

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 13.09.2021 18:39:52

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d089

1

## МИНОБРНАУКИ РОССИИ

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

Кафедра фундаментальной химии и химической технологии



Проректор по учебной работе  
О. Г. Локтионова  
2016 г.

### ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО БИОХИМИИ

Методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика» и нехимических специальностей

Курск 2016

УДК 577.1

Составитель Л. А. Горбачева

Рецензент

Кандидат биологических наук, доцент кафедры «Товароведения, технологии и экспертизы товаров» А.Г. Беляев

**Лабораторные работы по биохимии:** методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Биохимия» для студентов направления подготовки 30.05.03 «Медицинская кибернетика» и нехимических специальностей / Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: Л. А. Горбачева Курск, 2016. 52 с.; табл. 5. Библиогр.: с. 52

Методические указания содержат краткие сведения по основным группам биологических соединений, методам анализа, а так же конкретные методики исследования биохимических показателей крови и мочи.

Предназначены для студентов, обучающихся по специальности 30.05.03 «Медицинская кибернетика» и нехимических специальностей

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать 31.05.16 Формат 60x84 1/16

Усл. печ. л. 30 Уч.-изд. л. 2,4 Тираж 30 экз. Заказ 565

Бесплатно.

Юго-Западный государственный университет,  
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

## Содержание

Введение .....	3
Техника безопасности в лаборатории биологической химии .....	4
Лабораторная работа № 1 Тема: Реакции осаждения белков.....	5
Лабораторная работа № 2 Тема: Обратимое осаждение белков... ..	10
Лабораторная работа №3. Тема:Определение изоэлектрической точки белка.....	12
Лабораторная работа № 4. Тема: Ферментативный гидролиз крахмала .....	15
Лабораторная работа № 5 Тема: Определение амилазной активности слюны .....	24
Лабораторная работа № 6. Тема: Окислительно-восстановительные ферменты .....	26
Лабораторная работа №7. Тема: Количественное определение активности амилазы в моче.....	31
Лабораторная работа № 8 Тема: Влияние температуры на скорость ферментативного катализа.....	33
Лабораторная работа № 9 Тема: Открытие витаминов.....	34
Лабораторная работа № 10 Тема: Открытие углеводов.....	36
Лабораторная работа № 11. Тема: Открытие липидов (жиров)....	39
Лабораторная работа №12 Тема: Фосфолипиды .....	44
Лабораторная работа № 13 Тема:Эмульгирование жира.....	46
Лабораторная работа № 14 Тема: Водный и минеральный обмен	47
Литература .....	51

## **Введение**

Биохимия – наука о молекулярных основах жизни. Она изучает химический состав организма, превращение веществ и энергии, которое осуществляется в процессе их жизнедеятельности.

Лабораторные работы имеют целью практическое освоение студентами научно-теоретических положений биохимии, овладение ими техникой экспериментальных исследований и анализа полученных результатов, привитие навыков работы с лабораторным оборудованием, контрольно-измерительными приборами и вычислительной техникой.

При выполнении лабораторных работ студенты должны научиться безопасным приемам обращения с химическими реактивами, приборами и посудой, приобрести навыки исследования свойств аминокислот, белков, ферментов, жиров и углеводов, и приобрести навыки использования справочной и научной литературы.

В методических указаниях приведены правила техники безопасности при работе в лаборатории биологической химии, приведены условия и аналитические эффекты качественных реакций на важнейшие классы соединений, а также перечислен необходимый минимум лабораторного оборудования и химической посуды.

## **Техника безопасности в лаборатории биологической химии**

1. Приступая к работе в лаборатории, студенты должны ознакомиться с расположением средств пожаротушения и первой медицинской помощи.

2. При подготовке к лабораторной работе студенты должны внимательно изучить задание по выполнению опытов, обратив особое внимание на правила, обеспечивающие безопасное выполнение работы, а также познакомиться со свойствами используемых в лаборатории веществ (огнеопасность, токсичность и т. д.).

3. При работе в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, аккуратность, быть внимательным, исключить попадание веществ на кожу и одежду, не трогать руками лицо и глаза, тщательно мыть руки с мылом.

4. В лаборатории не разрешается принимать пищу, пить воду из лабораторной посуды, пробовать вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, направляя к себе пары или газ движением руки.

5. Категорически запрещается одному работать в лаборатории.

6. Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде.

7. Работу с большинством органических веществ следует проводить только в вытяжных шкафах или в хорошо проветриваемом помещении.

## Лабораторная работа № 1 Тема: Реакции осаждения белков

**Цель работы:** ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки;

**СУТЬ РАБОТЫ:** Устойчивость белков в биологических жидкостях организма человека обуславливают два фактора:

- заряд и водная оболочка – для гидрофильных белков
- только заряд – для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется нативной конформацией белка.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

Денатурация – изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т. д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии денатурирующих агентов возможен возврат биологической активности, т. е. ренатурация белка с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению лучей при 280 нанометрах ( $10^{-9}$  м).

**Реактивы:** 1%-ный раствор яичного белка, 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный

раствор гидроксида натрия, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты, 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, 10%-ный раствор сульфата меди, 5%-ный раствор ацетата свинца, 5%-ный раствор нитрата серебра, неразведенный яичный белок, насыщенный раствор сульфата аммония;

**Оборудование:** фильтры, стеклянные палочки, спиртовки, пробирки, штативы, электрическая плитка.

Известно, что в растворе белки сохраняются в нативном (природном) состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная (водная) оболочка вокруг неё. Удаление этих факторов приводит к выпадению белков в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необратимым в зависимости от природы используемых реактивов.

### ***Необратимое осаждение белков.***

Необратимое осаждение белков связано с глубокими нарушениями вторичной и третичной структуры и потерей им нативных свойств, т. е. денатурацией белков. Она вызывается кипячением белка, действием солей тяжелых металлов, растворами минеральных и органических кислот и щелочей.

### **Опыт 1 Осаждение белка кипячением**

Белки являются термолабильными соединениями и при нагревании свыше  $50^{\circ}\text{C}$  наступает денатурация. Сущность тепловой денатурации заключается в разворачивании специфической структуры полипептидной цепи и разрушении гидратной оболочки белковых молекул, что проявляется заметным уменьшением их растворимости.

Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т. е. при таком значении рН среды, когда суммарный заряд белковой молекулы равен нулю. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки, обладающие щелочными свойствами – в слабощелочной. В сильнокислых и сильнощелочных средах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, так как частицы его перезаряжаются и несут в первом случае

положительный, а во втором отрицательный заряд, что повышает его устойчивость в растворе.

**Ход работы.** В четыре пронумерованные пробирки приливают по 10 капель 1%-ного раствора яичного белка. Затем:

а) первую пробирку нагревают до кипения. 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 его равна рН 4,8) и в нейтральной среде заряжен отрицательно.

б) во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает осадок белка, так как белок приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд.

в) в третью пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в сильнокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе).

г) в четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд частиц увеличивается.

Делают вывод.

## **Опыт 2 Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами**

Концентрированная серная, соляная, азотная и другие кислоты при взаимодействии с белком вызывают его денатурацию. Это связано с тем, что кислоты удаляют гидратную оболочку и нейтрализуют заряд молекулы. При избыточном количестве серной и соляной кислот выпавший осадок денатурированного белка вновь растворяется, по-видимому, за счет перезарядки молекул белка и частичного его гидролиза. При добавлении же избытка азотной кислоты растворения осадка не происходит (механизм этого явления до конца не изучен). Поэтому в клинических лабораториях при определении белка в моче пользуются азотной кислотой.

**Ход работы.** В три пробирки наливают по 5-10 капель концентрированных серной, соляной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирку под углом  $45^{\circ}$ , осторожно по стенке пробирки (так, чтобы жидкости не смешивались) наслаивают такой же объем 1%-ного раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде белого кольца. Затем, осторожно, встряхивая пробирки, обнаруживают растворение белка в пробирках с соляной и серной кислотами, тогда как в пробирке с азотной кислотой растворения белка не происходит.

Делают вывод.

### **Опыт 3 Осаждение белков органическими кислотами**

Органические кислоты типа трихлоруксусной, сульфосалициловой вызывают необратимое осаждение белков, основанное на нейтрализации заряда и удаления гидратной оболочки с белковой молекулы. Однако, трихлоруксусная кислота денатурирует только белки, тогда как сульфосалициловая кислота осаждает и белки, и высокомолекулярные полипептиды, поэтому в клинической лабораторной практике при определении остаточного азота используют трихлоруксусную кислоту., чтобы можно было отдельно определить содержание азота белков и других азотсодержащих веществ – пептидов, мочевины, аминокислот и др.

