

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ФГБОУ ВО КЕМЕРОВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИН-
СТИТУТ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
(УНИВЕРСИТЕТ)

Е.П. Зинкевич, Т.В. Лобова, И.А. Еремина

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Лабораторный практикум

Для студентов вузов

Кемерово 2017

УДК 577.1(076)

ББК 28.072я73

363

Рецензенты:

О.А. Неверова, д-р биол. наук, профессор Кемеровского государственного университета;

Л.Г. Пинчук, д-р с.-х. наук, профессор Кемеровского государственного сельскохозяйственного института

*Рекомендовано редакционно-издательским советом
Кемеровского технологического института
пищевой промышленности (университета)*

363 Основы биохимии: лабораторный практикум / Е.П. Зинкевич, Т.В. Лобова, И.А. Еремина; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет). - Кемерово, 2017.- 104 с.

ISBN

В пособии представлены методы обнаружения и количественного определения белков, ферментов, углеводов, липидов и витаминов в биологических объектах и сырья для пищевой промышленности, а также приемы выделения этих соединений. Работы подобраны с учетом доступности исследуемого материала, реактивов и оборудования, возможности выполнения в отведенное для занятий время и использования методов анализа для различных биологических объектов. Каждая работа содержит теоретическое обоснование, порядок выполнения, способ учета результатов, контрольные вопросы для защиты.

Данный лабораторный практикум составлен в соответствии с учебным планом подготовки бакалавров, обучающихся по направлениям 19.03.01 «Биотехнология», 19.03.02. «Продукты питания из растительного сырья», 19.03.03. «Продукты питания животного происхождения». В практикуме представлены также лабораторные работы для бакалавров направления 19.03.04 «Технология продукции и организация общественного питания», изучающих дисциплину «Биохимия и микробиология».

УДК 577.1(076)

ББК 28.072я73

ISBN

*Охраняется законом об авторском праве,
не может быть использовано любым
незаконным способом без письменного договора*

© КемТИПП (университет), 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.	5
Глава 1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ.	6
1.1. Указания к выполнению лабораторных работ.	9
1.2. Правила безопасной работы в лаборатории биохимии.	10
Глава 2. БЕЛКИ И АМИНОКИСЛОТЫ.	11
Лабораторная работа № 1. Цветные реакции на белки и аминокислоты.	13
Лабораторная работа № 2. Определение общего азота по Кьельдалю.	22
Лабораторная работа № 3. Определение белка с биуретовым реактивом.	29
Лабораторная работа № 4. Выделение белков из семян злаковых и бобовых.	32
Лабораторная работа № 5. Реакции осаждения белков.	39
Глава 3. ФЕРМЕНТЫ.	44
Лабораторная работа № 6. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов.	45
Лабораторная работа № 7. Специфичность действия амилазы и сахаразы.	47
Лабораторная работа № 8. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции (на активность ферментов).	51
Лабораторная работа № 9. Влияние рН на скорость ферментативной реакции.	55
Лабораторная работа № 10. Выделение α - и β -амилаз из солода и определение их активности.	57
Лабораторная работа № 11. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов по Вольгемуту.	63
Лабораторная работа № 12. Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину).	68
Глава 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ.	73

Лабораторная работа № 13. Определение активности липазы клещевины.	74
Глава 5. ОБМЕН БЕЛКОВ.	78
Лабораторная работа № 14. Определение активности протеаз (по методу Ансона).	78
Глава 6. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ.	83
Лабораторная работа № 15. Анаэробное окисление углеводов.	84
Глава 7. ВИТАМИНЫ.	89
Лабораторная работа № 16. Количественное определение витамина С.	91
Вопросы к тестам	99
Библиографический список.	102

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данный лабораторный практикум составлен в соответствии с учебным планом подготовки бакалавров, обучающихся по направлениям 19.03.01 «Биотехнология», профиля «Пищевая биотехнология»; 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» профилей «Технология хлеба, макаронных и кондитерских изделий», «Технология бродильных производств и виноделие», «Технология консервов и пищевых концентратов», «Технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметической продукции»; 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» профилей «Технология молока и молочных продуктов», «Технология мяса и мясных продуктов». В практикуме представлены также лабораторные работы для бакалавров направления 19.03.04 «Технология продукции и организация общественного питания» профилей «Технология и организация производства продукции общественного питания», «Технология и организация ресторанного сервиса», изучающих дисциплину «Биохимия и микробиология».

В пособии представлены методы обнаружения и количественного определения белков, ферментов, углеводов, липидов и витаминов в биологических объектах и сырье для пищевой промышленности, а также приемы выделения этих соединений. Работы подобраны с учетом доступности исследуемого материала, реактивов и оборудования, возможности выполнения в отведенное для занятий время и использования методов анализа для различных биологических объектов. Каждая работа содержит теоретическое обоснование, порядок выполнения, способ учета результатов, контрольные вопросы для защиты работы.

Лабораторные работы, представленные в пособии, являются исследовательскими, так как преподавателю предоставляется возможность перед началом работы выдать студентам индивидуальные задания с учетом изучаемого направления и профиля, используя при этом различные виды изучаемых биологических материалов, а также различные критерии оценки химического состава и ферментативной активности.

По окончании изучения курса «Основы биохимии» обучающиеся по вышеперечисленным направлениям бакалавриата должны знать биологическую роль, пищевое значение, строение и свойства химических соединений, входящих в состав живых организмов и основные процессы обмена, лежащие в основе жизнедеятельности и овладеть основными методами химического анализа биологического материала: качественное обнаружение и количественное определение белков, аминокислот, витаминов и др. соединений.

Глава 1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ

Биохимия является и биологической и химической наукой, так как изучает вещества животного, растительного и микробного происхождения с целью познания их строения, свойств и выяснения механизмов функционирования.

Данные о химическом составе организмов, строении мономеров, полимеров, надмолекулярных комплексов, органелл клеток, их структур и функций были получены разнообразными методами неорганической, аналитической, органической химии, химии высокомолекулярных соединений, физиологии и методами разработанными биохимиками.

Среди методов, используемых в биохимии, ключевое значение имеют методы выделения веществ из биологического материала и их очистка с целью получения индивидуальных соединений.

Следует отметить три главные проблемы выделения индивидуальных комплексов из живых организмов, в особенности таких сложных как белки и нуклеиновые кислоты.

Во-первых исследуемый материал – биомасса, из которой предстоит выделить интересующее исследователя вещество – состоит из сотен и тысяч различных соединений. Разделение таких смесей по уровню сложности не имеет себе равных среди других этапов изучения веществ. Это усугубляется еще тем, что многие компоненты этих смесей, выполняя различные биологические функции, построены однотипно и мало различаются по

таким свойствам как растворимость и осаждаемость или способность поглощаться определенным типом сорбентов.

Во-вторых, многочисленные исследования выделенного и очищенного вещества (например, белка), ставят в рамки необходимости работать с очень малыми количествами вещества – мг и мкг. Поэтому основными методами исследования являются: спектрофотометрические, основанные на измерении поглощения видимого или ультрафиолетового света; радиохимические, основанные на измерении радиоактивности, и люминесцентные, основанные на флюоресценции (био- и хемилюминесценции).

В-третьих, многие компоненты обладают очень низкой устойчивостью. Так многие белки, при умеренных температурах и незначительных изменениях рН среды, подвергаются необратимому изменению нативной конформации – денатурации, которая сопровождается потерей биологической активности – инактивацией. Кроме того, в клетках имеются ферменты, способные гидролизовать белки и нуклеиновые кислоты – протеазы и нуклеазы. В неповрежденных клетках эти ферменты сосредоточены главным образом в лизосомах. Однако при разрушении клеток тканей, которое всегда предшествует выделению веществ, лизосомы разрушаются, ферменты выходят, что приводит к быстрому гидролизу биополимеров в биомассе.

Выделение индивидуальных биополимеров является многоступенчатым процессом. На каждом этапе разделения должна получаться фракция, более богатая выделяемым веществом. Такой процесс называют фракционированием.

Для выделения искомого биополимера из раствора можно воспользоваться осаждением, для этого необходимо понизить растворимость этого биополимера. Так, для осаждения белков добавляют к их водным растворам ацетон. На растворимость белков влияет ионная сила раствора. Высокая концентрация соли приводит к высаливанию. При этом концентрация соли, необходимая для осаждения, различна для различных белков. Наиболее широко для высаливания используется сульфат аммония, обладающий высокой растворимостью и даже высокие

концентрации этой соли не вызывают денатурирующего действия на белки.

Изменение рН среды для кислых белков в кислую сторону, а для основных – в щелочную приводит их молекулы к изоэлектрической точке. Молекулы лишенные ионной атмосферы сближаются до радиуса действия Ван-дер-Ваальсова притяжения. Иногда это приводит к выпадению белка в осадок. Такой способ выделения называют изоэлектрическим осаждением. Выпавший осадок можно отделить фильтрованием.

На начальных стадиях выделения белков из исходной биомассы или осадков нередко используют экстракцию. Например, для выделения из измельченного биологического материала фракции альбуминов применяют экстракцию дистиллированной водой, фракции глобулинов – экстракцию 5-10 %-ными растворами нейтральных солей (хлорида натрия или сульфата аммония), суммарной фракции липидов – серным эфиром и т.д.

Многие задачи по разделению веществ решаются с помощью сорбции части компонентов смеси на тех или иных сорбентах (гель фосфата кальция, активированный уголь). Заряженные компоненты можно сорбировать на ионитах – сорбентах, имеющих на поверхности заряженные группы.

Разделение может проводиться по размеру частиц с использованием ситового эффекта. Молекулярные сита – это материалы с порами определенного размера. Вещества, молекулы которых меньше размера пор, при пропускании через колонку задерживаются в порах, так как вода, находящаяся там, служит неподвижной фазой для малых частиц. Для больших молекул эти поры недоступны, и они обтекают гранулы, существенно опережая низкомолекулярные компоненты смеси.

Во многих методах разделения применяют различные низкомолекулярные вещества (органические растворители, соли, кислоты, щелочи), создающие нужные значения ионной силы и рН, от которых, на определенном этапе выделения и очистки, требуется избавиться. Для этого используется диализ, основанный на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для биополимеров. Чаще всего для этого используют пленки из целлофана,

представляющие собой нитрат целлюлозы, обладающие прочностью и способностью пропускать молекулы воды и гидрофильных низкомолекулярных компонентов.

Для получения индивидуального вещества, из смеси близких по строению веществ, используют зональные методы разделения. Одним из них является хроматография. Используются три группы методов хроматографии: на колонках, на пластинах (тонкослойная) и на бумаге. Вторым зональным методом разделения смесей является электрофорез, основанный на перемещении заряженных частиц в электрическом поле.

Зональное разделение можно проводить с помощью седиментации органелл клеток, биополимеров в центробежном поле в ультрацентрифугах.

Более тонкие методы разделения основаны на использовании специфического (например, иммунного) средства биополимера к партнеру получили название аффинных методов разделения. Наиболее широко используемый вариант - использование аффинных сорбентов, которые адсорбируют выделяемое вещество из смеси.

После выделения и очистки конкретного вещества используют методы качественного и количественного определения, методы изучения их свойств, структуры и функций.

Изучение структур биополимеров, надмолекулярных комплексов осуществляют методами электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа.

Выяснение химизма обмена веществ проводят на живых организмах, органах, тканях и клетках животных, растений, микробов методами балансовых опытов, меченых атомов (радиоактивных изотопов) и др.

1.1. Указания к выполнению лабораторных работ

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

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

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

Выполняемую работу обязательно записать в тетрадь с указанием номера, названия, цели работы, принципа метода, химизма происходящих реакций или процессов, схемы исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод.

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

1.2. Правила безопасной работы в лаборатории биохимии

1. Работу в лаборатории необходимо выполнять в халатах.
2. Всю посуду перед выполнением работы необходимо вымыть.
3. Концентрированные кислоты, щелочи и другие сильнодействующие реактивы набирать пипеткой с грушей или отмерять цилиндром.
4. Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и легкоиспаряющимися веществами производить только в вытяжном шкафу.
5. Если пролили концентрированную кислоту или щелочь, то их надо нейтрализовать толченым мелом или раствором кислоты, соответственно, а затем смыть водой.
6. При попадании концентрированной кислоты или щелочи на кожу, необходимо быстро смыть водой, а затем соответ-

ственно 2 % раствором бикарбоната натрия или 2 % раствором борной кислоты.

7. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.
8. Категорически запрещается принимать в лаборатории пищу, пользоваться лабораторной посудой для питья.
9. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.

Глава 2. БЕЛКИ И АМИНОКИСЛОТЫ

Белки – высокомолекулярные биологические полимеры, структурными (мономерными) звеньями которых служат α -аминокислоты. Аминокислоты в белках соединены друг с другом пептидной связью, образование которой происходит за счет карбоксильной группы, стоящей у α -углеродного атома одной аминокислоты и α -аминной группы другой аминокислоты с выделением молекулы воды. Мономерные звенья белков называют остатками аминокислот.

Согласно пептидной теории Э.Фишера (1902 г.) основой структуры белковой молекулы является полипептидная цепь, которая построена из нескольких десятков, а иногда и сотен остатков аминокислот, связанных между собой пептидными связями.

Характерной особенностью строения полипептидной цепи является то, что атомы углерода и азота в её основе, образованной из чередующихся пептидных связей и α -метильных групп (- NH – CH – CO - фрагментов), располагающихся приблизительно в одной плоскости под углом $109^{\circ}28'$. При этом радикалы соседних аминокислотных остатков находятся в транс-положении друг относительно друга. Это стабилизирует молекулу белка и делает её более устойчивой.

Любая полипептидная цепь (в белках и полипептидах) имеет N-концевую и C-концевую аминокислоты. Полипептидная цепь белка не содержит разветвлений. Белковая молекула может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей, которые соединены между собой ковалентными или некова-

лентными связями. Белки, состоящие из двух или нескольких полипептидных цепей, не связанных между собой ковалентными связями, называют *олигомерными*. Отдельные полипептидные цепи в таких белках называют *протомерами*, а их функционально активные части – *субъединицами*.

Радикалы аминокислотных остатков полипептидных цепей структурно и функционально многолики. Они могут быть маленькими (глицин и аланин) или большими (триптофан и лейцин), полярными и неполярными, заряженными и незаряженными. В радикалах находятся аминные, карбоксильные, гидроксильные, фенольные, тиольные, дисульфидные, амидные, метильные, имидазольные и другие функциональные группы. Разнообразие функциональных групп обеспечивает белкам полифункциональные свойства (разнообразие реакций, в которых участвуют белки).

Кроме белков, из аминокислот построены пептиды - соединения, содержащие до 10 аминокислотных остатков (условно относят к олигопептидам) и полипептиды, содержащие от 10 до 50 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 6 тыс. ед. Массовая доля белков в биологических объектах колеблется в широких пределах: молоке – 2,5-5 %, мышечной ткани – 18-22 %, содержимом куриного яйца – 12-14%, семенах зерновых культур (от сухой массы) – 12- 40 % (и более), картофеле – 0,7-4,6 %, свекле, моркови и других корнеплодах 0,9-1,6 %, фруктах и ягодах – 0,3-2 %, грибах – 3-4 %.

Пептиды, полипептиды и белки отличаются не только количеством, составом, но и последовательностью аминокислотных остатков, физико-химическими свойствами и функциями, выполняемыми в организме.

Молекулярная масса белков варьирует от 6 тыс. до 1 млн. и более. Например, инсулин бычий – 5733; β -казеин – 24000; пепсин – 35500; альбумин яиц – 45000; зеин кукурузы – 50000; гемоглобин лошади – 65000. Химические и физические свойства белков обусловлены химической природой и физико-химическими свойствами радикалов, входящих в них остатков аминокислот. Способы обнаружения и количественного определения белков в биологических объектах и продуктах питания, а

также выделения их из тканей и биологических жидкостей основаны на физических и химических свойствах этих соединений.

Лабораторная работа № 1

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ И АМИНОКИСЛОТЫ

Цель работы: Провести биуретовую, нингидриновую, ксантопротеиновую и реакцию Фоля.

Реактивы: Вода дистиллированная (в дальнейшем вода); растворы с массовыми долями: казеина 1%, желатины 1%, яичного белка 1%, сульфата меди 1%, гидроксида натрия 10 и 30%, глицина (или другой аминокислоты) 0,1%, фенола 0,1%, ацетата свинца 5%, нингидрина в ацетоне или этаноле 1%; концентрированная азотная кислота.

Реактив Фоля готовят в пробирке перед определением. В пробирку вносят 1 мл 5 % раствора ацетата свинца и небольшими порциями (по 1,5-2 мл) приливают 30 % раствор гидроксида натрия с интервалом 30 сек, каждый раз, перемешивая, до растворения молочно-белого хлопьевидного осадка появившегося после внесения первой порции гидроксида натрия.

Краткие теоретические положения

Белки при взаимодействии с некоторыми химическими веществами дают окрашенные соединения. Образование этих соединений происходит при участии радикалов аминокислот, их специфических групп или пептидных связей. Цветные реакции позволяют установить наличие белка в биологическом объекте или растворе и доказать присутствие определенных аминокислот в белковой молекуле. На основе цветных реакций разработаны некоторые методы количественного определения белков и аминокислот.

Универсальными считают биуретовую и нингидриновую реакции, так как их дают все белки. Ксантопротеиновая реакция,

реакция Фоля и др. являются специфическими, так как они обусловлены радикальными группами определенных аминокислот в молекуле белка.

Цветные реакции позволяют установить наличие белка в исследуемом материале и присутствие определенных аминокислот в его молекулах.

