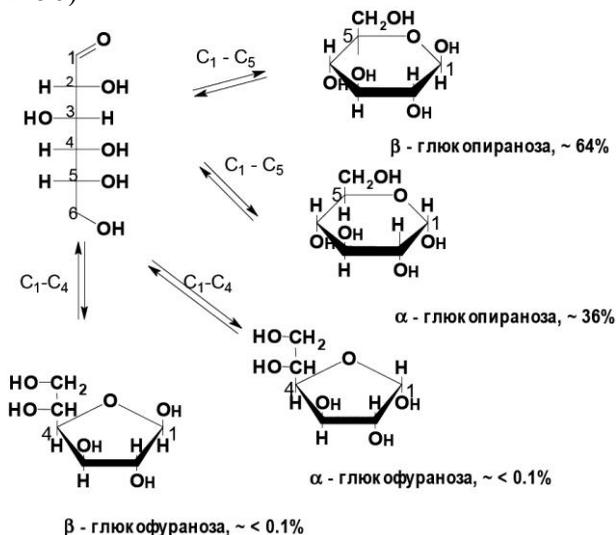


Рис. 56. Взаимные превращения открытой и циклической форм

Благодаря этому моносахариды обладают способностью восстанавливать в щелочной среде катионы металлов (Ag^{2+} , Cu^{2+}), при этом они подвергаются расщеплению с образованием продуктов окисления.

Дисахариды состоят из двух одинаковых или различных остатков моносахаридов. Их связывание в природных дисахаридах осуществляется двумя путями.

1. За счет полуацетальной (гликозидной) OH-группы одного и любой спиртовой OH-группы другого моносахарида, кроме полуацетальной. Это восстанавливающие дисахариды (гликозид - гликозиды). К ним относятся: мальтоза, целлобиоза, лактоза и др. Так, мальтоза состоит из двух остатков α -глюкозы, соединенных α, α - 1,4 - O - гликозидной связью (см. рис. 57).

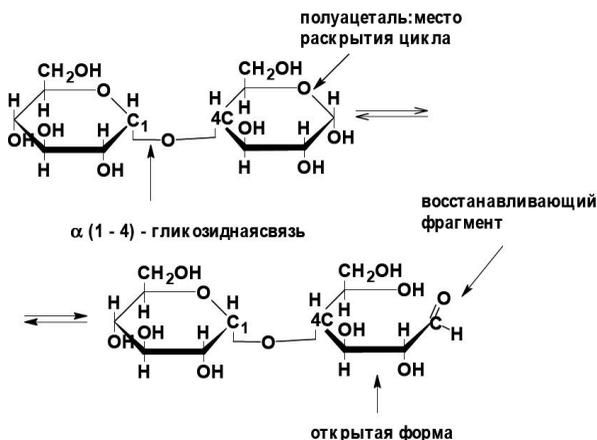


Рис. 57. α, α - 1,4 - O - гликозидная связь

Целлобиоза состоит из двух остатков β -глюкозы, соединенных β, β -1,4 гликозидной связью. Лактоза состоит из остатков β -галактозы и α -глюкозы, соединенных α, β - 1,4 - O - гликозидной связью.

2. За счёт полуацетальных (гликозидных) OH-групп обоих моносахаридов. Это невосстанавливающие дисахариды: сахароза, трегалоза и другие (см. рис. 58).

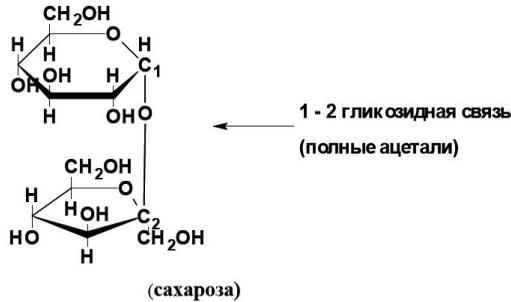


Рис. 58. 1-2 гликозидная связь сахарозы

Полисахариды — высокомолекулярные углеводы, которые по химической природе являются полигликозидами. В полисахаридах растительного происхождения в основном имеют место (1 - 4) и (1 - 6) гликозидные связи, а в полисахаридах животного и бактериального происхождения дополнительно имеются также (1 - 3) и (1 - 2) гликозидные связи. Полисахариды подразделяют на:

1. Гомополисахариды (гомогликаны), которые состоят из остатков одного моносахарида. Так, крахмал состоит из остатков α -глюкозы, его дисахаридным фрагментом является мальтоза. Целлюлоза состоит из остатков β -глюкозы, его дисахаридным фрагментом является целлобиоза.