**Ход работы.** В две пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, затем в одну из них вносят 1-2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – такое же количество 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирках выпадает осадок белка.

Делают вывод.

### **Опыт 4 Осаждение белков солями тяжелых металлов.**

Белки при взаимодействии с солями ртути, свинца, меди и других тяжелых металлов денатурируют и выпадают в осадок. В основе этого процесса лежит адсорбция металла на поверхности белковой молекулы, в результате которой происходит образование нерастворимого комплекса. Это свойство белков широко используется в клинике при отравлениях солями тяжелых металлов. В качестве адсорбентов этих металлов применяют белки



молока и сырых яиц, что приводит к ограничению всасывания металлов и снижению степени отравления.

Однако при избытке некоторых солей (ацетата свинца, сульфата меди) наблюдается растворение (пептизация) первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле. При избытке солей серебра и ртути растворения осадка не происходит.

**Ход работы.** В три пробирки вносят по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавляют: в первую пробирку - 1 каплю 10%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца, в третью – такое же количество 5%-ного раствора нитрата серебра. Во всех пробирках выпадает осадок. Затем, в первую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора нитрата серебра – растворение осадка не происходит.

Делают вывод.

#### **Опыт 5 Осаждение белков органическими растворителями.**

**Ход работы.** К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

**Ход работы.** В три пробирки вносят по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавляют: в первую пробирку – 1 каплю 10%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца, в третью – такое же количество 5%-ного раствора нитрата серебра. Во всех пробирках выпадает осадок. Затем, в первую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора нитрата серебра – растворение осадка не происходит.

Делают вывод.

### **Опыт 6 Осаждение белков реактивами на алкалоиды**

Танин, пикриновая кислота, растворы диодида ртути в иодиде калия, фосфорновольфрамовая и фосформолибденовая кислоты взаимодействуют с группой веществ, содержащих пиррольные, индольные, имидазольные гетероциклы, несущие положительный заряд в слабокислой среде. Наличие подобных группировок в белках приводит к образованию осадков, при этом растворы надо подкислить.

Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

**Ход работы.** В три пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка, по 4-5 капель 1% раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку - 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую - насыщенного раствора танина, в третью - 5% раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

Делают вывод.

### **Лабораторная работа № 2 Тема: Обратимое осаждение белков**

**Цель работы:** ознакомить студентов с условиями обратимого осаждения белков.

**СУТЬ РАБОТЫ:** Обратимое осаждение белков – это процесс, когда под воздействием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) факторов осаждения белки вновь растворяются и приобретают свои нативные свойства. При этом молекулы белка не подвергаются глубоким нарушениям. Одним из видов обратимого осаждения является высаливание, которое проводится с помощью нейтральных растворов концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и др.

В основе осаждения лежит снятие заряда и удаление водной оболочки. Выпадение различных белков в осадок зависит от молекулярной массы и величины их молекул, заряда и степени гидрофильности. Поэтому с помощью метода высаливания можно разделять белки на фракции. Например, глобулины как более крупные и плотные молекулы белка будут выпадать в осадок при меньшей концентрации солей. Тогда как альбумины, молекулы

которых намного меньше и легче высаливаются более концентрированными растворами солей.

Этот метод применяется в клинических лабораториях для разделения белков сыворотки крови на фракции и их исследования, в медицинской промышленности – при получении белковых препаратов (лечебные сыворотки), в научных исследованиях – для выделения и очистки различных белков (ферменты, гормоны и др.)

**Реактивы:** яичный белок, белок рыбы, насыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  порошок, 0,6 М раствора KCl, раствор NaCl, 5% раствор хлорида калия, 0,5% раствор уксуснокислого свинца, раствор 10% NaOH, 1 %  $\text{CuSO}_4$

### **Опыт 1 Альбумины и глобулины в природных белках**

Альбумины и глобулины могут быть разделены, поскольку альбумины растворимы в воде, а глобулины - только в слабых растворах солей, а в крепких растворах (например, полунасыщенном растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  осаждаются).

#### **а) Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка.**

В пробирку наливают 30 капель неразведенного яичного белка и добавляют равное количество насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешивают. Получается полунасыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , и при этом глобулиновая фракция белка осаждается, а альбуминовая фракция остается в растворе. Через 5 минут осадок отфильтровывают. На фильтре остается глобулиновая фракция, а в фильтрате – альбумины. 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.

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.

Делают выводы.

### **б) Мышечные белки.**

Мышцы содержат белки, растворяющиеся в воде или очень слабых растворах солей. Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы мышечных клеток) растворимы в воде или в солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5% раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

**Ход работы** Мышечную кашу, полученную измельчением мышцы какой-либо рыбы 5-10 г, растирают с 4-5 кратным количеством воды - в воде будут находиться миоальбумины и сходные с ним белки. Отфильтрованный осадок смешивают с 4-5кратным количеством 0,6 М раствора KCl и растирают в ступке 10-20 минут; в раствор переходит миозин.

Полученный гомогенат фильтруют через два слоя марли. С фильтратом (или центрифугатом) проводят цветные реакции на белки (биуретовую, ксантопротеиновую, реакции Миллона, Фоля и Сакагучи). Тот и другой белковый экстракт разливают по пробиркам и прибавляют по каплям 0,5% раствор уксуснокислого свинца. Появляются осадки.

Примечание. Если экстрагировать мышцу 0,5 М раствором HCl не 20 минут, а сутки - в раствор перейдет более сложный глобулин - актомиозин.

Делают выводы.

## **Лабораторная работа №3. Тема: Определение изоэлектрической точки белка**

**Цель работы:** определить изоэлектрическую точку белков.

**СУТЬ РАБОТЫ:** Изоэлектрической точкой белка называется величина pH среды, при которой суммарный электрический заряд белка равен нулю. Изоэлектрическая точка большинства белков

лежит в пределах 5,5-7,0. Устойчивость белковой молекулы определяется наличием зарядов в полипептидной цепи, а также образованием гидратной оболочки. Отсутствие заряда и снятие гидратной оболочки приводит к сближению белковых молекул, в результате чего они слипаются, увеличиваются в размерах и выпадают в осадок под действием собственной силы тяжести. Это явление называется коагуляцией.

Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы, нейтральные молекулы белка легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами.

**Реактивы:** 0,2 М раствор уксусной кислоты, вода дистилл., раствор казеина, 0,2 М раствор ацетата натрия, 0,1 М раствор уксусной кислоты, 1 М раствор уксусной кислоты, раствор желатина, 0,1 М раствор ацетата натрия

### **Опыт 1. Определение изоэлектрической точки белка казеина**

**Ход работы.** Для определения изоэлектрической точки казеина в 7 сухих пробирок наливают последовательно реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице:

Таблица 1 - Приготовление растворов

№ пробирки	CH <sub>3</sub> COOH 0,2 М	H <sub>2</sub> O	0,4% раствор казеина в 0,2 М растворе CH <sub>3</sub> COONa	рН смеси
1	1,6	0,4	0,2	3,8
2	0,8	1,2	0,2	4,1
3	0,4	1,6	0,2	4,4
4	0,2	1,8	0,2	4,7
5	0,1	1,9	0,2	5,0
6	0,06	1,94	0,2	5,3
7	0,03	1,97	0,2	5,6

Растворы тщательно перемешивают. Через 5-10 минут наблюдается помутнение растворов. Наибольшее количество осадка наблюдается в той пробирке, где рН соответствует изоэлектрической точке казеина.

Делают вывод.

### **Опыт. Определение изоэлектрической точки желатина**

**Ход работы:** Для определения изоэлектрической точки желатина в 6 сухих пробирок последовательно наливают реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице:

Таблица 2 - Приготовление растворов

№ пробирки	H <sub>2</sub> O	0,1 М раствор СН <sub>3</sub> СООН	1М раствор СН <sub>3</sub> СООН	0,1М раствор СН <sub>3</sub> СООНa	1% раствор желатина	рН среды
1	3,8	0,8	-	2,0	2,0	5,6
2	3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3	3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
4	2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
5	-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
6	3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

Содержимое каждой пробирки перемешивают и затем во все пробирки медленно по стенке добавляют по 2 мл 96% этанола (или ацетона). Через 30 минут определяют изоэлектрическую точку желатина. Она будет соответствовать рН пробирки с максимальной степенью помутнения.

Отметить степень помутнения в пробирках и записать изоэлектрические точки казеина и желатина.

Делают вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Укажите элементный состав белков и пептидов.
3. Охарактеризуйте свойства пептидов.
4. Белки как природные полипептиды.
5. Функции белков.