На основании некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

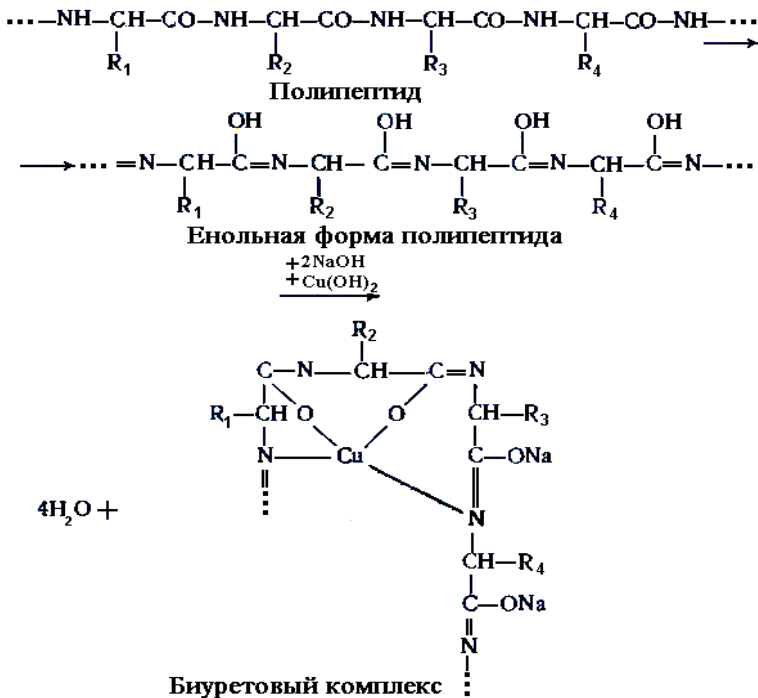
БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ. Название «биуретовая реакция» происходит от дающего её биурета ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) – производного, образующегося при прокаливании в пробирке нескольких кристаллов мочевины ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$). Реакция обусловлена наличием в белках, пептидах, полипептидах пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с ионами меди (II) комплексные соединения, окрашенные в фиолетовый (с красным или с синим оттенком) цвет. Окраска обусловлена наличием в молекуле не менее двух групп – $\text{CO} - \text{NH}$ –, связанных непосредственно между собой или при участии атома углерода или азота.

Интенсивность окраски зависит от количества белка в растворе. Это позволяет использовать данную реакцию для количественного определения белка. Цвет окрашенных растворов зависит от длины полипептидной цепи. Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза (поли- и олигопептиды) – красную или розовую окраску. Биуретовую реакцию дают не только белки, пептиды и полипептиды но и биурет ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{CO} - \text{NH}_2$), гистидин. Группа, образующая **пептидную связь** ($-\text{CO}-\text{NH}-$), в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме:



При избытке щелочи происходит диссоциация гидроксильной группы, появляется отрицательный заряд, с помощью

которого кислород взаимодействует с медью, возникает солеобразная связь; кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путём использования их неподелённых электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен. Схема реакции:

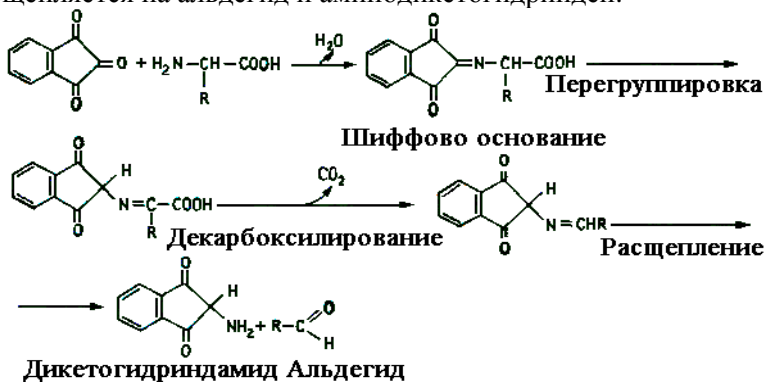


ХОД РАБОТЫ. Берут 5 пробирок и вносят по 0,5 мл: в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора α-аминокислоты. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора гидроксида натрия 10 % и по 5-6 капель раствора с массовой долей сульфата меди 1%. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 минут для развития окраски. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повы-

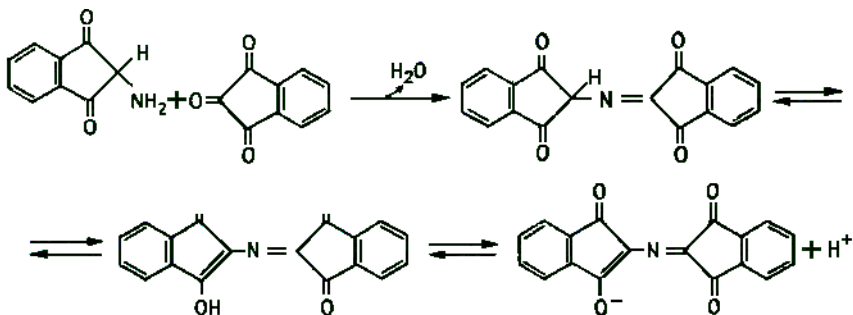
силь путём наложения на раствор белка в щёлочи 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1%. Результаты этой и всех других цветных реакций на белки и аминокислоты вносят в табл. 1.

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ. Белки, полипептиды, а также свободные α -аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином (трикетогидринденом). Реакция характерна для аминогрупп в α -положении и обусловлена наличием α -аминокислот в молекуле белка.

Сначала в результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминокетогидринден.

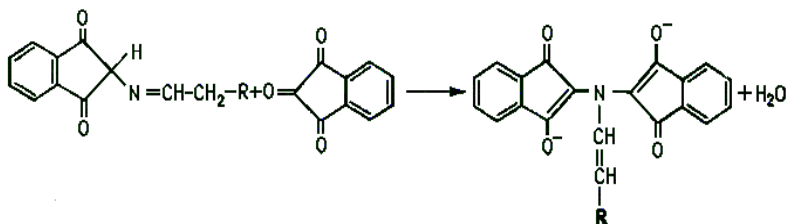


Аминокетогидринден конденсируется ещё с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизуясь, переходит в окрашенную форму, получившую название «Сине-фиолетовый Руэмана», по имени исследователя, впервые в 1910 г. Изучившего эту реакцию:



Сине-фиолетовый Руэмана

В присутствии органических растворителей (аcetона, этанола, пиридина и др.), на которых обычно готовят раствор нингидрина, протекает побочная реакция:



Продукт этой реакции содержит в своём составе радикал исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску (голубую, красную и т.п.) соединений, возникающих при реакции аминокислот с нингидрином.

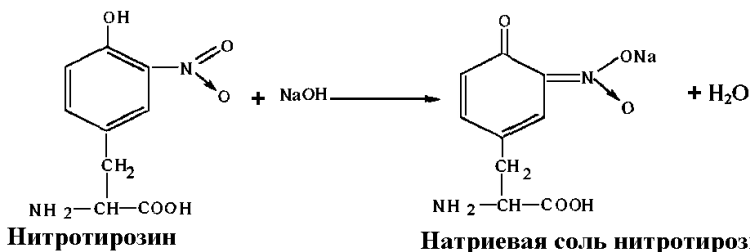
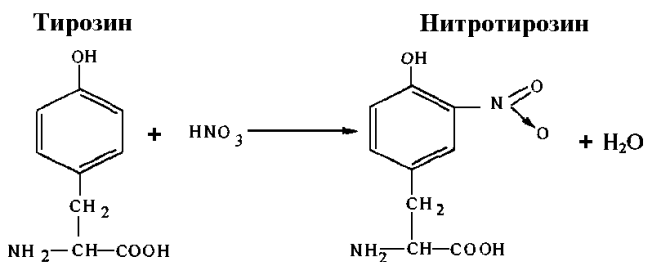
Очень легко реагируют с нингидрином α -аминокислоты. Наряду с ними сине-фиолетовый Руэмана образуют также белки, пептиды, первичные амины, аммиак и некоторые другие соединения. Вторичные амины, например пролин и оксипролин, дают желтую окраску.

Нингидриновую реакцию широко используют для обнаружения и количественного определения аминокислот.

ХОД РАБОТЫ. Берут пять пробирок, и вносят по 0,5 мл: в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора аминокислоты (глицина). Затем в каждую пробирку

добавляют по 10-12 капле раствора с массовой долей нингидрина в ацетоне или этаноле 1%. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и ставят их в кипящую водяную баню на 3-5 мин. Записывают химизм реакции, схему постановки опыта, строение окрашенных соединений. Результаты вносят в табл. 1.

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ. Эта реакция указывает на наличие в белках остатков ароматических аминокислот – тирозина, фенилаланина, триптофана. Основана на нитровании бензольного кольца радикалов этих аминокислот с образованием нитросоединений, окрашенных в желтый цвет (греческое «ксантос» – желтый). На примере тирозина эту реакцию можно описать в виде следующих уравнений.



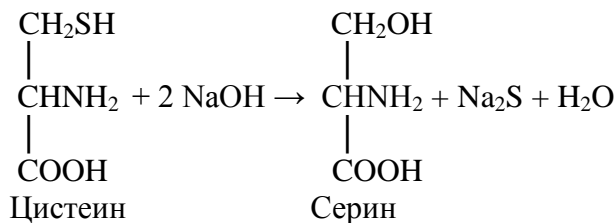
В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

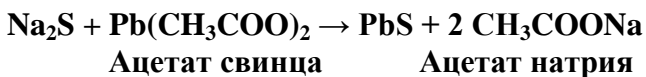
Ксантопротеиновую реакцию дают бензол и его гомологи, фенол и другие ароматические соединения.

ХОД РАБОТЫ. Берут четыре пробирки и вносят по 0,5 мл: в первую раствора казеина, во вторую – раствора яичного белка, в третью – раствора желатины, в четвертую – раствора фенола. Во все пробирки добавляют по 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое перемешивают встряхиванием и пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5-8 мин. Под действием кислоты появляется осадок белка, который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После бани пробирки выдерживают при комнатной температуре 4-5 мин и записывают окраску содержимого. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 30% (или другую щелочь). Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, окраску записывают. Работу оформляют в соответствии с табл.1.

РЕАКЦИЯ ФОЛЯ (на слабосвязанную серу). Этой реакцией открывают в белках радикалы цистеина содержащие как свободные – **SH** (тиоловые) радикальные группы, так и окисленные с образованием дисульфидных (**-S-S-**) связей цистина.

При нагревании белка, содержащего в молекуле остатки цистеина и цистина, с концентрированным раствором щелочи и ацетатом (или другой растворимой солью) свинца (реактив Фоля) образуется бурое или черное окрашивание. Это объясняют тем, что под действием щелочи от радикалов цистеина отщепляется сера в виде иона со степенью окисления минус два, который, взаимодействуя с ионом свинца (II), дает бурый или черный нерастворимый осадок сульфида свинца. Белки, в составе которых нет цистина и цистеина, реакцию Фоля не дают. Химизм процесса можно описать следующими реакциями:





При нагревании со щелочью часть белка подвергается гидролизу. Кроме того происходит отщепление части аминок групп (реакция дезаминирования) в виде аммиака, который можно обнаружить по запаху и посредством смоченной водой красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенок!).

ХОД РАБОТЫ. Берут четыре пробирки и вносят по 0,5 мл: в первую – воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатин. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 30 % и по 6-8 капель раствора с массовой долей ацетата свинца 5%, или можно приготовить реактив Фолья на всю подгруппу и добавить по 1 мл в каждую пробирку приготовленного раствора. Содержимое перемешивают встряхиванием, и пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5-7 мин. Окраску содержимого пробирок записывают. Результаты оформляют в табл. 1.

Таблица 1

Цветные реакции на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
1	2	3
Биуретовая реакция		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
Нингидриновая реакция		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		

Продолжение табл. 1

1	2	3
Аминокислота		
Ксантопротеиновая реакция		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Фенол		
Реакция Фоля (на слабосвязанную серу)		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		

Контрольные вопросы

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков.
2. Полипептидная теория строения белков Э.Фишера.
3. Как соединяются аминокислоты в молекуле белка и за счет каких групп? Соедините Ала, Цис, Сер. Дайте название полученному трипептиду.
4. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.
5. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.
6. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?
7. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.
8. Назовите аминокислоты имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.
9. Назовите аминокислоты содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
10. Напишите уравнение реакции образования дисульфидной связи.
11. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?
12. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α -аминокислот и почему?

Лабораторная работа № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА ПО КЬЕЛЬДАЛЮ

Цель работы: Определить общий азот в биологическом материале по методу Кьельдаля.

Реактивы: Серная кислота конц.; сульфат меди; сульфат калия или натрия; пероксид водорода; растворы с массовыми долями: гидроксида натрия 40%, борной кислоты 4%; раствор с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (или серной кислоты = 0,05 моль/л); смешанный индикатор, или индикатор Таширо (0,2 г метилового красного и 0,1 г метилового синего растворяют в 100 мл этанола).

Краткие теоретические положения

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

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

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

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

Азот биологических объектов делят на общий, белковый и небелковый. Общий – это весь азот органических и минеральных соединений, содержащийся в биологическом объекте – целом организме, молоке, зернах растений, плодах и фруктах, яйцах птиц, мышцах, крови и т.п.

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

Метод определения азота в биологических объектах и продуктах питания предложен Кьельдалем в 1883 году и до настоящего времени остается, по сравнению с другими методами, наиболее точным. Этим методом определяют отрицательно заряженный трехвалентный азот органических и минеральных соединений.

Принцип метода. Навеску анализируемого материала кипятят с концентрированной серной кислотой. При этом углерод органических веществ окисляется до диоксида углерода, водород – до воды; азот (отрицательно заряженный трехвалентный) превращается в аммиак, который с серной кислотой, взятой в избытке, образует сульфат аммония. Минерализованную пробу затем подщелачивают, аммиак отгоняют в раствор кислоты, где определяют титрованием.

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

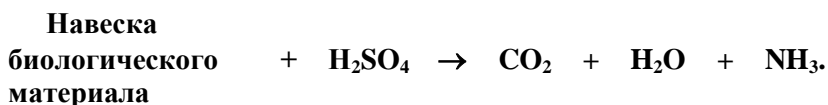
ХОД РАБОТЫ. Работу по определению общего азота в биологических объектах и пищевых продуктах условно можно разделить на три этапа: минерализация, отгонка аммиака, титрование и расчет.

1. **МИНЕРАЛИЗАЦИЯ.** Материал для исследования взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,0002 г и вносят, не касаясь краев, на дно колбы Кьельдаля проба для анализа должна содержать 10-20 мг азота.

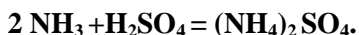
Исходя из этого отвешивают: сухой растительный материал – 300-500 мг, сухой животный материал – 100-200 мг, кровь, органы и ткани животных – 0,5-1,0 г, молоко – 2-4 г, молочная сыворотка – 10-20 г. В колбу добавляют 5-10 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84), 5-7 крупинок сульфата меди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

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

Параллельно с опытной ставят контрольную пробу с теми же реактивами, но без исследуемого материала. Химизм этого этапа можно выразить следующими уравнениями:



Образующиеся при минерализации диоксид углерода и вода улетучиваются, а аммиак вступает в реакцию с избытком серной кислоты:



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

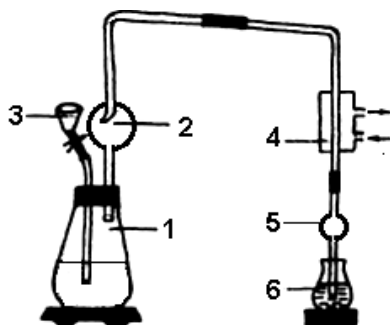


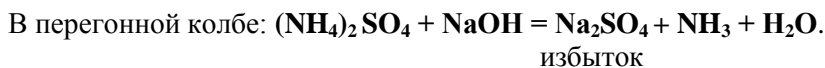
Рис.1 Аппарат для отгонки аммиака

По окончании минерализации колбу Кьельдаля с содержимым оставляют при комнатной температуре для охлаждения и собирают аппарат для отгонки аммиака. Затем в приемный стакан (или колбу) вносят 25 мл раствора с массовой концентрацией борной кислоты 4% или 20 мл раствора с концентрацией серной кислоты 0,05 моль/л (или соляной = 0,1 моль/л), 3-5 капель смешанного индикатора (имеет резкий переход цвета при рН 5,4 от сине-фиолетового в кислой среде к зеленому в щелочной) и ставят его так, чтобы нижний конец трубки, присоединённой к холодильнику, был погружён в раствор кислоты приёмной колбы. Охлаждённый минерализат разбавляют в 2-3 раза водой и из колбы Кьельдаля переносят в перегонную колбу. Колбу Кьельдаля ополаскивают 3-4 раза порциями воды по 20-30 мл, смыв выливают в перегонную колбу. При ополаскивании учитывают, чтобы общий объём жидкости в перегонной колбе составлял около 1/3 ее вместимости. В перегонную колбу вносят 3-5 капель индикатора Таширо, бросают несколько кусочков пемзы или короткие стеклянные трубочки для равномерного кипения и ставят на нагревательный прибор. Все части отгонного аппарата соединяют герметически, через воронку приливают к содержимому перегонной колбы раствор с массовой долей гидроксида натрия 40% до сильно щелочной реакции. При этом содержимое колбы окрасится в зеленый цвет. Нужный объем

добавляемой щелочи можно предварительно рассчитать по реакции нейтрализации.

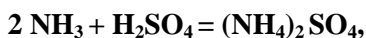
Включают холодильник и, нагревая содержимое перегонной колбы до кипения, отгоняют аммиак. Конец отгонки аммиака определяют по отсутствию изменения цвета красной лакмусовой бумажки при нанесении на нее капли жидкости, вытекающей из холодильника после отсоединения от него трубки с шариком.

Первую проверку на полноту отгонки аммиака проводят через 10-15 мин после полного прогревания каплеуловителя. Обычно отгонку заканчивают после увеличения в приемной колбе объема жидкости в 2,5-3 раза от первоначального. По такой же методике производят отгонку содержимого контрольной колбы. Реакции второго этапа можно записать в виде следующих уравнений:



В приемной колбе:

а) при улавливании отгоняемого аммиака раствором серной кислоты -



б) при улавливании отгоняемого аммиака раствором борной кислоты -



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

3. ТИТРОВАНИЕ И РАСЧЕТ. После окончания отгонки аммиака холодильник приподнимают так, чтобы свободный конец трубки с шариком находился над поверхностью жидкости приемной колбы и трубку изнутри и снаружи ополаскивают дистиллированной водой. Содержимое приемной колбы (погон) титруют раствором кислоты или щелочи, что зависит от соединения, применяемого для поглощения аммиака. При

отгонке аммиака в раствор борной кислоты погон титруют раствором с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной кислоты 0,05 моль/л) до четкого перехода зеленого цвета в сине-фиолетовый (промежуточная окраска сероватого тона). Реакции, происходящие при титровании, можно описать следующими уравнениями:



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

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

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

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

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

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

m – масса исследуемого вещества, г.

При отгонке аммиака в раствор серной (соляной) кислоты погон титруют раствором с концентрацией гидроксида натрия (реже калия) 0,1 моль/л до четкого перехода сине-фиолетового цвета в зеленый. В этом случае оттитровывают избыток раствора с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л (серной - 0,05 моль/л) взятого для поглощения аммиака.

Массовую долю азота в исследуемом материале рассчитывают по приведенной выше формуле с той лишь разницей,

что обозначения «a», «b» и «T» относятся не к кислоте, а к щелочи.

