

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

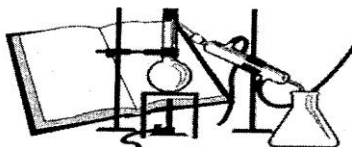
Кафедра химии

О. В. Поддубная, И. В. Ковалёва, Е. В. Мохова

ХИМИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

*Методические указания по выполнению
лабораторных работ для студентов специальностей
1-74 03 01 Зоотехния,
1-74 03 03 Промышленное рыбоводство*



**Горки
БГСХА
2014**

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Кафедра химии

О. В. Поддубная, И. В. Ковалёва, Е. В. Мохова

ХИМИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

*Методические указания по выполнению
лабораторных работ для студентов специальностей
1-74 03 01 Зоотехния,
1-74 03 03 Промышленное рыбоводство*

Горки
БГСХА
2014

УДК 54(072)

ББК 24я73

П44

*Рекомендовано методической комиссией
зооинженерного факультета.
Протокол № 5 от 27 января 2014 г.*

Авторы:

кандидаты сельскохозяйственных наук, доценты
О. В. Поддубная, И. В. Ковалёва, Е. В. Мохова

Рецензенты:

доктор сельскохозяйственных наук, профессор *Н. И. Гавриченко*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Е. Л. Микулич*

Поддубная, О. В.

П44 Химия. Биологическая химия : методические указания по выполнению лабораторных работ / О. В. Поддубная, И. В. Ковалёва, Е. В. Мохова. – Горки : БГСХА, 2014. – 144 с.

Методические указания знакомят студентов с методами обнаружения и количественного определения белков, ферментов, углеводов, липидов и витаминов в биологических объектах, а также приемами выделения этих соединений и некоторыми сторонами их обмена. Работы подобраны с учетом доступности исследуемого материала, реактивов и оборудования, возможности выполнения в отведенное для занятий время и использования методов анализа для различных биологических объектов. Каждая работа содержит теоретическое обоснование, порядок выполнения, способ учета результатов.

Для студентов зооинженерного факультета.

УДК 547(072)

ББК 24я73

ВВЕДЕНИЕ

Биохимия является и биологической, и химической наукой, так как изучает вещества животного, растительного и микробного происхождения с целью познания их строения, свойств и выяснения механизмов функционирования. При составлении лабораторных работ использована современная концепция преподавания биохимии.

Методические указания по выполнению лабораторных работ по биохимии предназначены для студентов зооинженерных специальностей и всех форм обучения. Разработка включает методы определения белков, углеводов и жиров, а также методы определения активности ферментов белкового, углеводного и липидного обменов.

Цель лабораторного практикума – ознакомить студентов с основными методами, применяемыми в биохимии, а также с проведением работ, включающих элементы исследования. Лабораторные работы по темам содержат несколько опытов, что предполагает возможность выбора с учетом получаемой специальности. В конце работы полученные результаты сводятся в таблицу и анализируются.

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

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

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

Авторы методической разработки надеются, что такой подход к процессу обучения позволит студентам лучше понять и качественно усвоить материал раздела биологической химии.

1. УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Перед выполнением работы необходимо внимательно ознакомиться с методикой ее проведения и предположить ожидаемый результат, вытекающий из теоретического обоснования химизма реакции или процесса. Выполнение работ знакомит студента с методами качественных и количественных исследований сырья растительного и животного происхождения, дополняет и закрепляет теоретический материал наиболее сложных тем биологической химии.

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

Контрольные вопросы и тестовые задания, приведенные к каждой теме, очерчивают минимум знаний, необходимых для защиты выполненной и оформленной лабораторной работы.

2. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

Работу в лаборатории необходимо выполнять в халатах.

Всю посуду перед выполнением работы необходимо вымыть.

Концентрированные кислоты, щелочи и другие сильнодействующие реактивы набирать пипеткой с грушей или отмерять цилиндром.

Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и легкоиспаряющимися веществами производить только в вытяжном шкафу.

Если пролили концентрированную кислоту или щелочь, то их надо нейтрализовать толченым мелом или раствором кислоты соответственно, а затем смыть водой.

При попадании концентрированной кислоты или щелочи на кожу, необходимо быстро смыть водой, а затем соответственно 2%-ным раствором бикарбоната натрия или 2%-ным раствором борной кислоты. Запрещается оставлять без присмотра включенные электроприборы.

Категорически запрещается принимать в лаборатории пищу, пользоваться лабораторной посудой для питья. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.

Тема 1. ВИТАМИНЫ

Цель. Изучить биологическое действие отдельных витаминов и методы исследования витаминов в биологическом материале.

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

Витамины – это низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, способные самостоятельно или в составе ферментов катализировать биохимические реакции. Они не являются энергетическим материалом и организму требуются в ничтожно малых количествах. Потребность в витаминах организмы удовлетворяют по-разному: растения синтезируют все необходимые им витамины, человек, животные, птицы и рыбы получают их с пищей в готовом виде или в виде провитаминов – предшественников, из которых образуются соответствующие витамины. Некоторые витамины синтезируются микроорганизмами, населяющими кишечник, удовлетворяя частично или полностью потребности организма.

Классифицируют витамины по растворимости на жирорастворимые и водорастворимые. Водорастворимые витамины не растворяются в жирах и многих органических растворителях, но хорошо растворимы в воде. В эту группу входят витамины группы В (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_с и др.), витамины С, Р, Н, U и другие. Водорастворимые витамины тесно связаны с ферментами, многие из них принимают участие в построении небелковых групп ферментов и тем самым оказывают влияние на жизнеспособность организма. Водорастворимые витамины отличаются термоллабильностью и неустойчивостью к изменению pH среды. В организме почти не накапливаются и должны постоянно поступать с пищей. Способны наиболее полно усваиваться из рационов, сбалансированных по белку. Жвачные животные менее зависимы от поступления витаминов с пищей, что связано с деятельностью микрофлоры ЖКТ.

Жирорастворимые витамины не растворяются в воде, но хорошо растворимы в жирах и органических растворителях. К ним относят А, D, Е, К, F, Q и другие. Жирорастворимые витамины участвуют в ряде окислительно-восстановительных реакций, регуляции проницаемости мембран и многих биохимических процессов. Жирорастворимые ви-

тамины отличаются термостабильностью и устойчивостью к изменению pH среды. В организме практически не синтезируются, но могут депонироваться. Полнее усваиваются организмом при наличии жиров в рационе. Отсутствие или недостаток в пище витаминов приводят к нарушениям обмена веществ и в конечном счете заболеваниям, получившим название авитаминозов и гиповитаминозов, избыток витаминов – к гипервитаминозам. Биохимическая роль витаминов представлена в табл. 1.