6. Классификация белков.
7. Структуры белка.
8. Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений

#### **Лабораторная работа № 4. Тема: Ферментативный гидролиз крахмала**

**Цель работы:** ознакомить студентов с ферментативным гидролизом крахмала

**СУТЬ РАБОТЫ:** Ферменты - биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. fermentum закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Почти все химические процессы в организмах и в различных производственных смесях протекают при участии ферментов.

Ферменты очень чувствительны к воздействию тепла, кислот, щелочей и солей металлов.

Большинство ферментов в водном растворе при комнатной температуре быстро теряет свою активность, поэтому растворы и препараты ферментов необходимо хранить при пониженных температурах. При длительной работе с растворами ферментов необходимо вносить антисептики (толуол или тимол) во избежание развития в растворах микроорганизмов.

Ферменты можно экстрагировать из растительного или животного материала водой, а затем водным экстрактом действовать на тот или иной субстрат (например, на крахмал или на белок). Учитывая количество образующихся продуктов реакции или изменения субстрата, определяют активность того или иного фермента. Так определяется активность ферментов, растворимых в

воде. Однако ферменты не всегда растворяются в воде. Например, фермент липаза из семян клещевины не растворяется в воде. Поэтому в некоторых случаях применяются автолитические методы, основанные на том, что размолотый и растертый испытуемый материал помещается в воду и оставляется на определенное время при температуре 40-45°C. Под действием как растворимых, так и нерастворимых ферментов, содержащихся в испытуемом материале, происходят соответствующие реакции. Таким образом, определяется суммарное действие ферментов, как растворимых в воде, так и нерастворимых.

Действие ферментов можно определить по вызываемому ферментами изменению окраски субстрата, по накоплению продуктов распада субстрата, по изменению вязкости, по изменению угла вращения плоскости поляризации и другими способами.

Белковую часть сложных белков ферментов называют апоферментом, а небелковую – кофактором. Кофактор условно делится на кофермент (коэнзим), легкодиссоциирующий и простетическую группу, труднодиссоциирующую. Кофермент легко присоединяется к различным апоферментам, а простетическая группа соединяется только с одним апоферментом.

Фермент амилаза, содержащийся в слюне, соке поджелудочной железы, крови, печени, мозге, катализирует гидролиз крахмала. Последовательно процесс расщепления крахмала можно представить следующим образом.





**Реактивы:** раствор слюны (свежую слюну разводят дистиллированной водой в 5 раз); 1 %-й раствор крахмала; раствор йода в йодиде калия (1 г KI растворяют в нескольких миллилитрах воды. В концентрированном растворе соли растворяют 1 г йода и разбавляют водой до 300 мл.); 5 %-й раствор гидроксида натрия; 5 %-й раствор сульфата меди.

**Оборудование:** пробирки; водяная баня.

### Ход работы

*Задание 1. Гидролиз крахмала.*

В две пробирки налейте по 2 мл 1 %-го раствора крахмала.

В одну пробирку долейте 1 мл разведенной слюны, а в другую – 1 мл воды (для контроля) и поставьте пробирки на 10 мин. в водяную баню или термостат, нагретые до 37 - 38 С (внимательно следите за температурой, не допуская ее повышения).

По окончании реакции проанализируйте содержимое пробирок на содержание крахмала и мальтозы, как указано в заданиях 2 и 3.

*Задание 2. Обнаружение продуктов гидролиза крахмала.*

Из опытной и контрольной пробирок задания 1 отлейте в отдельные пробирки по 1 мл растворов.

Добавьте в каждую пробирку по 1 капле раствора йода и перемешайте.

Сравните окраску полученных растворов.

*Задание 3. Обнаружение мальтозы.*

К оставшимся растворам опытной и контрольной пробирок добавьте по 1 капле раствора сульфата меди и по 5 капель раствора щелочи.

Содержимое пробирок перемешайте и поместите их в кипящую водяную баню.

Сравните окраску полученных растворов.

Делают выводы.

Запишите схемы частичного и полного гидролиза крахмала. Объясните полученные результаты заданий 2 и 3.

#### **Лабораторная работа № 4. Тема: Свойства ферментов**

**Цель работы:** ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере амилазы;

**СУТЬ РАБОТЫ:** По своей химической природе ферменты являются белками, поэтому обладают всеми свойствами последних: термолабильностью, амфотерностью, способностью образовывать коллоидные растворы. Наряду с этим ферментам присущи и некоторые только для них характерные свойства, такие как, высокая специфичность, действие при определенном значении рН среды и др.

К общим свойствам ферментов относятся высокая каталитическая активность, специфичность действия, чувствительность к изменению температуры.

Действие почти всех ферментов связано с тем, что фермент временно вступает в химическое соединение со своим субстратом, тем самым видоизменяя его, а затем и отделяясь от него. Особенность ферментов – обратимость их действия. Они катализируют как процесс распада, так и синтеза, однако эти процессы могут катализироваться разными ферментами.

Ферменты, являясь белками, обладают термолабильностью, их действие зависит от рН.

Действие ферментов может активизироваться веществами, которые называют активаторами, или замедляться веществами - ингибиторами. Ферменты весьма чувствительны к температуре и проявляют свою наивысшую активность при оптимальном ее значении, которая для ферментов тела человека находится в пределах 35-45<sup>0</sup>С. При высокой температуре (свыше 50<sup>0</sup>С) их активность снижается, а затем наступает инактивация, так как при

этом нарушается структура активного центра и не происходит соединения его с субстратом.

Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. Вследствие тепловой денатурации белковой молекулы фермента происходит замедление и прекращение ферментативных реакций. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале 40...50 °С.

В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия фермента амилазы слюны

**Реактивы и оборудование:** 1% раствор крахмала, термостат или водяная баня, 1% раствор йода, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия, амилаза, дистиллированная вода, 2% раствор соляной кислоты, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор сульфата меди, 5% эмульсия сухих сливок, 5% раствор панкреатина, 1% раствор фенолфталеина, 1% раствор карбоната натрия, 2N раствор гидроксида натрия.

### **Влияние температуры на активность ферментов.**

#### **Ход работы.**

В две пробирки прилить по 10 капель 1% раствора крахмала. Затем в одну из них добавить 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 мин слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37<sup>0</sup>С, после чего с содержимым каждой пробирки проделать реакции с йодом. В пробирке с прокипяченной слюной гидролиза крахмала не произойдет (почему?).

Сделать вывод.

#### **Реакция Троммера.**

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс углеводов: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают.

#### **Ход работы.**

В пробирку наливают гидролизат и 6-8 капель 2н NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2Н раствор  $\text{CuSO}_4$  до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на плитке. Голубой, не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II) постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера.

#### **Специфичность действия ферментов.**

**СУТЬ РАБОТЫ:** Каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных субстратов, что обусловлено соответствием структуры фермента, точнее его активного центра и структуры субстрата. Например, амилаза действует только на крахмал, сахароза – только на сахарозу и т. п.

Специфичность действия бывает абсолютная (действует только на определенный субстрат), относительная, групповая и стереохимическая. Высокая специфичность ферментов определяется только тем, что только некоторые строго определенные функциональные группы, входящие в состав ферментов, могут участвовать в образовании фермент – субстратного комплекса. Специфичность – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не действуя на дисахариды. Сахароза состоит из двух молекул глюкозы, но на неё не действует амилаза, поэтому пробирка с сахарозой не даст реакции в реактиве Фелинга.

**Ход работы.** В пробирку (№1) вносят 10 капель 1% раствора крахмала, в другую (№2) - 10 капель 2% раствора сахарозы. Затем в пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и оставляют в термостате на 15 мин. при 37<sup>0</sup>С. После этого с содержимым всех четырех пробирок проделывают реакции с йодом, с реактивом Троммера: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива, нагревают пробирку до кипения и кипятят в течение 1 мин. В случае положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание вследствие образующейся закиси меди; результаты заносят в таблицу

Таблица 3 - Определение специфичности действия ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	Амилаза		
2	Сахароза	Амилаза		

В выводах следует отметить, в какой пробирке и при каких условиях обнаружено действие ферментов и почему.

### **Влияние pH среды на активность ферментов.**

Для каждого фермента существует определенное значение реакции среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменения pH вызывают снижение или полное торможение деятельности фермента. В основе этого лежит нарушение структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра). Большинство ферментов проявляет максимальную активность при значениях pH, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты «работают» в сильно кислой или сильно щелочной среде. Например, активность пепсина - фермента, гидролизующего белки в желудке, – максимальна при pH 1,5-2,5. В щелочной среде «работают» ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения pH-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при изменении pH может измениться ионизация

субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса.