2. Гетерополисахариды (гетерогликаны) состоят из остатков различных моносахаридов: гепарин, гиалуроновая кислота и др.

Полисахариды проявляют очень слабые восстановительные свойства и гидролизуются, подобно дисахаридам только в кислой среде.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) NaOH (5% - ный раствор).
- 2) CuSO₄ (5% - ный раствор).
- 3) Резорцин.
- 4) HCl (25% - ный раствор).
- 5) Реактив Барфедда. 6,5 г Cu(CH₃COO)₂ растворяют в 100мл горячей воды (t = 70°C), смесь фильтруют и к фильтрату прибавляют 1 мл ледяной CH₃COOH).
- 6) Раствор Люголя (0,3 г иода и 0,6 г иодистого калия растворяют в 15 мл дистиллированной воды и затем разбавляют водой до объема 100 мл).
- 7) Пробирки, пипетки, стеклянные палочки, водяная баня.
- 8) Глюкоза (5% - ный раствор).
- 9) Фруктоза (5% - ный раствор).
- 10) Лактоза (5% -ный раствор).
- 11) Мальтоза (5% - ный раствор).
- 12) Крахмал (0,1%-ный раствор).

Моносахариды

Опыт 1. Реакция Троммера

Принцип метода. Используется для определения восстанавливающих моносахаридов (глюкоза, фруктоза и др.). Моносахариды в щелочной среде восстанавливают оксид меди (II) в оксид меди (I), при этом образуется осадок красно-бурого цвета.

Ход эксперимента. В пробирку к 6 каплям 5% - ного раствора глюкозы добавляют 3 капли 5% - ного раствора NaOH и 2 капли 5% - ного раствора CuSO₄. Содержимое пробирки перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до изменения цвета раствора.

Опыт 2. Реакция Селиванова на кетозы

Принцип метода. При нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой и резорцином наблюдается вишнево-красное окрашивание раствора.

Ход эксперимента. В пробирку помещают 15 капель 5% - ного раствора фруктозы, 3 капли 25% - ного раствора HCl и несколько кристаллов резорцина. Смесь нагревают на водяной бане в течение 5 - 10 минут при $t = 80^{\circ}\text{C}$ до появления характерного окрашивания раствора.

Опыт 3. Реакция Барфедда

Принцип метода. Позволяет отличить восстанавливающие моносахариды от дисахаридов. Окисление углевода протекает не в щелочной среде (см. реакцию Троммера), а в среде, близкой к нейтральной. В

этих условиях восстанавливающие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов. При взаимодействии моносахаридов с реактивом Барфедда образуется осадок красно-бурого цвета.

Ход эксперимента. К 5 каплям 5% - ного раствора глюкозы добавляют 5 капель реактива Барфедда. Смесь перемешивают и осторожно нагревают до кипения, наблюдая за изменением цвета раствора.

Дисахариды

Опыт 4. Реакция Троммера

Принцип метода. Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы) эти дисахариды обладают восстанавливающими свойствами.

Ход эксперимента. В пробирку к 4 каплям 5% - ного раствора лактозы (мальтозы) добавляют 3 капли 5% - ного раствора NaOH и 2 капли 5% - ного раствора CuSO_4 . Содержимое пробирки перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до изменения цвета раствора.

Полисахариды

Опыт 5. Реакция крахмала с иодом

Принцип метода. При взаимодействии крахмала с иодом образуется комплексное адсорбционное соединение, окрашенное в синий цвет. При нагревании

окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойкого комплекса крахмала с иодом.