Умножая полученную массовую долю азота на 6,25 (фактор пересчета азота в белок), находят содержание в исследуемом материале «сырого» белка.

«Сырым» белок в этом случае называют потому, что при расчете исходят не из белкового азота, а из всего азота биологического объекта (или пищевого продукта), определенного методом Кьельдаля.

Массовые доли азота в белках некоторых биологических объектов и факторы пересчета азота в белок (белковые коэффициенты) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Массовая доля белка в биологических объектах

Наименование	Массовая доля азота в белке, %	Фактор пересчёта (белковый коэффициент)
Белки молока в целом	15,65	6,38
Белки животных организмов (кроме коллагена)	16,00	6,25
Белки зерна риса	16,80	5,95
Белки зерна овса и ржи	17,15	5,83
Белки зерна сои	17,51	5,71
Белки зерна пшеницы и ячменя	17,54	5,70
Коллаген (животный белок)	17,59	5,62
Белки зерна арахиса	18,31	5,46
Белки семян подсолнечника, льна и хлопчатника	18,88	5,30

Контрольные вопросы

1. Перечислите группы методов количественного определения белков.
2. Общая характеристика метода Кьельдаля и его этапов.
3. Техника проведения минерализации, и её химизм.

4. Техника и химизм отгонки аммиака.
5. Техника и химизм титрования. Расчет массы белка.
6. Назовите физические методы количественного определения белка. На чем они основаны?
7. Какие Вы знаете колориметрические (физико-химические) методы количественного определения белков? На чем они основаны?

Лабораторная работа № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С БИУРЕТОВЫМ РЕАКТИВОМ

Цель работы: Рассчитать массовую концентрацию белка в растворе яичного белка.

Реактивы: Вода дистиллированная; биуретовый реактив (в мерную колбу вместимостью 1 л вносят 500 мл воды, последовательно растворяют в ней 1,5 г кристаллогидрата сульфата меди и 6,0 г кристаллогидрата тартрата калия-натрия; приливают медленно при постоянном перемешивании 300 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 10% (свободного от карбонатов); для предотвращения образования осадка оксида меди (I) добавляют 1,0 г иодида калия; содержимое колбы доводят до метки водой и перемешивают; хранят реактив в парафиновой или пластиковой посуде); стандартный раствор казеина или другого белка, содержащий 10 мг белка в 1 мл (в мерной колбе вместимостью 100 мл взбалтывают с 60 мл воды 1,0 г чистого казеина и при помешивании добавляют 10-12 мл раствора с концентрацией гидроксида натрия 0,2 моль/л до растворения казеина; затем приливают по каплям при помешивании 10-12 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 0,1 моль/л до pH 7, содержимое доводят до метки водой и перемешивают); раствор исследуемого белка.

Метод основан на биуретовой реакции, образующей в щелочной среде окрашенные в фиолетовый цвет комплексы пептидных связей с ионами меди (II). Он известен в двух модификациях: макрометод и микрометод. Макрометод (макропре-

деление) применяют в случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (1-10 мг/мл); микрометод позволяет определить в 4 мл щелочного раствора 0,1-2 мг белка. На окраску, даваемую белками, оказывают влияние соли аммония, сахара, глицерин и др. Ниже приведено описание макрометода.

ХОД РАБОТЫ. Исследование начинают с построения калибровочного графика. Для чего готовят стандартный раствор белка (альбумина, глобулина, казеина или другого белка), содержащий 10 мг белка в 1 мл. Из стандартного раствора казеина (или другого белка) готовят в соответствии с табл. 3 ряд растворов белка известной концентрации.

Таблица 3

Разведение стандартного раствора белка

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

Берут еще три пробирки и наливают в них исследуемый раствор белка: в первую – 1,0 мл, во вторую – 0,5 мл и в третью – 0,25 мл. Затем во вторую и третью пробирки добавляют соответственно 0,5 и 0,75 мл воды (объем содержимого в каждой пробирке должен быть одинаковым и составлять на данном этапе 1 мл). Таким образом, во второй и третьей пробирках полу-

чают раствор исследуемого белка, разведенный соответственно в 2 и 4 раза. Эти разведения учитывают при расчете.

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

Оптическую плотность растворов (экстинкцию) измеряют на ФЭЖе при 540-650 нм (зеленый светофильтр) против контроля (проба № 1).

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

Закон Бера-Бугера-Ламберта гласит: прямая зависимость между концентрацией вещества и его оптической плотностью сохраняется в строго определенных параметрах концентраций. Для построения графика необходимо иметь усредненные данные экстинкций трех повторностей колориметрирования стандартных растворов. Соединив полученные точки прямой линией, получим калибровочный график. По калибровочному графику определяют массу белка в анализируемых пробах. На основании полученных данных рассчитывают массовую концентрацию белка в исследуемом растворе (учесть разведения).

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

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

где, V – объем экстракта альбуминов муки;
 m – масса навески муки;
1000 – коэффициент пересчета мг на г;
100 – коэффициент пересчета на 100 г муки.

При оформлении работы кратко описывают принцип метода. Поясняя на своем примере методику определения по калибровочному графику массы белка в пробе. На основании полученных данных составляют формулу для расчета массовой концентрации белка в исследуемом растворе.

Контрольные вопросы

1. Техника приготовления основного и стандартного растворов белка.
2. Техника проведения биуретовой реакции со стандартными и исследуемыми растворами белков.
3. Принцип и техника построения калибровочного графика. Минимум повторностей для построения калибровочного графика.
4. Методика и техника определения количества белка в исследуемом сырье или продукте колориметрическим методом.
5. Закон Бера-Бугера-Ламберта, его практическое значение для построения калибровочного графика и количественного определения белка в сырье или продукте по калибровочному графику.

Лабораторная работа № 4

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ СЕМЯН ЗЛАКОВЫХ И БОБОВЫХ

Цель работы: Выделить группы простых белков: альбумины, глобулины и проламины из семян пшеницы и гороха.

Реактивы: Растворы с массовыми долями: хлорида натрия 10%, этанола 70%, гидроксида натрия 10%, сульфата меди 1%, насыщенный раствор хлорида натрия.

Краткие теоретические положения

Процесс выделения белков включает следующие операции:

- измельчение биологического материала до однородной (гомогенной) массы (растения, органы и ткани животных, микроорганизмы);
- перевод белков в растворенное состояние (наиболее часто извлечение белков производят при одновременном измельчении биологического объекта);
- осаждение из раствора отдельных фракций (групп) белков;
- выделение индивидуального белка из смеси других белков.

Операции по выделению белков производят при температуре около 5°C с применением химических реагентов, щадящих нативную конформацию молекулы белка (применение кислот и щелочей, растворов солей тяжелых металлов для экстрагирования белков недопустимо).

Простые белки – протеины, состоят только из остатков α-аминокислот соединенных пептидными связями. Протеины выполняют разные функции в организме: структурную, каталитическую, регуляторную, защитную, сократительную и т. д. Протеины различаются аминокислотным составом и разделены на группы по способности к растворению в различных растворителях.

Альбумины – белки хорошо растворимые в воде и в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4-10% и выпадают в осадок из этих растворов при полном насыщении их этими же солями и сульфатом аммония. При кипячении выпадают в осадок в виде сгустков денатурированного белка. Альбумины широко распространены в животных и растительных организмах. Содержатся в сыворотке крови, белке яиц, мышцах, молоке, семенах, листьях, стеблях и корнях растений. Участвуют в качестве ферментов в каталитических реакциях; выполняют транспортную и питательную функции; альбумины сыворотки крови поддерживают кислотно-щелочное равновесие. Альбумины белка яиц и молока применяются в кондитерской промышленности.

Глобулины – не растворимы в воде, хорошо растворимы в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4-10%, выпадают в осадок при полунасыщении этих растворов. Глобулины встречаются во всех видах организ-

мов, наиболее распространены в растениях, особенно много их в семенах бобовых. В семенах растений являются запасными белками и ферментами. В животных организмах выполняют защитную и транспортную функции. Представители: глобулины сыворотки крови, глобулины молока, яичный глобулин, леугмин семян гороха, фазеолин семян фасоли и др.

Проламины – хорошо растворимы в растворе с массовой долей этанола 60-80% . Эта группа белков найдена только в семенах злаковых. В составе молекулы содержат 15% пролина, 30 – 45% глутаминовой кислоты. Выполняют функцию запасных веществ, некоторые проявляют ферментативную активность. Входят в состав клейковины. Представители: глиадины пшеницы и ржи, гордеин ячменя, зеин кукурузы, авенин овса.

Протамины (простейшие белки) – относительно небольшие белки с молекулярной массой до 10000. Протамины встречаются в большом количестве в молоках рыб. В составе молекулы этих белков содержится до 85% аминокислот с положительно заряженными радикалами (обычно аргинин) и 6-8 других аминокислот, что обуславливает их основные свойства. Протамины растворимы в слабых растворах кислот, не осаждаются при кипячении, имеют изоэлектрическую точку при рН 10-12, входят в состав белков нуклеопротеинов.

Гистоны – представляют собой основные белки с молекулярной массой от 12000 до 20000, содержащие в составе молекулы 20-30% аминокислот с положительно заряженными радикалами (обычно аргинин и лизин). Гистоны растворимы в разбавленных кислотах, осаждаются аммиаком и этанолом, имеют изоэлектрическую точку при рН 8,5. Содержатся главным образом в ядрах клеток животных и растений, где играют важную роль в структуре хроматина.

Глютелины – хорошо растворяются в слабых растворах щелочей. Они содержат до 45% глутаминовой кислоты. Содержатся в семенах злаков и других культур, а также в зелёных частях растений. К глютелинам относится глютеин семян пшеницы, оризенин семян риса, глютеин кукурузы. Глютелины вместе с проламинами входят в состав клейковины.

Протеиноиды (склеропротеины) – растворяются только в специфических растворителях. Протеиноиды являются фибриллярными белками. Эти белки входят в состав кожи, сухожилий, костей, хрящей (коллаген), волос, рогов, копыт, перьев (кератин), паутины. Кератины содержат до 3% серы. При длительном нагревании с водой коллаген превращается в растворимый желатин.

Сложные белки – состоят из белковой части и небелковой (протетической) группы различного происхождения. В зависимости от химической природы протетической группы различают: хромопротеины, фосфопротеины, липопротеины, гликопротеины, металлопротеины, нуклеопротеины.

Хромопротеины – состоят из простого белка, связанного с каким либо-либо окрашенным соединением небелкового характера. Эти белки обладают высокой биологической активностью. Одни из них участвуют в окислительно-восстановительных реакциях (флавопротеины), другие в процессе фотосинтеза (хлорофилл), третьи – в переносе кислорода и диоксида углерода (гемоглобин) и т.д.

Фосфопротеины – белки, содержащие в своём составе ортофосфорную кислоту, присоединённую сложноэфирной связью к остаткам серина, реже треонина. Фосфопротеины играют важную роль в питании как зародышей животных, так и молодого, растущего животного организма. Представители: казеин – главный белок молока, фосфовитин – белок яичного желтка и др.

Липопротеины – соединения, состоящие из липидов и специфических белков, связанных между собой гидрофобными и электростатическими взаимодействиями. Различают структурные липопротеины (нерастворимые) и свободные (эмульгированные). Структурные липопротеины входят в состав мембран клетки и её структурных образований, обеспечивают избирательную проницаемость мембран. Свободные липопротеины содержатся в плазме крови, молоке, желтке яиц и другие, занимают ключевое место в транспорте и обмене липидов.

Гликопротеины – белки, содержащие в качестве небелковой группы углеводы и их производные. Углеводный и белко-

вый компоненты в гликопротеинах соединены О- или N- гликозидными связями. Гликопротеины выполняют самые разнообразные функции: избирательного взаимодействия и высокоспецифичного узнавания, придают эластичность и упругость коже, хрящам и сухожилиям, транспортную и каталитическую функции. Представители: гликофорин - белок мембраны эритроцитов, вицилин – запасной белок семян бобовых.

Металлопротеины – сложные белки, в состав которых входят ионы одного или нескольких металлов, соединённые с белковой частью комплексной связью. Представители: ферритин, содержащий железо; амилаза, содержащая кальций и др. Некоторые металлопротеины содержат в качестве простетической группы несколько различных веществ. Например, в сукцинатдегидрогеназе наряду с производным флавина содержится железо и т.д.

Нуклеопротеины – комплексы нуклеиновых кислот с белками. Они содержатся в каждой клетке и выполняют важнейшие специфические функции, связанные с хранением и реализацией генетической информации. Белковой составляющей нуклеопротеинов могут быть гистоны, протамины и так называемые негистоновые белки. Из нуклеиновых кислот в состав нуклеопротеинов входят дезоксирибонуклеиновая кислота (**ДНК**) или рибонуклеиновая кислота (**РНК**).

Нуклеопротеины, содержащие ДНК, называют дезоксирибонуклеопротеинами (ДНП), а содержащие РНК – рибонуклеопротеины (РНП). ДНП и РНП – это сложные комплексы, построенные из одной-двух молекул нуклеиновых кислот и большого числа прикрепленных к ней белковых молекул. Представитель РНП – рибосомы, ДНП – хроматин.

Белки и нуклеиновые кислоты в нуклеопротеинах соединены между собой нековалентными взаимодействиями.

ХОД РАБОТЫ.

ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 минут, перемешивая

содержимое пробирок через каждые 6-10 минут. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции (см. стр. 14). По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора альбуминов пшеничной или гороховой муки добавить по 4 мл насыщенного раствора хлорида натрия то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛОБУЛИНОВ. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл раствора хлорида натрия с массовой долей 10%, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 минут, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 минут. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции (см. стр. 14). По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора глобулинов пшеничной или гороховой муки добавить по 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОЛАМИНОВ. В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл раствора этанола с массовой долей 70%, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 минут, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 минут. По истечении указанного времени со-

держимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут со скоростью 3000об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции (см. стр. 14). По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах.

Если к 2 мл раствора проламинов пшеничной или гороховой муки добавить по 2 мл воды, то белки выпадут в осадок, раствор мутнеет. Результаты записать в табл. 4.

Таблица 4

Содержание простых белков в пшенице и горохе

Объект исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Пшеница			
Горох			

Контрольные вопросы

1. Строение простых белков (протеинов).
2. Какие функции выполняют протеины?
3. Какой принцип положен в основу деления протеинов на группы?
4. Общая характеристика групп простых белков.
5. Общая характеристика групп сложных белков.
6. Назовите основные операции выделения простых белков.
7. Значение превращения биологического материала в гомогенную массу.
8. Растворимость и осаждаемость белков.
9. Выделение, обнаружение и осаждение альбуминов.
10. Выделение, обнаружение и осаждение глобулинов.
11. Выделение, обнаружение и осаждение проламинов.
12. Какие из выделяемых белков содержатся в пшеничной муке и горохе.

Лабораторная работа № 5

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель работы: Провести реакции осаждения белков при нагревании, минеральными кислотами, трихлоруксусной кислотой, ацетатом свинца и этанолом.

Реактивы: Вода дистиллированная; раствор белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, разбавляют водой до 250 мл, тщательно перемешивают и фильтруют через двойной слой марли); растворы с массовыми долями: уксусной кислоты 1% и 10%, гидроксида натрия 10%, трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 10%, ацетата свинца 5%, насыщенный раствор хлорида натрия; концентрированные кислоты: азотная, соляная; этанол 96%.

Краткие теоретические положения

Стабильность белковых растворов обусловлена двумя основными факторами: наличием заряда белковой молекулы и, обусловленной зарядом, гидратной оболочки вокруг нее. Устранение этих факторов приводит к осаждению белка из раствора. Реакции осаждения белков делят на две группы: обратимые и необратимые.

При необратимых реакциях осаждения белки подвергаются денатурации и, утрачивая свои нативные свойства, теряют способность растворяться в первоначальном растворителе. К этим реакциям относят: осаждение белков кислотами, солями тяжелых металлов, при нагревании и др.

При обратимых реакциях осаждения молекулы белка не подвергаются глубоким изменениям (разрушаются четвертичная и до 30% третичной структуры), сохраняют свои нативные (первоначальные) свойства и полученные осадки можно вновь растворить в первоначальном растворителе. К названным реакциям относят: осаждение белков этанолом и ацетоном при температуре минус 3÷5°С, высаливание (осаждение белков нейтральными солями – NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄) и др.

Реакции осаждения применяют для обнаружения белка в растворе, получения безбелковых фильтратов (например, при

определении сахаров в молоке или крови), выделения из раствора отдельных групп белков (фракционирования белков).

При температуре выше 50°C многие белки денатурируют и выпадают в осадок. Наиболее полное и быстрое осаждение их при нагревании происходит в **изоэлектрической точке (ИЭТ)**. В сильно кислых (за исключением азотной, ТХУ и сульфосалициловой кислот) и сильно щелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок. Это объясняют усилением заряда (или перезарядкой) молекул белка. Осадить белок из сильно кислых растворов можно добавлением растворов нейтральных солей.

Концентрированные минеральные кислоты (кроме ортофосфорной) вызывают необратимое осаждение белков. Это объясняют как явлениями дегидратации молекул белка, так и рядом других причин (денатурация, образование нерастворимых солей и др.). В избытке минеральных кислот, кроме азотной, выпавший остаток белка растворяется. Желатин не осаждается минеральными кислотами.

Из органических кислот в качестве осадителей белков широко применяют **трихлоруксусную кислоту (ТХУ)** и сульфосалициловую кислоту.

Механизм осаждения белков этими кислотами объясняют денатурацией и дегидратацией молекулы белка. ТХУ осаждает только белки и не осаждает продукты их гидролиза. Это имеет важное значение для определения белкового и небелкового азота. Сульфосалициловая кислота осаждает белки и высокомолекулярные пептиды.

Соли тяжелых металлов (ртути, серебра, свинца, меди и др.) вызывают необратимое осаждение белков, образуя с ними соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением нитрата серебра и дихлорида ртути), но нерастворимые в воде.

Растворение осадка в избытке раствора соли происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка. Способность молекул белка прочно связывать ионы тяжелых металлов с образованием нерастворимых в воде осадков используется как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и другими металлами.

Механизм действия спирта и других органических растворителей (ацетона, хлороформа) объясняют дегидратацией молекул белка, что ведет к понижению устойчивости их в растворе. Если к раствору белка предварительно добавить хлорид натрия, осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда с коллоидной частицы.