Таблица 1. Краткая биохимическая роль витаминов

Витамины	Биохимическая роль
Витамин А – ретинол	<ol style="list-style-type: none"> 1. Защищает роговицу глаза от сухости 2. Способствует выработке слизи (витамин плодовитости) 3. Катализирует синтез белков, стимулирует рост 4. Способствует защите кожи против дерматитов 5. Является антиоксидантом 6. Обладает антиинфекционными свойствами 7. Оказывает влияние на тканевый состав и энергетический обмен
Витамин D – кальциферол	<ol style="list-style-type: none"> 1. Регулирует обмен Ca^{2+} и фосфора 2. Активизирует процессы окислительного фосфорилирования 3. Участвует в тканевом дыхании 4. Усиливает синтез РНК
Витамин Е – токоферолы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Способствует процессу оплодотворения у животных 2. Способствует биосинтезу белков и нуклеиновых кислот 3. Участвует в процессе окислительного фосфорилирования в качестве переносчика электронов 4. Способствует превращению каротина в витамин А 5. Является природным антиоксидантом – защищает липиды мембран от окисления
Витамин К – филлохинон	<ol style="list-style-type: none"> 1. Принимает участие в окислительных процессах и в процессе свертывания крови 2. Участвует в процессе окислительного фосфорилирования в качестве переносчика электронов 3. Способствует синтезу амилазы, пепсина, трипсина, лиазы 4. Участвует в реакции энергетического обмена
Витамин F	<ol style="list-style-type: none"> 1. Участвует в обмене липидов 2. Способствует выведению из организма холестерина 3. Стимулирует активность витаминов группы В
Витамин Q – убихинон	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является компонентом дыхательной цепи при биологическом окислении 2. В качестве кофермента концентрирует протоны и электроны от дегидрогеназ и передает в дыхательную цепь

Витамины	Биохимическая роль
Витамин В ₁ – тиамин	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является коферментом, ферментом декарбоксилаз 2. Способствует биосинтезу белков, нуклеиновых кислот, углеводов и жиров 3. Предохраняет витамин С от окисления 4. Участвует в процессах декарбоксилирования, дезаминирования, переаминирования
Витамин В ₃ – пантотеновая кислота	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является коферментом Ко-А, является коферментом ферментов трансфераз, участвующих в переносе ациллов, при этом происходит активация ациллат: он связывается коэнзимом макроэргической связью
Витамин В ₄ (холин)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Участвует в образовании ацетилхолина, метионина и других соединений
Витамин В ₅ (РР) – никотинамид	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является компонентом двух дегидрогеназ: НАД и НАДФ. Основная функция коферментов – это перенос гидрид ионов в процессах 2. Участвует в энергетическом обмене: цикл трикарбоновых кислот, гликолиз (анаэробная фаза окисления углеводов до молочной кислоты)
Витамин В ₆ – пиридоксол	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является коферментом ферментов, участвует в декарбоксилировании, дезаминировании аминокислот 2. Участвует в синтезе гормонов адреналина, норадреналина
Витамин В ₉ – фолиевая кислота	<ol style="list-style-type: none"> 1. Входит в состав ферментов 2. Принимает участие в биосинтезе белка и ряда аминокислот 3. Вместе с витамином В₁₂ участвует в процессе кроветворения
Витамин В ₁₂ – цианкобаламин	<ol style="list-style-type: none"> 1. Является коферментом ферментов, участвующих в обмене нуклеиновых кислот, белков, расщепления жира, превращения углеводов 2. Участвует в процессе кроветворения, а также в процессе макроэргических соединений
Витамин В ₁₅ – пангамовая кислота	<ol style="list-style-type: none"> 1. Участвует в биосинтезе холина, метионина, креатина, адреналина, стероидов, стероидных гормонов и др.
Витамин Н – биотин	<ol style="list-style-type: none"> 1. Входит в состав ферментов, катализирует процессы обмена белков 2. Участвует в карбоксилировании и декарбоксилировании жирных кислот, а также синтезе мочевины
Витамин С – аскорбиновая кислота	<ol style="list-style-type: none"> 1. Участвует во многих реакциях обмена веществ, являясь донором, акцептором протонов и нейтронов 2. Выступает в качестве кофактора
Витамин U (U – метилметионин)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Принимает участие во всех тех реакциях метилирования, в которых обычно участвует другая активированная форма метионина – 5-аденозилметионин

Добавление витаминов имеет целью ревитаминизацию, стандартизацию, обогащение и специальное воздействие при технологической переработке и хранении кормов. Ревитаминизация – это добавление витаминов в сырье, которое теряет их при переработке (добавление витаминов В₁, В₂, В₅ к пшеничной муке высшего сорта и обрубленному рису, а также витаминов А и D к обезжиренному молоку).

Обнаружение витаминов в кормах и биологических объектах преимущественно основано на их способности давать цветные реакции с определенными химическими веществами.

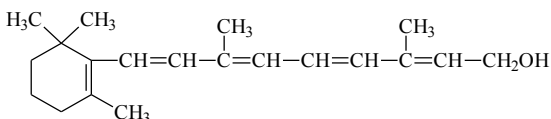
Лабораторная работа 1. Качественные реакции на витамины

Материалы и оборудование. Концентрированная серная кислота; концентрированная соляная кислота; ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа (II); концентрированная азотная кислота; хлорид железа (III), 1%-ный раствор; диэтилдитиокарбомат натрия, 2%-ный спиртовой раствор; NaOH, 4%-ный спиртовой раствор; смесь анилина с концентрированной соляной кислотой (15:1 по объему); цистеин, 0,25%-ный спиртовой раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфаниловая кислота, 1%-ный раствор; нитрит натрия, 5%-ный раствор; Na₂CO₃, 10%-ный раствор; металлический цинк; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; роданид аммония, 5%-ный раствор; хлорид железа (III), 1%-ный раствор; раствор брома в хлороформе в соотношении 1:60; раствор рыбьего жира в хлороформе в соотношении 1:5; препарат витамина А; концентрат витамина D; сахароза; насыщенный раствор хлорида сурьмы (III); витамин Е, 0,1%-ный спиртовой раствор; витамин К, 0,05%-ный спиртовой раствор; викасол, 0,05%-ный спиртовой раствор; тиамин, 5%-ный раствор; K₃[Fe(CN)₆], 5%-ный раствор; KOH 30%-ный раствор; изобутиловый спирт; витамин В₂, 0,025%-ный раствор; раствор витамина В₁₂ в ампулах; тиомочевина, 10%-ный раствор; никотинамид, 1%-ный раствор; витамин В₆, 1%-ный раствор; метиленовая синь, 6,0%-ный раствор; водный раствор рутина. Желток яйца, рыбий жир, тертая морковь, сухой шиповник. Часовое стекло, штатив и пробирки, капельные пипетки, пипетки на 1 и 5 мл, стеклянная палочка.

1.1. Качественные реакции на жирорастворимые витамины

Витамин А

Витамин А (ретинол) – ненасыщенный гидроароматический спирт, состоящий из β-иононового кольца и боковой цепи, представленной двумя остатками изопрена и первичной – спиртовой группой:



Ретинол

Нерастворим в воде, хорошо растворяется в жирах и органических растворителях.

При недостатке витамина А синтез зрительного пурпура задерживается, сетчатка плохо воспринимает световые раздражения – наступает гемералопия («куриная слепота»). Витамин А необходим для поддержания нормального состояния эпителия. При авитаминозе А поражаются все виды эпителиальных клеток: эпителий роговой оболочки глаз (ксерофтальмия и кератомалация), кожи (сухость, кератозы), дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и др. Богаты витамином А сливочное масло, яичный желток, печень, жир из печени некоторых морских рыб, например, трески (тресковый или рыбий жир). В растениях находятся окрашенные в желтый или оранжевый цвет пигменты – каротины, которые могут в животном организме превращаться в витамин А. Провитамины витамина А – каротины – являются продуктами растительного происхождения.

