

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 27.01.2021 17:29:32

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d088

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»
(ЮЗГУ)

Кафедра товароведения, технологии и экспертизы товаров



ПИЩЕВАЯ БИОХИМИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ
для студентов направления 19.03.03 «Продукты питания животного
происхождения»

Курск 2019

УДК: 540

Составитель: А.Г. Беляев

Рецензент

Кандидат фармацевтических наук, доцент *Л.А. Горбачева*

Пищевая биохимия: методические указания по выполнению лабораторных работ / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: А.Г. Беляев. Курск, 2019. 55 с.: Библиогр.: с.55

Приводится перечень лабораторных работ, цель их выполнения, вопросы для подготовки, краткие теоретические сведения, задания, рекомендуемая литература.

Предназначены для студентов направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» очной, заочной и сокращенной форм обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать 20.02.19. Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 3,19 Уч.-изд. л. 2,89 Тираж 50 экз. Заказ. 118 Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Лабораторная работа №1 Правила безопасной работы в лаборатории биохимии. Цветные реакции на белки и аминокислоты	7
Лабораторная работа №2 Выделение белков из биологических объектов. Реакции осаждения белков	16
Лабораторная работа №3 Выделение ферментов и обнаружение их действия. Специфичность действия ферментов.	21
Лабораторная работа №4 Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)	27
Лабораторная работа №5 Определение жирорастворимых витаминов в продуктах питания.	30
Лабораторная работа №6 Определение водорастворимых витаминов в продуктах питания.	35
Лабораторная работа №7 Определение углеводов. Определение инвертного сахара в меде. Реакция Троммера	40
Лабораторная работа №8 Обнаружение липидов. Растворение и эмульгирование жиров. Определение йодного и кислотного числа жира	44
Список рекомендуемой литературы	55

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к выполнению лабораторных работ предназначены для студентов направления для студентов направления подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения» с целью закрепления и углубления ими знаний, полученных на лекциях и при самостоятельном изучении учебной литературы.

Методические указания разработаны в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта. Перечень лабораторных работ, их объем соответствуют учебному плану и рабочей программе дисциплины. При подготовке к занятиям студенты должны изучить соответствующий теоретический материал по учебной литературе, приобрести теоретические и практические знания по вопросам физиологии и биохимии питания.

Студенты должны ознакомиться с содержанием (теоретической частью) и порядком выполнения лабораторной работы.

Каждое занятие содержит цель его выполнения, контрольные вопросы, краткие теоретические сведения, задания для выполнения. При выполнении работ основным методом обучения является самостоятельная работа студентов под руководством преподавателя. Результаты выполненных каждым студентом заданий обсуждаются в конце занятий. Оценка преподавателем работы студента осуществляется комплексно: по результатам выполненного задания, устному сообщению и качеству оформления работы, что может быть учтено в рейтинговой оценке знаний студента.

Правила оформления 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 го-

товой 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, происходящих реакций или процессов, схемы исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод.

1. Отчеты по каждой теме занятия оформляются в отдельной тетради.
2. Перед оформлением каждой работы студент должен четко написать ее название, цель выполнения, краткие ответы на вопросы для подготовки, объекты и результаты исследования, выводы по результатам работ. Если предусмотрено оформление работ в виде таблиц, то необходимо все результаты занести в таблицу в тетради. После каждого задания должно быть сделано заключение с обобщением, систематизацией или обоснованием результатов исследований.
3. Каждую выполненную работу студент защищает в течение учебного семестра. Выполнение и успешная защита работ являются допуском к сдаче теоретического курса на экзамене.

Наименование работ	Объем, часов		
	очная	заочная	Сокращенная (по индивидуальному плану)
Лабораторная работа №1 Правила безопасной работы в лаборатории биохимии. Цветные реакции на белки и аминокислоты	2		
Лабораторная работа №2 Выделение белков из биологических объектов. Реакции осаждения белков	2		
Лабораторная работа №3 Выделение ферментов и обнаружение их действия. Специфичность действия ферментов.	2		
Лабораторная работа №4 Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)	2	2	2
Лабораторная работа №5 Определение жирорастворимых витаминов в продуктах питания.	2	2	2
Лабораторная работа №6 Определение водорастворимых витаминов в продуктах питания.	4*		
Лабораторная работа №7 Определение углеводов. Определение инвертного сахара в меде. Реакция Троммера	2		
Лабораторная работа №8 Обнаружение липидов. Растворение и эмульгирование жиров. Определение йодного и кислотного числа жира	2		
Итого, час.	18	4	4

Примечание: * - лабораторные работы, проводятся с использованием интерактивных форм ведения занятий.

Лабораторная работа №1

Правила безопасной работы в лаборатории биохимии.
Цветные реакции на белки и аминокислоты

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Ознакомиться с правилами безопасной работы в лаборатории биохимии. Изучить цветные реакции на белки и аминокислоты

1. Теоретическая часть.

Правила безопасной работы в лаборатории биохимии

1. Работу в лаборатории необходимо выполнять в халатах.
1. Всю посуду перед выполнением работы необходимо вымыть.
2. Концентрированные кислоты, щелочи и другие сильнодействующие реактивы набирать пипеткой с грушей или отмерять цилиндром.
3. Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и легкоиспаряющимися веществами производить только в вытяжном шкафу.
4. Если пролили концентрированную кислоту или щелочь, то их надо нейтрализовать толченым мелом или раствором кислоты, соответственно, а затем смыть водой.
5. При попадании концентрированной кислоты или щелочи на кожу, необходимо быстро смыть водой, а затем соответственно 2 % раствором бикарбоната натрия или 2 % раствором борной кислоты.
6. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.
7. Категорически запрещается принимать в лаборатории пищу, пользоваться лабораторной посудой для питья.

8. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.

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. Кроме белков, из аминокислот построены пептиды – соединения, содержащие до 20 аминокислотных остатков и полипептиды, содержащие от 20 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.

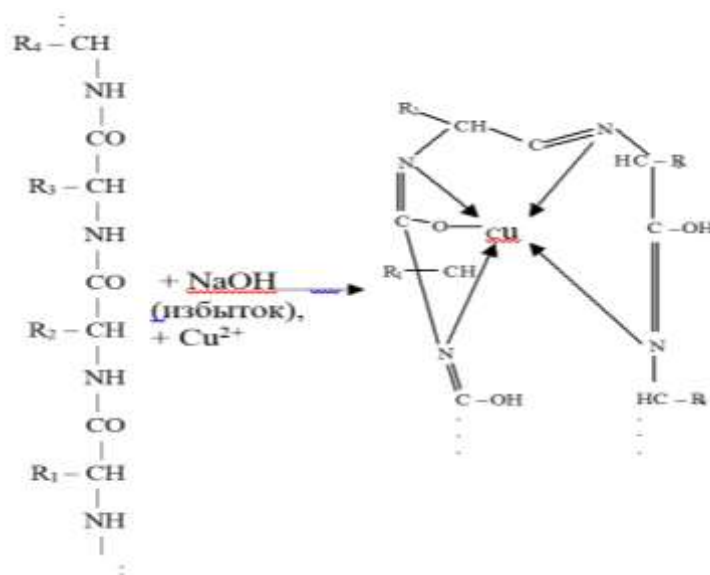
Молекулярная масса белков варьирует от 6 тыс. до 1 млн. и более. Химические и физические свойства белков обусловлены химической природой и физико-химическими свойствами радикалов, входящих в них остатков аминокислот. Способы обнаружения и количественного определения белков в биологических объектах и продуктах питания, а также выделения их из тканей и биологических жидкостей основаны на физических и химических свойствах этих соединений. 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.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Реактивы, используемые в работе: 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 или бензола 0,1 %, ацетата свинца 5 %, нингидрина в ацетоне или этаноле 1%; концентрированная азотная кислота.

Биуретовая реакция. 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 -CO-NH-, связанных непосредственно между собой или при участии атома углерода или азота. Образующееся в щелочной среде комплексное соединение меди (II) с пептидными группами имеет следующее строение:



Ионы меди (II) соединяются двумя ионными связями с группами $=C-O$ и четырьмя координационными связями с атомами азота ($=N-$).

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 ($NH_2-CO-NH-CO-NH_2$), оксамид ($NH_2-CO-CO-NH_2$), гистидин.

Реактивы: 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствор желатины; раствор аминокислоты (глицина) 10% раствор NaOH; 1 % раствор $CuSO_4$.