Если осаждение проводить на холоде (от 4 до 0°C) и осадок быстро отделить от спирта, то белок может раствориться в воде, т.е. денатурация не успевает произойти, и осаждение обратимо. При длительном стоянии со спиртом белок денатурирует необратимо и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ПРИ НАГРЕВАНИИ

ХОД РАБОТЫ. В пять пробирок вносят по 1мл раствора белка яиц (альбумина). Альбумин яиц – кислый белок и в нейтральной среде имеет отрицательный заряд.

Содержимое **первой пробирки** нагревают. Жидкость мутнеет (появление опалесценции), но осадок не образуется или его очень мало. Это объясняют тем, что частицы белка в нейтральной среде имеют отрицательный заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во **вторую пробирку** добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 1% и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок белка. Это объясняют тем, что рН среды приближается к изоэлектрической точке и молекула белка теряет заряд.

В **третью пробирку** добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 10% и содержимое нагревают. Осадок белка в этом случае не образуется, так как в сильно кислой среде частицы белка приобретают значительный положительный заряд.

В **четвертую пробирку** добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 10%, одну каплю раствора насыщенного хлоридом натрия и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок, так как вследствие адсорбции ионов хлорида натрия (образование двойного электрического слоя) про-

исходит нейтрализация положительного заряда на частицах белка; наступает момент, когда силы притяжения между молекулами превышают силы отталкивания, и белок выпадает в осадок.

В **пятую пробирку** добавляют две капли раствора с массовой долей гидроксида натрия 10% и нагревают. Осадка белка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

Нагревание пробирок производят в кипящей водяной бане (лучше всех пробирок одновременно). Желатин при нагревании в осадок не выпадает. Результаты опыта и выводы оформляют в виде табл. 5.

Таблица 5

Осаждение белков при нагревании

№ пробирки	Реакция среды	Наблюдаемые изменения	Причина изменений
1	Нейтральная		
2	Слабокислая		
3	Сильнокислая		
4	Сильнокислая + NaCl		
5	Щелочная		

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

ХОД РАБОТЫ. В две пробирки вносят 1,5-2,0 мл следующих концентрированных кислот: в первую – соляной, во вторую – азотной. Затем, наклонив пробирки под углом 45°, осторожно по стенке наслаивают 0,5-1,0 мл раствора белка (молоко или раствор яичного белка). На границе соприкосновения двух слоев образуется осадок в виде белого кольца. Пробирки осторожно встряхивают и наблюдают за состоянием осадка. Осадок, выпавший при действии азотной кислоты, увеличивается, а осадок, выпавший при действии соляной кислоты, растворяется в их избытке. Результаты этой и всех последующих реакций вносят табл. 6.

Осаждение белков

№ пробы	Название осадителя	Характер осадка	Растворимость осадка в избытке осадителя
1	Соляная кислота		
2	Азотная кислота		
3	Трихлоруксусная кислота		
4	Ацетат свинца		
5	Этанол		

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают по 1 мл раствора белка яиц и добавляют равный объем раствора с массовой долей ТХУ 10%. Выдерживают 5 мин и результат опыта вносят в табл. 6.

При осаждении белков конечная концентрация органических кислот в растворе должна быть не менее 2,5-5%. При осаждении белков молока она должна составлять 12%.

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают по 1 мл раствора белка яиц и медленно, по каплям при встряхивании прибавляют до появления осадка раствор с массовой долей ацетата свинца 5%. Результаты опыта вносят в табл. 6.

ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ЭТАНОЛОМ

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают 1мл раствора яичного белка, добавляют на кончике ножа (0,2 г) хлорида натрия и энергично встряхивают. Затем постепенно (каплями) приливают 2 мл этанола. Энергично встряхивают и оставляют в штативе.

Через 4-6 мин появляется мелкий осадок белка. Результаты записать в табл. 6.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе.
2. Причины осаждения белков нагреванием при рН около 7,0?
3. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
4. Почему в растворе при рН<7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
5. Почему в растворе при рН>7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
6. Почему в растворе при рН<7,0 с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
7. Механизм действия минеральных кислот на молекулы белков в растворе.
8. Механизм осаждения белков органическими кислотами.
9. Механизм осаждения белков солями тяжелых металлов.
10. Механизм осаждения белков органическими растворителями.
11. Растворимость и осаждаемость белков.

Глава 3. ФЕРМЕНТЫ

Ферментами (энзимами) называют специфические белки, обладающие каталитическим действием. Каталитические свойства ферментов проявляются и вне живой клетки. На этом основано практическое применение ферментов во многих отраслях промышленности. В хлебопекарном производстве для ускорения гидролиза крахмала и улучшения качества теста используют амилазы. При приготовлении детской пищи с целью облегчения переваривания углеводов и белков исходные продукты обрабатываются амилазой и протеиназами. Протеиназы значительно ускоряют процесс мягчения мяса, улучшают его консистенцию при производстве консервов. Протеиназы и пектиновые ферменты оказываются полезными реагентами в виноделии и приготовлении соков. Некоторые ферменты используют

как лекарственные средства: например, пепсин, трипсин, химотрипсин и др.

Ферменты входят в состав всех клеток и тканей живых организмов и способны катализировать реакции, как внутри организма, так и при оптимальных условиях вне его (например, свертывание молока пепсином, сычужным ферментом, гидролиз сахарозы и т.п.). Ферменты синтезируются в клетках живых организмов постоянно. Подобно неорганическим катализаторам ферменты повышают скорость химических реакций за счет понижения энергии активации. Однако делают они это с более высокой эффективностью (в 10^5 - 10^{12} раз) при температуре 36-50°C и pH близких к 7,0.

Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур. Выделяют ферменты при температуре близкой к нулю. Хранят растворы ферментов только в холодильнике, причем и в этих условиях они быстро теряют активность. В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, работу часто проводят с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой частично очищенные ферменты или вытяжки из биологических объектов.

Вещество, превращение которого вызывает фермент, называют субстратом; выдерживание субстрата с ферментом – инкубацией. О присутствии фермента в биологическом объекте или вытяжке из него судят по превращению соответствующего субстрата.

Лабораторная работа № 6

СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ И ФЕРМЕНТОВ

Цель работы: Сравнить температуру действия серной кислоты и амилазы солода.

Реактивы: Вода дистиллированная; растворы с массовыми долями: крахмала 1%, соляной (или серной) кислоты 10%; водный раствор йода; вытяжка из солода (20 г измельченного солода растирают в ступке с небольшим количеством воды до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 2 часа (можно поставить в холодильник на ночь). По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течении 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Центрифугат используют в качестве источника амилазы).

Краткие теоретические положения

Ферменты отличаются от неорганических катализаторов. Это отличие состоит в том, что ферменты функционируют только в водной среде, при атмосферном давлении, при температуре 30-40°C (за некоторым исключением), при pH среды от 2 до 10 (зависит от конкретного фермента) и очень интенсивно.

Амилазы – группа ферментов подкласса гликозидаз (3.2), катализирующих гидролиза крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов и олигосахаридов путём разрыва гликозидных связей. Они содержатся в тканях животных и растений, микроорганизмах, слюне, молоке, крови и др. жидкостях организма. Высокой амилазной активностью обладают слюна и солод.

ХОД РАБОТЫ. В пять пробирок наливают по 3 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по 1 мл раствора с массовой долей серной или соляной кислоты 10%. Содержимое перемешивают встряхиванием и первые три пробирки ставят в термостат при 37-38°C, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждую добавляют по 3 капли водного раствора йода. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона. Записывают окраску содержимого каждой

пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты оформить в виде табл. 8.

Таблица 8

Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

№ пробы	Субстрат, 3 мл	Катализатор, 1 мл	Температура инкубации, °С	Окраска с йодом
1	Крахмал	Вода	37 – 38	
2	Крахмал	Амилаза	37 – 38	
3	Крахмал	Кислота	37 – 38	
4	Крахмал	Кислота	100	
5	Крахмал	Вода	100	

Контрольные вопросы

1. В каких пробирках отмечен гидролиз крахмала и какова его глубина?
2. Назовите катализаторы, которые осуществили гидролиз крахмала в данном опыте.
3. Назовите наиболее эффективный катализатор и объясните его преимущества.
4. Как влияла температура на активность небиологического катализатора и почему?
5. При каких условиях действуют ферменты?
6. Ферменты: определение, строение одно- и двухкомпонентных ферментов.
7. При каких условиях действуют ферменты.

Лабораторная работа № 7

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ И САХАРАЗЫ

Цель работы: Выделить амилазу слюны. Изучить специфичность действия амилазы слюны и сахаразы дрожжей.

Реактивы: Вода дистиллированная; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %, соляной (или серной) кислоты 10%, сахарозы 1%, гидроксида натрия 10%, сульфата меди 5%; водный раствор йода; слюна разбавленная 1:3 (хорошо прополаскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой, набрать в рот 2-3 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1% и держать 4-5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы); сахараза (в фарфоровую ступку вносят 1 г прессованных пекарских дрожжей и тщательно растирают в 3 мл воды в течение 5 мин . Затем добавляют 17 мл воды, перемешивают и ставят ступку в термостат при 37°C на 20 мин. Через каждые 5 мин содержимое перемешивают. По истечении указанного времени смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3,5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и используют как водный экстракт сахаразы).

Краткие теоретические положения

Специфичность действия ферментов – это способность катализировать одну или несколько близких реакций, преобразовывать одно вещество или один вид связей. Специфичность ферментов бывает нескольких видов: **абсолютная, относительная (групповая), стереохимическая.**

Абсолютная специфичность – фермент катализирует превращение только одного субстрата. Например, фермент каталаза катализирует расщепление пероксида водорода на воду и кислород.

Относительная, или групповая специфичность – фермент катализирует несколько близких по строению соединений, действует на один и тот же тип связи. Например, фосфатазы действуют на эфиры фосфорной кислоты.

Стереохимическая специфичность – фермент преобразует определённый стереоизомер. Например, пептидгидролазы действуют только на пептиды, образованные аминокислотами L-ряда.

Ферменты отличаются от катализаторов небиологической природы высокой специфичностью, что обусловлено индивидуальными особенностями строения активных центров различных ферментов.

Активный центр фермента – это трёхмерное образование в виде углубления на ферменте, который формируется из аминокислотных остатков полипептидной цепи в пространстве, на третичной и четвертичной структурах. В нём условно выделяют «каталитически активный» участок, где происходит превращение субстрата, и так называемый контактный или «якорный» участок, который обеспечивает связывание субстрата с ферментом.

Пространственная структура активного центра предопределяет не только комплементарность субстрату, но и природу последующих превращений субстрата в фермент-субстратном комплексе, приводящих к образованию соответствующего продукта. Будучи высокоспецифичной, ферментативная реакция протекает в 10^5 - 10^{12} раз быстрее, чем самопроизвольная (спонтанная) реакция.

Для изучения специфичности этих ферментов используем амилазу слюны и сахаразу хлебопекарных дрожжей. Амилаза слюны (3.2.1.1) по механизму действия является α -амилазой. Катализирует гидролиз α (1 \rightarrow 4) гликозидных связей в молекуле крахмала (и гликогена) без определенного порядка. Процесс гидролиза происходит как бы ступенчато и может быть выражен в виде схемы:

Крахмал \rightarrow Амилодекстрины \rightarrow Эритродекстрины \rightarrow Ахродекстрины \rightarrow Мальтодекстрины \rightarrow Мальтоза. Глубину гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с раствором йода табл. 9.

Сахаразу из дрожжей имеет более правильное рабочее название β -фруктофуранозидаза (3.2.1.26). Катализирует гидролиз β -гликозидных связей в молекулах как сахарозы, так и раффинозы, при этом сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу, которые обнаруживаются реакцией Троммера. Сахароза содержится в высших растениях и микроорганизмах. В большом количестве β -фруктофуранозидаза содержится в

дрожжах, из которых её получают в виде очищенных ферментных препаратов.

Таблица 9

Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилдекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 тыс. до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Жёлтая
Мальтоза	342	Жёлтая

ХОД РАБОТЫ. Берут 6 пробирок и пробы для опыта готовят в соответствии с табл. 10.

Содержимое перемешивают и пробирки помещают в термостат при температуре 37-38°C на 20 мин. После инкубации с пробирками № 1, 2 и 3, где в качестве субстрата был крахмал, проводят пробу с йодом, с другими (№ 4, 5, 6), где в качестве субстрата была сахароза проводят реакцию Троммера.

Таблица 10

Схема изучения специфичности действия ферментов

№ пробы	Субстрат, 3 мл	Фермент, 1 мл	После инкубации	
			Проба с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	Вода		Не делать
2	Крахмал	Амилаза		Не делать
3	Крахмал	Сахараза		Не делать
4	Сахароза	Вода	Не делать	
5	Сахароза	Амилаза	Не делать	
6	Сахароза	Сахараза	Не делать	

Реакция Троммера. К содержимому пробирок добавляют 2 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия

10 %, при встряхивании по каплям раствор с массовой долей сульфата меди 5% до появления не исчезающей муты гидроксида меди (II). Содержимое пробирок нагревают на водяной бане до изменения цвета. Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие восстанавливающих сахаров (глюкозы и фруктозы), которые в щелочной среде восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I), сами при этом окисляются до альдоновых кислот.

Результаты опыта вносят в табл. 10 и делают вывод о специфичности амилазы слюны и сахаразы из дрожжей.

Контрольные вопросы

1. Характеристика специфичности действия фермента.
2. Чем обусловлена специфичность действия каждого фермента?
3. К какому классу и подклассу относятся ферменты α -амилаза и сахараза?
4. Как определить специфичность действия ферментов?
5. Какую реакцию катализирует амилаза слюны?
6. Какую реакцию катализирует сахараза и почему её называют β -фруктофуранозидазой?
7. Как можно обнаружить продукты гидролиза крахмала? Назовите продукты и их окраску с йодом.
8. Какой реакцией можно обнаружить продукты гидролиза сахаразы? В чем химизм этой реакции.
9. Строение активного центра ферментов.

Лабораторная работа № 8

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ (на активность ферментов)

Цель работы: Определить оптимум температуры для активности амилазы солода при гидролизе крахмала.

Реактивы: Вода дистиллированная; вытяжка из солода; раствор йода в йодиде калия; растворы с массовыми долями: крахмала 1%, серной (или соляной) кислоты 10%.

Краткие теоретические положения

Белковая природа обеспечивает ферментам характерные для белков строение и свойства и, прежде всего, лабильность, т.е. способность изменять активность в зависимости от различных факторов (температуры, pH, концентрации фермента и концентрации субстрата, активаторов и ингибиторов и т.п.). Степень изменения активности от различных факторов можно определить по скорости ферментативной реакции. Мерой скорости ферментативной реакции служит количество субстрата, подвергшегося превращению в единицу времени, или количество образовавшегося продукта. При изучении влияния какого-либо фактора на скорость ферментативной реакции все прочие факторы должны оставаться неизменными и по возможности иметь оптимальные значения.

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Оптимальным считается то значение ее, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. Для большинства ферментов, выделенных из организма теплокровных и многих микроорганизмов оптимальная температура составляет 37-40°C, для ферментов растительного происхождения – 40-50°C. Повышение температуры сверх оптимальной приводит к уменьшению, а затем прекращению действия фермента, что связано с денатурацией. При переходе от оптимальной к низким температурам скорость ферментативной реакции падает в 2-2,5 раза на каждые 10°C, достигая минимальной величины при 0°C и приостанавливается при отрицательных её значениях (минус 18°C). Причиной является снижение скорости движения молекул субстратов и ферментов, что замедляет образование фермент-субстратного комплекса и проведения реакции. При повышении температуры от отрицательных значений действие ферментов восстанавливается, скорость катализируемых реакций возрастает в 2-2,5 раза на каждые 10°C, до оптимальной температуры. Принцип снижения активности ферментов при

понижении температуры используется при консервировании сырья и готовой продукции низкими температурами. Инактивация ферментов высокой температурой необратима, используется в пищевой промышленности для консервирования многих продуктов растительного и животного происхождения.

ХОД РАБОТЫ. В штативе располагают двумя рядами 8 пробирок (по 4 пробирки в ряду). Во все пробирки одного ряда наливают по 3 мл раствора крахмала; во все пробирки другого ряда по 0,5 мл вытяжки из солода. Первые пробирки из обоих рядов (одна с ферментом, другая с крахмалом) помещают в лед или снег, вторые – оставляют при комнатной температуре, третьи – в термостат при 37-38°C, четвертые – в кипящую водяную баню. Через 10 мин содержимое каждой пары пробирок объединяют вместе (приливают крахмал к ферменту), перемешивают и пробирки с содержимым оставляют в тех же условиях. Этот момент считать началом опыта.

Не теряя времени, берут 3 чистые пробирки, вносят в них по 0,5-1 мл воды и по 3 капли раствора йода. Эти пробирки нужны для наблюдения за ходом гидролиза крахмала амилазой по реакции с йодом.

По истечении 2-5 мин инкубации из пробирки, стоящей при комнатной температуре, отбирают 0,2-0,3 мл инкубируемой смеси и вносят ее в одну из пробирок с раствором йода. Если появляется синее или фиолетовое окрашивание, то все пробирки оставляют в тех же условиях еще на 5 мин. После истечения этого времени реакцию с йодом повторяют. В случае появления красных тонов окраски содержимого пробирки, стоящей при комнатной температуре, инкубацию прекращают. Сразу же все пробирки собирают в штатив и в каждую добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной (или соляной) кислоты 10% и по 3 капли раствора йода, содержимое перемешивают.

Глубину гидролиза крахмала определяют по окраске с раствором йода, результат записывают в табл.11.

На основании полученных данных строят график зависимости скорости ферментативной реакции от температуры. При построении графика по оси ординат, начиная от нуля,

обозначить цвета в следующей последовательности: синий, фиолетовый, красный (объединяя все его тона), оранжевый, желтый; по оси абсцисс – температуру, обозначив разрыв между 40 и 100°C. Сделать выводы.

Таблица 11

Влияние температуры на активность ферментов

Температура инкубации, °С	Окраска с йодом	Название обнаруженных продуктов на основании окраски
0		
18 – 22		
37 – 38		
100		

Контрольные вопросы

1. Перечислите факторы среды, влияющие на активность ферментов (скорость ферментативной реакции).
2. Назовите оптимальные температуры для ферментов животного, растительного и микробного происхождения.
3. Как влияет снижение температуры, от оптимальной до 0°C и ниже, на скорость ферментативной реакции. Чем можно объяснить влияние этого фактора?
4. Как влияет повышение температуры от минусовых значений до оптимальной, на скорость ферментативной реакции?
5. Как влияет повышение температуры от оптимальной до 70°C и выше, на активность фермента. Чем объясняется влияние этого фактора?
6. Какая температура, в исследовании, была оптимальной, и как Вы это установили?
7. При каких температурах в исследовании, амилаза «не работала». Как Вы это установили? Объясните влияние этих факторов?
8. Практическое использование знаний о влиянии температуры на активность ферментов.