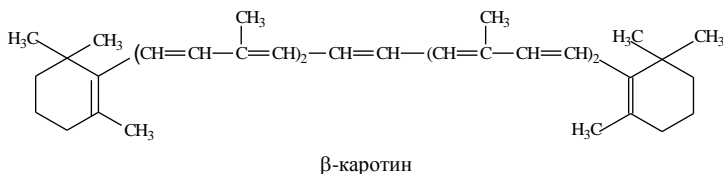
1. Реакция с сульфатом железа (II). К 2–3 каплям рыбьего жира или раствора витамина А в масле добавляют 10–15 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 2–4 капли концентрированной серной кислоты. Реакцию проводят в сухой пробирке. После перемешивания содержимого появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

2. Реакция с раствором хлорида железа (III). В раствор рыбьего жира или витамина А в масле добавляют 5 капель 1%-ного раствора хлорного железа. Появляется ярко-зеленый цвет.

3. Открытие витамина А в рыбьем жире с концентрированной серной кислотой. В сухой пробирке 1–2 капли рыбьего жира или рас-

творы витамина А в масле растворяют в 10 каплях хлороформа и прибавляют 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое или фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в бурокрасное. Реакция неспецифична. Химизм реакции окончательно не выяснен.

4. Открытие каротина в шиповнике и обнаружение в нем ненасыщенных связей. Каротин открывается по появлению окраски при взаимодействии с треххлористой сурьмой или концентрированной серной кислотой. Наличие в его молекуле ненасыщенных связей можно обнаружить по обесцвечиванию бромной воды, т. е. по способности каротина как соединения, имеющего двойные связи, присоединять бром по месту их разрыва:



Одну-две сухие ягоды шиповника растирают в ступке, затем добавляют 2–3 мл хлороформа и растирание продолжают еще 1 минуту.

Содержимое ступки фильтруют через заранее приготовленный фильтр в сухую пробирку. Фильтрат окрашен каротинами в оранжевый цвет.

В сухой пробирке к нескольким каплям хлороформной вытяжки, содержащей каротин, добавляют около 20 капель насыщенного раствора хлорида сурьмы (III) в хлороформе. Появляется голубая окраска, которая даже при длительном стоянии не переходит в розово-фиолетовую.

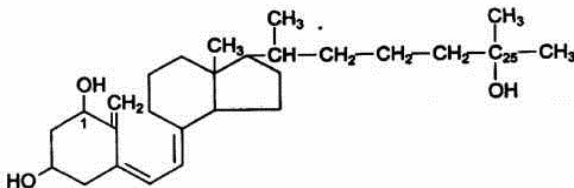
В сухую пробирку вносят несколько капель хлороформной вытяжки и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется синяя окраска, переходящая в зеленую.

К нескольким каплям хлороформной вытяжки добавляют 1–2 капли бромной воды и встряхивают. Бромная вода обесцвечивается. В ходе реакции происходит не только обесцвечивание брома, но и обесцвечивание самого каротина. Избыток бромной воды добавлять не следует, так как он вызывает окрашивание хлороформного слоя.

Витамин D

Витамин D – группа соединений, принимающих участие в регуляции фосфорно-кальциевого обмена и процесса образования костей. Нерастворим в воде, растворяется в жирах и органических растворителях. Этот витамин можно рассматривать как производное циклических спиртов – эргостерола и 7-дегидростерола, являющихся его провитаминами. Превращение названных провитаминов в витамин D происходит под действием ультрафиолетовых лучей.

Известно несколько витаминов группы D (кальциферолы). Они образуются из провитаминов путем воздействия ультрафиолетового света. Провитаминами являются стерины, у которых в кольце В имеются две двойные связи:



Естественным витамином, находящимся в тканях животного и человека, а также в рыбьем жире, является витамин D₃ (холекальциферол), который образуется из 7-дегидрохолестерина в коже под влиянием ультрафиолетовых солнечных лучей. Витамин D₂ (эргокальциферол) представляет собой искусственный продукт, полученный при ультрафиолетовом облучении эргостерина, содержащегося в растениях, и применяется для лечебных целей и витаминизации кормов. Он путем стимуляции синтеза белка, связывающего кальций, увеличивает активное всасывание кальция и фосфатов в кишечнике. Кроме того, 1,25-(ОН)₂D₃ влияет на обмен кальция и фосфатов в костях и их реабсорбцию в почечных канальцах. Основные проявления недостаточности этого витамина касаются костной системы. Недостаток витамина D приводит к возникновению рахита. Это приводит к деминерализации костей, их размягчению и искривлению. Богаты витамином D печеночный жир морских рыб, сливочное масло, желтки яиц.

1. Реакция с анилином. В сухой пробирке смешивают 4 капли рыбьего жира или раствора витамина D в масле с 10 каплями хлороформа, добавляют при помешивании 10 капель смеси анилина с концентриро-

ванной соляной кислотой. Пробирку ставят на кипящую водяную баню на 30–60 секунд. При нагревании содержимое пробирки приобретает красную окраску.

2. Бромхлороформная проба. На часовое стекло наносят 3 капли рыбьего жира (раствора витамина D в масле) и прибавляют 3–5 капель раствора брома в хлороформе. Смесь в пробирке постепенно окрашивается в зелено-голубой цвет. Под часовое стекло следует предварительно подложить лист белой бумаги.

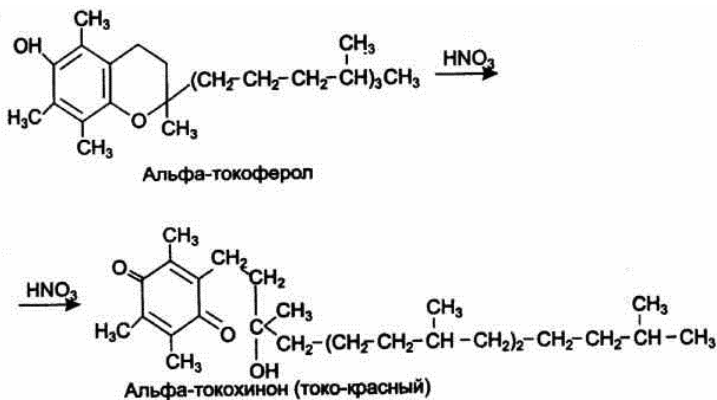
3. Реакция с хлоридом сурьмы (V). В пробирку вносят 2 мл раствора витамина D в хлороформе, доливают 0,2 мл насыщенного раствора пятихлористой сурьмы ($SbCl_5$) и при наличии витамина наблюдают появление желтого окрашивания.