Ход работы. Берут пять пробирок и вносят по 1 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 2 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 повысить путем наслоения на раствор белка в щелочи 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Результаты этой и всех других цветных реакций на белки и аминокислоты вносят в табл. 1.

Таблица 1. Цветные реакции на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Биуретовая реакция		
Вода		
Казеин молока		
Яичный белок		
Желатин		

Аминокислота		
Нингидриновая реакция		
Вода		
Казеин молока		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
Ксантопротеиновая реакция		
Казеин молока		
Яичный белок		
Желатин		
Бензол		
Реакция Фоля (на слабосвязанную серу)		
Вода		
Казеин молока		
Яичный белок		
Желатин		
Реакция Адамкевича		
Вода		
Казеин молока		
Яичный белок		
Желатин		

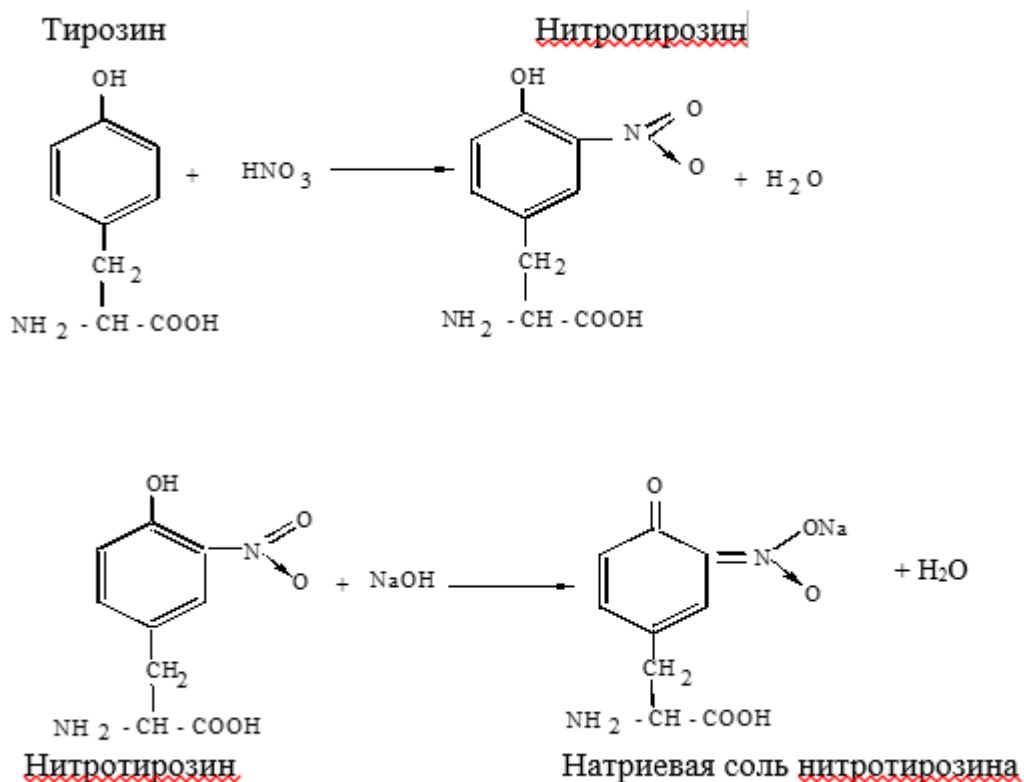
Нингидриновая реакция. В этой реакции растворы белка, полипептидов, пептидов и свободных α -аминокислот при нагревании с нингидрином дают синее, сине-фиолетовое или розово-фиолетовое окрашивание. Окраска в этой реакции развивается за счет α -аминогруппы. Реакция протекает в две стадии. Нингидрин образует с аминокислотами соединения с двойной связью между углеродом и азотом, называемые имидами или основаниями Шиффа. Эти соединения обладают высокой реакционной способностью. Дальнейшее превращение их приводит к промежуточному амину, который может реагировать со второй молекулой нингидрина, давая соединение, окрашенное в сине-фиолетовый (пурпурный) цвет – сине-фиолетовый (пурпурный) Руэмана. 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.

Реактивы: 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствор желатины; раствор аминокислоты (глицина) раствор с массовой долей нингидрина в ацетоне или этаноле 1 %.

Ход работы. Берут пять пробирок, и вносят по 1 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 капель 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.

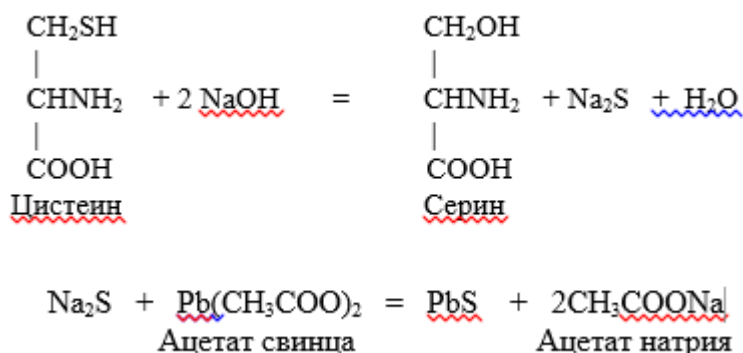
Реактивы: 10% раствор NaOH, HNO₃ (конц.), 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствора желатины; раствор аминокислоты, бензол.

Ход работы

Берут четыре пробирки и вносят по 1 мл: в первую раствора казеина, во вторую – раствора яичного белка, в третью – раствора желатины, в четвертую – раствора бензола. 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 пробирки-

рок 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, содержащегося 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 аминокрупп (реакция дезаминирования) в виде аммиака, который можно обнаружить по запаху и посредством смоченной водой красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (**не касаться стенок!**).

Реактивы: 1% раствор яичного белка; раствора казеина; раствор желатины; раствор аминокислоты; реактив Фоля (к 5% раствору ацетата свинца прибавляют равный объем 30% раствора гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка).

Ход работы К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель реактива Фоля и кипятят 2-3 мин. После отстаивания 1-2 мин. появляется черный или бурый осадок.

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.

Контрольные вопросы

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

Лабораторная работа №2

Выделение белков из биологических объектов. Реакции осаждения белков

План занятия

1. Теоретическая часть.

2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить методы выделения белков из биологических объектов. Реакции осаждения белков

1. Теоретическая часть.

Белки в растворе и соответственно в организме сохраняются в нативном (природном) состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная (водная) оболочка вокруг нее. Удаление этих факторов приводит к склеиванию молекул белков и выпадению их в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необратимым в зависимости от состава реактивов и условий реакции.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Обратимое осаждение

Под действием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) этих факторов белки вновь переходят в растворимое состояние и приобретают свои нативные свойства. Одним из видов обратимого осаждения белков является высаливание.

Высаливание

Насыщенным раствором сульфата аммония осаждается альбуминовая фракция белков, полунасыщенным раствором сульфата аммония—глобулиновая фракция. Сущность реакции заключается в дегидратации (обезвоживании) молекул белка.

Реактивы: неразведенный яичный белок; насыщенный раствор сульфата аммония, 10% раствор гидроксида натрия; 1% раствор сульфата меди; сульфат аммония в порошке.

Ход работы: В пробирку наливают 30 капель неразведенного яичного белка и добавляют равное количество насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешивают. Получают полунасыщенный раствор сульфата аммония, при этом глобулиновая фракция белка осаждается, а альбуминовая остается в растворе. Через 5 мин. Осадок отфильтровывается, на фильтре остается глобулиновая фракция, а в фильтрате—альбуминовая

Осадок с фильтра снимают стеклянной палочкой и переносят в пробирку, куда добавляют 5 капель воды.

Осадок растворяется. Наличие в растворе белка можно доказать с помощью биуретовой реакции, которая будет положительной (проведите реакцию). В пробирку с фильтратом добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения раствора, т.е. до тех пор, пока не прекратится растворение соли. При этом - выпадает осадок— альбумины. Его отфильтровывают, растворяют и проводят биуретовую реакцию.

Необратимое осаждение

Необратимое осаждение белков связано с глубокими нарушениями структуры белков (вторичной и третичной) и потерей ими своих нативных свойств, т.е. денатурацией. Такие изменения белков можно вызвать кипячением, действием концентрированных растворов минеральных и органических кислот, солями тяжелых металлов и т.д.