Лабораторная работа № 9

ВЛИЯНИЕ pH НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Цель работы: Определить оптимум pH для активности амилазы солода при гидролизе крахмала.

Реактивы: Вода дистиллированная; раствор йода в йодиде калия; вытяжка из солода; растворы с массовыми долями: крахмала 1%, серной (или соляной) кислоты 10%; буферные растворы с указанными значениями pH.

Краткие теоретические положения

Ферменты при постоянной температуре работают наиболее эффективно в пределах pH (от 2 до 10). Оптимальным считается то значение pH, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. Отклонение в любую сторону от этого значения сопровождается снижением скорости ферментативной реакции. Это объясняется тем, что ферменты имеют большое число полярных, положительно и отрицательно заряженных групп, участвующих в поддержании нативной конформации, образовании фермент-субстратного комплекса и проведении реакции.

Во многих случаях субстраты являются электролитами, и реакция осуществляется лишь с определенными (ионизированными или неионизированными) их формами, возникающими при оптимуме pH.

Многие ферменты являются двухкомпонентными (сложными белками), небелковый компонент которых слабо связан с белком ионными, водородными связями в условиях оптимума pH. Сдвиги pH за пределы оптимума вызывают диссоциацию кофактора и разрушение структуры активного центра. Например, пероксидаза диссоциирует в кислой среде на два компонента, однако при pH 7,0 её структура и активность восстанавливаются.

При очень низких и очень высоких значениях рН ферменты денатурируют.

ХОД РАБОТЫ. Нумеруют 5 пробирок и в каждую вносят по 5 мл буферного раствора со следующими значениями рН: 1,68; 2,2; 4,49; 6,81; 9,18. Пипетки после внесения каждого буферного раствора промывают. Во все пробирки добавляют по 2 мл раствора крахмала и по 0,5 мл вытяжки из солода. Содержимое перемешивают. Оставляют при комнатной температуре на 4 минуты. Готовят 3 пробирки с водным раствором йода (0,5 мл воды и 3 капли йода). Через 4 минуты инкубации из третьей пробирки отбирают 0,2 мл смеси и вносят в первую пробирку с йодом. Если появилось синее или фиолетовое окрашивание, то все пробирки оставляют ещё на 5 минут. После этого реакцию с йодом повторяют. Если появилось красное или коричневое окрашивание инкубацию прекращают. Сразу во все пробирки вносят по 1 мл раствора серной кислоты 10% и по 3 капли йода. Содержимое пробирок перемешивают. Результат оформляют в табл. 12.

Таблица 12

Влияние рН на активность амилазы солода

Показатели	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
рН	1,68	2,2	4,49	6,81	9,18
Окраска с йодом					

Строят график глубины гидролиза крахмала амилазой солода в зависимости от рН.

Контрольные вопросы

1. Как определить изменение активности амилазы под влиянием рН?
2. Характеристика оптимального рН и её параметры для амилазы солода.

3. Каковы физико-химические основы влияния оптимальной pH на активность ферментов?
4. Каковы физико-химические основы влияния на активность ферментов сдвига pH от зоны оптимума в любую сторону?
5. Практическое применение знаний о влиянии pH на скорость ферментативных реакций и процессов.

Лабораторная работа № 10

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

Цель работы: Выделить α - и β -амилазу из солода. Определить активность амилаз солода.

Реактивы: Вода дистиллированная; вытяжка из солода (приготовление см. с. 38); ацетатный буфер pH 5,5 (к 57,4 мл раствора с концентрацией уксусной кислоты 1 моль/л добавляют 50 мл раствора с концентрацией гидроксида натрия 1 моль/л и общий объем доводят водой до 500 мл); раствор с массовой долей крахмала 2% (суспензируют 2 г растворимого крахмала в 20 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 80 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, после охлаждения объем доводят водой до 100 мл и содержимое перемешивают); раствор с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л; раствор с массовой долей йода 0,3 % в растворе с массовой долей йодида калия 3 % (0,3 г йода кристаллического и 3 г йодида калия смешивают с 3-5 мл воды и после растворения йода объем доводят водой до 100 мл).

Краткие теоретические положения

Активность фермента – это способность фермента преобразовывать субстрат за единицу времени.

Для выражения каталитической активности Комиссией по ферментам Международного биохимического союза (1961 г.) была рекомендована стандартная единица, обозначаемая на русском языке – Е, а на английском – U.

Стандартная единица – это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за одну минуту. При определении числа стандартных единиц фермента в исследуемом объекте рекомендуется, где это возможно, придерживаться температуры 25°C; pH и концентрация субстрата должны быть по возможности оптимальными. Температура 25 °C рекомендуется в связи с тем, что она является стандартной в физической химии. В 1964 г. Международный биохимический союз во втором издании своих рекомендаций предложил проводить исследование при температуре 30 °C.

Это было сделано в связи с тем, что климатические условия ряда стран затрудняют термостатирование при 25 °C.

В 1972 г. Комиссия по ферментам Международного биохимического союза предложила выражать активность ферментов в **каталах**. **Катал** (обозначение – кат) – это такое количество фермента, которое способно превращать один моль субстрата за одну секунду (при оптимальных условиях). Эта единица каталитической активности фермента находится в соответствии с единицами измерения системы СИ. В настоящее время катал является **официальной единицей** каталитической активности.

К производным величинам, характеризующим активность ферментов, относят удельную каталитическую активность ферментов, концентрацию фермента в растворе и другие. Удельную каталитическую активность фермента или ферментативного препарата выражают в каталах на 1 кг белка ($\text{кат}\cdot\text{кг}^{-1}$) или чаще в мккат на 1 мг белка. Концентрацию фермента в растворе выражают в каталах на 1 литр ($\text{кат}\cdot\text{л}^{-1}$) или в других кратных этому значению величинах.

Перечисленные выше единицы являются абсолютными, что дает возможность сравнивать активность как различных ферментов, так и одинаковых ферментов, но выделенных из различных биологических объектов.

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

Выделение α - и β -амилазы из солодовой водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и рН среды. При нагревании солодовой вытяжки до 70°C β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. α -амилаза чувствительна к подкислению (оптимум рН 5,6-6,3), но термостабильна (температурный оптимум 65°C). Оптимум действия β -амилазы проявляется при рН 4,8, однако α -амилаза при таких значениях рН теряет свою активность, а при понижении до рН 3,3 – денатурирует. Оптимум температуры для β -амилазы 51°C.

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

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

ВЫДЕЛЕНИЕ α -АМИЛАЗЫ

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

ВЫДЕЛЕНИЕ β -АМИЛАЗЫ

ХОД РАБОТЫ. В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл раствора с концентрацией соляной кислоты равной 0,1 моль/л (рН полученной смеси должен быть 3,3). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на снег или лед (можно в морозильную камеру холодильника). В этих

условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде к содержимому колбы добавляют 2 мл раствора с концентрацией гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) 0,15 моль/л для того, чтобы рН довести до 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ СОЛОДА (по массе гидролизованного крахмала)

Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывают по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по окончании опыта нерасщепленным крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. При проведении опыта продолжительность инкубации и объем раствора ферментного препарата устанавливают таким, чтобы в опытных пробирках (содержащих фермент) не произошел полный гидролиз крахмала.

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

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

Содержимое в пробирках перемешивают и ставят в термостат при 37-38°C на 30 мин. Такая постановка опыта позволяет одновременно определить суммарную активность амилаз в солодовой вытяжке (α - и β -амилаз вместе), активность α -амилазы и активность β -амилазы. По окончании времени инкубации пробирки из термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 мл раствора с концентрацией

соляной кислоты 1моль/л и по 3 капли водного раствора йода; содержимое перемешать.

Таблица 13

Определение активности амилаз солода

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

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

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

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

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

где, m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг;
 E_k – оптическая плотность контрольного раствора;
 E_o – оптическая плотность опытного раствора;
 C – масса внесенного крахмала, мг (3 мл раствора с массовой долей крахмала 2% содержат 60 мг крахмала).

Полученный результат умножают на разбавление (см. табл. 14), т.е. приводят к 1 мл исходной ферментной вытяжки и затем делят на время инкубации (30 мин), что позволяет выразить активность амилазы в мг расщепленного крахмала 1 мл ферментной вытяжки за 1 мин.

Зная методику приготовления вытяжки из биологического объекта, можно легко рассчитать активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г биологического материала за 1 мин по формуле:

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

где, A – активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1г солода (или другого материала) за 1 мин;
 E_k – оптическая плотность контрольного раствора;
 E_o – оптическая плотность опытного раствора; 60 – масса взятого для анализа крахмала, мг (в 3 мл 2 % раствора содержится 60 мг крахмала);
 V – общий объем солодовой вытяжки, полученной из солода (100 мл);
 V_1 – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, мл;
30 – время инкубации, мин;
 m – масса солода, взятого для приготовления солодовой вытяжки.

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

Результаты исследований записывают и делают выводы об активности амилаз солода.

Контрольные вопросы

1. Какие ферменты содержатся в солоде и как их можно выделить?
2. Техника выделения α -амилазы. На чем она основана?
3. Метод выделения β -амилазы, на чем он основан?
4. Специфичность действия и активность α -амилазы.
5. Специфичность действия и активность β -амилазы.
6. Оптимум температуры и рН для активности α -амилазы и β -амилазы?
7. Какие продукты гидролиза крахмала образовались при действии α -амилазы и β -амилазы?
8. Активность ферментов: определение, единицы активности.
9. Расчет активности и характеристика полученных результатов.

Лабораторная работа № 11

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ПО ВОЛЬГЕМУТУ

Цель работы: Определить влияние активатора хлорида натрия и ингибитора сульфата меди на активность амилазы солода при гидролизе крахмала.

Реактивы: Вода дистиллированная; вытяжка из солода; растворы с массовыми долями: крахмала 1%; хлорида натрия 1%; сульфата меди 1%; серной (или соляной) кислоты 10%; раствор йода в йодиде калия.

Краткие теоретические положения

Активность ферментов, помимо температуры и рН, в значительной степени зависит от наличия и концентрации в

реакционной среде некоторых ионов и соединений. Одни из них усиливают активность ферментов – активаторы, другие действуют угнетающе – ингибиторы. Одни из регуляторов – активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного или малоактивного фермента, увеличивают активность до максимальной. Эту функцию часто выполняют ионы металлов: калия, кальция, магния, цинка, железа, марганца, кобальта и анион хлора. Ряд протеиназ (катепсины, папаин), аргиназа активируются молекулами цистеина, восстановленного глутатиона, имеющих свободную HS-группу.

Нарастание активности ферментов под действием металлов объясняется тем, что в одних случаях ионы металлов выполняют роль кофакторов, в других – облегчают образование фермент-субстратного комплекса, в третьих – способствуют присоединению кофермента к апоферменту, в четвертых обеспечивают стабилизацию третичной и четвертичной структуры фермента.

Скорость ферментативной реакции (активность ферментов) регулируется присутствием в среде ингибиторов и активаторов, в качестве которых в организме работают ионы металлов и низкомолекулярные промежуточные метаболиты.

Ингибиторами называют вещества, вызывающие частичное или полное торможение химических реакций, включая и ферментативные. Подавление активности какого-либо фермента, участвующего в важном процессе обмена, приостанавливает весь процесс, что приводит к серьезным нарушениям обмена веществ и даже гибели организма.

Ферменты теряют каталитическую активность при воздействии различных факторов, вызывающих денатурацию (нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов и др.). Подобное разрушение фермента не рассматривается как ингибирование, так как оно не связано с механизмом действия фермента. Ингибиторы действуют на скорость реакции определенным химическим путем.

Механизм действия ингибиторов может быть разнообразным, но в общей форме ингибитор вступает с ферментом в соединение, образуя комплекс фермент – ингибитор.

Различают *обратимое и необратимое* ингибирование фермента. При обратимом ингибировании активность фермента восстанавливается по мере удаления свободного ингибитора диализом или иным способом, т.е. при обратимом ингибировании существует равновесие между свободным ингибитором и ферментом. При необратимом ингибировании равновесие между свободным ингибитором и ферментом не устанавливается и активность фермента не удается восстановить диализом.

Обратимое ингибирование ферментативных реакций может протекать по *конкурентному и неконкурентному механизмам*.

Конкурентное ингибирование вызывается веществами, схожими по своему строению с субстратом, за счет чего они, конкурируя с субстратом, соединяются с активным центром фермента, но не подвергаются ферментативному превращению и новые продукты из них не образуются. В связи с тем, что часть фермента при конкурентном ингибировании расходуется на образование комплекса фермент – ингибитор, скорость ферментативной реакции снижается. Конкурентное ингибирование протекает при условии, когда концентрация ингибитора в 4–6 раз превышает концентрацию субстрата. Конкурентное ингибирование обратимо, так как при увеличении концентрации субстрата скорость реакции возрастает.

Неконкурентное ингибирование вызывают вещества, не имеющие структурного сходства с субстратом. Причем эти вещества обратимо присоединяются к ферменту не в активном центре, где обычно связывается субстрат, а совсем в другом месте и, следовательно, конкуренция между субстратом и ингибитором отсутствует. Связываясь с ферментом, неконкурентные ингибиторы вызывают изменение пространственной структуры активного центра, и, хотя присоединение субстрата к такому активному центру происходит, тем не менее катализ становится невозможным. Неконкурентные ингибиторы связываются обратимо как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом, образуя неактивные фермент-ингибитор (EJ) и (или) фермент-субстрат-ингибитор (ESJ-структура).

Мощное действие на ферменты оказывают вещества, присоединяющиеся к ним в особых участках, удаленных от активного центра, называемых *аллостерическим центром*. Эти вещества влияют на активность фермента, вызывая обратимое изменение в структуре его активного центра. Называют такие вещества *аллостерическими эффекторами*. Если эти эффекторы увеличивают сродство фермента к субстрату, то их называют *аллостерическими активаторами*, а если уменьшают – *аллостерическими ингибиторами*.

Аллостерические ферменты имеют важное значение в регуляции ферментативных процессов в клетке. Это связано с тем, что эффекторами могут быть различные промежуточные продукты обмена веществ, называемые *метаболитами*. В частности, установлено, что конечный, а иногда и промежуточный продукт многостадийного процесса распада или биосинтеза может служить аллостерическим ингибитором одной из первых его реакций.

Ключевые (регуляторные) ферменты имеют аллостерический центр для присоединения активаторов и ингибиторов, которые, присоединившись, вызывают обратимое изменение в структуре активного центра. Аллостерические ферменты выполняют важную роль в регуляции процессов метаболизма. Установлено, роль активаторов чаще всего в этом случае выполняют молекулы собственного субстрата, когда их концентрация в среде достигает определенного уровня, а также АМФ и некоторые гормоны. В ряду ингибиторов для этих ферментов обнаружены неорганические соли, некоторые гормоны, конечный или промежуточный продукт многостадийного процесса распада или синтеза часто служит аллостерическим ингибитором одной из первых реакций (так называемое ингибирование по типу обратной связи).

ХОД РАБОТЫ. В качестве источника фермента используют для работы вытяжку из солода.

В штативе располагают тремя рядами 18 пробирок (6 пробирок в каждом ряду). Пробирки каждого ряда нумеруют и во все вносят по 1 мл воды. Затем в первую пробирку каждого

ряда добавляют по 1 мл вытяжки из солода, содержимое хорошо перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После разбавления во все пробирки первого ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд), в пробирки второго ряда – по 1 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1% и в пробирки 3-го ряда – по 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1%. Затем во все пробирки приливают по 1 мл раствора с массовой долей крахмала 1% в следующем порядке: сначала в первые пробирки всех рядов, после этого во вторые пробирки всех рядов и т.д. Содержимое перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками ставят в термостат при 37-38°C на 30 мин. По окончании инкубации в пробирки каждого ряда добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной (или соляной) кислоты 10 % и по 3 капли раствора йода в том же порядке, в каком приливался раствор крахмала. Содержимое перемешивают и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция на крахмал отрицательная (желтое окрашивание). Результаты опыта заносят в таблицу 14, обозначив желтые тона буквой «Ж», красные (красно-коричневые) – «К», фиолетовые – «Ф» и синие – «С».

Таблица 14

Окраска проб с йодом после инкубации

Компоненты	Номера пробирок и доля вытяжки из солода в содержимом, мл					
	1	2	3	4	5	6
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Вода						
Хлорид натрия						
Сульфат меди						

Определяют активатор и ингибитор. Разделив степень разведения контрольной пробы (первый ряд), в которой реакция с йодом отрицательная, на степень разведения проб, давших отрицательную реакцию с исследуемыми веществами, находят во сколько раз активатор или ингибитор стимулирует или тормозит действие амилазы. При высокой активности амилазы солода число пробирок в опыте увеличивают до 7-8.

Контрольные вопросы

1. Общая характеристика регуляторов ферментов.
2. Характеристика строения и действия активаторов.
3. Химическая природа и механизм действия ингибиторов.
4. Схема опыта «Действие некоторых ионов на активность амилаз солода».
5. Каким методом, в этом опыте, определяли активность амилаз солода?
6. Какие соединения в опыте были активаторами и ингибиторами. Объясните механизм их действия.

Лабораторная работа № 12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

(по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

Цель работы: Определить активность каталазы в клубнях картофеля.

Реактивы: Вода дистиллированная; кальций углекислый (порошок); раствор с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л; растворы с массовыми долями: пероксида водорода 1% (10 мл раствора с массовой долей H_2O_2 30% разбавить водой до 300 мл), серной кислоты 10%.

Краткие теоретические положения

К классу **оксидоредуктаз** принадлежат все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Систематическое название составляется по типу «донор:

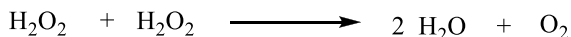
акцептор оксидоредуктаза». Термины «донор» и «акцептор» введены потому, что происходит реакция переноса двух восстановительных эквивалентов в той или иной форме (атомов водорода, электронов, гидрид-ионов и т.д.) от одного субстрата (окисляемого) к другому (восстанавливаемому).

В зависимости от природы окисляемых групп в молекуле донора спиртовая, альдегидная или кетонная группы, **СН-СН**-группа, **СН-NH₂**-группа, **СН-NH**-группа и др. оксидоредуктазы делятся на 19 подклассов. В зависимости от природы акцепторов, которыми могут быть коферменты (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД), цитохром, молекулярный кислород и т.д., подклассы ферментов делятся на подподклассы.