Ход эксперимента. К 5 каплям 0,1% - ного раствора крахмала добавляют 1 каплю раствора Люголя, содержимое пробирки перемешивают и наблюдают за изменением цвета раствора.

Контрольные вопросы и тесты

- 1) Что представляют собой углеводы, на какие классы они делятся?
- 2) Каковы функции углеводов в живой клетке?
- 3) На какие классы делятся моносахариды? Какие функциональные группы они содержат?
- 4) Каков механизм образования дисахаридов?
- 5) На какие классы делятся дисахариды? Что лежит в основе этой классификации?
- 6) Какие из перечисленных углеводов вступают в реакцию Троммера?
 - а) глюкоза, фруктоза, лактоза, трегалоза;
 - б) сахароза, рибоза, арабиноза, ксилоза;
 - в) манноза, фруктоза, галактоза, трегалоза;
 - г) арабиноза, глюкоза, сахароза, рибоза.
- 7) Какие из предложенных углеводов вступают во взаимодействие с резорцином в кислой среде?
 - а) рибулоза, глюкоза, рибоза, манноза;
 - б) манноза, ксилулоза, арабиноза, галактоза;
 - в) фруктоза, рибоза, глюкоза, галактоза.
- 8) Какие из перечисленных углеводов вступают в реакцию Барфедда?

а) глюкоза, фруктоза, рибоза, лактоза; б) сахароза, манноза, фруктоза, галактоза, в) рибоза, лактоза, арабиноза, ксилоза; г) арабиноза, трегалоза, манноза, глюкоза.

9) Какие из предложенных дисахаридов обладают восстанавливающими свойствами?

а) сахароза, лактоза, мальтоза; б) целлобиоза, мальтоза, трегалоза.

10) Какие углеводы относятся к дисахаридам?

А. Глюкоза. Б. Крахмал. В. Фруктоза. Г. Целлюлоза.

Д. Сахароза. Е. Мальтоза.

11) Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) крахмал; б) гликоген; в) инулин; г) целлюлоза.

12) Что является мономером целлюлозы?

А. Хитин. Б. Глюкоза. В. Аминокислота.

Г. Углерод. Д. Глицерин. Е. Крахмал.

13) Какие углеводы относятся к моносахаридам?

А. Фруктоза. Б. Крахмал. В. Глюкоза. Г. Целлюлоза.

Д. Рибоза. Е. Галактоза.

14) Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) целлюлоза; б) лигнин; в) пектин;

г) гликоген; д) крахмал.

15) Сахароза:

а) глюкоза+глюкоза; б) фруктоза+глюкоза;

в) глюкоза+галактоза; г) фруктоза+фруктоза.

16) Самым распространенным углеводом на Земле является:

а) сахароза; б) крахмал; в) целлюлоза;

г) гликоген; д) гемицеллюлоза.

V. Липиды

Лабораторная работа №12

Анализ масел и пищевых жиров

Задачи лабораторной работы

1. Провести качественные реакции на глицериды.
2. Определить продукты гидролитического расщепления глицеридов с помощью качественных реакций.
3. Определить содержание поваренной соли в маргарине и сливочном масле.

Общая характеристика липидов. *Липидами* называется сложная смесь органических веществ, выделяемых из растительных и животных объектов. Они обладают близкими физико-химическими свойствами, в первую очередь, нерастворимостью в воде и хорошей растворимостью в ряде органических растворителей (диэтиловом эфире, бензоле, хлороформе, спиртах).

По элементарному составу липиды разделяются на две большие категории: простые и сложные. Простые липиды включают вещества, молекулы которых состоят только из жирных кислот и спиртов, сложные – образуют комплексы с белками (липопротеиды), с сахарами (гликолипиды), с фосфором (фосфолипиды).

По природе содержащегося спирта простые липиды классифицируются на:

- а) *глицериды*, или *ацилглицеролы* (содержат спирт глицерол);
- б) *цери́ды* (содержат высшие алифатические спирты);

в) *стериды* (содержат полициклические спирты, носящие название стеролы).