Осаждение при кипячении.

Белки являются термолабильными соединениями и при нагревании свыше 50-60°C денатурируются. Сущность тепловой денатурации заключается в разрушении гидратной оболочки, разрыве стабилизирующих белковую глобулу связей и разворачивании белковой молекулы. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке (когда заряд молекулы равен нулю), поскольку при этом частицы белка наименее устойчивы. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки с основными свойствами—в слабощелочной.

В сильнокислых или сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, так как его частицы перезаряжаются и несут в первом случае положительный, а во втором—отрицательный заряд, что повышает их устойчивость в растворе.

Реактивы: 1 % раствор яичного белка; 1 % и 10% растворы уксусная кислоты; 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы: В 4 пронумерованные пробирки приливают по 10 капель раствора яичного белка. Затем 1-ю пробирку нагревают

до кипения, при этом раствор белка мутнеет, но так как частицы денатурированного белка несут заряд, они в осадок не выпадают.

Это связано с тем, что яичный белок имеет кислые свойства (изоэлектрическая точка белка 4.8) и в нейтральной среде заряжен отрицательно; во-2-ую пробирку добавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Белок выпадает в осадок, так как его раствор приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд (один из факторов устойчивости белка в растворе). В 3-ю пробирку добавляют 1 каплю 10% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в сильноокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе). В 4-ю пробирку добавляют 1 каплю раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Осадок не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд частиц белка увеличивается.

Осаждение концентрированными минеральными кислотами.

Концентрированные кислоты (серная, хлороводородная, азотная и др.) вызывают денатурацию белка за счет удаления факторов устойчивости белка в растворе (заряда и гидратной оболочки). Однако при избытке хлороводородной и серной кислот выпавший осадок денатурированного белка вновь растворяется. По-видимому, это происходит в результате перезарядки молекул белка и частичного его гидролиза. При добавлении избытка азотной кислоты растворения осадка не происходит (точный механизм этого явления не установлен).

Реактивы: яичный белок; концентрированная серная кислота; концентрированная хлороводородная кислота; концентрированная азотная кислота.

Ход работы: В три пробирки наливают по 5 капель концентрированной серной, хлороводородной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирку под углом 45° , осторожно по стенке пробирки (так, чтобы жидкости не смешивались) наслаивают такой же объем раствора яичного белка. На границе двух слоев появляется осадок белка в виде, белого кольца. Осторожно встряхивают пробирки, наблюдают растворение белка в пробирках с серной и хлороводо-

родной кислотами, в пробирке с азотной кислотой растворение белка не происходит.

Осаждение солями тяжёлых металлов Белки при взаимодействии с солями свинца, меди, ртути, серебра и других тяжелых металлов денатурируются и выпадают в осадок. Однако при избытке некоторых солей наблюдается растворение первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле.

Реактивы: 1% раствор яичного-белка; 10% раствор сульфата меди; 5% раствор ацетата свинца; 5% раствор нитрата серебра.

Ход работы: В три пробирки вносят по 5 капель белка. В первую пробирку добавляют 1 каплю сульфата меди, во вторую - 1 каплю ацетата свинца, в третью - 1 каплю нитрата серебра. Затем в первую пробирку добавляют 10 капель сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку вносят 10 капель нитрата серебра - осадок не растворяется.

Контрольные вопросы

1. Правильны ли утверждения:

- а) белки состоят из аминокислот;
- б) все природные аминокислоты являются, а аминокислотами;
- в) в составе аминокислот содержится группировка $-CH - NH_2 - COOH$;
- г) аминокислоты различаются своими радикалами;
- д) в составе аминокислот обязательно присутствует сера.

2. Почему все белки дают яркую биуретовую реакцию?

3. Выберите правильный ответ.

Факторами устойчивости водного раствора белка являются:

- а) электрический заряд белковой молекулы;
- б) водная (гидратная) оболочка; в) наличие серосодержащих аминокислот.

4. Выберите правильные ответы.

Соли щелочных и щелочноземельных металлов, применяемые для осаждения белков:

- а) удаляют водную оболочку и снимают электрический заряд;
- б) изменяют изоточку белка.

5. Выберите правильный ответ.

При денатурации белков происходят:

- а) изменение первичной структуры белка;
- б) потеря нативных свойств белка;
- в) уменьшение растворимости;
- г) изменение вторичной и третичной структуры белка.

6. Почему альбуминовая фракция белков осаждается насыщенным раствором сульфата аммония, а глобулиновая - полунасыщенным?

7. Почему при нагревании в слабокислой или слабощелочной среде белок выпадает в осадок?

Лабораторная работа №3

Выделение ферментов и обнаружение их действия.
Специфичность действия ферментов

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить методы выделения ферментов и обнаружение их действия. Изучить специфичность действия ферментов

1. Теоретическая часть.

Ферментами (энзимами) называют специфические белки, обладающие каталитическим действием. Они 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 °С и рН близких к 7,0.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Выделение ферментов и обнаружение их действия

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.

Обнаружение крахмала.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета. Этой реакцией пользуются для выявления активности ферментов, гидролизующих крахмал.

Реактивы: 1% раствор крахмала; йод (1% раствор в 2% растворе йодида калия).

Ход работы: К 10 каплям крахмала добавляют 1 - 2 капли йода; Наблюдается ярко-синее окрашивание. Напишите уравнение реакции, лежащее в основе данного опыта.

Ферментативный гидролиз крахмала.

Фермент слюны амилаза при определенных условиях производит гидролиз крахмала до мальтозы и глюкозы.

Обнаружение продуктов гидролиза проводят с помощью реакций с раствором йода и реакции Троммера. Не гидролизованный крахмал дает с йодом синее окрашивание (положительная реакция), глюкоза такого окрашивания не дает. Положительную реакцию Троммера (кирпично-красное окрашивание) дает глюкоза, то-

№	Субстрат	Фермент	Реакции
---	----------	---------	---------

гда как крахмал такой реакции не дает.

Реактивы: 1% раствор крахмала; водный раствор слюны (ополоснуть рот водой. Снова набрать в рот немного воды, подержать 2 мин, выпустить на подготовленный фильтр. Фильтрат использовать для работы); 10% раствор гидроксида натрия; 1% раствор йода в 2% растворе йодида калия; 5% раствор сульфата меди

Ход работы: В две пробирки наливают по 10 капель раствора крахмала. В 1-ю вносят 5 капель воды (контроль), а во 2-ю — 5 капель раствора слюны. Перемешивают и ставят в термостат на 15 мин. при 37°C.

В две чистые пробирки отбирают по 4 капли содержимого первой пробирки (контроль) В одну из них прибавляют 1 каплю раствора йода. Наблюдают и записывают результат. В другую добавляют 1 каплю сульфата меди и 4 капли гидроксида натрия, нагревают до кипения. Отмечают результат.

Аналогичные реакции проделывают с содержимым 2-й пробирки. Результаты работы оформляют в таблицу.

Таблица 1 Гидролиз крахмала амилазой слюны

пробирки			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Вода (контроль)		
2		Амилаза		

Специфичность действия ферментов.

Ряд ферментов осуществляет расщепление строго определенных веществ, т.е. обладает абсолютной специфичностью. Однако большинство ферментов имеет относительную специфичность—расщепляет группу веществ, имеющих одинаковые связи в молекуле (пептидные, эфирные и др.). Специфическим субстратом для фермента амилазы является крахмал, для фермента сахаразы—сахароза. Реактивы: раствор слюны; 1 % раствор крахмала; 2% раствор сахарозы

Специфичность амилазы.

Ход работы: В одну пробирку вносят 10 капель раствора крахмала, в другую—такое же количество сахарозы. В обе пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, помещают в термостат на 15 мин. При температуре 37°C. С содержимым пробирок выполняют реакцию с раствором йода и реакцию Троммера Результаты записывают в виде таблицы.

2. Специфичность сахаразы.

Ход работы: В одну пробирку вносят 10 капель раствора сахарозы. В обе пробирки добавляют по 4 капли раствора сахаразы, помещают в термостат на 15 мин при температуре 37°C. С содержимым каждой пробирки выполняют реакцию с раствором йода и реакцию Троммера. Результаты опыта записывают в виде таблицы. Делают общий вывод о расщеплении субстратов только специфическими ферментами.