Витамин E (токоферолы)

Под общим названием витамина E известен ряд веществ, обладающих витаминными свойствами и являющихся производными хромана. Самым активным из них является α -токоферол, выделяемый из масла пшеничных зародышей. Токоферолы в чистом виде представляют собой светло-желтое вязкое жидкое масло, нерастворимы в воде, но растворимы в жирах и жирорастворителях. Они устойчивы к воздействию кислот к нагреванию (до $170\text{ }^\circ\text{C}$). Витамин E необходим для процессов размножения. При отсутствии этого витамина в пище крыс у животных развивается бесплодие. Наиболее богаты витамином E масла из зародышей пшеницы, семян яблок, шиповника, облепихи, кукурузы, сои. Он содержится в семенах злаков, мясе, жире, печени, яичном желтке, масле, молоке. Для усвоения организмом витамина E необходимо наличие желчи в кишечном содержимом.

Витамин E обладает противоокислительным действием: он тормозит окисление ненасыщенных жирных кислот и тем самым предохраняет от разрушения ненасыщенные липиды, входящие в состав таких важных клеточных структур, как митохондрии. Задерживая окисление ненасыщенных жирных кислот, витамин E уменьшает прогоркание жиров, а также окисление каротина и витамина A, находящихся вместе с ним в продуктах питания.

Витамин E окисляется при действии сильных окислителей (марганцовокислый калий, азотная кислота). Данная реакция обусловлена окислением токоферолов под влиянием концентрированной азотной кислоты в соединения, имеющие хиноидную структуру и окрашенные в красный цвет.



1. Реакция с концентрированной азотной кислотой. В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1%-ного спиртово-сахарного раствора витамина Е и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты.

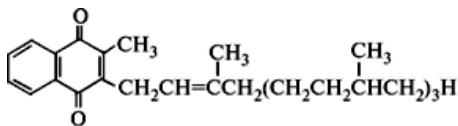
Содержимое пробирки встряхивают. Образуется эмульсия, которая постепенно окрашивается в красный цвет. Эмульсию оставляют стоять до расслоения. Окраска остается в верхнем масляном слое.

В присутствии азотной кислоты токоферол окисляется через промежуточное образование токоферолхинона до орто-, или парохинона, имеющего красное окрашивание.

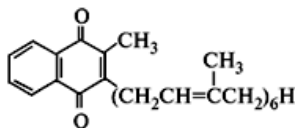
2. Реакция с хлоридом железа (III). В пробирку вносят 0,5 мл 0,1%-ного спиртового раствора витамина Е и добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора хлорида железа (III). Встряхнув содержимое пробирки, наблюдают появление красного окрашивания вследствие образования α -токо-ферилхинона.

Витамин К (филлохинон)

Витамин К₁ (филлохинон, получен из люцерны) – желтое масло, нерастворимое в воде, легко разрушаемое светом и щелочами. Устойчив к нагреванию в нейтральной среде. Витамин К₂ (фарнохинон, получен из гниющей рыбной муки) – желтый кристаллический порошок, в воде нерастворим, неустойчив к нагреванию и к ультрафиолетовым лучам. Его биологическая активность ниже витамина К₁. Оба витамина синтезированы. Витамин К является производным 2-метил-1,4-нафтохинона.



Филлохинон



Менахинон

Витамин К необходим для синтеза клетками печени ряда факторов свертывания крови. В остатки глутаминовых кислот белковых молекул этих факторов вводится еще одна карбоксильная группа. Образуются остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты, через которые происходит присоединение ионов кальция. Поэтому после введения в организм антагонистов витамина К время свертывания крови увеличивается. При авитаминозе К появляются подкожные и внутримышечные кровоизлияния, содержание протромбина в крови понижается. Наиболее богаты витамином К капуста, шпинат, плоды рябины, печень.

Источником витамина К для животных служат растительные корма и кишечная микрофлора, а также искусственно синтезированный аналог витамина К – викасол.

1. Реакция с диэтилдитиокарбоматом натрия. В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 2%-ного спиртового раствора диэтилдитиокарбомата натрия и 4 капли 4%-ного спиртового раствора NaOH. Содержимое пробирки встряхивают. Постепенно появляется красное окрашивание жидкости.

2. Реакция с анилином. В пробирку вносят 2 мл 0,05%-ного спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли анилина. Осторожно встряхивают содержимое пробирки и наблюдают красное окрашивание, что обусловлено образованием 1-метил-2-фениламинафтохинона.

3. Реакция с цистеином. На часовое стекло наносят 5 капель 0,05%-ного спиртового раствора викасола, 5 капель 0,025%-ного спиртового раствора цистеина и 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия. Наблюдают лимонно-желтое окрашивание.

1.2. Качественные реакции на водорастворимые витамины

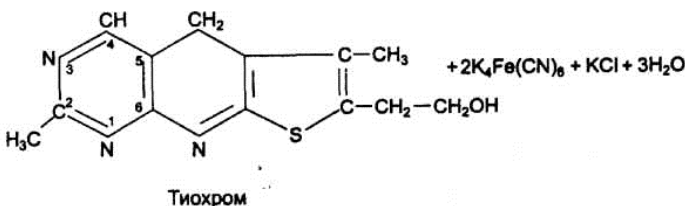
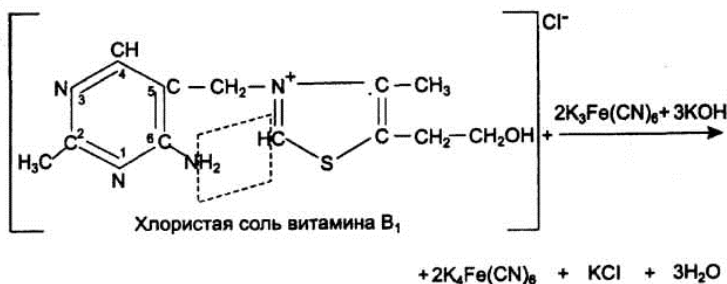
Витамин В₁ (тиамин, анейрин)

Химически чистый тиамин – бесцветный кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Тиамин устойчив в кислой среде (например, в желудке), но разрушается в щелочном растворе, поэтому

варка пищи в щелочной среде приводит к потере витамина.

Витамин В₁ представляет собой замещенный пиримидин, связанный метиленовой группой с замещенным тиазолом. В виде своего пирофосфорного эфира он в организме животных и человека, в комплексе с другими коферментами – липоевой кислотой, коэнзимом А (HS–КоА), НАД⁺, ФАД – входит в состав ферментной системы, осуществляющей окислительное декарбоксилирование α-кетокислот (пировиноградной, α-кетоглutarовой). При отсутствии или недостаточном поступлении в организм тиамина окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и последующее ее окисление нарушаются, что приводит к накоплению этой кислоты в тканях. Особенно резкие нарушения в превращениях пировиноградной кислоты наблюдаются в мозгу. Это выражается в различных расстройствах функции центральной и периферической нервной системы (невриты, параличи и др.).

1. Реакция окисления витамина В₁ в тиохром (2,7-диметилтиохромин-8-этанол). Реакция основана на способности тиамина окисляться в щелочной среде под действием красной кровяной соли в тиохром, который извлекается из раствора изобутиловым спиртом и дает в ультрафиолетовых лучах сине-голубую флуоресценцию.



Щепотку (на кончике стеклянной лопаточки) порошка тиамин растворяют в пробирке в 5–10 каплях воды. К раствору тиамин прибавляют 5 капель 5%-ного раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, 10 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и тщательно перемешивают.