Основную массу этих веществ составляют сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высокомолекулярных жирных кислот – *глицериды*. Кроме глицеридов в состав липидов входят свободные жирные кислоты, воски, фосфо- и гликолипиды, жирорастворимые пигменты, стерины, жирорастворимые витамины, а также продукты их разнообразных превращений. Основную массу липидов составляют глицериды, которые являются, по существу, жирами. Жиры – запасные вещества, накапливающиеся в очень больших количествах в семенах и плодах многих растений, используемых в жировой промышленности для получения масел (растительных жиров).

В состав жиров в основном входят триглицериды, но присутствуют ди- и моноглицериды (см. рис. 59).

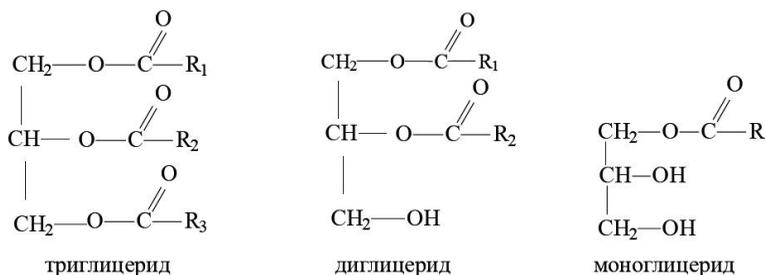


Рис. 59. Моно-, ди- и триглицериды (R_1, R_2, R_3 – радикалы жирных кислот)

Все жирные кислоты, входящие в состав жиров, делят на две группы:

а) *насыщенные*, не содержащие двойных связей (пальмитиновая к-та – $C_{15}H_{31}COOH$, стеариновая – $C_{17}H_{35}COOH$, арахиновая, бегеновая);

б) *ненасыщенные*, содержащие двойные связи (олеиновая – $C_{17}H_{33}COOH$, линолевая, линоленовая).

Самые распространенные липиды, встречающиеся в природе – триацилглицеролы. Их принято делить на жиры (при $t = 20^\circ C$ они остаются твердыми) и масла (при $t = 20^\circ C$ имеют жидкую консистенцию). Растительные жиры или масла богаты ненасыщенными кислотами, поэтому в подавляющем большинстве случаев они являются жидкими. Твердыми являются только *кокосовое масло* и *масло бобов какао*. Животные жиры при обыкновенной температуре – твердые, так как содержат главным образом насыщенные жирные кислоты.

Биологические функции липидов. Липиды – наиболее важный из всех питательных веществ источник энергии. В количественном отношении липиды – основной энергетический резерв организма. В основном жир содержится в клетках в виде жировых капель, которые служат метаболическим «топливом». Липиды окисляются в митохондриях до воды и диоксида углерода с одновременным образованием большого количества АТФ (АТР).

Ряд липидов принимает участие в образовании клеточных мембран. Типичными мембранными липидами являются фосфолипиды, гликолипиды и холестерин. Следует отметить, что мембраны не содержат жиров.

Жировые отложения в подкожной ткани и вокруг различных органов обладают высокими теплоизолирующими свойствами. Как основной

компонент клеточных мембран липиды изолируют клетку от окружающей среды и за счет гидрофобных свойств обеспечивают формирование мембранных потенциалов.

Некоторые липиды выполняют в организме специальные функции. Стероиды, эйкозаноиды и некоторые метаболиты фосфолипидов выполняют *сигнальные функции*. Они служат в качестве гормонов, медиаторов и вторичных переносчиков (мессенджеров). Отдельные липиды выполняют роль «якоря», удерживающего на мембране белки и другие соединения. Некоторые липиды являются *кофакторами*, принимающими участие в ферментативных реакциях, например, в свертывании крови или в трансмембранном переносе электронов. Светочувствительный каротиноид ретиналь играет центральную роль в процессе зрительного восприятия. Поскольку некоторые липиды не синтезируются в организме человека, они должны поступать с пищей в виде незаменимых жирных кислот и жирорастворимых витаминов.