Таблица 2 Определение специфичности действия ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакции	
			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Амилаза		
2	Сахараза		
3	Сахароза	Амилаза		

4		Сахараза		
---	--	----------	--	--

Влияние температуры на активность ферментов.

Ферменты термолабильны и проявляют оптимальную активность при температуре 35-45°C. При повышении температуры (свыше 50°C) их активность снижается, а затем происходит разрушение структуры молекулы фермента.

Реактивы: раствор слюны; 1% раствор крахмала; 1% раствор йода; 5% раствор сульфата меди; 10% раствор гидроксида натрия; термостат.

Ход работы: В две пробирки вносят по 10 капель раствора крахмала. В одну из них добавляют 5 капель раствора слюны, в другую—такое же количество предварительно прокипяченной слюны. Пробирки встряхивают, помещают в термостат на 15 мин. при температуре 37°C. Охлаждают и проводят реакции с раствором йода и реакцию Троммера. Результаты записывают в виде таблицы и делают выводы.

Таблица 3 Влияние температуры на активность ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Температура °С	Реакции	
				с йодом	Троммера
1	Крахмал	Амилаза	37		
2		Амилаза (прокипяченная)	100		

Влияние pH среды на активность ферментов.

Для амилазы слюны оптимальное значение pH среды—6,8. В кислой и щелочной среде активность ее снижается и расщепление крахмала происходит не полностью, до стадии декстринов, которые с раствором йода дают красно-фиолетовую или красно-бурую окраску.

Реактивы: слюна - раствор, разведенный в 10 раз; 1% раствор крахмала; 1% раствор йода; 0,2% раствор соляной кислоты, H₂O дистиллированная

Ход работы: В 8 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды. В 1-ю пробирку вносят 1 мл раствора хлороводородной кислоты, перемешивают, отбирают из этой про-

бирки 1 мл смеси и переносят его во 2-ю пробирку. Содержимое 2-й пробирки перемешивают, отбирают 1 мл полученной смеси и переносят в 3-ю пробирку и т.д. Из 8-й пробирки 1 мл смеси выливают. Таким образом, в пробирках получают разведения хлор водородной кислоты в убывающей концентрации, соответствующей различным значениям рН среды.

После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны. Пробирки встряхивают и помещают в термостат на 15 мин. при температуре 37°C. Затем охлаждают под проточной водой и добавляют по 3 капли раствора йода. Отмечают, при какой концентрации хлороводородной кислоты (рН среды) произошел полный гидролиз крахмала.

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют его активации или блокированию. Для фермента слюны амилазы активатором является хлорид натрия, а ингибитором—сульфат меди.

Реактивы: Раствор слюны (слюна, разведенная в 5 раз); H₂O дистиллированная; 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди; 1% раствор хлорида натрия.

Ход работы: В 3 пробирки отмеривают по 10 капель раствора слюны. Затем добавляют по одной капле: в 1-ю—хлорид натрия, во 2-ю—сульфат меди, в 3-ю— воды (контроль).

Перемешивают, вносят в каждую пробирку по 5 капель раствора крахмала и оставляют на 3 мин. при комнатной температуре.

Затем добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают, наблюдают за окраской растворов и определяют, в какой пробирке действовал активатор или ингибитор. Результаты опыта оформляют в тетради в виде таблицы.

Таблица 4 Действия активатора и ингибитора на активность амилазы

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом в присутствии		
			воды	сульфата меди	хлорида натрия -
1	Крахмал	Амилаза			

2					
3					

Контрольные вопросы

1. Правильны ли утверждения:
 - а) все ферменты по своей химической природе являются белками;
 - б) ферменты являются биологическими катализаторами;
 - в) все ферменты способны катализировать как прямую, так и обратную реакцию
2. Как можно обнаружить наличие фермента в биологической жидкости?
3. Какой фермент содержится в слюне? Какой субстрат следует добавить в раствор слюны, чтобы проявилось действие этого фермента? Почему?
4. Выберите правильный ответ. Все ферменты обладают:
 - а) абсолютной специфичностью;
 - б) относительной специфичностью;
 - в) высокой специфичностью, в основе которой лежит строгое соответствие структуры субстрата и активного центра фермента.
5. Почему в опытах с амилазой слюны при добавлении крахмала (1) и сахарозы (2) реакция Троммера в первом случае была положительной, а во втором отрицательной?
6. Правильны ли утверждения:
 - а) каждый фермент проявляет свою активность при определенном значении рН среды;
 - б) оптимум рН среды для амилазы слюны 6,8 - 7,4;
 - в) оптимум рН среды для пепсина 1,0-1,5.

Лабораторная работа №4

Определение активности каталазы
(по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить действие ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции.

1. Теоретическая часть.

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

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

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

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

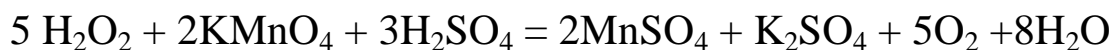
Каталаза (КФ 1.11.1.6) относится к гемопротейнам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород: $2 \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты образующие и обезвреживающие H₂O₂ находятся в пероксисомах – органеллах, покрытых мембраной.

Главными потребителями H₂O₂ являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов [2H] на H₂O₂, восстанавливая его до 2 H₂O. Молекулы пероксида водорода, невостребованные пероксидазами, обезвреживаются каталазой.

2. Выполнение заданий по теме занятия

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



На основании приведенного уравнения реакции можно считать, 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 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 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.

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 %.

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. Характеристика строения и действия цитохромов.

7. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
8. Метод определения активности каталазы.

Лабораторная работа №5

Определение жирорастворимых витаминов в продуктах питания.

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить методы определения жирорастворимых витаминов в продуктах питания.

1. Теоретическая часть.

Витаминами называют низкомолекулярные органические соединения, необходимые, для нормальной жизнедеятельности организмов и выполняющие каталитические и регуляторные функции. Витамин А содержится в печени и жировой ткани рыб, в яичном белке, молоке, сливочном масле. В растительной пище есть особые вещества - каротины, превращающиеся в организме человека в витамин А. Каротинами богаты абрикосы, морковь, помидоры, шпинат, чернослив и т.д..

При недостатке витамина А в организме обнаруживается задержка роста, падает вес, понижается аппетит, развиваются заболевания кожи и глаз.

Продукты прогоркания жира разрушают витамин А. Он легко разрушается при хранении продуктов питания и при сушке овощей.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Реакция с хлоридом железа (III).

Реактивы: раствор FeCl_3 1%, растительное масло, рыбий жир.

Ход работы: в пробирку вносят 2мл исследуемого

раствора, рыбьего жира, а вдругую 2 мл растительного масла. Добавляют в обе пробирки по 6-7 капель раствора хлорида железа (Ш). При наличии витамина А раствор жиров окрашивается в ярко-зеленый цвет.

Реакция с серной кислотой.

Реактивы: серная кислота концентрированная, растительное масло, рыбий жир.

Ход работы в пробирку вносят 2мл исследуемого раствора рыбьего жира, а вдругую 2 мл растительного масла. Добавляют в обе пробирки по 1-2 мл концентрированной серной кислоты. В присутствии витамина А появляется синяя окраска, которая переходит в фиолетовую, а затем в красно-бурую.

Полученные результаты необходимо занести в таблицу.

Таблица 1 Результаты анализа.

Жиры	Наблюдения при реакции с		Заключение
	FeCl ₃ (раствор)	H ₂ SO ₄ (конц.)	
Рыбий жир			
Растительное масло			

Качественный анализ витамина D. Реакция с бромом.

Витамин D (кальциферол) регулирует обмен кальция и фосфора, входящих в состав зубной и костной ткани. Витамин D используют для лечения рахита, костных заболеваний, вызванных нарушением кальциевого обмена, туберкулеза и кожных заболеваний.

Кальциферол содержится в больших количествах наряду с витамином А в печени и жировой ткани рыб, в яичном желтке. В овощах, фруктах, зерновых культурах он не содержится.

Кристаллический витамин D не стоек при хранении, но в масляных растворах, защищенных от света, сохраняет свою активность в течении нескольких лет. Витамин D легко разрушается в кислой среде.

Реактивы: рыбий жир, сливочное масло (или куриный желток), раствор брома.

Ход работы: Налить в первую пробирку 2 мл рыбьего жира, а в другую 2 мл сливочного масла или куриного желтка. Затем необходимо добавить в обе пробирки по 6-8 капель брома. В присутствии витамина D должно появиться зеленовато-голубое окрашивание.