Оптимум рН для амилазы слюны можно определить при взаимодействии её с крахмалом при различных значениях рН.

О степени расщепления крахмала судят по его реакции с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью и реакция на крахмал с йодом будет отрицательная, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов, которые дадут с йодом красную или фиолетовую окраску, или же крахмал вообще не будет расщепляться и реакция с йодом будет положительная.

**Ход работы.** а) В 8 пробирках приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку № 1 вносят 1 мл 0,2% раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку № 3 и так далее. Из пробирки № 8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют различным значениям рН среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37<sup>0</sup>С. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Отметить, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках № 5 и 6, где рН среды раствора находится в пределах 6,8 – 7,2, т. е. оптимальных для действия амилазы.

### **Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.**

Различные вещества могут вызывать или активирование действия фермента (активаторы) или тормозить его активность (ингибиторы). Примерами активаторов служат ионы хлора для амилазы, желчные кислоты для липазы поджелудочной железы, тогда как в качестве ингибиторов амилазы выступают ионы меди; цитохромов, ферментов, участвующих в биологическом окислении, - цианиды и т. п.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют образованию его или блокированию. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и тем самым менять ферментативную активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы. Ингибиторами нередко являются продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных препаратов. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

### **Обратимые ингибиторы**

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное,

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

**Ход работы.** В пробирку №1 вносят 1 каплю 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 1 каплю 1% раствора сульфата меди, а в пробирку №3 – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют 1-3 мин при комнатной температуре. После чего вносят во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Результаты записывают в виде таблицы:

Таблица 4 - Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ Пробы	Субстрат	Фермент	Окраска раствора после добавления йода
вода	сульфата меди	хлорида натрия	
1	Крахмал	Амилаза	
2	Крахмал	Амилаза	
3	Крахмал	Амилаза	

Делают вывод.

### **Лабораторная работа № 5 Тема: Определение амилазной активности слюны**

**Цель работы:** определить амилазную активность слюны.

Амилазную активность слюны выражают в количестве субстрата (крахмала), расщепляемого 1 мл слюны за определенный промежуток времени (например, 30 минут). Определение основано на нахождение максимального разведения, при которой исследуемая жидкость еще расщепляет крахмал до стадии красного окрашивания с йодом.

При определении амилазной активности слюны можно также наблюдать влияние на ферменты активаторов и ингибиторов. Так, хлористый натрий в разведенных растворах ускоряет действие амилазы слюны на крахмал. Растворы сернокислой меди, наоборот, сильно замедляют действие амилазы слюны.

**Ход работы.**



1. Наливают из бюретки в 10 пронумерованных пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку отмеривают 1 мл слюны, разведенной водой в 10 раз.

3. Перемешивают содержимое первой пробирки путем троекратного втягивания пипеткой жидкости из пробирки и последующего выпуска из пипетки. 1 мл полученного раствора переносят из первой пробирки во вторую.

4. Перемешивают таким же образом содержимое второй пробирки и переносят 1 мл из второй пробирки в третью и т. д. Этим способом получают ряд разведений. Концентрация фермента в каждой последующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Из десятой пробирки 1 мл жидкости как излишний выливают.

5. Наливают во все 10 пробирки еще по 1 мл дистиллированной воды.

6. Наливают далее из бюретки во все 10 пробирок (начиная с десятой, потом в девятую и т. д.) по 2 мл раствора крахмала и перемешивают содержимое каждой пробирки. Добавление крахмала нужно производить с пробирки, содержащей наименьшую концентрацию амилазы, так как в ней расщепление на холоду идет очень медленно и ошибка за счет одновременного прибавления субстрата практически не отразится на результатах определения.

7. Одновременно помешивают все 10 пробирок в нагретую до 37°C водяную баню.

8. Через 30 минут вынимают пробирки из бани, быстро охлаждают их током холодной воды, перемешивают содержимое каждой пробирки и ставят по порядку в штатив.

9. Прибавляют в каждую пробирку по 2 капли раствора йода, перемешивают и наблюдают в пробирках гамму цветов от желтого к синему. Желтый цвет свидетельствует об отсутствии крахмала, красно-бурый - о присутствии промежуточных продуктов расщепления - различных декстринов, синий - о присутствии крахмала или продуктов его начального расщепления.

10. Вычисляют амилазную активность исследуемой слюны. При этом исходят из следующего. В пробирке, где жидкость окрашена еще в синий цвет, должного расщепления крахмала не произошло. Достаточное расщепление крахмала, очевидно, имеет место в той пробирке, где нет синего оттенка. Пусть, например, это будет пятая пробирка (в шестой пробирке уже имеется синий оттенок). В пятой пробирке, не разведенной слюны было  $1/320$  мл, т. е. мы можем написать:

$1$  мл слюны расщепляет  $2$  мл  $0,1\%$  раствора крахмала  $1/320$   
 $1$  мл -----X  $0,1\%$  раствора крахмала,  
 следовательно,  $X = 640$

Таким образом,  $1$  мл неразбавленной слюны расщепляет за  $30$  минут при  $37^\circ\text{C}$   $640$  мл  $0,1\%$  раствора крахмала. Это принято изображать следующим образом:

$\alpha$  (диастаза)  $37^\circ = 640$  единицам (для данного случая).

Делают вывод.

### **Лабораторная работа № 6. Тема: Окислительно-восстановительные ферменты**

**Цель работы:** изучить группы окислительных ферментов

**Суть работы:** в живом организме окислительно-восстановительные процессы протекают с большой скоростью при участии ряда ферментов. Окисление органических веществ, образующихся в результате гидролитического распада белков, жиров, углеводов представляет собой химический процесс.

Окислительные процессы в организме могут протекать разными путями: путем присоединения кислорода, путем отдачи водорода, путем отнятия электронов. Все окислительные ферменты делятся на 2 большие группы: оксидазы и дегидрогеназы.

Оксидазы катализируют реакции окисления органических веществ кислородом воздуха. По химической природе оксидазы являются металлопротеидами. В состав простетической группы входит медь или железо. При окислении или восстановлении металлы простетических групп меняют свою валентность, отдавая

электроны молекулярному кислороду и принимая их снова от окисляемого вещества. К группе оксидаз относятся полифенол - оксидаза, аскорбиноксидаза, тирозиназа и цитохромоксидаза.

Дегидрогеназы катализируют перенос водорода с окисляемого вещества на соответствующий акцептор. Акцептором водорода может быть кислород или какое-либо вещество, содержащееся в тканях. Дегидрогеназы подразделяют на: анаэробные и аэробные дегидрогеназы.

Анаэробные дегидрогеназы. Коферментом этих дегидрогеназ является никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Коферментом других анаэробных дегидрогеназ является никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ).

Дегидрогеназы, содержащие в качестве активной группы НАД и НАДФ окисляют самые разнообразные вещества: молочную, яблочную, изолимонную, глутаминовую кислоты, различные альдегиды и спирты. Они отнимают водород от ряда органических соединений. В результате происходит окисление данного соединения, при этом фермент превращается в восстановленную форму, в дальнейшем передает водород флавиновому ферменту, либо какому-нибудь другому промежуточному соединению.

Аэробные дегидрогеназы. Передают водород, отнятый от окисляемого вещества или от восстановленной формы анаэробной дегидрогеназы, кислороду воздуха или метиленовой сини.

Активной группой аэробных дегидрогеназ является рибофлавин (витамин В1). Флавиновые дегидрогеназы окрашены в желтый цвет, а восстановленная форма этих ферментов - лейкофлавины, как и восстановленная форма метиленовой сини, является бесцветным соединением.

Восстановленные формы флавиновых ферментов могут передавать свой водород не только кислороду воздуха или метиленовой сини, но и полифенолоксидазной или цитохромоксидазной системе.

Пероксидазами называются ферменты, которые катализируют окисление некоторых фенолов, полифенолов, аминов перекисью водорода или органическими перекисями. Органические перекиси

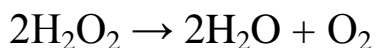
возникают при окислении кислородом воздуха легко окисляющихся веществ (каротиноидов, терпенов, насыщенных жирных: кислот).

Каталаза обладает способностью разлагать перекись водорода на молекулярный кислород и воду. Этот фермент очень чувствителен к нагреванию. Определение активности катализы используют при определении семенных качеств зерна, режимов сушки и длительности хранения зерна.