Липиды – важные компоненты пищи, во многом определяют пищевую ценность и вкусовые достоинства.

Исключительно велика роль липидов в разнообразных процессах пищевой технологии. Порча зерна и продуктов его переработки при хранении (прогоркание), в первую очередь, связана с изменением его липидного комплекса.

Поскольку в жире содержатся ненасыщенные жирные кислоты, он может легко окисляться. Процесс окисления жира, окисления ненасыщенных жирных кислот, может идти сам по себе за счет присоединения кислорода воздуха по месту двойных связей. Однако этот процесс может значительно ускоряться под

влиянием особого фермента, содержащегося в зерне, муке и крупе – *липоксигеназы*. Она особенно активна в сое и соевой муке.

В результате действия липоксигеназы ненасыщенные жирные кислоты образуют перекиси и гидроперекиси.

Реактивы, посуда, оборудование и исследуемый материал

- 1) Кристаллический KHSO_4 .
- 2) Ледяная CH_3COOH .
- 3) Концентрированная HCl .
- 4) Растворы KOH 10% или NaOH 60% в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.
- 5) NaHCO_3 1%.
- 6) CaCl_2 5%.
- 7) MgCl_2 5% .
- 8) AgNO_3 0.05 н.
- 9) K_2CrO_4 .
- 10) Масло подсолнечное, кукурузное, сливочное.
- 11) Маргарин и сливочное масло.

Опыт 1. Образование эмульсии

Ход эксперимента. В две пробирки вносят по 2-3 капли масла, в одну из них добавляют 2 мл воды, в другую – 2 мл раствора соды. Пробирки с жидкостью энергично встряхивают. Образуются эмульсии: стойкая и нестойкая.

Опыт 2. Омыление жиров

Принцип метода. Глицериды под влиянием щелочи расщепляются гидролитически по

сложноэфирной связи на глицерол и на жирные кислоты. Высвободившие жирные кислоты в щелочной среде образуют соответствующие натриевые или калиевые соли, носящие название мыла. Реакция щелочного гидролиза с образованием мыл называется омылением.

Ход эксперимента. В колбу на 50 мл вносят 0,5 мл масла и добавляют 10 мл спиртового раствора КОН или NaOH. Колбу закрывают форштосом и помещают в кипящую водяную баню до тех пор, пока не обнаружится исчезновение мыла (жира) (\approx на час).

При добавлении 10 мл H_2O получится раствор мыла, при встряхивании дающий пену (детергентное действие). Соли K и Na растворимы в воде. Они используются в некоторых из следующих далее реакций.

Опыт 3. Образование свободных жирных кислот

Принцип метода. При добавлении минеральных кислот и нагревании раствор мыла становится кислым и в этих условиях образуются свободные жирные кислоты.

Свободные жирные кислоты нерастворимы в водной среде и образуют муть или жирный слой на поверхности жидкости.

Ход эксперимента. К 20 каплям раствора мыла добавляют 3-5 капель концентрированной соляной или уксусной кислоты, перемешивают и оставляют для расслоения.

Опыт 4. Образование нерастворимых кальциевых или магниевых мыл

Ход эксперимента. К 20 каплям раствора мыла добавляют 10 капель раствора хлористого кальция или магния. Образуются хлопья кальциевых или магниевых солей жирных кислот.

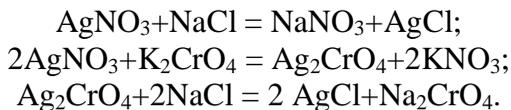
Опыт 5. Акролеиновая проба на глицерол

Принцип метода. При нагревании в присутствии кислого сульфата калия глицерин претерпевает внутримолекулярное обезвоживание. Образуется акролеиновый альдегид (акролеин) – жидкость с удушливым и раздражающим запахом пригоревшего жира.

Ход эксперимента. Реакция выполняется под тягой. К 2-3 каплям масла добавляют 100-200 мг сернокислого калия и смесь нагревают на газовой горелке. Осторожно нюхают.