Качественный анализ витамина D. Реакция с анилином.

Реактивы: рыбий жир, раствор анилина в концентрированной соляной кислоте (15:1) (приготавливается перед использованием).

Ход работы: Налить в пробирку 6-8 капель рыбьего жира и добавить столько же раствора анилина. Раствор перемешать. Затем раствор нагреть до кипения и прокипятить 0,5 минут.

При наличии витамина D желтая эмульсия делается зеленой, а затем красной. Через одну - две минуты эмульсия делится на два слоя, из которых нижний окрашен в красный цвет.

Полученные данные запишите в таблицу 2

Таблица 2 Результаты наблюдений.

Жиры	Наблюдения при реакции с		Заключение
	Br_2 (раствор)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ (раствор)	
Рыбий жир			
Сливочное масло (куриный желток)			

Качественный анализ витамина E. Реакция с азотной кислотой.

Витамин Е — токоферол, содержатся как в животных, так и в растительный продуктах. Его много в зародышах пшеницы, хлопковом масле, яичном белке, в семенах яблок.

Витамин В — один из самых стойких витаминов, он не разрушается при кипячении, действии кислот, щелочей, не окисляется кислородом воздуха.

Реактивы: а—токоферол 0,1% (в спирте), азотная кислота (конц.).

Ход работы: Налить в пробирку 4-5 капель спиртового раствора а—токоферола, добавить 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое перемешать.

Затем поместить пробирку в водяную баню, нагретую до 70 С.

При наличии витамина Е образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается. Верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

Качественный анализ витамина Е. Реакция с хлоридом железа (III).

Реактивы: а—токоферол 0,1% (в спирте), раствор хлорида железа (III).

Ход работы: Налить в пробирку 4-5 капель спиртового раствора, а—токоферола, добавить 0,5 мл раствора хлорида железа (III) и содержимое пробирки перемешать.

Затем поместить пробирку в водяную баню, нагретую до 70 С. В присутствии витамина Е появится красная окраска.

Полученные данные запишите в таблицу 3.

Таблица 3 Результаты наблюдений.

Реагенты	Наблюдения	Заключение
HNO ₃ (конц.)		
FeCl ₃ (раствор)		

Качественный анализ витамина К. Витамин К обозначают по первой букве слова «коагуляция» - свертывание. Витамин К выпускается в виде препаратов: метиноп и викасол. Витамин К в больших количествах находится в зеленых листьях растений, а именно в крапиве, моркови, в шпинате, салате, капусте. Из источ-

ников животного происхождения, особенно, им богата свиная печень. А так же некоторые кишечные бактерии способны синтезировать витамин К. Витамин К способствует свертыванию крови.

Реактивы: спиртовой раствор викасола 0,1% или спиртовой раствор метинола 0,2%, раствор цистеина 0,025%, раствор гидроксида натрия 10%.

Ход работы: Налить в пробирку 1 мл спиртового раствора викасола (или метинола), добавить 2 капли раствора цистеина. Затем прилить 2 капли раствора гидроксида натрия. В присутствии витамина К появится желтое окрашивание.

Контрольные вопросы

- 1 Назовите продукты питания, содержащие витамин А.
- 2 В чем растворим витамин А?
- 3 Что такое каротины?
- 4 Что происходит в организме при нехватке витамина А?
- 5 Назовите характерные реакции для витамина А.
- 6 В каких продуктах питания содержится витамин D
- 7 К чему приводит недостаток витамина D?
- 8 Каковы химические свойства витамина D?
- 9 Назовите главные источники витамина D.
- 10 Витамин Е является жирорастворимым или водорастворимым?
- 11 Назовите источники витамина Е.
- 12 Для чего необходим витамин Е?
- 13 Как определить наличие витамина Е?
- 14 Для чего необходим витамин К? В каких случаях его используют?
- 15 Как определить наличие витамина К?

Лабораторная работа №6

Определение водорастворимых витаминов в продуктах питания.

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия

3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить методы определения водорастворимых витаминов в продуктах питания.

1. Теоретическая часть.

Витамин В₁ (тиамин) состоит из пиримидинового и тиазолового колец, связанных метиленовой группой

В связи с наличием в молекуле атома серы и аминогруппы этому витамину было дано химическое название тиамин. Тиамин в форме тиаминпирофосфата выполняет коферментные функции в реакциях декарбоксилирования α -кетокислот и в транскетолазной реакции.

Источником тиамина для человека служат, главным образом, хлеб и крупы, но в тех случаях, когда в процессе переработки зерна не происходит удаление зародышей и оболочек, которые в основном и содержат этот витамин. Очень много тиамина в пекарских и пивных дрожжах. В щелочной среде тиамин легко превращается в тиамин-тиол, который с диазореактивом образует сложное комплексное соединение красного или розово-оранжевого цвета.

Витамин В₂ (рибофлавин) в химическом отношении представляет азотистое основание (6,7-диметилизоаллоксазин), соединенное с остатком пятиатомного спирта рибитола (flaus -желтый).

Насыщенные водные растворы рибофлавина окрашены в желто-зеленый цвет с характерной желто-зеленой флуоресценцией в видимом и ультрафиолетовом свете. При действии восстановителей рибофлавин превращается в бесцветный и нефлуоресцирующий лейкофлавин.

Рибофлавин входит в состав двух родственных кофакторов - флавин-моноклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Источником рибофлавина для человека являются молоко и зеленые овощи, печень и почки животных, пивные и пекарские дрожжи.

Витамин С существует в окисленной (L-дегидроаскорбиновая кислота) и восстановленной (L-аскорбиновая кислота) формах. Несмотря на это, его называют аскорбиновой кислотой. Обе формы витамина С обладают биологической активностью, участвуют в

ферментативных окислительно-восстановительных реакциях, в частности, в окислении молочной, лимонной и других оксикислот; в гидроксировании остатков пролина и лизина в молекуле проколлагена с образованием гидроксипролина и гидроксилизина в молекулах коллагена и эластина. Биохимическая функция аскорбиновой кислоты окончательно не известна.

Человек, приматы и морские свинки не способны синтезировать аскорбиновую кислоту и должны получать ее с пищей. Большинство других видов животных и, вероятно, все растения могут синтезировать это соединение из глюкозы. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней.

Источником витамина С для человека служат самые разнообразные продукты растительного происхождения. Особенно много ее содержат черная смородина, плоды шиповника, хвоя ели и сосны, капуста, картофель, облепиха, рябина, красный перец, лимоны, черемша и др.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Анализ витамина В1

Реактивы: тиамин хлорид (витамин В1), раствор сульфаниловой кислоты 5М, раствор нитрата натрия 5%, раствор карбоната натрия 10%.

Ход работы: В пробирку, содержащую 5 капель сульфаниловой кислоты добавить 5 капель нитрата натрия. К полученному раствору добавить на кончике шпателя тиамин хлорид. Затем необходимо прилить 5-7 капель раствора карбоната натрия. В присутствии витамина В1 жидкость окрашивается в розовый цвет.

Анализ витамина В2. Восстановление рибофлавина выделяющимся водородом.

Реактивы: рибофлавин, соляная кислота (конц.), цинк (металлический), дистиллированная вода.

Ход работы: Растворить 1/10 часть таблетки рибофлавина в 0,5 мл воды. Затем добавить в раствор 10 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического

цинка. В присутствии витамина В₂ жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается.

Качественный анализ витамина С.

Аскорбиновая кислота (витамин С) представляет собой кристаллический порошок белого цвета, хорошо, растворим в воде. Особенно богаты витамином С зеленый грецкий орех, плоды шиповника, черной смородины, капуста, лимоны, апельсины, лук, чеснок, картофель.

Витамин С повышает иммунитет организма, полезен. При пониженной работоспособности и при различного рода кровотечениях.

Витамин С не накапливается в организме, поэтому его необходимо применять регулярно.

Нерационально совместное применение витамина С с сульфаниламидными препаратами, добавки аскорбиновой кислоты в мясные продукты тоже не безобидны.

Определение аскорбиновой кислоты основано на ее способности вступать в окислительно восстановительные реакции и восстанавливать, например, гексацианоферрат (III) калия. При последующем добавлении хлорида железа (III) образуется берлинская лазурь, окрашивающая раствор в синий цвет.

Аскорбиновая кислота восстанавливает нитрат серебра до серебра (темный осадок), а йод до йодоводорода.