**Реактивы:** 1% раствор перекиси водорода, кровь дефибрированная, перекись водорода, молоко, рыба, янтарная кислота, метиленовая синь

### **Качественная реакция на каталазу**

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Этот фермент содержится во всех тканях и жидкостях организма, но особенно много его в строме эритроцитов и печени. Биологическая роль каталазы заключается в разрушении вредной для организма перекиси водорода, которая накапливается в тканях при окислительных процессах.



Каталаза широко распространена и содержится в большем или меньшем количестве во всех тканях и жидкостях организма

### **Ход работы.**

В пробирку вносят 10 капель 1% раствора перекиси водорода и 1 каплю крови. Наблюдается бурное выделение газа.

Если внести тлеющую лучинку, то она разгорается, что указывает на присутствие выделяющегося кислорода.

В пробирку помещают 0,3-0,5 расчетной печени, добавляют около 10 мл воды и перемешивают содержимое. Быстро наливают раствор перекиси водорода до верха пробирки и сейчас же, закрыв пробирку пальцем, опрокидывают ее в стакан с водой, не выливая жидкости. Наблюдают выделение газа (кислорода) в пробирке и вытеснение им жидкости в стакан.

Закрыв пробирку пальцем, осторожно вынимают ее из воды, переворачивают и быстро вносят в пробирку тлеющую лучинку.

Разгорание лучинки указывает на то, что выделившийся газ является кислородом.

### **Качественные реакции на дегидрогеназы**

**Суть работы:** дегидрогеназами называют ферменты, катализирующие окисление различных веществ путем отнятия от них водорода (дегидрогенирование), откуда и название этих ферментов.

Окисление веществ под действием дегидрогеназ происходит без участия кислорода (анаэробное окисление). Дегидрогеназой водород передается другим веществам, называемым акцепторами водорода, само же окисляемое вещество при этом отдает водород и является донатором водорода.

Действие дегидрогеназ можно наблюдать на примере дегидрогеназы молока и сукцинатдегидрогеназы мышц. Дегидрогеназа молока способна окислять ряд субстратов. Согласно современным данным, ее следует рассматривать как ксантиндегидрогеназу, т. е. фермент, окисляющий ксантин в мочевую кислоту. Дегидрогеназа молока относительно устойчива к действию температуры, ее действие, поэтому лучше наблюдать при температуре около 70°C.

Если в качестве субстрата окисления (донатора водорода) взять формальдегид, а в качестве акцептора водорода - метиленовую синь и оба эти вещества прибавить к молоку, то под действием дегидрогеназы молока происходит окисление муравьиного альдегида путем отнятия водорода, который присоединяется к метиленовой сини, восстанавливая этот краситель в бесцветное соединение (лейкооснование).

Дегидрогеназами называют ферменты, катализирующие окисление различных веществ путем отнятия от них водорода (дегидрогенирование), откуда и название этих ферментов.

Окисление веществ под действием дегидрогеназ происходит без участия кислорода (анаэробное окисление). Дегидрогеназой водород передается другим веществам, называемым акцепторами водорода, само же окисляемое вещество при этом отдает водород и является донатором водорода.

Действие дегидрогеназ можно наблюдать на примере дегидрогеназы молока и сукцинатдегидрогеназы мышц. Дегидрогеназа молока способна окислять ряд субстратов. Согласно современным данным, ее следует рассматривать как ксантиндегидрогеназу, т. е. фермент, окисляющий ксантин в мочевую кислоту. Дегидрогеназа молока относительно устойчива к действию температуры, ее действие, поэтому лучше наблюдать при температуре около 70°C.

Если в качестве субстрата окисления (донатора водорода) взять формальдегид, а в качестве акцептора водорода - метиленовую синь и оба эти вещества прибавить к молоку, то под действием дегидрогеназы молока происходит окисление муравьиного альдегида путем отнятия водорода, который присоединяется к метиленовой сини, восстанавливая этот краситель в бесцветное соединение (лейкооснование).

Дегидрогеназами называют ферменты, катализирующие окисление различных веществ путем отнятия от них водорода (дегидрогенирование), откуда и название этих ферментов.

Окисление веществ под действием дегидрогеназ происходит без участия кислорода (анаэробное окисление). Дегидрогеназой водород передается другим веществам, называемым акцепторами водорода, само же окисляемое вещество при этом отдает водород и является донатором водорода.

Действие дегидрогеназ можно наблюдать на примере дегидрогеназы молока и сукцинатдегидрогеназы мышц. Дегидрогеназа молока способна окислять ряд субстратов. Согласно современным данным, ее следует рассматривать как ксантиндегидрогеназу, т. е. фермент, окисляющий ксантин в мочевую кислоту. Дегидрогеназа молока относительно устойчива к действию температуры, ее действие, поэтому лучше наблюдать при температуре около 70°C.

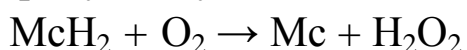
Если в качестве субстрата окисления (донатора водорода) взять формальдегид, а в качестве акцептора водорода - метиленовую синь и оба эти вещества прибавить к молоку, то под действием дегидрогеназы молока происходит окисление

муравьиного альдегида путем отнятия водорода, который присоединяется к метиленовой сини, восстанавливая этот краситель в бесцветное соединение (лейкооснование).

#### **Ход работы.**

Наливают в 2 пробирки по 4-5 мл молока. Содержимое второй пробирки кипятят, а потом охлаждают. Добавляют в обе пробирки по 8-10 капель раствора формальдегида и по 1-2 капли раствора метиленовой сини, взбалтывают и ставят в водяную баню при 70°C. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания во второй пробирке.

После обесцвечивания первую пробирку сильно взбалтывают. Синее окрашивание появляется вновь вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини за счет передачи его водорода кислороду воздуха:



Если пробирку снова поставить в водяную баню, то метиленовая синь вновь обесцветится. Эту операцию можно повторять много раз. Метиленовая синь является при этом переносчиком водорода, и небольшое количество ее может окислить много формальдегида.

2. Помещают в две пробирки по 3-4 мл мышечной кашицы. В первую пробирку добавляют около 0,5 мл нейтрализованного раствора янтарной кислоты.

В обе пробирки добавляют по 2 капли раствора метиленовой сини, встряхивают и ставят в баню при 37°C. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания во второй пробирке.

#### **Лабораторная работа №7. Тема: Количественное определение активности амилазы в моче.**

**Цель работы:** определить активность амилазы в моче, 0,1% раствор крахмала,

Определение активности амилазы основано на нахождении максимального разведения мочи, при котором происходит полное

расщепление крахмала. Этот метод имеет большое значение в клинике, так как позволяет диагностировать заболевания поджелудочной железы.

Реактивы: физиологический раствор, моча, 0,1% раствора крахмала, раствор Люголя.

**Ход работы.** В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл физиологического раствора, а затем в пробирку №1 добавляют 1 мл мочи, тщательно перемешивают, отбирают 1 мл смеси и вносят его в пробирку №2. Смешивают содержимое пробирки (№2), отбирают 1 мл и переносят в пробирку №3. Эту процедуру повторяют до пробирки №10, из которой 1 мл раствора выливают. Таким образом, получают следующие разведения мочи:

Пробирки 9 10

Разведения 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024

Во все пробирки вносят по 2 мл 0,1% раствора крахмала и ставят в термостат на 15 мин при 45<sup>0</sup> С. Затем пробирки охлаждают и добавляют в каждую по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия и перемешивают. Отмечают пробирку, в которой произошло полное расщепление крахмала (желтое окрашивание с йодом). Рассчитывают активность амилазы: например, если в первых трех пробирках отмечено желтое окрашивание, то активность амилазы рассчитывают по третьей пробирке, в которой моча разведена в 8 раз.

За единицу активности амилазы принимают количество фермента, необходимое для расщепления 1 мл 0,1% крахмала за 15 мин при 45<sup>0</sup>С. Активность амилазы обозначается А<sup>45°</sup> 15. В данном случае (полное расщепление в пробирке №3) 1 мл неразведенной мочи может расщепить в 8 раз большее количество крахмала, т. е.  $A^{45^{\circ}} 15 = 2 \cdot 8 = 16$ , где 2 – количество 0,1% крахмала, взятого в опыт. В норме амилазная активность мочи здорового человека находится в пределах 16-64 ед. и повышается при заболеваниях поджелудочной железы – панкреатитах.

Сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1 Правила техники безопасности при выполнении работы.



- 2 Понятие о ферментах.
- 3 Классификация ферментов.
- 4 Строение фермента.
- 5 Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
- 6 Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
- 7 Чем обусловлена специфичность ферментов?
- 8 Понятие об ингибиторах и активаторах.
- 9 Обратимое и необратимое ингибирование.
- 10 Методика исследования свойств сахаразы.
- 11 Методика исследования свойств амилазы.