Через 5–10 минут прибавляют 15 капель изобутилового спирта, интенсивно взбалтывают в течение 0,5–1 минуты и дают отстояться.

Верхний спиртовой слой при помощи капилляра или микропипетки переносят в сухую стеклянную пробирку из нефлюоресцирующего стекла и наблюдают голубую флюоресценцию этого раствора в ультрафиолетовых лучах.

2. Реакция с диазореактивом. В пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты, 1 мл 5%-ного раствора нитрита натрия (в пробирке образуется диазореактив). Затем к диазореактиву приливают 0,5 мл 5%-ного раствора тиамин и 1 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Наблюдают характерное окрашивание. Витамин B_1 в щелочной среде с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

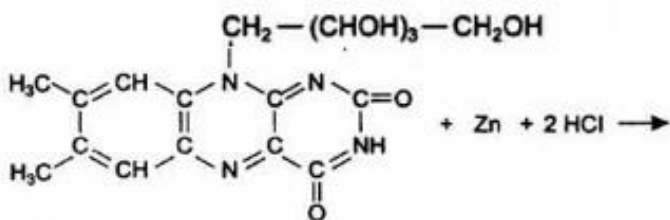
Витамин B_2 (рибофлавин)

Витамин B_2 – оранжево-желтое кристаллическое вещество, трудно растворимое в воде. Наиболее богатыми источниками этого витамина являются дрожжи, яичный желток, молоко, печень, мясо. Суточная потребность взрослого человека в витамине B_2 составляет 1,5–2,5 мг. Рибофлавин представляет собой замещенный изоаллоксазин, связанный с D-рибитолом. В виде рибофлавин-5'-фосфата он входит в состав простетической группы (ФАД) флавиновых ферментов организма животных, птиц и рыб. При недостаточности рибофлавин нарушаются окислительно-восстановительные процессы, что влечет выпадение волос, заболевание глаз, воспалительное поражение слизистых ротовой полости, а также прилежащих участков кожи и др.

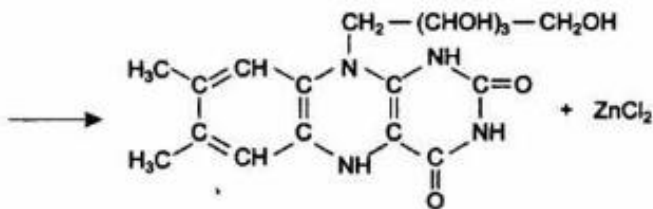
При его участии происходит перенос электронов и протонов с окисляемого субстрата на кислород в дыхательной цепи ферментов. Витамина много в отрубях, молочных продуктах, овощах.

1. Реакция восстановления витамина B_2 . Реакция основана на способности рибофлавин легко восстанавливаться и вновь окисляться. При восстановлении водород присоединяется к азоту по месту

двойных связей в изоаллоксазиновом кольце.



Рибофлавин, окисленная форма (желтого цвета)



Рибофлавин, восстановленная форма (бесцветен)

Источником водорода служит реакция взаимодействия соляной кислоты с металлическим цинком. Выделяющийся водород восстанавливает рибофлавин (раствор желтого цвета) через розовый (или красный) рибофлавин (промежуточный продукт) в бесцветное соединение – лейкофлавин.

Отмеривают в пробирку 10 капель 0,025%-ного раствора рибофлавина, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Тотчас же идет бурное выделение пузырьков водорода. Выделяющийся водород реагирует с окисленной формой В₂ желтого цвета, восстанавливая его до промежуточного родофлавина розово-красного цвета (насыщенность цвета зависит от концентрации В₂) и далее до бесцветного лейкофлавина. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

Поскольку витамин В₂ участвует в построении флавиновых ферментов, описанная реакция демонстрирует механизм действия ферментов в процессе тканевого дыхания.

Витамин В₆ (пиридоксин, адермин)

Витамин В₆ – бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде и спирте. Устойчив к нагреванию, щелочам и кислотам, разрушается на свету, особенно при действии ультрафиолетовых лучей. Хорошо сохраняется при консервировании кормов. Пиридоксин – общее название группы веществ, обладающих активностью витамина В₆, к которой принадлежат пиридоксол, пиридоксаль и пиридоксамин.



Эти соединения в организме человека легко переходят друг в друга. Пиридоксаль и пиридоксамин являются коферментами ферментов, участвующих в основном в белковом обмене, в частности, в превращениях аминокислот (в трансаминировании, декарбоксилировании и др.). Поскольку с обменом аминокислот связан синтез многих биологически важных веществ (гистамина, витамина РР и др.), недостаток в пиридоксине приводит к глубоким нарушениям биохимических процессов в организме. Наиболее богатыми источниками витамина В₆ являются зародыши пшеницы, дрожжи и печень.

1. Реакция с хлоридом железа (III). При взаимодействии витамина В₆ с хлорным железом образуется комплексное соединение типа фенолята железа, окрашенное в красный цвет. Реакция обусловлена наличием в молекуле витамина В₆ фенольного гидроксила в третьем положении пиримидинового кольца. Аналогичная реакция с такой же окраской получается при взаимодействии хлорного железа с раствором пирогаллола.

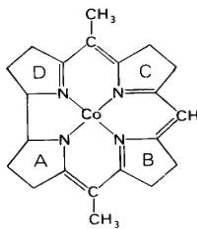
В пробирку вносят 1 мл 1%-ного хлорида железа (III) и 1 мл 1%-ного раствора витамина В₆. Смесь встряхивают. После встряхивания в присутствии витамина в смеси возникает красная окраска жидкости.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин)

Витамин В₁₂ представляет собой игольчатые кристаллы рубиново-красного цвета благодаря присутствию кобальта. Хорошо растворим в воде и спирте. Недостаток витамина В₁₂ является причиной возникновения злокачественной анемии, для которой характерны нарушение кроветворной функции костного мозга (уменьшение числа эритроцитов, появление овалоцитов, макроцитов и мегалобластов), расстройство нервной системы. Производные витамина В₁₂ выполняют роль коферментов во многих обменных процессах. Они носят название кобамидные коферменты. Ферменты, имеющие в своем составе кобамидные коферменты, участвуют в обмене метильной группы. Они, например, катализируют метилирование пиримидинового кольца при синтезе тимина.

Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата им печень рогатого скота и цыплят.

1. Открытие кобальта, содержащегося в витамине В₁₂, реакцией с тиомочевинной. Витамин В₁₂ – это единственный витамин, в молекуле которого содержится кобальт (4,5 %). Его можно обнаружить после минерализации раствора витамина и последующей обработки тиомочевинной.



Корриновое ядро кобаламина

Вскрывают ампулу с раствором витамина В₁₂ и переносят содержимое в пробирку. Добавляют 3–5 капель концентрированной серной кислоты, закрепляют пробирку в штативе в несколько наклонном положении и производят сжигание до обесцвечивания в вытяжном шкафу.