Оксидоредуктазы всех подподклассов, для которых акцептором водорода служит любое соединение, но не кислород, называют *дегидрогеназами*, а в случаях, когда донор водорода точно не установлен, используют термин *редуктаза*. Если акцептором служит кислород, то ферменты, катализирующие перенос водорода на него, называют оксидазами. Реакции прямого включения кислорода в молекулу органического субстрата катализируют *оксигеназы*, при этом происходит включение либо двух атомов кислорода (*диоксигеназы*), либо одного атома кислорода (*монооксигеназы*). Термин *пероксидаза* относится к ферментам, использующим в качестве окислителя пероксид водорода.

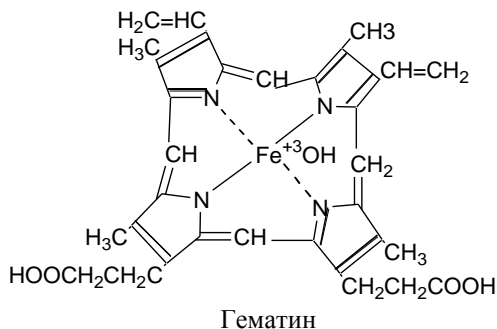
Многие дегидрогеназы в качестве акцептора водорода используют коферменты **НАД** (никотинамидадениндинуклеотид) и **НАДФ** (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), содержащие в своих молекулах производное пиридина – *никотинамид*, в связи с чем эти ферменты называются *пиридиновыми (пиридинзависимыми)* дегидрогеназами, или *пиридинпротеинами (ПП)*.

Каталаза (КФ 1.11.1.6; пероксид водорода:пероксид водорода оксидоредуктаза) катализирует окислительный распад пероксида водорода по схеме:



Каталаза – двухкомпонентный фермент, простетической группой которого является гематин, представляющий прото-

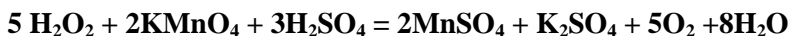
порфирин, состоящий из четырех пирольных колец, соединенных в циклическую систему метиловыми мостиками, содержащий атом трехвалентного железа:



Фермент каталаза широко распространен в природе и найден у животных, растений, аэробных бактерий. Роль каталазы в организме связывают с расщеплением образующегося в процессе окисления ядовитого для клеток пероксида водорода. Каталаза содержится и в молоке, куда она переходит из клеток молочной железы, а также вырабатывается содержащимися в молоке бактериями и лейкоцитами.

Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты образующие и обезвреживающие H_2O_2 находятся в пероксисомах – органеллах покрытых мембраной. Главными потребителями H_2O_2 являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов $[2\text{H}]$ на H_2O_2 , восстанавливая его до $2 \text{H}_2\text{O}$. Молекулы пероксида водорода, неустраиваемые пероксидазами, обезвреживаются каталазой.

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H_2O_2 в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия $0,02$ моль/л:



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

ХОД РАБОТЫ. 2-3 г сырого картофеля (или другого свежего растительного материала) тщательно растирают в ступке с кварцевым песком или стеклом. Для уменьшения кислой реакции добавляют на кончике скальпеля CaCO_3 до прекращения выделения пузырьков CO_2 . В процессе растирания в ступку добавляют небольшими порциями 40-50 мл воды. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Смесь оставляют стоять 10-15 мин и после перемешивания фильтруют.

Берут две конические колбочки вместимостью 150-200 мл и вносят в них по 20 мл полученного фильтрата. Содержимое одной колбы кипятят в течение 1 мин и охлаждают до комнатной температуры (контроль). Другая колба опытная содержит активный фермент. К содержимому опытной и контрольной колб приливают по 20 мл воды и по 3 мл раствора с массовой долей H_2O_2 1%. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин. По окончании инкубации в обе колбы добавляют по 5 мл раствора с массовой долей серной кислоты 10%, перемешивают и избыток H_2O_2 в каждой колбе оттитровывают раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л до образования розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

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

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

где X – активность каталазы, Е/г;

- $(a-b)$ – разность между объемами раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л, пошедшего на титрование контрольной (a) и опытной (b) проб, мл;
- T – титр примененного для титрования раствора перманганата калия;
- 50 – коэффициент пересчета на мкмоль H_2O_2 ;
- 100 – общий объем приготовленного экстракта;
- m – масса взятого для анализа материала, г;
- 20 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл;
- 30 – время инкубации, мин.

Принцип определения, порядок анализа и результат анализа записывают. Активность каталазы можно определить и по объему кислорода, выделившегося после прибавления к исследуемому объекту H_2O_2 .

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

Контрольные вопросы

1. Основные пути окисления субстратов в клетке.
2. Характеристика строения и действия НАД⁺- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
3. Характеристика строения и действия ФАД-зависимых дегидрогеназ.
4. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы.
5. Характеристика строения и действия пероксидаз и каталаз.
6. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
7. Метод определения активности каталазы.

Глава 4. ОБМЕН ЛИПИДОВ

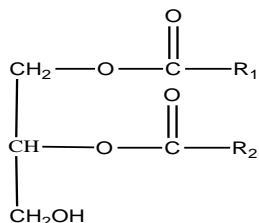
Липидами называют большую и разнообразную группу веществ тканей животных и растений, которые могут быть экстрагированы из них неполярными растворителями: эфиром, бензолом, хлороформом, петролейным эфиром и др.

Массовая доля липидов в организме человека не превышает обычно 10-20%, в организме животных она может достигать 50%. Массовая доля липидов в пересчете на сухую массу семян пшеницы, ржи, ячменя составляет 2-3%; овса, кукурузы, проса – 4-6%; льна, конопли, подсолнечника – 30-50%; хлопчатника, сои – 20-30%; мака, клещевины – 50-60%; картофеля, свеклы, овощей – 0,1-1% от сырой массы.

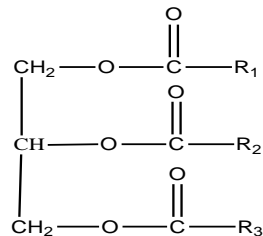
Липиды молока носят общее техническое название: **молочный жир**. В его состав входят: нейтральные жиры (три-, ди- и моноацилглицерины, свободные жирные кислоты), фосфолипиды (главным образом фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины), стерины (в основном холестерин) и гликолипиды. Составные части молочного жира содержатся в жировых шариках, оболочке жировых шариков и в виде следов – в молочной сыворотке. Массовая доля молочного жира в молоке колеблется в пределах 2,8-5%. От общей массы молочного жира на долю триацилглицеринов приходится 98-99%.

Нейтральные жиры (жиры, триацилглицерины, ацилглицеролы) – это сложные эфиры трехатомного спирта глицерола (1,2,3-пропантриола) и жирных кислот. В зависимости от числа этерифицированных гидроксильных групп глицерола (три, две или одна) различают соответственно триацилглицеролы, диацилглицеролы и моноацилглицеролы. Триацилглицеролы составляют основную массу природных жиров (94-98%). Поэтому термин триацилглицерол часто используют как синоним термина жир или нейтральный жир. Моноацилглицеролы и диацилглицеролы хотя и представляют собой важные промежуточные продукты липидного обмена, но в составе природных жиров встречаются в малых количествах.

В формуле R_1, R_2, R_3 - остатки жирных кислот. Номенклатура нейтральных жиров основывается на названиях жирных кислот, входящих в состав их молекул. Например: тристеарин, трипальмитин, олеодипальмитин, олеостеаропальмитин и т.д.



Диацилглицерол



Триацилглицерол

В составе природных ацилглицеролов найдено несколько десятков различных жирных кислот. Все они отличаются друг от друга длиной углеводородной цепи, степенью ненасыщенности, числом и положением двойных связей и т.д. В составе жиров содержание ненасыщенных жирных кислот выше, чем насыщенных. Особенно это заметно в жирах организмов, живущих при низких температурах. Это связано с тем, что ненасыщенные жирные кислоты имеют более низкую температуру плавления и содержащие их нейтральные жиры остаются жидкими даже при температуре ниже 5°C. Ненасыщенные жирные кислоты преобладают в растительных жирах, называемых маслами. Присутствие в жирах большого количества ненасыщенных жирных кислот придает им жидкую консистенцию, содержание преимущественно насыщенных жирных кислот – твердую.

Лабораторная работа № 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ КЛЕЩЕВИНЫ

Цель работы: Определить активность липазы семян клещевины при гидролизе растительного масла.

Реактивы: Смесь этанола с эфиром (1:1), семена клещевины очищенные, нейтральное растительное масло, растворы с массовой долей гидроксида калия 0,1 моль/л и фенолфталеина 1% в этаноле.

Краткие теоретические положения

Обмен липидов во всех организмах, состоит из процессов синтеза (анаболизма) и распада (катаболизма), у животных есть ещё процессы переваривания и всасывания липидов. Катаболизм и переваривание липидов начинаются с гидролиза при участии липаз.

Переваривание жира начинается в желудке, где на него действует фермент липаза. Но она расщепляет только эмульгированный жир. Из пищевых жиров такими являются жиры молока и желтка яиц птицы, поэтому этот процесс имеет значение главным образом у детей грудного возраста.

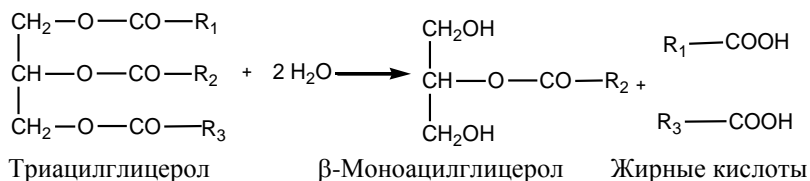
Основным местом переваривания жиров является начальная часть тонкого отдела кишечника, где имеются все необходимые условия: слабощелочная среда рН 7,5–8,5; перемешивание пищи с пищеварительными соками; наличие эмульгаторов.

Из эмульгаторов в кишечнике человека важную роль играют желчные кислоты: холевая, дезоксихолевая, литохолевая, хенодезоксихолевая, таурохолевая и гликохолевая. Они вырабатываются клетками печени и поступают в кишечник с желчью. Эти кислоты являются производными холановой кислоты и различаются между собой числом и местом расположения гидроксильных групп. В желчи человека преобладает холевая кислота. Наиболее часто она соединена с глицином или таурином. Связь образуется между карбоксильной группой желчной кислоты и аминной группой глицина или таурина. Соединение желчных кислот с глицином или таурином называют *парными соединениями*. Соли парных соединений желчных кислот облегчают эмульгирование. Кроме желчных кислот и их парных соединений, для образования эмульсии жира необходимы ненасыщенные жирные кислоты и моноацилглицеролы, которые всегда есть в кишечнике.

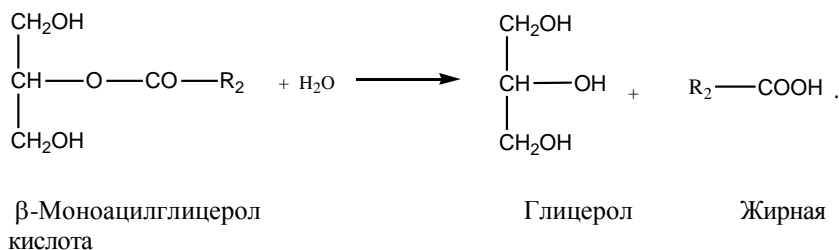
Таким образом, в результате взаимодействия жиров, желчных кислот и их солей, ненасыщенных жирных кислот, моноацилглицеролов образуется очень тонкая жировая эмульсия с диаметром частиц менее 0,5 мкм, которая способна проходить через стенку кишечника.

Основная масса липидов пищи представлена триацилглицеролами, меньше – фосфолипидами и стероидами. Гидролиз

жиров в кишечнике осуществляет липаза, поступающая туда с соком поджелудочной железы. Наряду с эмульгирующими свойствами желчные кислоты являются активаторами липазы поджелудочной железы. Гидролиз триацилглицеролов липазой идет постепенно. Присоединяясь к капелькам эмульсии, она катализирует отщепление сначала крайних жирных кислот. В результате образуются жирные кислоты и β -моноацилглицеролы:



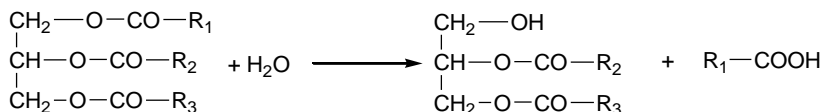
Эту реакцию осуществляют липазы, специфичные в отношении 1,3-эфирных связей. Связи во втором положении гидролизуют другие липазы:



Таким образом, практически основными продуктами, образующимися в кишечнике при расщеплении жиров, являются жирные кислоты, β -моноацилглицеролы и глицерол.

В процессе переработки и хранения пищевого сырья могут создаваться условия, увеличивающие активность липаз. Например, перекачивание, встряхивание и пастеризация молока активизируют липазу; освобождающиеся при гидролизе триацилглицеролов молочного жира низкомолекулярные жирные кислоты (масляная, капроновая, каприловая) придают такому молоку и продуктам из него прогорклый вкус и запах. Хранение некоторых видов муки и крупы, особенно содержащих много жира (пшено, овсяная мука и крупа), при

повышенных температуре и влажности стимулирует гидролиз триглицеридов, что приводит к повышению кислотности продукта и его быстрому прогорканию. В семенах клещевины содержится значительное количество липазы. Этот фермент относится к классу гидролаз, подклассу эстераз, группы эстераз сложных эфиров карбоновых кислот (КФ 3.1.1.3). Липаза клещевины не растворяется в воде и проявляет активность в слабокислой среде при pH 4,8-5,0. Липазы легко и быстро отщепляют от молекулы триацилглицерола один внешний кислотный остаток:



Затем второй внешний кислотный остаток и в последнюю очередь третий (средний) кислотный остаток.

Метод основан на определении количества жирных кислот, образующихся при действии липаз на растительный жир методом титрования. В качестве источника липаз используют семена масличных культур.

ХОД РАБОТЫ. Берут две фарфоровые ступки (опыт и контроль). В опытной ступке тщательно растирают 1 г семени клещевины, очищенного от оболочки, и смешивают с 2 мл буферного раствора pH 4,7 добавляют 3 мл нейтрального растительного масла и оставляют на 30 мин при комнатной температуре для гидролиза. После этого в ступку добавляют 5 мл спирта, 5 мл эфира и 4 – 5 капель раствора фенолфталеина, и оттитровывают отщепившиеся жирные кислоты раствором гидроксида калия с концентрацией 0,1 моль/л до слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек. В контрольной ступке тщательно растирают 1 г семени клещевины, добавляют 2 мл буферного раствора pH 4,7; 5 мл спирта, 5 мл эфира перемешивают, вносят 3 мл нейтрального растительного масла, перемешивают и тут же добавляют 4 - 5 капель фенолфталеина и сразу титруют раствором гидроксида калия с концентрацией 0,1 моль/л до слабо-розовой окраски, не исчезающей 30 сек. Контрольную пробу не подвергают инкубации.

Разница в объеме израсходованного на титрование гидроксида калия в опыте и контроле показывает активность

липазы. Результаты определения записать в табл. 15.

Таблица 15

Определение активности липазы клещевины

Исследуемый материал	Объём КОН, пошедший на титрование, мл		Разница, мл
	Опытная проба	Контроль	
Семена клещевины			

Контрольные вопросы

1. Из каких процессов состоит обмен липидов в организме животных, растений и микроорганизмов?
2. С какого процесса начинается катаболизм и переваривание липидов?
3. Липазы пищевого сырья, их влияние на качество продукции.
4. К какому классу, подклассу и группе относятся липазы?
5. Напишите реакции катализируемые липазами.
6. Метод определения активности липаз.
7. Роль постановки контроля в определении активности липаз.

Глава 5. ОБМЕН БЕЛКОВ

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

Лабораторная работа № 14

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАЗ
(по методу Ансона)**

Цель работы: Определить активность пепсина при гидролизе гемоглобина.

Реактивы: Вода дистиллированная; фосфатно-цитратный буфер рН 2,2 (196 мл раствора с концентрацией лимонной кислоты 0,1 моль/л смешивают с 4 мл раствора с концентрацией гидрофосфата натрия 0,2 моль/л); растворы с массовыми долями: гемо-глобина 1% (приготовлен на фосфатно-цитратном буфере рН 2,2), ТХУ 5%, ацидина-пепсина 1% (4 таблетки препарата растворяют в 100 мл воды) или пепсина 0,1% в растворе с массовой долей соляной кислоты 0,2% (4,5 мл концентрированной соляной кислоты разбавить в мерной колбе до 1 л); раствор с концентрацией карбоната натрия (или гидроксида натрия) 0,5 моль/л; раствор тирозина для построения калибровочного графика, содержащий в 1 мл 500 мкмоль (4,53 мг тирозина растворяют в 50 мл раствора с массовой долей соляной кислоты 0,2%); реактив Фолина, разбавленный в соотношении 1:2. Реактив Фолина готовится следующим образом: 100 г вольфрамвокислого натрия и 25 г молибдено-вокислого натрия растворяют в 700 мл дистиллированной воды. К раствору прибавляют 50 мл 85% ортофосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Смесь кипятят с обратным холодильником 10 часов, после чего прибавляют 150 г сернокислого лития, 50 мл дистиллированной воды и несколько капель бромной воды. Для удаления избытка брома смесь кипятят без холодильника 15 мин. в вытяжном шкафу. После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 1 литра, фильтруют и хранят в темной склянке. Цвет реактива должен быть желтым. Перед употреблением его разбавляют водой 1:2 (готовят рабочий раствор).

Краткие теоретические положения

Пептидгидролазы (подкласс 3.4.), называемые также протеолитическими ферментами, или протеазами, катализируют гидролиз пептидных связей в белках и пептидах.

Подразделяются на два подподкласса: пептидазы (экзопептидазы) и протеиназы (эндопептидазы). Пептидазы катализируют гидролиз пептидов до свободных аминокислот; протеиназы – гидролиз белков и высокомолекулярных пептидов до пептидов меньшей молекулярной массы.

Пепсин относится к кислым протеиназам, в активном центре которых содержатся радикалы дикарбоновых амино-

кислот и имеют оптимум рН ниже 5,0. Пепсин вырабатывается слизистой оболочкой желудка в виде профермента – пепсиногена, превращающегося в пепсин под влиянием соляной кислоты и свободного пепсина.

Белки, поступая с пищей в пищеварительный тракт, в результате последовательного воздействия на них группы протеолитических ферментов расщепляются до низкомолекулярных полипептидов и аминокислот. Последние всасываются в кровь и принимают участие в обновлении белков разных тканей и в биосинтезе активных веществ белковой природы (гормонов, ферментов).