Опыт 6. Определение содержания поваренной соли в маргарине и сливочном масле

Принцип метода. Поваренная соль является важной вкусовой добавкой и играет большую роль в физиологических процессах в организме. В пищевой промышленности поваренная соль используется как консервант, оказывающий губительное действие на микрофлору продукта. Для определения массовой доли поваренной соли в масле сливочном соленом и маргарине используют argentометрический метод. В качестве индикатора используют хромат калия. В процессе титрования происходят три реакции:



Образующийся в результате второй реакции кирпично-красный осадок Ag_2CrO_4 более растворим, чем белый осадок AgCl , поэтому в начале титрования он быстро исчезает, растворяясь при взаимодействии с NaCl . Как только все ионы хлора окажутся связанными с ионами серебра, последняя реакция прекращается и неисчезающее кирпично-красное окрашивание раствора показывает конец титрования. Вытяжка для титрования должна быть охлаждена, так как при повышении температуры растворимость осадка Ag_2CrO_4 возрастает. Реакция среды должна быть нейтральной, в кислой среде осадок Ag_2CrO_4 растворяется, а в щелочной образуется труднорастворимый осадок AgOH , который выпадает раньше Ag_2CrO_4 .

Ход эксперимента. Навеску маргарина массой 5 г помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3 и смешивают с 50 см^3 дистиллированной воды, отмеренной пипеткой. Колбу накрывают часовым стеклом и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 7 мин. или нагревают на электроплитке до 90°C . Затем энергично взбалтывают, охлаждают при комнатной температуре в течение 20 мин. и фильтруют через влажный фильтр. Отбирают 10 см^3 фильтрата, добавляют 3 капли хромата калия и титруют раствором 0,05 н. AgNO_3 до слабо-кирпичного окрашивания, не исчезающего при взбалтывании.

Массовую долю поваренной соли в маргарине X (в %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{100V \times 0.0029V_1K}{m},$$

где: V – количество раствора AgNO_3 , израсходованного на титрование вытяжки, см^3 ;

$0,0029$ – титр $0,005$ н. раствора AgNO_3 , г/см^3 ;

V_1 – общий объем вытяжки, см^3 ;

K – поправочный коэффициент к $0,005$ н. раствору AgNO_3 ;

m – масса навески маргарина, г.

Оформление работы. Результаты работы представляют в виде таблицы:

№	Название реакции	Используемые реактивы	Наблюдаемые эффекты	Молекулярный механизм реакции
1				

Контрольные вопросы и тесты

- 1) Что называется липидами?
- 2) На какие классы делятся липиды?
- 3) Каковы физиологические функции липидов в живой клетке?
- 4) Какие жирные кислоты входят в состав липидов?
- 5) Какими свойствами обладают жирные кислоты и как они влияют на качество пищевых продуктов?
- 6) Какими физическими свойствами характеризуются глицериды?
- 7) Какие ферменты участвуют в химических превращениях глицеридов и жирных кислот?
- 8) Что понимают под процессом прокисания и прогоркания жиров?
- 9) Чем отличаются растительные и животные жиры?
- 10) Какова сущность аргентометрического метода определения массовой доли поваренной соли в маргарине и сливочном соленом масле? Какие реакции

происходят в процессе титрования водно-солевой вытяжки?

11) Липиды:

а) хлорофилл; б) воски; в) жиры; г) пектин; д) кумарин.

12) Липиды:

а) сложные соединения, мономером которых является глицерин;

б) сложные соединения глицерина с жирными кислотами;

в) гидрофобные соединения; г) гидрофильные соединения.

13) Что входит в состав жиров?

А. Аминокислоты. Б. Глюкоза. В. Азотистые основания.

Г. Жирные кислоты. Д. Глицерин.

14) Выберите термин, который не подходит данному контексту:

а) липопротеиды, гликолипиды, фосфолипиды, жиры;

б) олеиновая к-та, пальмитиновая к-та, линолевая к-та, линоленовая к-та, арахидоновая к-та;

в) пальмитиновая к-та, олеиновая к-та, стеариновая к-та, арахидоновая к-та, лауриновая к-та.