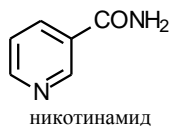
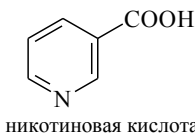
После обесцвечивания жидкости к минерализату добавляют осторожно, понемногу, перемешивая, приблизительно 1 мл воды. Наносят 2–3 капли 10%-ного раствора тиомочевинны на беззольный фильтр и

высушивают над сеткой горелки.

После высушивания наносят на фильтр 12 капель полученного минерализата и вновь нагревают фильтр над сеткой. На фильтре, чаще по краю пятна, получается зеленое окрашивание, доказывающее присутствие кобальта в молекуле витамина В₁₂.

Витамин В₅ (витамин РР, никотинамид)

Витамином РР являются никотиновая кислота и ее амид. Они обладают витаминной активностью в одинаковой мере. Никотиновая кислота представляет собой игольчатые кристаллы белого цвета, растворимые в воде и спирте. В организме из никотиновой кислоты, или никотинамида, образуются никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамид-адениндинуклеотидфосфат (НАДФ), участвующие в качестве коферментов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых дегидрогеназами. Установлено, что некоторое количество никотиновой кислоты синтезируется в организме человека и животных из триптофана при участии витамина В₆ (пиридоксина).



При отсутствии витамина РР в пище возникает пеллагра – заболевание, характеризующееся поражением кожи, расстройствами деятельности желудочно-кишечного тракта и нервной системы. Наиболее богаты витамином РР дрожжи, печень, почки.

Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок плохо растворимой медной соли.

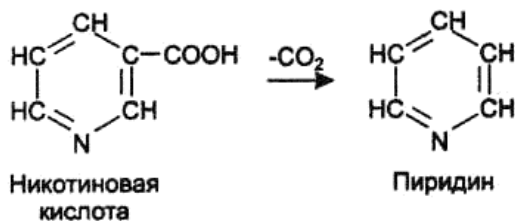
1. Качественная реакция на никотиновую кислоту с уксуснокислой медью. Реакция основана на том, что никотиновая кислота, имея в своей молекуле карбоксильную группу, образует соли. Медная соль никотиновой кислоты является труднорастворимым веществом голубого или синего цвета. Свинцовая соль имеет белый цвет.

5–10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10–20 каплях 10%-ного раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоя-

нии выпадает осадок синего цвета медной соли никотиновой кислоты.

2. Качественная реакция на V_5 . В пробирку вносят 1 мл раствора никотинамида и 1 мл 1%-ного сульфата меди, затем по каплям прибавляют 5%-ный раствор родонида аммония. В присутствии витамина наблюдают зеленое окрашивание.

3. Обнаружение пиридинового кольца в молекуле витамина РР. Никотиновая кислота является производным пиридина. Реакция основана на разрушении никотиновой кислоты при нагревании ее с содой с образованием свободного пиридина, имеющего своеобразный запах.



В пробирку помещают немного соды в порошок (на кончике стеклянной лопаточки) и добавляют равное количество никотиновой кислоты. Нагревают смесь в пламени горелки в вытяжном шкафу при включенной тяге. Устанавливают выделение пиридина по появлению характерного запаха.

Витамин Р (рутин)

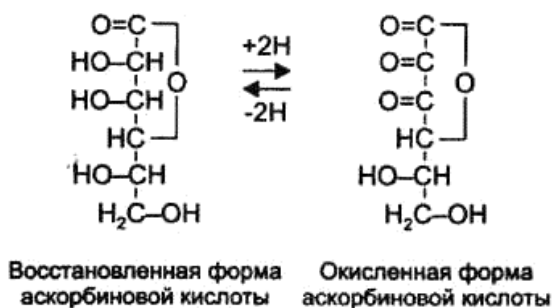
Рутин в организме отвечает за нормальное функционирование стенок сосудов, предохраняет адреналин от окисления, обладает антиоксидантным действием по отношению к витамину С и усиливает его антигиалуронатлиазную функцию. Витамина Р много в растительных кормах.

1. Качественная реакция на рутин. В пробирку вносят 1 мл насыщенного водного раствора рутина и прибавляют несколько капель 1%-ного раствора хлорида железа (III). Хлорид железа образует с рутином комплексное соединение по типу фенолята железа зеленого цвета. К раствору рутина можно прилить осторожно по стенке концентрированную серную кислоту. На границе двух жидкостей наблюдают окрашенное в желтый цвет кольцо.

Витамин С (аскорбиновая кислота)

Витамин С – кристаллы кислого вкуса, растворимые в воде. Не имея

свободной карбоксильной группы, витамин С тем не менее обладает кислыми свойствами вследствие диссоциации одного из енольных гидроксильных групп и способности его реагировать с катионами металлов, образуя соли (аскорбинаты). В кристаллическом виде аскорбиновая кислота устойчива, но легко разрушается в водных растворах. В основе качественных реакций и количественных методов определения аскорбиновой кислоты лежит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую, а другое вещество (например, 2,6-дихлорфенолиндофенол) восстанавливается. Аскорбиновая кислота в организме способствует некоторым окислительным процессам, например, образованию стероидных гормонов в коре надпочечников, необходима для превращения фолиевой кислоты в фолиновую и параоксифенилпировиноградной кислоты в гомогентизиновую (при обмене тирозина), играет роль в образовании дезоксирибонуклеиновой кислоты и коллагена. Она предохраняет от окисления адреналин, тормозит действие фермента гиалуронидазы. При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости, особенно зубы, что связано с дегенеративным превращением специализированных клеток (одонтобластов и остеобластов) в соединительнотканые.



Богаты витамином С лимоны, черная смородина, шиповник, хвоя, из животных продуктов – печень.

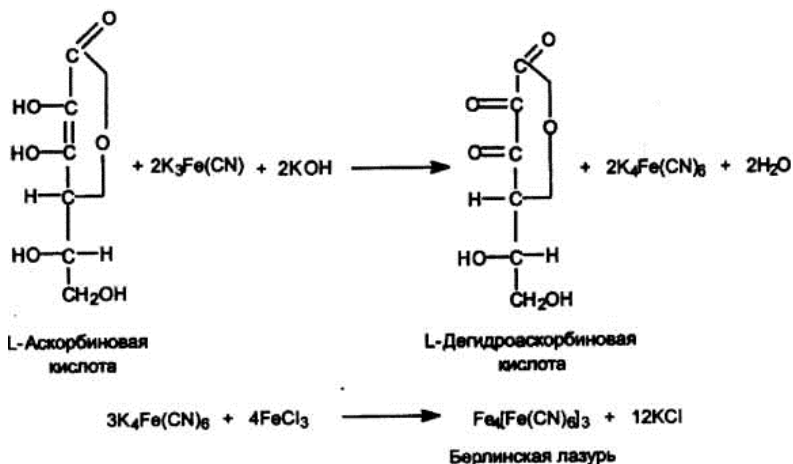
Человек, приматы и морские свинки не способны синтезировать аскорбиновую кислоту и должны получать ее с пищей. Большинство других видов животных и, вероятно, все растения могут синтезировать

это соединение из глюкозы. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней.

Определение витамина С основано на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, восстанавливать, например, метиленовую синь, 2,6-дихлорофенолиндофенол натрия (краску Тильманса), гексациано-(III)-феррат калия, нитрат серебра, йод и др.