### **Лабораторная работа № 8 Тема: Влияние температуры на скорость ферментативного катализа**

Реактивы: 1) крахмал, 0,5 % раствор; 2) йод в 0,2 % растворе KI; 3) слюна, разбавленная в 10 раз; 4) вода дист.; 5) NaOH, 10% раствор.

**Суть метода:** Скорость ферментативной реакции закономерно увеличивается примерно вдвое с повышением температуры на каждые 10<sup>0</sup>С. С 45-50<sup>0</sup>С начинается денатурация фермента от нагревания. Постепенно разрушение фермента приводит к тому, что скорость основного химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается. Наивысшая температура, при которой сохраняются нативные свойства ферментов в течение длительного периода времени, называется оптимальной температурой. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах 45-50<sup>0</sup>С.

**Ход работы:** В 4 пронумерованные пробирки наливают по 4 мл раствора крахмала и по 1 мл разведенной в 10 раз водой слюны. Первую пробирку быстро помещают в кипящую водяную баню, вторую - в лед, третью - в термостат при 37-40<sup>0</sup>С, а четвертую оставляют при комнатной температуре. Через 10 минут содержимое каждой пробирки разделить приблизительно на две части. С одной

частью проводят пробу на крахмал: добавляют к содержимому 2 капли раствора Люголя, - синее окрашивание свидетельствует о наличии негидролизованного крахмала.

Со второй частью содержимого проводят реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью: добавляют 1 мл 10% NaOH и по каплям 1% CuSO<sub>4</sub> до образования исчезающей голубой мути. Нагревают пробирки до кипения. Появление желтого окрашивания, переходящего в кирпично-красное, свидетельствует о наличии восстанавливающих углеводов (глюкозы), появившихся после полного расщепления крахмала. Результаты работы сравнивают и анализируют.

### **Лабораторная работа № 9 Тема: Открытие витаминов**

**Цель работы:** открытие аскорбиновой кислоты в различных биологических объектах

#### **Открытие аскорбиновой кислоты в шиповнике**

Витамин С – аскорбиновая кислота является антицинготным или антискорбутным витамином. Витамин С содержится в хлорофиллоносных частях растений, ягодах, плодах, клубнях

Аскорбиновая кислота легко окисляется при действии ферментов: аскорбиноксидазы, пероксидазы, полифенолоксидазы.

Метод определения аскорбиновой кислоты по Тольмансу основан на ее восстанавливающих свойствах. При титровании раствором дихлорфенолиндофенола происходит окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту. Конец реакции можно установить по изменению окраски: восстановленная форма дихлорфенолиндофенола приобретает розовую окраску.

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в вытяжке из шиповника, восстанавливает феррицианид калия (железосинеродистый калий) в ферроцианид (железистосинеродистый), который, взаимодействуя с хлорным железом, образует плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа - берлинскую лазурь.

**Оборудование и реактивы:** сок картофеля; сок капусты (клубни картофеля или часть кочана капусты натрите на терке из нержавеющей стали или пластика, растертую массу отожмите через марлю, сложенную в два слоя); 5 %-ый раствор гексацианоферрата (III) калия; 5 %-ый раствор гидроксида калия; 10 %-ый раствор соляной кислоты; 1,5 %-ый раствор хлорида железа (III); 5 %-ый раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте); 10 % - ый раствор аммиака; дистиллированная вода, терка из нержавеющей стали или пластика; пробирки, вытяжка из плодов шиповника.

**Ход работы.** В пробирку вносят по 2 капли 5% раствора феррицианида калия и 1 каплю раствора хлорного железа. Жидкость приобретает бурую окраску. Затем добавляют 5-10 капель 1% вытяжки из шиповника (приготовленной из экстракта) и цвет раствора переходит в зеленовато-синий, после чего выпадает осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь), который при добавлении воды становится более отчетливым.

Сделать вывод.

### **Обнаружение аскорбиновой кислоты в соке картофеля и капусты**

Аскорбиновая кислота легко вступает в окислительно-восстановительные реакции, что используется для ее качественного обнаружения.

**Ход работы:** *Восстановление ионов железа (III).* В две пробирки налейте по 1 мл сока картофеля и капусты, прибавьте по 2 капли раствора гидроксида калия и столько же раствора гексацианоферрата (III) калия.

Содержимое пробирок тщательно перемешайте, после чего в пробирки добавьте по 6-8 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

*Восстановление ионов серебра.* В пробирку налейте 1 мл раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака.

Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 мл сока картофеля, а во вторую - 1 мл сока капусты.

Пробирки поставьте в горячую (80°C) воду на 5-10 минут. На стенках пробирок образуется зеркальный налет металлического серебра.

Сделать вывод.

## **Лабораторная работа № 10 Тема: Открытие углеводов**

**Цель работы:** ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы;

К природным высокомолекулярным соединениям относятся углеводы, белки, нуклеиновые кислоты.

Углеводы (сахара) – обширная группа природных органических соединений, химическая структура которых часто отвечает общей формуле  $C_m(H_2O)_n$ , т. е. углерод + вода. Используемый термин возник более 100 лет назад, когда так называли природные соединения, отвечающие формуле  $(CH_2O)_n$ , т. е. гидраты углерода. Углеводы включают соединения, начиная с низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких миллионов.

**Реактивы:** 1% раствора крахмала, 1% раствор йода в йодиде калия,  $\alpha$ -нафтол, 1% раствор сахарозы, серная кислота конц., 1 % раствор глюкозы, лактозы и сахарозы, 5 % раствор NaOH; 5 % раствор медного купороса ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), 2 % раствор  $Co(NO_3)_2$ ,

### **Открытие крахмала**

**Ход работы.** В пробирку вносят 10 капель 1% раствора крахмала и каплю 1% раствора йода в йодиде калия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

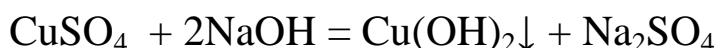
**Реакция на обнаружение углеводов.** С помощью реакции с  $\alpha$ -нафтолом или тимолом обнаруживаются незначительные количества углеводов или углеводных компонентов в сложных соединениях.

**Ход работы.** В две пробирки вносят по 10 капель 1% раствора сахарозы. Затем в одну из них добавляют 3 капли 1% спиртового раствора а-нафтола, а в другую – такое же количество 1% спиртового раствора тимола. В обе пробирки осторожно настилают по 0,5 мл концентрированной серной кислоты и на границе двух жидкостей наблюдают фиолетовое окрашивание в пробирке с а-нафтолом и красное в пробирке с тимолом.

### Реакция Троммера

Принцип метода. Реакция является пробой на редуцирующие (восстанавливающие) сахара. Моносахариды, окисляясь в щелочной среде, восстанавливают ионы меди(II) до меди(I), а также соли серебра до металлического серебра. Эти реакции могут использоваться для количественного определения восстанавливающих моносахаридов, молекулы которых содержат свободные карбонильные группы, которые при восстановлении меди(II) окисляются до карбоксильных. Восстанавливающими свойствами обладают также некоторые дисахариды: мальтоза, лактоза, целлобиоза.

**Ход работы:** в пробирку наливают 1–2 мл исследуемого раствора и равный объем раствора NaOH. Затем по каплям добавляют раствор соли до появления исчезающей мути  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  голубого цвета:



При нагревании смеси сначала появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием гидроксида меди(I)

При дальнейшем нагревании желтая окраска раствора в присутствии восстанавливающих сахаров переходит в красную:

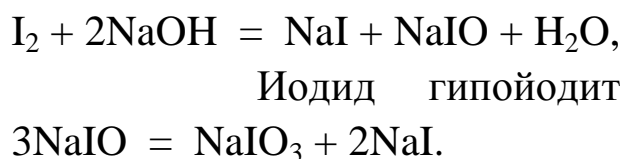
Избыток меди может затемнить реакцию, так как при нагревании  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  теряет воду и превращается в черный оксид меди(II)

**Проба на сахарозу. Качественная реакция с солями кобальта.**

**Ход работы.** В пробирку с 2 мл раствора сахарозы добавляют 1 мл раствора NaOH и несколько капель раствора  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ . Появляется фиолетовое окрашивание.