Глоссарий

Анаболизм – процесс синтеза новых, более сложных соединений из более простых, протекающий с расходом энергии АТФ.

Белки – высокомолекулярные органические вещества, состоящие из соединённых в цепочку пептидной связью аминокислот.

Витамины – группа низкомолекулярных органических соединений, выполняющих каталитическую функцию в составе активных центров ферментов.

Катаболизм – процесс распада органических соединений на более простые вещества, обычно протекающий с высвобождением энергии в виде тепла и в виде АТФ.

Липиды – жирные кислоты, а также их производные, как по радикалу, так и по карбоксильной группе.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные органические соединения, биополимеры, образованные остатками нуклеотидов, присутствующие в клетках всех живых организмов и выполняющие важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации.

Фенолы – органические соединения ароматического ряда, в молекулах которых гидроксильные группы связаны с атомами углерода ароматического кольца.

Ферменты, или энзимы – обычно белковые молекулы или молекулы РНК (рибозимы) или их комплексы, ускоряющие химические реакции в живых системах.

Углеводы (сахариды) – общее название обширного класса природных органических соединений, содержащих неразветвленную цепь из нескольких атомов углерода, карбонильную группу, а также несколько гидроксильных групп.

Библиография

1. Брухман Е.Е. Прикладная биохимия. – Москва: Лёгкая и пищевая промышленность, 1981.- 294 с.
2. Владимиров Е.Г., Ушакова Г.И., Кушнарёва О.П. Биохимия зерна, биохимия хлебопечения; биохимия бродильных производств: Методические указания к лабораторному практикуму. – Оренбург, 2004.- 61 с.
3. Виноградова А.А, Мелькина Г.М., Фомичева Л.А. Лабораторный практикум по общей технологии пищевых производств. – Москва: Агропромиздат, 1991.- 336 с.
4. Врабие Т., Мустьяцэ Г.Ф. Динамическая биохимия. Цикл лекций. – Кишинёв: ТУМ, 2004.- 117 с.
5. Григорча П.Д., Глижин А.Г. Технологическая биохимия. Лабораторные работы. – Кишинёв: Молд. ГУ, 2004.- 247 с.
6. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. Россия, Москва. 2000.- 469 с.
7. Кретович В.Л. Биохимия растений. – Москва: Высшая школа, 1986.- 448 с.
8. Паламарчук Л.Ф., Мустьяцэ Г.Ф. Биохимия. Методические указания к лабораторным работам. – Кишинёв: ТУМ, 1995.- 95 с.
9. Петров О. А., Ключева М. Е., Малкова О. В. Основы биохимии: Учебное пособие. – Иваново, 2008.-48 с.
10. Петров О.А., Пуховская С.Г. Практикум по биохимии. Методические указания. – Иваново, 2006.- 60 с.
11. Кучеренко А.О., Шугалей В.С. Методическое пособие по курсу биохимии растений. – Ростов-на-Дону, 2004.-25 с.

Приложение 1

Протеиногенные стандартные α -аминокислоты

Название	Сокращенное название аминокислоты	
	русское	международное
1	2	3
<i>Алифатические</i>		
Глицин	Гли	Gly
Аланин	Ала	Ala
Валин*	Вал	Val
Лейцин*	Лей	Leu
Изолейцин*	Иле	Ile
<i>Серосодержащие</i>		
Цистеин	Цис	Cys
Метионин*	Мет	Met
<i>Нейтральные</i>		
Серин	Сер	Ser
Треонин*	Тре	Thr
Аспаргин	Асп	Asn
Глутамин	Глн	Gln
<i>Кислые</i>		
Глутаминовая кислота	Глу	Glu
Аспаргиновая кислота	Асп	Asp
<i>Основные</i>		
Лизин*	Лиз	Lys
Аргинин	Арг	Arg
Гистидин	Гис	His
<i>Ароматические</i>		
Тирозин	Тир	Tyr
Триптофан*	Три	Trp
Фенилаланин*	Фен	Phe
<i>Иминокислоты</i>		
Пролин	Про	Pro
* – незаменимые аминокислоты		