1. Реакция на витамин С с гексациано-(III)-ферратом калия.

Реакция основана на том, что аскорбиновая кислота, окисляясь в дегидроаскорбиновую в щелочной среде, может восстанавливать железосинеродистый калий до железистосинеродистого, последний, взаимодействуя с хлоридом железа (III), образует берлинскую лазурь.



В пробирку отмеривают 10 капель вытяжки из шиповника, добавляют 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия, 2 капли 5%-ного раствора гексациано-(III)-феррата калия и перемешивают.

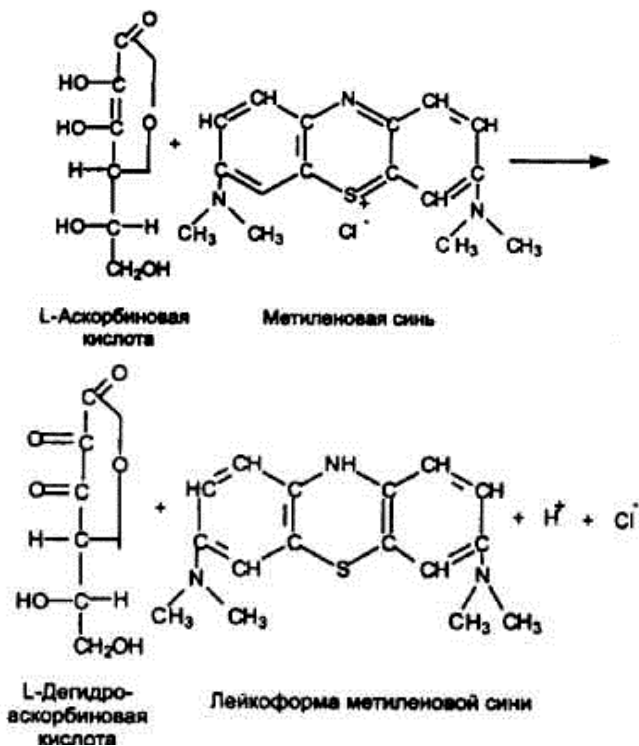
К содержимому пробирки добавляют 6 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 2 капли 1%-ного раствора хлорида железа (III). Выпадает синий осадок берлинской лазури, свидетельствующий о присутствии аскорбиновой кислоты в вытяжке из шиповника.

Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Появляется бурое окрашивание

жидкости, обусловленное образованием железосинеродистой соли окиси железа.

2. Качественная реакция на витамин С с метиленовой синью.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением метиленовой сини в бесцветную лейкоформу:

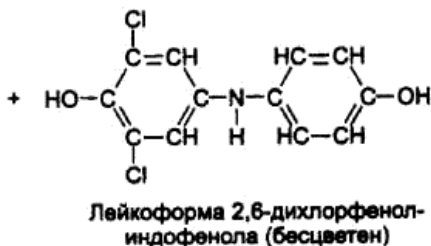
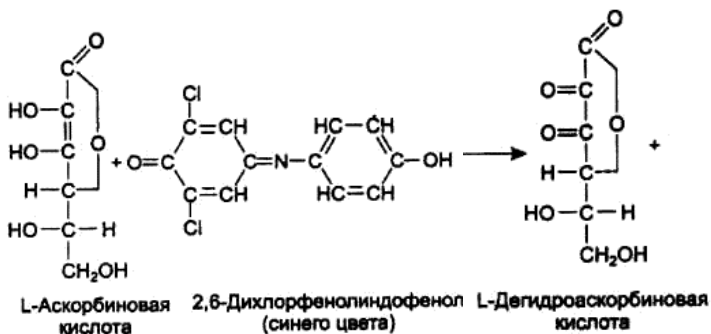


В пробирку наливают 2 капли 10%-ного раствора метиленовой сини, 2 капли 10%-ного раствора соды, 10 капель вытяжки из шиповника и нагревают. Жидкость обесцвечивается.

Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Обесцвечивания жидкости не происходит.

3. Качественная реакция на витамин С с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. За счет окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорби-

новую происходит восстановление индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в лейкосоединение:



В две пробирки наливают по 10 капель 0,02%-ного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

В одну из пробирок добавляют 10 капель вытяжки из шиповника, в другую 10 капель воды. Жидкость в пробирке с вытяжкой шиповника обесцвечивается.

Оформить полученные данные по предложенной схеме и сделать вывод. Занести результаты всех реакций на витамины в таблицу.

№ п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Реактив	Признаки обнаружения витамина	На чем основана реакция

Лабораторная работа 2. Количественное определение витамина С по Тильмансу

Витамин С (аскорбиновая кислота, аскорбутиновый) широко распространен в природе. Он является кофактором гидроксилирования пролина при синтезе коллагена, превращений кортикостероидных гормонов и трансферрина. Обладает антиоксидантным, антимуtagenным и антиконцерогенным действием. Предохраняет от окисления адреналин и сульфгидрильные группы белков. Витамина С много в зеленых частях растений, меньше в корнеплодах и практически нет в семенах. Аскорбиновая кислота активно синтезируется большинством животных в печени из глюкозы, а также микрофлорой ЖКТ. При заболеваниях, стрессовых ситуациях, повышенных физических нагрузках организм испытывает недостаток витамина С и его необходимо вводить в рацион. В норме в крови сельскохозяйственных животных содержится 0,2–1,5 мг% аскорбиновой кислоты (или 0,011–0,086 ммоль/л).

Материалы и оборудование. Соляная кислота, 2%-ный раствор; натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,0005 моль/л раствор ($M = 270$, г/экв – 145); 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,125 ммоль/л свежеприготовленный раствор; трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор; дистиллированная вода; соляная кислота, 10%-ный раствор; капуста, картофель, лук, хвоя, силос, сенаж и т. д. Фарфоровая ступка с пестиком, песок кварцевый, коническая колба, стаканчик, воронка, микробюретка, пипетка, фильтры, весы, центрифуга, центрифужные пробирки.

Порядок выполнения работы. Взвешивают 1 г продукта (навеску можно брать в зависимости от содержания витамина С от 0,1 до 3 г). Тщательно растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка. К растертой массе прибавляют 9 мл 0,2%-ного раствора HCl. Количество соляной кислоты зависит от количества взятого продукта. При этом общий объем навески (продукт + HCl) должен составлять 10 мл. Соляную кислоту можно приливать к растираемой массе порциями, оставив часть для смыва ступки. Через пять минут содержимое перемешивают и фильтруют. Отбирают 3 мл фильтрата в коническую колбу и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с, 1 мл 0,0005 моль/л

раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

Концентрацию аскорбиновой кислоты определяют по формуле

$$C = \frac{Q \cdot A \cdot V_0 \cdot 100}{V_1 \cdot a},$$

где Q – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,0005 моль/л раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,088 мг);

A – количество 0,0005 моль/л раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл;

V_0 – общее количество экстракта, мл;

V_1 – объем экстракта, взятый для титрования, мл;

a – навеска пищевого продукта, г;

100 – пересчет в %.

Для выражения в единицах СИ концентрацию витамина в мг% умножают на коэффициент 56,776 (мкмоль).