Переваривание белков носит гидролитический характер и заключается в расщеплении пептидных связей. Этот процесс начинается в желудке под влиянием желудочного сока. Желудочный сок, выделяемый железами слизистой оболочки стенок желудка, содержит до 99 % воды, свободную соляную кислоту (0,4–0,5 %) и протеолитический фермент – пепсин. У молодых животных желудочный сок содержит еще один протеолитический фермент – химозин (ренин).

Пепсин быстро катализирует гидролиз белков яиц, молока, мышц. Труднее расщепляются белки соединительной ткани – коллаген и эластин. Не расщепляются протамины и кератины. Важную роль в гидролизе белков в желудке выполняет соляная кислота. Она активизирует ферменты желудочного сока, создает соответствующий рН 1,5–2,5, обеспечивающий набухание белков и распад третичной структуры, дезинфицирует пищу.

Действие пепсина на пептидные связи отличается абсолютной специфичностью в отношении оптической конфигурации аминокислотных остатков по обе стороны от гидролизуемой связи. Особенно благоприятствует действию пепсина наличие ароматического кольца в боковой цепи одной из аминокислот. При действии пепсина происходит разрыв внутренних пептидных связей белковой молекулы. В результате гидролиза белков пепсином образуется смесь полипептидов.

Следующим местом расщепления белков является начальная часть тонкого отдела кишечника, где белки пищи

подвергаются воздействию пептидгидролаз кишечного сока, вырабатываемых в поджелудочной железе. Ферменты сока поджелудочной железы – трипсин и химотрипсин – гидролизуют белки и пептиды, перешедшие из желудка, до более простых пептидов и некоторых количеств аминокислот.

Трипсин и химотрипсин изначально вырабатываются в неактивной форме в виде трипсиногена и химотрипсиногена. Под действием фермента энтерокиназы трипсиноген превращается в активный фермент трипсин. Химотрипсиноген переходит в активную форму – химотрипсин – под действием трипсина. Оптимум действия этих протеолитических ферментов лежит в слабощелочной среде с рН 7,8. Синтез ферментов в неактивной форме имеет большое биологическое значение. Лишенные ферментативной активности, они не способны гидролизовать белки ткани, в которой сами образовались, и белковую основу других ферментов, вырабатываемых поджелудочной железой (амилаза, липаза).

Все протеолитические ферменты по химической природе являются полипептидами или белками. Неактивные их формы отличаются большой молекулярной массой за счет содержания полипептидов-ингибиторов, в отщеплении которых и заключается процесс активирования.

Расщепление пептидов до аминокислот завершают пептидазы: карбоксипептидазы, аминопептидазы и дипептидазы. Карбоксипептидазы расщепляют полипептид со стороны свободной карбоксильной группы; аминопептидазы – со стороны свободной аминогруппы. Образовавшиеся в результате гидролиза короткие пептиды и дипептиды распадаются под влиянием дипептидаз до свободных аминокислот.

Таким образом, пищевой белок по мере его продвижения в желудочно-кишечном тракте подвергается ферментативному гидролизу и распадается на аминокислоты, которые всасываются стенками кишечника, поступают в кровь и принимают участие в обмене веществ. Чистый белок в кровь не поступает.

Метод определения активности протеаз основан на определении тирозина (или тирозинсодержащих пептидов), освобождающихся при гидролизе раствора стандартного бел-

ка (гемоглобина, казеина, альбумина) протеазами (пептид-гидролазами). Оставшийся нерасщепленный белок осаждают раствором **трихлоруксусной кислоты (ТХУ)** и фильтруют. С фильтратом проводят цветную реакцию с реактивом Фолина и оптическую плотность полученного раствора измеряют при 760нм на ФЭКе с красным светофильтром.

ХОД РАБОТЫ. Берут две пробирки. В каждую наливают по 1мл раствора гемоглобина и по 1,5 мл фосфатно-цитратного буфера рН 2,2. Содержимое перемешивают и пробирки ставят в термостат при 37-38°С на 5 мин. Одновременно выдерживают в термостате раствор пепсина. После термостатирования в одну пробирку (контрольная) добавляют 5 мл раствора с массовой долей ТХУ 5% и перемешивают. Затем в обе пробирки приливают по 0,5 мл раствора ацидинпепсина (или пепсина), предварительно выдержанного в термостате при 37-38 °С, содержимое перемешивают и пробирки помещают в термостат при 37-38°С на 30 мин. После инкубации в другую пробирку (опытная) добавляют 5 мл раствора с массовой долей ТХУ 5% и оставляют ее в термостате на 10-15 мин для осаждения не прореагировавшего белка и фермента. Содержимое опытной и контрольной пробирок фильтруют и в прозрачном фильтрате определяют продукты ферментативного гидролиза – тирозин (или тирозинсодержащие пептиды). ТХУ продукты распада белка не осаждает.

Берут две чистые пробирки и вносят в них соответственно из опытной и контрольной проб по 2 мл фильтрата. Затем в каждую медленно приливают по 5 мл раствора с концентрацией карбоната (или гидроксида) натрия 0,5 моль/л и по 1 мл рабочего (разбавленного 1:2) раствора Фолина. Содержимое перемешивают и пробирки оставляют при комнатной температуре на 20 мин. После этого интенсивность окраски опытной и контрольной проб определяют на ФЭКе с красным светофильтром. Массу тирозина в пробе находят по калибровочному графику.

Протеолитическую активность выражают в мг (или мкмоль) тирозина, освободившегося на 1 мг белка ферментного препарата (или 1 мл ферментного раствора) за 1 мин. При подсчете необходимо помнить, что продолжительность инкубации составила 30 мин. Принцип определения, порядок работы,

результат анализа записывают и делают вывод об активности ферментного препарата.

Контрольные вопросы

1. К какому классу и подклассу ферментов относятся протеазы?
2. Специфичность действия протеаз.
3. Промежуточные и конечные продукты гидролиза белков под действием протеаз.
4. Где протекает гидролиз белков в живых организмах и роль этих процессов.
5. Принцип метода Ансона определения активности протеаз.
6. Последовательность определения активности протеаз по Ансону.
7. Расчет протеолитической активности ферментов по Ансону.
8. Переваривание белков в организме.

Глава 6. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Углеводы – основной источник энергии для процессов жизнедеятельности человека, животных, растений и многих микроорганизмов. Кроме этого, метаболиты (промежуточные продукты обмена) углеводов служат материалом для синтеза многочисленных мономеров, а из мономеров – полимеров и других соединений.

В продуктах питания человека, в кормах животных углеводы представлены полисахаридами – крахмалом, гликогеном, клетчаткой, пектиновыми веществами и др., а также олиго- и моносахаридами: сахарозой, мальтозой, лактозой, глюкозой, фруктозой и др. У растущих и развивающихся растений синтезируется резервный крахмал, который служит субстратом дыхания и источником метаболитов. В период созревания крахмал откладывается в плодах, клубнях, луковичках, семенах, зернах и служит запасным энергетическим материалом зародыша и источником многочисленных метаболитов.

Использование (мобилизация) полисахаридов начинается с их гидролиза амилазами или расщепления путем фосфолиза ферментом фосфолиазой.

Лабораторная работа № 15

АНАЭРОБНОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Цель работы: Изучить анаэробную фазу дыхания дрожжей.

Реактивы: Дрожжи; растворы с массовыми долями: сахаразы или глюкозы 5%, гидроксида натрия 10%, раствор Люголя.

Краткие теоретические положения

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

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

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

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

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

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

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

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

Молочнокислое брожение – это процесс получения энергии молочнокислыми бактериями. По характеру различают два вида молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное, которые осуществляются соответствующими группами молочнокислых бактерий.

Гомоферментативные (однотипнобродящие бактерии), в процессе брожения образуют в основном молочную кислоту и очень мало побочных продуктов. Они окисляют углеводы молока по пути гликолиза в анаэробных условиях, где пируват служит акцептором водорода от НАД·Н₂ и восстанавливается в конечный продукт брожения – лактат. Суммарное уравнение этого типа брожения можно записать так:



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

Гетероферментативные бактерии (разнотипнобродящие) – наряду с молочной кислотой образуют значительное количество других веществ: этанола, СО₂, уксусной кислоты. Окисление углеводов молока гетероферментативными молочнокислыми бактериями осуществляется своеобразной ферментативной системой в которой нет фермента альдолазы, но есть ферменты пентозофосфатного цикла и других типов брожения. После фосфорилирования гексоза окисляется дегидрогеназой и декарбоксилируется, превращаясь в пентозофосфат.

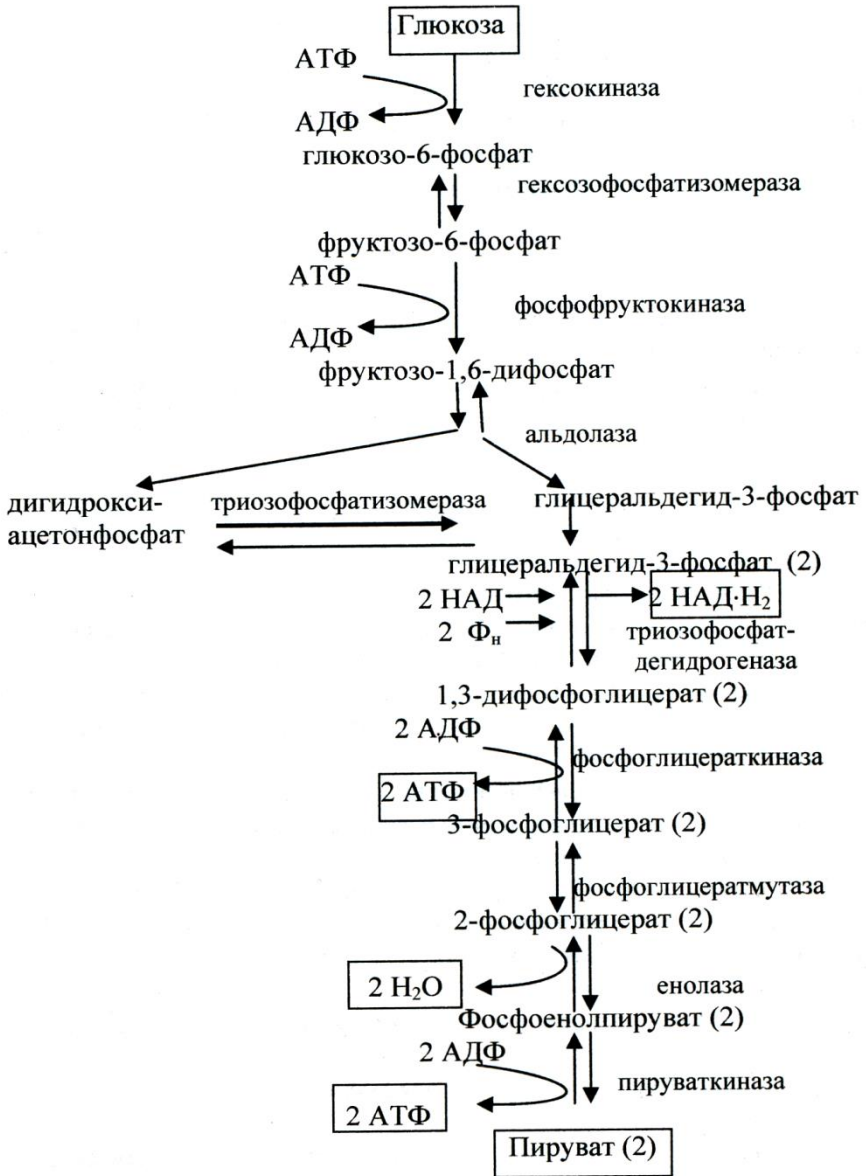
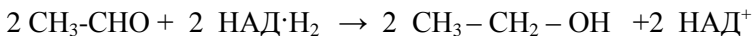
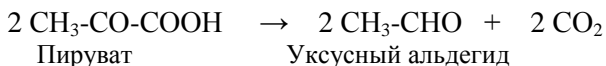


Рис. 2. Схема гликолиза (в рамках помещены исходные субстраты и конечные продукты гликолиза; цифрами в скобках обозначено число молекул)

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

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

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



Суммарное уравнение спиртового брожения:



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

Уксуснокислые бактерии окисляют этанол и другие спирты до уксусной кислоты:

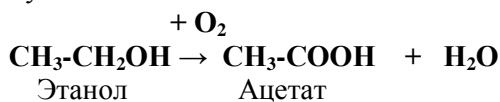




Рис. 3 Трубка Эйнгорна

Есть микроорганизмы осуществляющие маслянокислое, лимоннокислое и другие виды брожения. Многие брожения используются в пищевых технологиях и не менее важную роль они выполняют в природе. Анаэробную стадию окисления глюкозы наиболее удобно изучать на спиртовом брожении, которое протекает по пути гликолиза. Процесс состоит из 10 реакций

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

Трубку помещают в термостат при 37-38°C на 2-3 часа. Интенсивность брожения учитывают каждые 15-30 мин по объему CO_2 , который собирается в запаянном колене (в см^3). Если брожение протекает интенсивно, то после каждого замера запаянное колено трубки Эйнгорна повторно заполняют той же бродящей смесью (смесь перемещают из расширенной части трубки в запаянное колено). После 4-5 замеров строят график интенсивности брожения. По оси ординат откладывают объем CO_2 , по оси абсцисс – время замера (30, 60, 90, 120 и 150 мин от начала термостатирования).

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



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

Контрольные вопросы

1. Биологическое окисление и его роль.
2. Стадии окисления глюкозы в клетках, место их локализации.
3. Характеристика анаэробной стадии окисления глюкозы.
4. Роль анаэробной стадии окисления глюкозы для животных, человека, растений и микроорганизмов.
5. Характеристика гомоферментативного молочнокислого брожения и его роли.
6. Характеристика гетероферментативного молочнокислого брожения и его роли.
7. Характеристика спиртового брожения и его роли.
8. Характеристика уксуснокислого брожения и его роли.
9. Характеристика химизма пропионовокислого брожения и его роли.
10. Использование брожения в пищевой промышленности.
11. Роль брожения в живой природе.

Глава 7. ВИТАМИНЫ

Витамины – природные, биологически активные низко-молекулярные органические соединения, различные по строению и физико-химическим свойствам, но абсолютно необходимые для нормальной жизнедеятельности человека, животных, птиц, растений, микроорганизмов.

Потребность в витаминах организмы удовлетворяют по-разному: **растения синтезируют все** необходимые им

витамины, человек и животные получают их с пищей в готовом виде или в виде провитаминов – предшественников, из которых образуются соответствующие витамины. Некоторые витамины синтезируются микроорганизмами, населяющими кишечник человека, удовлетворяя частично или полностью потребности организма. Витамины делятся на водо- и жирорастворимые.

Водорастворимые витамины тесно связаны с ферментами, многие из них принимают участие в построении небелковых групп ферментов и, тем самым, оказывают влияние на жизнеспособность организма.

Жирорастворимые витамины участвуют в ряде окислительно-восстановительных реакций, регуляции проницаемости мембран и многих биохимических процессов.

Отсутствие или недостаток в пище витаминов приводят к нарушениям обмена веществ и, в конечном счете, заболеваниям, получившим название гиповитаминозов и авитаминозов.

Перед современной пищевой промышленностью стоит задача не только производство достаточного количества разнообразных, но и полноценных продуктов питания. Важная роль в этом принадлежит витаминам. Добавление витаминов имеет целью ревитаминизацию, стандартизацию, обогащение и специальное воздействие при технологической переработке и хранении продуктов.

Ревитаминизация – это добавление витаминов в сырье, которое теряет их при переработке (добавление витаминов В₁, В₂, В₅ к пшеничной муке высшего сорта и обрубленному рису, а также витаминов А и D к обезжиренному молоку).

Стандартизация и обогащение витаминами применяется при производстве фруктовых соков. Во многих странах, в зимнее время, к молоку добавляют витамин А или **каротины**. Витамин А и D вносятся при изготовлении маргаринов, халвы и т.д. **Каротины** добавляются как красящие вещества при производстве сливочного масла. Витамины С и Е, обладающие свойствами антиоксидантов, используются для стабилизации продуктов: витамин С – для предотвращения окисления напитков (пива, вина, фруктовых соков), а витамин Е – природный антиоксидант жиров и масел. Обнаружение витаминов в пищевых продуктах и

биологических объектах преимущественно основано на их способности давать цветные реакции с определенными химическими веществами.

Лабораторная работа № 16

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С

Цель работы: Определить содержание витамина С в клубнях картофеля.

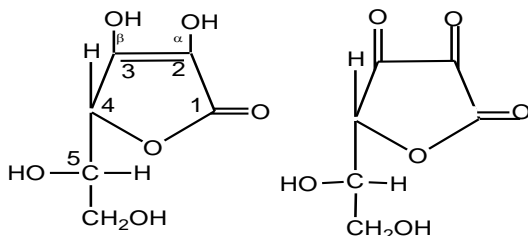
Реактивы: Вода дистиллированная; молоко свежее; картофель (лимоны, морковь, яблоки, капуста, черемша и т.п.); раствор с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2%; насыщенный раствор щавелевой кислоты; насыщенный раствор хлорида натрия; свежеприготовленный стандартный раствор аскорбиновой кислоты (в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 100 мг аскорбиновой кислоты квалификации «медицинская» и, растворяя, объем доводят до метки раствором с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2%; индофеноловый реактив (в мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 140-150 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия и 200-300 мл воды, энергично встряхивают до растворения краски, объем доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в сухую склянку из темного стекла; раствор хранят в холодильнике не более трех суток).

Краткие теоретические положения

Витамин С – бесцветные кристаллы кислого вкуса, хорошо растворимые в воде. Кислый характер этого витамина обусловлен наличием двух енольных гидроксильных групп, способных к диссоциации с отщеплением ионов водорода (в основном за счет гидроксильной группы в 3-м положении). В сухом кристаллическом состоянии *L*-аскорбиновая кислота устойчива, но во влажном состоянии или в растворах, особенно в присутствии воздуха, света и следов меди или железа, легко разрушается.

Витамин С находится в животных и растительных тканях как в виде *L*-аскорбиновой кислоты (γ -лактон 2,3-дегидро-*L*-гуло-новой кислоты), так и в виде ее окисленной формы – *L*-дегидроаскорбиновой кислоты (γ -лактон 2,3-дикето-*L*-гуло-новой кислоты). Оба соединения обладают физиологической активностью.