Приложение 2

Таблица Берграна

Сахар, мг	Медь, мг	Сахар мг	Медь, мг	Сахар мг	Медь, мг	Сахар мг	Медь, мг
1	2	3	4	5	6	7	8
10	20,6	33	64.8	56	105.7	79	143.7
11	22,6	34	66.7	57	107.4	80	145.3
12	24,6	35	68.5	58	109.2	81	146.9
13	26,5	36	70.3	59	110.9	82	148.5
14	28,50	37	72.2	60	112.6	83	150.0
15	30,50	38	74.0	61	114.3	84	151.6
16	32.5	39	75.9	62	115.9	85	153.2
17	34.5	40	77.7	63	117.6	86	154.8
18	36.4	41	79.5	64	119.2	87	156.4
19	38.4	42	81.2	65	120.9	88	157.9
20	40.4	43	83.0	66	122.6	89	159.5
21	42.3	44	84.8	67	124.2	90	161.1
22	44.2	45	86.5	68	125.9	91	162.6
23	46.1	46	88.3	69	127.5	92	164.2
24	48.0	47	90.1	70	129.2	93	165.7
25	49.8	48	91.9	71	130.8	94	167.3
26	51.7	49	93.6	72	132.4	95	168.8
27	53.6	50	95.4	73	134.0	96	170.3
28	55.5	51	97.1	74	135.6	97	171.9
29	57.4	52	98.8	75	137.2	98	173.4
30	59.3	53	100.6	76	138.9	99	175.0
31	61.1	54	102.3	77	140.5	100	176.5
32	63.0	55	104.0	78	142.1		

Приложение 3

Функции некоторых водорастворимых витаминов в ферментативном катализе

Вита мин	Активная форма (кофермент)	Ферменты, содержащие кофермент	Реакции, ускоряемые ферментами
В ₁	Тиамин пирофосфат	Дегидрогеназы	Декарбоксилирование α-кетокислот при углеводном обмене
В ₂	Флавиномоно нуклеотид, флавинаденин динуклеотид	Оксидазы и редуктазы	Окислительно-восстановительные реакции при внутриклеточном окислении
В ₆	Пиридоксаль фосфат	Амино трансферазы, карбоксилазы	Перенос аминогрупп в процессе синтеза и обмена аминокислот
В ₅	Никотин амидаденин динуклеотид, никотинамид адениндинуклеотидфосфат	Анаэробные дегидрогеназы	Окислительно-восстановительные реакции в процессе внутриклеточного окисления
Н	Биоцитин	Карбоксилазы	Перенос СО ₂ в процессе обмена белков и липидов

Содержание

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории.....	3
I. Нуклеиновые кислоты.....	5
№1. Гидролиз нуклеопротеинов.....	5
II. Аминокислоты и белки.....	15
№2. Определение содержания аммиака по методу Конвея-Байрна.....	15
№3. Потенциометрическое титрование формольных производных α -аминокислот.....	23
№4. Цветные реакции на аминокислоты и белки.....	31
№5. Выделение и анализ простых белков.....	41
III. Ферменты, коферменты и витамины.....	46
№6. Определение активности фермента сахаразы.....	46
№7. Определение активности фермента полифенолоксидаза.....	56
№8. Количественное определение восстановленного глутатиона.....	63
№9. Качественные реакции на витамины.....	68
№10. Количественный метод определения витамина С.....	83
IV. Углеводы.....	91
№11. Качественные реакции на углеводы.....	91
V. Липиды.....	101
№12. Анализ масел и пищевых жиров.....	101
Глоссарий.....	111
Библиография.....	112
Приложения.....	113

БИОХИМИЯ

*Методические указания
к лабораторному практикуму*

Авторы: Дан Згардан;
Лариса Некула;
Надежда Ботезату;
Юлия Санду