При действии на аскорбиновую кислоту метиленовой сини, последняя восстанавливается до бесцветного соединения.

Реакция с нитратом серебра.

Реактивы: раствор аскорбиновой кислоты 0,002%, раствор нитрата серебра 0,1н.

Ход работы: В пробирку налить 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, после чего добавить в нее 2 капли раствора нитрата серебра. При этом наблюдается образование осадка серого цвета.

Реакция с красной кровяной солью.

Реактивы: раствор аскорбиновой кислоты 0,002%, раствор красной кровяной соли 5%, дистиллированная вода, раствор хлорида железа (III) 1%.

Ход работы: Налить в первую пробирку 2-3 мл раствора аскорбиновой кислоты, во вторую пробирку для контроля 2-3 мл дистиллированной воды.

Добавить в обе пробирки по 5 капель красной кровяной соли и по 5 капель раствора хлорида железа (III). При этом раствор аскорбиновой кислоты приобретает синее или зеленое окрашивание, а затем дает темно-синий осадок – берлинскую лазурь. В пробирке с водой раствор имеет бурую окраску.

Реакция с раствором йода.

Реактивы: раствор аскорбиновой кислоты 0,002%, раствор иода 0.1н.

Ход работы: Поместить в пробирку 5-6 капель раствора аскорбиновой кислоты, добавить 1-2 капли йода. При этом должно наблюдаться обесцвечивание раствора.

Анализ растительных объектов на наличие витамина С.

Реактивы: сок капусты (картофеля), гидроксид калия 10%, раствор гексоцианоферрата (III) калия, раствор хлорида железа (III) 1%, раствор соляной кислоты 10%.

Ход работы: Налить в пробирку 1 мл капустного (картофельного) сока, добавить 2 капли раствора гидроксида калия.

Затем добавить 2 капли раствора гексоцианоферрата (III) калия и энергично встряхнуть содержимое пробирки. После того добавить 6-8 капель раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Отметьте выпадение синего или зеленоватого-синего осадка.

Результаты опыта оформляют в тетради для лабораторных работ в виде таблицы.

Таблица 1 Результаты анализа.

Реагенты	Раствор витамина С	Растительные объекты	Заключение
AgNO ₃ (раствор)			
Красная кровяная соль (раствор)			
I ₂ (раствор)			
Метиленовая синь			

Качественный анализ витамина Р

Витамин Р является не одним веществом, а целым комплексом витаминов. В лимонах содержится один из них — цитрин. Из гречихи выделяют — рутин. К группе Р-витаминного действия относят так же кверцетин, который содержится в листьях чая.

Витамин Р повышает эластичность капиллярных сосудов и понижает их проницаемость. Витамин Р помогает в профилактике атеросклероза, гипертонической болезни и ревматизма, а также нормализует деятельность щитовидной железы, обладает свойством ослаблять чувство жажды.

Источниками витамина Р являются: черноплодная рябина, черная смородина, шиповник, укроп, петрушка, лимон и т.д..

Реактивы: раствор хлорида железа (III) 1%, водный раствор рутина.

Ход работы: Налить в пробирку 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина. Прибавить 5-6 капель раствора хлорида железа (III). При наличии витамина Р возникает зеленое окрашивание.

Контрольные вопросы

1. Назовите главные источники витамина В1.
2. Как необходимо хранить витамин В1? С чем это связано?
3. Для чего необходим организму витамин В₁.
4. Назовите главные источники рибофлавина.
5. Назовите характерную реакция для определения витамина В1
6. Назовите характерную реакция для определения витамина В₂.
7. Каковы физические свойства аскорбиновой кислоты?
8. Какие изменения наблюдаются в организме при недостатке витамина С?
9. Какие химические свойства лежат в основе анализа аскорбиновой кислоты.
10. К какому из видов витаминов - жирорастворимые или водорастворимые относят витамин С.
11. Какие виды растительного сырья наиболее богаты витамином С?
12. В виде каких веществ представлен витамин Р?

13. Для чего необходим витамин Р? К чему приводит его недостаток?
14. Назовите функции витамина Р.
15. Назовите главные источники витамина Р.

Лабораторная работа №7

Определение углеводов. Определение инвертного сахара в меде.
Реакция Троммера

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: Изучить методы определения и химические свойства углеводов

1. Теоретическая часть.

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, луковицах, семенах, зернах и служит запасным энергетическим материалом зародыша и источником многочисленных метаболитов.

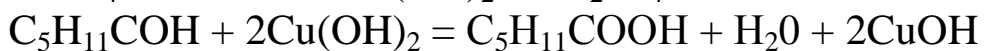
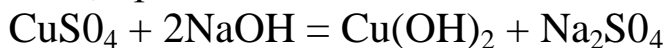
Использование (мобилизация) полисахаридов начинается с их гидролиза амилазами или расщепления путем фосфолиза ферментом фосфорилазой.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Реакция Троммера.

Моносахариды и некоторые дисахариды, имеющие свободную карбонильную группу, обладают способностью восстанавливать в щелочной среде металлы из их оксидов в закисные формы или свободное состояние.

Глюкоза в щелочной среде восстанавливает оксид меди в закись, при этом сама окисляется до глюконовой кислоты.



Реактивы: 1% раствор глюкозы; 1% раствор сахарозы; 1% раствор крахмала; 10% раствор гидроксид натрия; 5% раствор сульфата меди.

Ход работы: В каждую из трёх пронумерованных пробирок вносят 10 капель определенного раствора углевода: глюкозы, сахарозы и крахмала. Добавляют по 10 капель гидроксида натрия и по 2 капли сульфата меди, нагревают до кипения. При оформлении данного опыта в тетради запишите свои наблюдения.

Восстановление гидроксида меди(II).

Моносахариды легко восстанавливают ряд окислителей, например, ионы двух валентной меди. Это свойство используют при анализе углеводов. Если к раствору глюкозы прилить раствор гидроксида меди (II), появится ярко-синий раствор сахарата меди, что доказывает наличие большого количества гидроксильных групп. Так определяют содержание глюкозы в крови и моче при диагностики сахарного диабета.

Реактивы: раствор глюкозы (фруктозы) 1%, раствор сульфата меди 0,5 М, раствор гидроксида натрия 2,5М, вода.

Ход работы: К 5 каплям раствора глюкозы (фруктозы) добавляют при взбалтывании 5-6 капель раствора гидроксида натрия. Затем по каплям добавляют раствор сульфата меди (II), при этом об-

разуется светло-синий раствор. При подогревании этого раствора на водяной бане получается красный осадок.

Восстановление оксида серебра.

Реактивы-раствор глюкозы (фруктозы) 1%, аммиачный раствор оксида серебра, раствор метиленового синего.

Ход работы: К 4 каплям раствора глюкозы добавить 6-7 капель аммиачного раствора оксида серебра. Подогреть раствор на водяной бане, при этом наблюдается образование «зеркала».

Реакция с красителем (метиленовым синим).

Реактивы: раствор глюкозы (фруктозы) 1%, раствор гидроксида натрия 2,5М, раствор метиленового синего.

Ход работы: К 8-10 каплям раствора глюкозы добавить 4-5 капель раствора красителя. Затем прилить 2-3 капли раствора щелочи. Поместить пробирки на несколько минут в горячую водяную баню. При этом наблюдается переход голубой окраски жидкости в светло-желтую.

Количественное определение инвертируемого сахара с меде.

Мед поступающий в продажу не должен иметь пониженного содержания инвертируемого сахара (глюкоза и фруктоза) менее 65%.

Реактивы: мед, вода, раствор гидроксида натрия 1%, раствор метиленового синего 1%, красная кровяная соль 1%.

Ход работы: Поместить в пробирку 2,5 г меда, добавить 10 мл воды и перемешать. Поместить 1 мл полученного раствора в мерную колбу на 100 мл и добавить воды до метки. К 10 мл раствора красной кровяной соли добавить 2,5 мл раствора едкого натрия, а затем 6,3 мл 0,25% водного раствора меда. Нагреть содержимое колбы до кипения, прилить 1 каплю метиленового синего. Если жидкость не обесцвечивается, то в исследуемом меде инвертируемого сахара менее 65%. Такой мед фальсифицирован и в продажу не допускается.

Контрольные вопросы

1. Что общего в свойствах глюкозы и глицерина?
2. Наличие каких функциональных групп подтверждает опыт по восстановлению гидроксида меди глюкозой при нагревании?