### **Проба на полисахариды**

**Суть метода:** при взаимодействии полисахаридов с йодом происходят комплексообразование, адсорбция и другие процессы. Оттенок окраски раствора зависит от строения полисахарида, в частности от степени его ветвления. Для получения сорбционного соединения крахмала необходимо наличие свободного йода. NaOH превращает свободный йод в йодид, который после прибавления кислоты разлагается с выделением свободного йода. Поэтому прежде чем приступить к йодной пробе, щелочные растворы надо нейтрализовать. Реакция связывания свободного йода в щелочной среде



### **Ориентировочный экспресс-метод определения сахаров**

В клинике важное значение имеют методы, позволяющие быстро определять примерное количество сахара в моче. Данный метод основан на способности образовывать соединения различной окраски в зависимости от количества сахара в присутствии сульфата меди и карбоната натрия.

**Ход работы.** В ступке растирают в тонкий порошок 1 г сульфата меди с 10 г безводного карбоната натрия  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . На предметное стекло насыпают немного порошка и наносят несколько капель мочи. Подогревают до кипения. Синий цвет означает отсутствие сахара, желто-зеленый цвет свидетельствует о наличии сахара в моче в пределах 0,5% (5 г/л), зеленый – 1% (10 г/л), красно-коричневый – до 2% (20 г/л) и интенсивно-красный цвет – свыше 2% (20 г/л).

Сделать выводы.

## Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов
- 2 Дайте определение и проведите классификацию углеводов.
- 3 Функции углеводов в организме.
- 4 Классификация моносахаридов.
- 5 Строение молекулы глюкозы (доказательства строения, открытая, циклическая, проекционная формулы и формула Хеуорса)
- 6 Химические свойства глюкозы (реакции окисления, алкилирования, ацилирования, уменьшения и увеличения цепи)
- 7 Фруктоза: строение и свойства.
- 8 Сахароза: строение, свойства, гидролиз.
- 9 Крахмал: строение, амилоза, амилопектин, физические и химические свойства.

## Лабораторная работа № 11. Тема: Открытие липидов (жиров)

**Цель работы:** ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды;

Липиды (от греч. липос – жир) – низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир). Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность). Липиды представляют собой разнородные химические соединения

I Простые липиды:

- 1 ацилглицеролы (жиры, триглицериды и т. п.);
- 2 воска.

II Сложные липиды:

- 1 фосфолипиды
  - глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);
  - сфингофосфолипиды (сфингомиелин);

2 стероиды (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, экдистероиды);

3 гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Для характеристики жира используют константы или жировые числа:

**Кислотное число** – масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

**Число омыления** – это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

**Йодное число** – это масса йода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происходит по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т. п.

### **Реактивы и оборудование:**

Жиры (говяжий, свиной, бараний) 10 г, масло (подсолнечное, касторовое, растительное) 10 г, толуол, ацетон, петролейный эфир, диэтиловый эфир, гексан, этиловый спирт, серная кислота (конц.), соляная кислота (0,5н), соляная кислота (разб. 1:1), гидроксид калия (водный 0,1 н), гидроксид калия, (спиртовой раствор 0,5н), раствор гидроксида натрия (разб.), раствор карбоната натрия 10%, гидросульфат калия (безвод.), раствор нитрата серебра, аммиак (водный раствор), раствор фуксинсернистой кислоты, спиртовой раствор йода (0,2н), раствор тиосульфата натрия (0,1н), раствор крахмала 1%, бромная вода, раствор гидроксида натрия 35%; пробирки, колбочки для титрования, держатель, спиртовка, водяная баня.

### **Растворимость жиров и масел**



В 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т. п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

В 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т. д.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

### **Гидролиз жиров и масел**

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

### **Выделение жира из молока**

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло – молочный жир.

### **Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)**

В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира), 0,1-0,2 г безводного  $\text{KHSO}_4$  и нагревают на спиртовке (под тягой) до

появления белых густых паров. В пары вносят бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

Аналитический эффект: Бумажка с раствором солей серебра темнеет, а с раствором фуксинсернистой кислоты становится ярко-розовой.

### **Определение йодного числа**

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3-4 капли масла (жира).

Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В колбу добавляют 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбу вносят 12,5 мл 0,2н спиртового раствора йода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колбы титруют 0,1н раствора тиосульфата натрия до появления слабо желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют – контроль, но без масла (жира).

Расчет йодного числа проводят по формуле:

$$\text{И. ч.} = (V_2 - V_1) \times 0,0127 \times 100 / m,$$

где  $V_2$  – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля;  $V_1$  – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 – титр тиосульфата по йоду;  $m$  – навеска масла (г)

### **Определение кислотного числа**

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 мл масла (жира) – 2-3 г. Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) примерно 2-3 г. В колбочку добавляют 10-15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового

окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5-1 мин.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К. ч.} = V T / m,$$

где К. ч. – кислотное число; V – объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл); T – титр 0,1 н раствора КОН; m – масса навески масла (жира), г.

### **Омыление жиров**

В фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35 %-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню. Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.

### **Определение числа омыления**

В 2 колбочки помещают: 1-0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2-0,5 мл воды. Затем в обе колбочки добавляют по 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30-40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15-20 мл воды, 3-4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч. о.} = (V_2 - V_1) \times 28 / m,$$

где Ч. о. – число омыления; V<sub>2</sub> – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля; V<sub>1</sub> – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла; m – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

Сделать выводы.

### **Контрольные вопросы**

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и проведите классификацию липидов.
- 3 Укажите функции липидов в организме.
- 4 Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.
- 5 Приведите примеры качественных реакций, доказывающих неопредельный характер ВЖК.
- 6 Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
- 7 Какие реакции лежат в основе омыления жира?
- 8 Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
- 9 Перечислите компоненты, участвующие в переваривании жиров.
- 10 Значение ВЖК, холестерина в метаболических процессах.

### **Лабораторная работа №12 Тема: Фосфолипиды**

**Цель работы:** ознакомить студентов с качественными реакциями на фосфолипиды

**Суть работы:** основная масса фосфолипидов представлена производными фосфатидной кислоты – фосфатидами (в основном, фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины) и фосфатидилсерины). Кроме того, в тканях присутствуют фосфатидилинозиты, сфинофосфатиды и дифосфатидилглицерины, в частности, кардиолипин, который обладает иммуномодуляторными свойствами. Фосфолипиды содержатся преимущественно в биологических мембранах, являясь их главным липидным компонентом.

**Реактивы:** 1) яичный желток; 2)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 3) ацетон; 4)  $\text{NaOH}$ , 10% раствор; 5)  $\text{CdCl}_2$ , насыщенный раствор; 6)  $\text{HCl}$ , 10% раствор; 7) кислый сернокислый К, сухой; 8)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , сухой; 9)  $\text{KNO}_3$ , сухой; 10)  $\text{HNO}_3$ , 10% раствор; 11) молибденовый реактив; 12)  $\text{H}_2\text{O}$  дист.

### **Получение фосфатидилхолинов из яичного желтка**

**Ход работы:** в стаканчик помещают приблизительно 1/5 часть одного куриного желтка и добавляют при перемешивании около 10-15 мл горячего спирта. При охлаждении смесь фильтруют в сухую пробирку. Если в фильтрате появилась муть, то фильтрование повторяют до получения совершенно прозрачного раствора.

#### **Осаждение ацетоном**

В пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям приливают немного полученного фильтрата. Наблюдается появление мути в ацетоне, что указывает на выпадение холинфосфатидов, которые в ацетоне не растворимы.

#### **Эмульгирование**

К 2-3 мл спиртового раствора добавляют по каплям дистиллированную воду. Наблюдают образование устойчивой эмульсии фосфатидилхолинов.

#### **Осаждение фосфатидилхолинов хлористым кадмием**

При добавлении хлористого кадмия к спиртовому раствору фосфатидилхолинов последние выпадают в осадок, т.е. образуется соединение их с хлористым кадмием, в котором на 3 частицы фосфатидилхолинов приходится 4 части хлористого кадмия. Это соединение слабо растворимо.

**Ход работы:** В сухую пробирку наливают 5 капель спиртового раствора фосфатидилхолинов и добавляют 1-2 капли насыщенного раствора хлористого кадмия. Выпадает осадок.

#### **Гидролиз фосфатидилхолинов**

**Ход работы:** К оставшемуся спиртовому раствору фосфатидилхолинов добавляют 3-5 мл 10% раствора едкого натра и подвергают кипячению в течение 5-10 минут. Происходит гидролитический распад фосфатидилхолинов с отщеплением холина, жирных кислот и глицеринфосфатной кислоты. При нагревании ощущается запах селедочного рассола или посинение лакмусовой бумажки, характерные для триметиламина, образующегося из холина. В растворе устанавливают наличие жирных кислот, глицерина, фосфорной кислоты.

Сделать выводы.