Аскорбиновая кислота – широко распространенный витамин, который синтезируется растениями и большей частью видов животных, **кроме человека**, обезьян и морских свинок. Семена высших растений лишены аскорбиновой кислоты, но она появляется в них с первых дней прорастания. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней. Биосинтез аскорбиновой кислоты осуществляется из *D*-глюкозы через ряд промежуточных продуктов.



L-аскорбиновая кислота

L-дегидроаскорбиновая кислота

Одним из важных свойств аскорбиновой кислоты является способность окисляться с образованием дегидроаскорбиновой кислоты, которая при восстановлении снова превращается в аскорбиновую кислоту. Окисление аскорбиновой кислоты до дегидроаскорбиновой кислоты происходит в растениях при участии фермента аскорбатоксидазы, а в животных тканях при помощи цитохромной системы. Дегидроаскорбиновая кислота является нестойким соединением, и если не происходит ее быстрого восстановления, то она легко разрушается. Восстановление дегидроаскорбиновой кислоты в аскорбиновую кислоту происходит при участии фермента глутатиондегидрогеназы. Донором водорода для этой реакции служит восстановленный глутатион.

Участие ферментов в превращениях окисленной и восстановленной форм аскорбиновой кислоты позволяет предполо-

жить, что она может служить биологическим переносчиком водорода, однако значение ее в этом процессе еще не вполне ясно. Имеются предположения, что аскорбиновая кислота играет роль кофактора гидроксирования пролина и лизина при синтезе белка соединительной ткани коллагена, играющего важную роль в построении опорных тканей и стенок кровеносных сосудов, и, возможно, в других реакциях гидроксирования. Получены данные об участии аскорбиновой кислоты в предохранении от окисления SH-групп белков и ферментов. Эти действия аскорбиновой кислоты нельзя считать специфическими; они связаны с ее окислительно-восстановительными свойствами.

Источником витамина С для человека служат овощи, фрукты и ягоды. Много его содержат плоды шиповника, черная смородина, облепиха, рябина, хрен, красный перец, укроп, салат, зеленый лук, томаты. К важным повседневным источникам витамина С относятся картофель и капуста. Из непищевых источников богаты витамином С листья черной смородины, хвоя ели и сосны, экстракты из которых могут полностью удовлетворить потребность организма человека в этом витамине.

В некоторых растениях (различные виды капусты, редька, рапс, редиска) наряду со свободной аскорбиновой кислотой содержится ее связанная форма – *аскорбиген* – вещество, обладающее менее чем 5%-ной активностью витамина С. По своей структуре аскорбиген – индолное производное аскорбиновой кислоты.

В процессе хранения плодов и овощей, при варке, сушке и консервировании витамин С частично разрушается в результате окисления, ускоряемого следами железа или меди, и особенно сильно – окислительными ферментами, которые интенсивно проявляют свое действие при очистке и измельчении овощей, при лежании их в нарезанном виде, а также при закладке для варки в холодную воду и при медленном повышении температуры до закипания. Для сохранения витамина С овощи нужно варить, опуская сразу в кипящую воду, или на пару. Перед сушкой нарезанные плоды и овощи подвергают бланшировке (быстрая обработка кипящей водой или паром) или сульфитации (обработка сернистым газом).

При недостатке витамина С у человека развивается цинга. Болезнь сопровождается появлением мелких кровоизлияний под

кожу и в кожу, кровоточивостью десен, расшатыванием и выпадением зубов, структурными изменениями хрящей и костей.

Суточная потребность в витамине С для человека составляет **100–120 мг**. Аскорбиновая кислота имеет большое значение как антиоксидант для сохранности пищевых продуктов. Ее используют для стабилизации внешнего вида картофеля, мяса и мясных изделий, а также для стабилизации пива, вина, фруктовых соков и для приготовления напитков. Кроме того, аскорбиновая кислота является хорошим хлебопекарным улучшителем. В небольших количествах (2–5 г на 100 кг муки) она заметно улучшает хлебопекарные качества пшеничной муки; хлеб получается более пышным, с лучшей пористостью и структурой мякиша.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРА 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛА НАТРИЯ (ПО АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЕ).

Количественное определение аскорбиновой кислоты в исследуемом материале часто осуществляют с помощью раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия, который в щелочной среде имеет синюю окраску, в кислой – розовую. Химизм реакции можно выразить в виде следующего уравнения



ХОД РАБОТЫ. В две колбочки вносят по 5 мл раствора с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2% и по 2 мл стандартного раствора аскорбиновой кислоты (основной опыт). Со-

держимое каждой колбочки титруют индофеноловым реактивом до слабо-розового окрашивания, сохраняющегося 30 секунд. Параллельно с основным опытом проводят контрольное определение, где также берут две колбочки и в каждую вносят по 7 мл раствора с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2% и воду в объеме, равном объему индофенолового реактива, пошедшего на титрование в основном опыте. Содержимое этих колб титруют индофеноловым реактивом до слабо-розового цвета, сохраняющегося 30 секунд.

Массу аскорбиновой кислоты (в мг), соответствующую 1 мл индофенолового реактива (раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия), рассчитывают по формуле:

$$M = \frac{2}{v - v_1},$$

где М – масса аскорбиновой кислоты в мг, соответствующая 1 мл индофенолового реактива;

$(v - v_1)$ - разность между объемами индофенолового реактива, пошедшими на титрование пробы с аскорбиновой кислотой (v) и пробы без аскорбиновой кислоты (v_1), мл;

2 – масса аскорбиновой кислоты в мг, содержащаяся в опытной пробе (основной опыт).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Принцип метода основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать индофеноловый реактив. При титровании вытяжки исследуемого материала раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола происходит окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановление индофенолового реактива. Конец титрования можно установить по изменению окраски. Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола имеет синюю окраску в нейтральной и щелочной среде, восстановленная форма – приобретает розовую окраску в кислой среде.

Аскорбиновую кислоту извлекают из исследуемого материала 1% раствором соляной кислоты и титруют раствором индофенолового реактива. По количеству краски, затраченной на титрование, рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

Следует заметить, что точному определению содержания аскорбиновой кислоты в биологических объектах мешают другие, легко окисляемые вещества: глутатион, цистеин и т.п.

ХОД РАБОТЫ. Берут навеску исследуемого материала 5-20г (в зависимости от предполагаемого содержания аскорбиновой кислоты), нарезают мелкими кусочками (картофель, морковь, черемша, яблоки и т.п.) тщательно растирают в ступке со щепоткой стекла или кварцевого песка, добавляя порциями по 4-5 мл раствора с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2% до получения однородной жидкой кашицы. Смесь из ступки количественно, с помощью раствора используемой при растирании кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и общий объем экстракта доводят до метки тем же раствором кислоты. Содержимое хорошо перемешивают, настаивают 5-7 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат должен быть совершенно прозрачным.

Используемые для экстракции кислоты (соляная, метафосфорная, щавелевая) извлекают из исследуемого материала как свободную, так и связанную аскорбиновую кислоту, а также способствуют устойчивости аскорбиновой кислоты в экстрактах.

Берут две конические колбочки вместимостью 100-150 мл и в одну пипеткой вносят 20 мл полученного фильтрата, в другую – 20 мл раствора кислоты, используемой для растирания исследуемого материала. Содержимое колбочек титруют индофеноловым реактивом до слабо-розового цвета, удерживающегося 30 секунд. Результаты записывают, и титрование повторяют с новыми порциями того же фильтрата. На основании средней величины, полученной из 2-3 определений, рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot M \cdot v \cdot 100}{v_1 \cdot m},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты в материале, мг/100г продукта;

(a-b) – разность между объемами индофенолового реактива, пошедшими на титрование опытной (a) и контрольной (b) проб, мл;

M – масса аскорбиновой кислоты, соответствующая 1 мл индофенолового реактива (см. стр. 106), мг;

v – общий объем экстракта, мл;

v₁ – объем фильтрата, взятого для титрования, мл;

m – масса исследуемого материала, г,

100 – пересчет на 100 г материала.

В растительных тканях в некоторых количествах содержатся и другие редуцирующие вещества, восстанавливающие 2,6-дихлорфенолиндофенол, поэтому при необходимости проведения особо точного анализа следует принять это в расчет. Для этого к двум другим порциям по 10-20 мл исследуемой вытяжки прибавляют по 0,1 или 0,2 мл 10% раствора сернокислой меди и нагревают в термостате или сушильном шкафу 10 мин при температуре 110°C. Охлаждают и титруют индофеноловым реактивом. В присутствии солей меди и при нагревании аскорбиновая кислота разрушается полностью. Полученную поправку вычитают из данных титрования опытных проб.

При анализе многих плодов и ягод, некоторых овощей получают окрашенные экстракты, что затрудняет определение аскорбиновой кислоты. Для определения аскорбиновой кислоты, окрашенную вытяжку переносят в широкую пробирку, приливают 2-5 мл дихлорэтана или хлороформа и титруют при взбалтывании раствором индофенолового реактива до появления в слое дихлорэтана или хлороформа розового окрашивания, не исчезающего 30 сек.

При определении необходимо учитывать редуцирующую способность применяемых для экстракции кислот (смесь 20 мл 1% соляной кислоты и 80 мл 2% метафосфорной или 1% щавелевой кислоты). Для этого две порции смеси кислот по 10 мл титруют индофеноловым реактивом до розового окрашивания. Полученную поправку (обычно не превышающую 0,08-0,10 мл раствора краски) вычитают из данных титрования опытных растворов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В МОЛОКЕ

ХОД РАБОТЫ. Для определения аскорбиновой кислоты в молоке предварительно осаждают белки.

В колбочку наливают 50 мл молока и добавляют 4 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты, взбалтывают, приливают 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия, взбалтывают и оставляют при комнатной температуре на 5 мин. Затем содержимое колбочки фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отмеривают пипеткой 20 мл фильтрата и титруют его индофеноловым реактивом до слабо-розового цвета, сохраняющегося 30 секунд. Берут еще 20 мл фильтрата и титрование повторяют. Для расчета берут средний результат.

Параллельно проводят контрольное определение, для чего в колбочке смешивают 50 мл воды, 4 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты и 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Далее поступают как в основном опыте.

Содержание аскорбиновой кислоты (X мг/100 мл молока) рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot 64 \cdot M \cdot 100}{v \cdot v_1},$$

где $(a-b)$ – разность между объемами индофенолового реактива, пошедшего на титрование опытной и контрольной проб, мл;

64 - общий объем молока после добавления осадителей белка и жира;

M – масса аскорбиновой кислоты, соответствующая 1 мл индофенолового реактива (см. стр. 106), мг;
 v - объем фильтрата, взятого для титрования, мл;
 v_1 - объем молока, взятого для анализа, мл.

Контрольные вопросы

1. Количественное определение витамина С. Принцип метода.
2. Определение концентрации индофенолового реактива (краски Тильманса) по аскорбиновой кислоте.
3. Определение содержания витамина С в растительном материале.
4. Определение содержания витамина С в молоке.
5. Характеристика витамина С.

ВОПРОСЫ К ТЕСТАМ

Вопросы к зачётному тесту № 1

1. Общий химический состав живых организмов. Макро-, микро- и ультраэлементы. Органические и неорганические соединения клетки.
2. Клетка: определение, строение и функции органелл.
3. Классификация аминокислот: по полярности радикалов, по числу аминных и карбоксильных групп, по строению радикалов, по биологической ценности.
4. Характеристика аминокислот с неполярными (гидрофобными) радикалами, их роль в молекуле белка.
5. Характеристика аминокислот с полярными незаряженными, отрицательно и положительно заряженными радикалами, их роль в молекуле белка.
6. Заменяемые и незаменимые аминокислоты. Полноценные и неполноценные белки. Биологическая ценность белков.
7. Полипептидная теория строения белков. Глутатион: строение и биологическая роль.
8. Характеристика первичной и вторичной структуры белков.
9. Характеристика третичной и четвертичной структуры белков.
10. Растворимость и осаждаемость белков. Устойчивость раствора белка.
11. Коллоидное состояние растворов белков.

12. Денатурация белков и её роль в пищевой технологии.
13. Характеристика групп простых белков.
14. Характеристика групп сложных белков.
15. Структурные компоненты нуклеиновых кислот.
16. Строение и биологическая роль ДНК. Правила Чаргаффа. Комплементарность. Репликация.
17. Строение и биологическая роль РНК. Виды РНК.
18. Свободные нуклеотиды и их производные. Динуклеотиды. АТФ: строение и биологическая роль.

Вопросы к зачётному тесту № 2

1. Ферменты: определение, химическая природа, отличие от катализаторов небиологического происхождения. Иммуобилизованные ферменты.
2. Строение однокомпонентных и двухкомпонентных ферментов.
3. Строение активного центра одно- и двухкомпонентных ферментов. Аллостерический центр ферментов.
4. Специфичность ферментов и её виды.
5. Единицы активности ферментов.
6. Влияние температуры и рН на скорость ферментативной реакции.
7. Активаторы и ингибиторы ферментов. Виды ингибирования.
8. Классификация ферментов.
9. Пиридиновые дегидрогеназы: строение и тип катализируемых реакций. Алкогольдегидрогеназа. Лактатдегидрогеназа.
10. Флавиновые дегидрогеназы: строение и тип катализируемых реакций. Сукцинатдегидрогеназа. Альдегидоксидаза.
11. Каталаза и пероксидаза: строение и тип катализируемых реакций. Роль в обмене и пищевой технологии.
12. Аминотрансферазы. Гексокиназы.
13. Гидролазы. Липаза и фосфатаза: тип катализируемых реакций, роль в обмене и пищевой технологии.
14. Пептидгидролазы. Протеиназы. Пептидазы. Сычужный фермент.
15. Изомеразы. Триозофосфатизомераза. Глюкозофосфатизомераза.
16. Лигазы (синтетазы). Пируваткарбоксилаза.
17. Витамины: определение, классификация, роль в организме.

18. Жирорастворимые витамины (A, D, E): химическая природа, роль в обмене. Пищевые источники.
19. Водорастворимые витамины (B1, B2, B3, B5, B6, B12, C): химическая природа, роль в обмене. Пищевые источники.
20. Антибиотики: определение, классификация. Роль в организме.
21. Общая характеристика алкалоидов.

Вопросы к зачётному тесту № 3

1. Углеводы: определение, классификация, роль в живой природе.
2. Понятие о метаболизме, анаболизме, катаболизме.
3. Фотосинтез: определение, световые реакции фотосинтеза.
4. Темновые реакции фотосинтеза.
5. Превращение углеводов в процессе пищеварения.
6. Биосинтез гликогена.
7. Биосинтез лактозы.
8. Биосинтез сахарозы.
9. Гликолиз: определение, основные этапы, суммарное уравнение. Гликолиз в мышцах при недостатке кислорода.
10. Пути включения в гликолиз моносахаридов и дисахаридов.
11. Распад крахмала и гликогена в клетке. Гидролиз. Фосфоролиз.
12. Спиртовое брожение.
13. Молочнокислое брожение. Сбраживание лактозы.
14. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Характеристика мультиферментного комплекса. Суммарное уравнение.
15. Цикл Кребса: конечные продукты, биологическая роль.
16. Дыхательная цепь. Окислительное фосфорилирование. Выход АТФ при полном окислении глюкозы у аэробов.
17. Липиды: определение, классификация, биологическая роль. Незаменимые жирные кислоты.
18. Ацилглицеролы (жиры): строение, свойства. Числа жира.
19. Фосфолипиды: строение, классификация, роль в живых организмах и пищевой технологии.
20. Синтез глицерол – 3 – фосфата. Окисление глицерола.
21. Синтез насыщенных жирных кислот.
22. Синтез ацилглицеролов (нейтральных жиров).

23. Переваривание липидов (жиров и глицерофосфолипидов) в процессе пищеварения.
24. β – окисление жирных кислот в тканях.
25. Глиоксилатный цикл.
26. Роль белков в обмене и питании. Норма белка в питании. Азотистый баланс и его виды. Физиологический минимум белка.
27. Переваривание белков. Пептидгидролазы (протеазы). Протеиназы. Пептидазы. Сычужный фермент.
28. Распад аминокислот по α -аминогруппе (дезаминирование) и по α -карбоксильной группе (декарбоксилирование).
29. Синтез аминокислот в организме. Аминирование. Переаминирование.
31. Усвоение азота растениями: восстановление нитратов и нитритов.
32. Синтез белка.
33. Химический синтез пептидов. Типы пептидного синтеза.
34. Метаболизм ксенобиотиков.
35. Мембранный транспорт.

Библиографический список

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: Учебник. - М.: Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учебник. - М.: Высшая школа, 2000. - 479 с.
3. Королев А.П. Руководство к лабораторным занятиям по биохимии: Учебное пособие для студентов специальности «Технология молока и молочных продуктов». - Кемерово: ЛМТ КемТИПП, 1994. – 96 с.
4. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1-3. Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 1055 с.
5. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений: Учебник. – М.: Агропромиздат, 1985. – 255 с.
6. Скворцова Р.И. Биологическая химия: Методические указания к выполнению лабораторных работ для студентов специ-

альностей 2702, 2704 в 2-х частях. - Кемерово: РИО КемТИППа, 1989 . – 98 с.

7. Шапкарин В.В. Биологическая химия: Методические указания к выполнению лабораторных работ для студентов специальности 2711. - Кемерово, ЛМТ КемТИПП. - 1992. - 40 с.
8. Шапкарин В.В. Рекомендации, программа, график, письменные консультации и контрольные вопросы для самостоятельной работы студентов специальности 2707 «Технология жиров» по биохимии. - Кемерово: ЛМТ КемТИПП, 1995. – 36 с.
9. Шапкарин В.В., Королёв А.П., Гридина С.Б. и др. Биохимия: сборник лабораторных работ. – КемТИПП. Кемерово, 2005. – 84 с.
10. Пинчук Л.Г., Зинкевич Е.П., Гридина С.Б. Биохимия: учеб. пособие. – КемТИПП. – Кемерово, 2011. – 364 с.

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Зинкевич Елена Павловна
Лобова Тамара Васильевна
Еремина Ирина Александровна

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Лабораторный практикум

Для студентов вузов

Редактор *А.В. Дюмина*
Технический редактор *О.П. Долгополова*
Художественный редактор *О.П. Долгополова*

ЛР № 020524 от 02.06.97
Подписано в печать . Формат 60x84^{1/16}
Бумага типографская. Гарнитура Times New Roman
Уч.-изд. л. 6,5. Тираж 200 экз.
Заказ №

Оригинал-макет изготовлен в лаборатории множительной техники
Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета)
650002, г. Кемерово, ул. Институтская, 7

ПЛД № 44-09 от 10.10.99
Отпечатано в лаборатории множительной техники
Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета)
650002, г. Кемерово, ул. Институтская, 7