3. Составьте уравнение реакции восстановления оксида серебра с глюкозой.

4. Какие функциональные группы содержатся в глюкозе?

5. Правильны ли утверждения:

а) общая химическая формула углеводов $C_n(H_2O)_n$;

б) углеводы-альдегиды или кетоны многоатомных спиртов;

в) в составе углеводов содержатся группировки $-C=O$; $-C=O$; $H-C-OH$?

2. Выберите правильный ответ.

А. В человеческом организме широко представлены:

а) триозы; б) тетрозы; в) пентозы; г) гексозы.

Б. Основным источником энергии в организме человека является:

а) глюкоза; б) галактоза; в) фруктоза; г) мальтоза; д) лактоза; е) крахмал; ж) гликоген.

3. Выберите правильный ответ.

А. Углеводы, имеющие свободную карбонильную группу и обладающие способностью восстанавливать в щелочной среде металлы из их оксидов в закисную форму или свободное состояние, - это:

а) глюкоза; б) мальтоза; в) сахароза; г) крахмал.

Б. С помощью реакций Троммера и Ниландера можно обнаружить присутствие в растворе:

а) глюкозы; б) лактозы; в) мальтозы; г) сахарозы; д) крахмала.

Лабораторная работа №8

Обнаружение липидов. Растворение и эмульгирование жиров.
Определение йодного и кислотного числа жира

План занятия

1. Теоретическая часть.
2. Выполнение заданий по теме занятия
3. Контрольные вопросы

Цель работы: изучить методы обнаружения липидов и их свойства

1. Теоретическая часть.

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.

Липиды можно разделить на две большие группы: нейтральные жиры (ацилглицеролы) и жироподобные вещества, называемые липоидами. К липоидам относят воски, фосфолипиды (фосфатиты), гликолипиды, стероиды, растворимые в жирах пигменты (каротиноиды, хлорофилл) и жирорастворимые витамины.

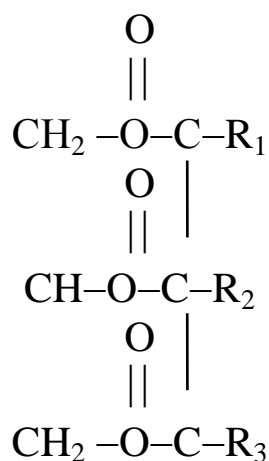
В организме животных и растений липиды находятся в форме запасного жира и входят в состав структурных компонентов клеток. Запасной жир откладывается в определенных частях организма животных и растений, используется в качестве энергетического материала, содержание его зависит от многих факторов. Липиды структурных компонентов клеток (цитоплазматические липиды) выполняют различные биологические функции и содержание их в клетках постоянно.

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 (глав-

ным 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. 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.



Триацилглицерол

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.

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 °С. 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 консистенцию при комнатной температуре.

О природе и качестве жира можно судить по его физическим и химическим величинам, называемым константами. Среди физических констант жира наибольшее значение имеют: плотность, вязкость, температура плавления и отвердевания; среди химических (называемых «числами» жира) – йодное число, кислотное число, число омыления и эфирное число.

Перед определением констант жир разогревают в термостате при 55-60 °С, в этом же термостате его фильтруют через сухой бумажный фильтр. Затем охлаждают до комнатной температуры и используют для исследования.

Качественные реакции на липиды дают возможность ознакомиться с некоторыми представителями этих соединений и их свойствами.

2. Выполнение заданий по теме занятия

Обнаружение глицеринсодержащих липидов.

Акролеиновая проба.

В основе реакции лежит способность глицерина при нагревании терять воду и превращаться в акролеин – ненасыщенный альдегид с резким запахом.

С помощью этой реакции обнаруживают глицерин, входящий в состав нейтральных жиров и фосфолипидов.

Реактивы: растительное масло; гидросульфат калия (порошок); воск.

Ход работы: В сухую пробирку вносят 1-2 капли растительного масла и на кончике шпателя порошок гидросульфата калия. Нагревают до появления белых паров акролеина с резким специфическим запахом. Прodelьвают эту же работу с кусочком воска. Образование акролеина не наблюдается. При оформлении данного опыта в тетради следует написать уравнение реакции образования акролеина.

Растворение и эмульгирование жиров.

Жиры растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Эмульгирование жиров (равномерное распределение в растворе) используется в технике и быту для удаления жира. В организме человека только эмульгированные жиры подвергаются действию ферментов и распадаются на более простые продукты.

Реактивы: растительное масло; бензин; этиловый спирт; 1 % раствор яичного белка; 10% раствор гидроксида натрия; 10% раствор карбоната натрия; раствор мыла; H₂O дистиллированная.

Ход работы:

1). В 2 пробирки вносят по 3 капли растительного масла и затем добавляют по 10 капель: в 1-ю пробирку—бензина, во вторую - этилового спирта. Пробирки встряхивают и наблюдают растворение жира только в первой пробирке.

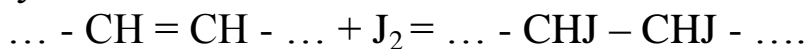
2). В 5 пробирок вносят по 2 капли растительного масла и 3 капли дистиллированной воды. Затем добавляют по 4 капли: в 1-ю пробирку—раствора белка, во 2-ю пробирку—гидроксида натрия, в 3-ю - бикарбоната натрия, в 4-ю—мыльного раствора. 5-я пробирка служит для контроля.

Пробирки встряхивают. Во всех пробирках, кроме 5-ой, наблюдается образование устойчивой эмульсии, а в 5-ой пробирке происходит расслоение воды и жира.

Определение йодного числа жира

Йодное число характеризует наличие в составе жира ненасыщенных (ненасыщенных) жирных кислот. Его выражают массой йода (в г), которая может быть связана 100 г жира. По величине йодного числа судят о натуральности жира и изменениях, которые могут происходить при его хранении.

Йодное число определяют на основе реакции присоединения йода по месту двойных связей:

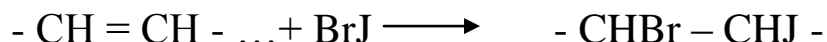


При комнатной температуре йод реагирует с кислотами, входящими в состав жира, очень медленно; при нагревании присоединение йода идет неравномерно. Более интенсивно реагируют с непредельными кислотами жира соединения йода с другими галоидами (хлором, бромом). Поэтому были предложены методы определения йодного числа, в которых йод заменили его соединениями с галоидами. Гюбль предложил для определения йодного числа готовить раствор йода с сулемой ($\text{HgCl}_2 + 2\text{J}_2 = \text{HgJ}_2 + 2\text{JCl}$), Ганус применил раствор бромистого йода.

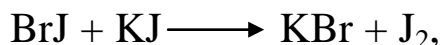
Полное насыщение двойных связей происходит только в том случае, если масса галоида на 60-100 % выше теоретической.

Йодные числа некоторых жиров и масел имеют следующие величины: Молочный жир – 24÷45, говяжий – 32÷47, свиной – 46÷66, китовый 108÷130, жир печени трески – 118÷186, кокосовое масло – 8÷12, хлопковое – 100÷116, подсолнечное – 119÷136, льняное – 175÷201, бараний - 31÷46, конский - 71÷86.

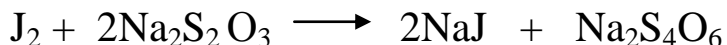
Жир выдерживают с избытком раствора бромистого йода в ледяной уксусной кислоте (раствор Гануса). При этом происходит присоединение йода по месту двойных связей жирных кислот:



После выдерживания избыток бромистого йода разлагают водным раствором йодида калия:



выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия:



Ход работы В колбу вместимостью 300-500 мл с притертой стеклянной пробкой вносят 0,4-0,5 г жира (0,1 г растительного масла, китового или рыбьего жира) и растворяют его в 10 мл хло-

роформа или четыреххлористого углерода (опытная проба). В другую такую же колбу вносят 10 мл того же растворителя, но без жира (контрольная проба). В обе колбы из бюретки приливают по 25 мл раствора Гануса, перемешивают, закрывают пробками и ставят в темное место на 30 мин, периодически встряхивая.