## **Лабораторная работа № 13 Тема: Эмульгирование жира**

**Цель работы:** ознакомить студентов с свойствами жиров

**Суть работы:** жиры и другие липиды нерастворимы в воде, но растворяются во многих органических жидкостях. С водой жир может образовать эмульсию, т. е. дисперсную систему из двух несмешивающихся жидкостей. Эмульсия, однако, неустойчива и при стоянии жир вновь всплывает на поверхность, образуя два слоя - жировой и водный. Если же к смеси добавить немного белка или щелочи, мыла, щелочнореагирующих солей (соды), желчи или некоторых других веществ (эмульгаторы, детергенты), то при взбалтывании эмульсия станет устойчивой. Стойкость эмульсии зависит от того, что эти вещества понижают поверхностное натяжение между поверхностными слоями жировых шариков и раствором белка или мыла, получающегося при взаимодействии жира со щелочами. Понижение поверхностного натяжения препятствует слипанию жировых капель и благодаря этому удерживает эмульсию в стойком состоянии. Примером такой эмульсии может служить молоко. Желчь в особенности обладает свойством эмульгировать жиры, так как содержит соли желчных кислот, сильно понижающих поверхностное натяжение. Это свойство желчи имеет большое значение для переваривания жиров в организме, так как во много раз увеличивает поверхность соприкосновения жира с липазой поджелудочной железы.

**Реактивы и оборудование:** растительное масло, дистиллированная вода, желчь, гидроксид калия, карбонат натрия, белок, сера кристалл., 0,5%-ный раствор ацетона. 10%-ный раствор гидроксида натрия, раствор Люголя, 0,5%-ный раствор ацетоуксусной кислоты, ледяная уксусная кислота, 10%-ный раствор нитропруссиды натрия концентрированный раствор аммиака, пробирки.

**Ход работы:** В 5 пробирок помещают по 2 капли растительного масла, по 1 мл дистиллированной воды и по 5 капель соответственно в каждую пробирку, начиная с первой: желчи, едкого кали, карбоната натрия, белка и воды. Пробирки встряхивают и наблюдают образование устойчивых эмульсий во

всех пробирках, кроме 5-й, где происходит расслаивание на жир и воду.

### **Проба на понижение поверхностного натяжения**

#### **Реактивы и оборудование:**

**Ход работы.** Берут 3 пробирки. В 1-ю вносят 2 мл желчи, в разведении 1:5, во 2-ю – 0,5 мл разведенной желчи и 1,5 мл воды, а в 3-ю – 2 мл дистиллированной воды. Затем все пробирки ставят на 5 минут в холодную воду и всыпают на конце шпателя порошок серы. Замечают результат: в 1-ой пробирке вся сера опустилась на дно, во 2-ой на дне обнаруживается часть серы, а в 3-ей вся сера опустилась на дно. Следовательно, желчные кислоты снижают поверхностное натяжение.

#### **Реакции на ацетоновые тела**

##### ***Реакция на образование йодоформа***

**Ход работы:** в пробирку вносят 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, и несколько капель йода в йодиде калия (раствор Люголя) и наблюдают образование желтого осадка йодоформа. Аналогичную реакцию проводят с мочой.

##### **Реакция с нитропруссидом натрия**

**Ход работы:** В одну пробирку наливают 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, а в другую – такое же количества 0,5%-ного раствора ацетоуксусной кислоты. Затем в обе пробирки прибавляют по 5 капель ледяной уксусной кислоты и по 3 капли 10%-ного раствора нитропрусида натрия. Встряхивают, после чего осторожно наслаивают по 0,5 мл концентрированного раствора аммиака. На границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Аналогичную реакцию проделывают с мочой.

Сделайте выводы.

## **Лабораторная работа № 14 Тема: Водный и минеральный обмен**

**Цель работы:** научиться определять минеральные вещества в моче на основе качественных реакций на катионы металлов и анионы кислот.

**Реактивы и оборудование:** 5%-ный раствор хромата калия, титрованный раствор нитрата серебра (1мл = 0,01 г NaCl), исследуемая моча, бюретка, колбы для титрования пипетки на 5 мл, стеклянные палочки.

**Суть работы:** значение воды и минеральных солей огромно. Все процессы, протекающие в организме, идут в водной среде. Без воды нет жизни. Минеральные вещества участвуют в построении всех органов и тканей, обеспечивают поддержание осмотического давления, активируют многие ферментные системы и выполняют еще большое число разнообразных функций. Содержание воды и минеральных солей в крови постоянно, поэтому их определение имеет важное значение для характеристики состояния организма.

**Открытие хлоридов в моче.** С мочой хлоридов за сутки выделяется около 15 г из расчета на хлорид натрия. Реакция основана на образовании белого осадка хлорида серебра, нерастворимого в азотной кислоте.

**Ход работы.** К 10 каплям мочи добавляют 2 капли 1%-ного раствора нитрата серебра и 3 капли 10%-ного раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок.

**Количественное определение хлоридов в моче.** Количество хлоридов в моче определяют количеством миллилитров нитрата серебра, пошедшим на титрование.

**Ход работы:**

В колбу для титрования отмеряют пипеткой 5 мл мочи, прибавляют в качестве индикатора 3-5 капель 5%-ного раствора хромата калия и постепенно титруют из бюретки раствором  $\text{AgNO}_3$  до бледно-розового осадка.

Для полноты осаждения хлоридов, которые могут захватываться из раствора выпадающим осадком, крупинки творожистого осадка следует растереть стеклянной палочкой.

По шкале бюретки фиксируют количество миллилитров  $\text{AgNO}_3$  (V), пошедшее на титрование.

4. Процентное содержание хлористого натрия ( $\omega$ ) вычисляют по формуле:



$$\omega = \frac{0,01 \cdot V \cdot 100}{5}$$

где 0,01 г NaCl соответствует 1 мл раствора нитрата серебра.

Приняв за суточный диурез 1500 мл мочи, вычисляют в ней суточное

количество хлорида натрия (в гр) по формуле:

$$m = \frac{\omega \cdot 1500}{100}$$

где

m – суточное количество NaCl (г),

$\omega$  – процентное содержание NaCl в моче,

1500 – суточный диурез (мл).

### **Открытие сульфатов**

В организме сера принимает участие во многих процессах обмена, в том числе и в синтезе некоторых гормонов (инсулина, окситоцина), в обезвреживании токсических продуктов (фенола, крезола и др.)

**Ход работы.** К 10 каплям мочи добавляют 5 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 5 капель 5%-ного раствора хлорида бария. Выпадает белый осадок.

### **Открытие фосфатов**

Значение фосфатов для организма трудно переоценить. Он является одной из составных частей костной и зубной ткани, обнаруживается в составе почти всех органов и тканей, поддерживает осмотическое давление, а его соли, особенно АТФ, представляют собой основной аккумулятор энергии в организме, обеспечивающий активирование глюкозы, жирных кислот, аминокислот, процессы синтеза, избирательную проницаемость клеточных мембран.

В основе определения фосфатов лежит их способность образовывать желтый осадок с молибденовым реактивом.

**Ход работы.** В пробирку наливают 20 капель молибденового реактива, нагревают почти до кипения и добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый кристаллический осадок фосфорных солей молибдата аммония.

Сделайте вывод.

**Контрольные вопросы:**

- 1 Дайте определение гомеостаза. Какими показателями характеризуется гомеостаз?
- 2 Какое значение имеет вода для организма? Что такое вне - и внутриклеточная вода? Каков ее состав?
- 3 Какие органы принимают участие в регуляции водного обмена? Как регулируется водный обмен?
- 4 Какова функция антидиуретического гормона и альдостерона в обмене воды?
- 5 Каково значение минеральных веществ для организма?
- 6 Какова суточная потребность в калии, кальции, фосфоре, железе?
- 7 Укажите на значение калия, натрия, кальция, фосфора и микроэлементов.

## Литература

1. Димитриев А. Д. Биохимия: учебное пособие / Алексей Димитриевич Димитриев, Елена Дмитриевна Амбросьева. - М.: Дашков и К, 2012. - 168 с.
2. Кнорре Д. Г. Биологическая химия: учебник для студентов вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. - 3-е изд., испр. - М.: Высшая школа, 2003.-479с. Гриф: Рекомендовано Министерством образования РФ
3. Чиркин А. А. Практикум по биохимии: Учебное пособие / А. А. Чиркин. - М.: Новое знание, 2002. - 512 с.
4. Биохимия [Текст] : учебник / Под ред. В. Г. Щербакова. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб. : ГИОРД, 2003. - 440 с.
5. Практикум по биохимии [Текст] : учебное пособие / А. А. Чиркин. - М. : Новое знание, 2002. - 512 с.