По истечении указанного времени в обе колбы добавляют по 10 мл раствора с массовой концентрацией йодида калия 15 г/100 мл, содержимое перемешивают и приливают к нему по 100 мл свежeproкипяченной охлажденной дистиллированной воды, ополаскивая ею пробку. Выделившийся йод титруют раствором с концентрацией тиосульфата натрия 0,1 моль/л до слабожелтого цвета. Затем вносят 1 мл раствора с массовой долей оклейстеренного крахмала 1 % и продолжают титрование по каплям до исчезновения синей окраски. Колбу закрывают пробкой и интенсивно встряхивают до извлечения йода, оставшегося в растворителе. При появлении синей окраски титрование продолжают до обесцвечивания.

Объем раствора тиосульфата натрия, израсходованный на все этапы титрования каждой пробы, записывают. Йодное число (Й.ч.) рассчитывают по формуле:

$$\text{Й.ч.} = \frac{(v - v_1) \cdot 0,01269 \cdot T \cdot 100}{m}$$

где $(v - v_1)$ – разность между объемами раствора с концентрацией тиосульфата натрия 0,1 моль/л, израсходованными на титрование опытной (v_1) и контрольной (v) проб, мл;

0,01269 - масса йода в граммах, соответствующая 1 мл раствора с концентрацией тиосульфата натрия 0,1 моль/л;

T - титр раствора тиосульфата натрия;

m – масса жира, г.

Реактивы Жир животный или растительный (фильтрованный); хлороформ или четыреххлористый углерод, раствор с концентрацией тиосульфата натрия 0,1 моль/л; раствор йодида калия (15 г йодида калия вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и, растворяя, объем доводят до метки водой); вода, дистиллированная; раствор с массовой долей оклейстеренного крахмала 1 %; рас-

твор Гануса (в 825 мл ледяной уксусной кислоты растворяют при нагревании 13,8 г йода. Охлаждают и 25 мл этого раствора титруют раствором с концентрацией тиосульфата натрия 0,1 моль/л. находят объем раствора тиосульфата, пошедший на титрование 1 мл приготовленного раствора йода (1-е титрование). Отмеривают 200 мл ледяной уксусной кислоты и приливают к ней 3 мл брома, содержимое перемешивают.

К 5 мл полученного раствора брома добавляют 10 мл раствора с массовой концентрацией йодида калия 15 г на 100 мл и титруют раствором тиосульфата натрия – 0,1 моль/л. Находят объем раствора тиосульфата, пошедшего на титрование 1 мл приготовленного раствора брома (2-е титрование) При первом и втором титрованиях в качестве индикатора используют раствор оклейстеренного крахмала. После титрований рассчитывают объем раствора брома, который нужно прилить для удвоения содержания галоида в оставшихся 800 мл раствора йода по формуле: $A = B/C$, где A - требуемый объем раствора брома, мл; B – находят умножением 800 на объем тиосульфата в мл, пошедший на титрование 1 мл раствора йода (1-е титрование); C – объем тиосульфата в мл, пошедший на титрование 1 мл раствора брома (2-е титрование). После смешивания в 1000 мл полученного раствора Гануса должно содержаться 13,2 г йода. Если окончательный раствор слишком крепкий, его разбавляют ледяной уксусной кислотой.

Определение кислотного числа жира

Кислотное число характеризует наличие в жире свободных жирных кислот. Оно измеряется массой гидроксида калия (в мг), пошедшего на нейтрализацию свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Кислотное число разных сортов свежего жира обычно не превышает 1,2-3,5. При хранении происходит гидролиз ацилглицеролов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот и снижению, вследствие этого, качества жира.

Метод определения кислотного числа (кислотности) основан на титровании свободных кислот жира спиртовым раствором гидроксида калия. Гидроксид калия избран для титрования потому, что образующиеся калиевые мыла лучше, чем другие, растворимы в условиях опыта.

Ход работы. В колбочку вместимостью 50-100 мл наливают равные объемы этанола и эфира (по 5-7 мл каждого), добавляют 3-4 капли раствора фенолфталеина и содержимое нейтрализуют, прибавляя по каплям раствор с концентрацией гидроксида калия в этаноле 0,1 моль/л до появления слабо-розового окрашивания.

В другой такой же колбе взвешивают на аналитических весах 2-3 г жира, приливают к нему приготовленную нейтральную спирто-эфирную смесь и содержимое перемешивают до полного растворения жира. Добавляют еще 1-2 капли раствора фенолфталеина и содержимое титруют раствором с концентрацией гидроксида калия в этаноле 0,1 моль/л до слабо-розового окрашивания, удерживающегося 30 секунд.

Кислотное число (К.Ч.) рассчитывают по формуле:

$$К.Ч. = \frac{v \cdot 5,61 \cdot T}{m},$$

где v - объем раствора с концентрацией гидроксида калия в этаноле 0,1 моль/л, израсходованный на титрование пробы жира, мл;

5,61 – масса гидроксида калия, соответствующая 1 мл раствора с концентрацией гидроксида калия в этаноле 0,1 моль/л;

T – титр раствора гидроксида калия;

m – масса взятого для анализа жира, г.

Реактивы Жир растительный или животный; этанол; диэтиловый эфир; раствор с массовой концентрацией фенолфталеина в этаноле 0,1 %; раствор с концентрацией гидроксида калия в этаноле 0,1 моль/л.

Контрольные вопросы

1. Строение и общая формула нейтральных жиров.
2. Номенклатура нейтральных жиров.
3. Чем характеризуются жирные кислоты, входящие в состав природных ацилглицеролов?
4. Какое состояние может иметь жир при комнатной температуре, и чем оно обусловлено?

5. Какие показатели используются для определения природы и качества жира?
6. Назовите физические и химические константы жиров.
7. Какие числа жира Вы знаете?
8. Методика подготовки жира к исследованию.
9. Что характеризует йодное число жира?
10. Что положено в основу определения йодного числа жира? Напишите уравнение.
11. Какие соединения и растворы используются для определения йодного числа и почему?
12. Назовите йодные числа некоторых жиров.
13. Химизм реакции раствора Гануса с жирными кислотами.
14. Химизм титрования йода раствором тиосульфата натрия.
15. Правильны ли утверждения:
 - а) триацилглицерины (нейтральные жиры) - это сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот;
 - б) к фосфолипидам относятся глицерофосфолипиды: фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилэтаноламин (кефалин), фосфатадилсерии;
 - в) в молекуле глицерофосфолипида остатки фосфорной кислоты и азотистого основания проявляют гидрофильные свойства, а остатки жирных кислот - гидрофобные;
 - г) триацилглицерины проявляют гидрофильные свойства?
16. Какое общее свойство объединяет вещества, относящиеся к группе липидов?
17. Выберите правильные ответы.
Акролеиновой пробой можно открыть: а) триацилглицерины; б) воска; в) глицерофосфолипиды; д) гликопротеиды:
18. Выберите правильные ответы. Холестерин:
 - а) высокомолекулярный циклический спирт;
 - б) нерастворим в воде;
 - в) плохо растворим в органических растворителях;
 - г) обнаруживается в растениях.
19. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
20. Что характеризует и чем измеряют кислотное число жира?
21. Что лежит в основе определения кислотного числа жира?
22. Назовите величины кислотных чисел свежего жира и масла.

23. Что лежит в основе нарастания кислотного числа жира и к чему это ведет?
24. Техника и последовательность определения кислотного числа жира.
25. Расчет кислотного числа жира.

Список рекомендуемой литературы

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: Учебник. - М.: Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969. – 740 с.

3. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия: Учебник. -М.: Высшая школа, 2000. - 479с.
4. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия [Текст] : учебник для студентов вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. - 3-е изд., испр. - М. : Высшая школа, 2003. - 479 с.
5. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 1-3. Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 1055 с.
6. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений: Учебник. –М.: Агропромиздат, 1985. –255 с.
7. Практикум по биохимии: Учебник / Мешковой Н.П. и Северина С.Е.; Под ред. Н.П. Мешковой. – М.: МГУ. 1979. –430 с.
8. Руководство по лабораторным занятиям по биологической химии/ Под ред. Березова Т.Т. –М.: Медицина, 1976. –294 с.
9. Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянов Г.А. Практикум по общей биохимии: Учебник. – М.: Просвещение, 1982. – 311 с.
10. Биохимия [Текст] : учебник / Под ред. В. Г. Щербакова. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб. : ГИОРД, 2003. - 440 с
11. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии [Текст] : учебное пособие / А. А. Чиркин. - М. : Новое знание, 2002. - 512 с