Результаты опытов оформить в виде таблицы.

Концентрация витамина

Материал	Навеска, г	Концентрация витамина С, мг%	Справочные данные, мг% на 100 г продукта

Лабораторная работа 3.

Определение витамина С йодометрическим методом

Сущность метода заключается в изменении окраски йода при добавлении гипоиодита калия в зависимости от содержания витамина С (аскорбиновой кислоты). Метод предназначен для анализа содержания витамина С в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения в сильно окрашенных растворах.

Материалы и оборудование. Картофель, капуста, лимоны, морковь, яблоки; 1%-ный раствор соляной кислоты, 2%-ный раствор метафосфорной кислоты, кристаллики KI, 1%-ный раствор крахмала, 0,001 н раствор гипоиодита калия, 2%-ный раствор фосфорной кислоты; 0,01 н раствор соли Мора; 0,01 н раствор $KMnO_4$, 0,01 н раствор $H_2C_2O_4$; гомогенизатор, мерная колба вместимостью 100 мл, шейкер, фильтровальная бумага, конические колбы вместимостью 100 мл, микробюретки.

Порядок выполнения работы. 10 г измельченной навески (картофеля или капусты) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливают 20 мл 1%-ного раствора соляной кислоты, смесь встряхивают, доводят объем до метки 2%-ным раствором метафосфорной кислоты, выдерживают в течение 10 мин для более полного растворения витамина С. Содержимое колбы фильтруют через бумагу.

По 10 мл фильтрата отбирают в 3 конические колбы вместимостью 100 мл. В две колбы добавляют по кристаллику KI и 3 капли 1%-ного раствора крахмала, полученные растворы титруют 0,001 н раствором гипоиодита калия из микробюретки. Даже в интенсивно-розовых растворах заметна фиолетовая окраска, появляющаяся от добавления 1 капли титранта. Для сравнения окраски третья колба должна стоять рядом.

Параллельно проводят титрование 10 мл 2%-ного раствора H_3PO_4 (контрольное титрование).

Расчет. Содержание витамина С (X , мг/100 г продукта) вычисляют по формуле

$$X = V_1 \cdot V_2 \cdot K \cdot 0,088 \cdot 100 / (V_3 \cdot g),$$

где V_1 – объем раствора 0,001 н раствора гипоиодита калия, израсходованного на титрование за вычетом поправки на контрольное титрование, мл;

V_2 – объем испытуемой пробы, мл;

g – навеска образца, взятого для анализа, г;

V_3 – объем анализируемого раствора, взятого на титрование, мл;

0,088 – количество аскорбиновой кислоты, точно соответствующей 1 мл 0,001 н раствора гипоиодита калия;

K – поправка на титрование раствора.

Поправочный коэффициент устанавливают по 0,01 н раствору соли Мора. Титр соли Мора определяют по 0,01 н KMnO_4 , а титр раствора перманганата по 0,01 н раствору $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Для этого 1 мл концентрированной серной кислоты добавляют к 10 мл 0,01 н раствора $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Смесь нагревают до 80 °С и титруют до слабо-розового окрашивания 0,01 н раствором KMnO_4 (расход раствора B , мл). Затем титруют соль Мора, для этого к 10 мл раствора соли Мора добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и титруют 0,01 н KMnO_4 (расход раствора V_1 , мл) до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Далее титруют 0,001 н раствор гипоиодита калия. Для этого к 10 мл добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата натрия и титруют из микробюретки раствором соли Мора до перехода окраски в соломенно-

желтую (расход раствора V_2 , мл). Поправку K рассчитывают по формуле

$$K = V_1 \cdot V_2 / B.$$

Результаты определений рассчитывают до второй значащей цифры и округляют до первого знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 25 %.

Лабораторная работа 4. **Определение содержания витамина С в молоке**

Материалы и оборудование. Вода дистиллированная; молоко свежее; 2%-ный раствор с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты; насыщенный раствор щавелевой кислоты; насыщенный раствор хлорида натрия; свежеприготовленный стандартный раствор аскорбиновой кислоты (в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 100 мг аскорбиновой кислоты квалификации «медицинская» и, растворяя, объем доводят до метки раствором с массовой долей метафосфорной или соляной кислоты 2%-ной); индофеноловый реактив – 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,0005 моль/л раствор (в мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 140–150 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия и 200–300 мл воды, энергично встряхивают до растворения краски, объем доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в сухую склянку из темного стекла, раствор хранят в холодильнике не более трех суток).

Порядок выполнения работы. Для определения аскорбиновой кислоты в молоке предварительно осаждают белки.

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

Параллельно проводят контрольное определение, для чего в колбочке смешивают 50 мл воды, 4 мл насыщенного раствора щавелевой

кислоты и 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Далее поступают как в основном опыте.

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

$$X = \frac{(a - b) \cdot 64 \cdot M \cdot 100}{V \cdot V_1},$$

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

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

M – масса аскорбиновой кислоты, соответствующая 1 мл индофенолового реактива – 0,088, мг; (1 мл 0,0005 моль/л раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг кислоты);

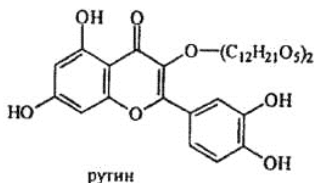
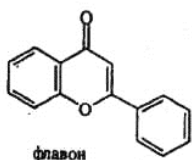
V – объем фильтрата, взятого для титрования, мл;

V_1 – объем молока, взятого для анализа, мл.

Лабораторная работа 5.

Количественное определение витамина Р (рутина)

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью. В основе их лежит скелет флавона.



Наиболее изучены строение и свойства рутина.

Рутин – кристаллическое вещество желто-оранжевой окраски. Содержится во всех продуктах, в которых обнаруживается витамин С. Рутин участвует в окислительно-восстановительных процессах. Его присутствие усиливает окислительно-восстановительный эффект витамина С.

Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяют индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после

полного окисления всего рутина. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,05 н раствора перманганата калия окисляет 3,2 мкг (0,00506 мкмоль) рутина. В черном чае содержится 300–500 мг/кг (474–790 мкмоль/кг) рутина.

Материалы и оборудование. 0,05 н раствор KMnO_4 , черный или зеленый чай, дистиллированная вода, индигокармин, конические колбы, пипетки.

Порядок выполнения работы. К 0,1 г черного или зеленого чая приливают по 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. Отмеривают в конические колбочки по 10 мл экстракта, добавляют по 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина. Титруют раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски. Расчеты производят по формуле

$$X = 3,2 \cdot (0,00506) \cdot V \cdot 50 \cdot 1000 / 10 \cdot 0,1 \text{ (мкг(мкмоль)/кг)},$$

где 3,2 (0,00506) – количество рутина (мкг, мкмоль), соответствующее 1 мл 0,05 н раствора перманганата калия;

V – количество 0,05 н раствора перманганата калия, израсходованное на титрование, мл;

10 – количество вытяжки, взятое для титрования, мл;

50 – общий объем экстракта;

0,1 – масса сухого вещества, г;

1000 – коэффициент пересчета на 1 кг сухого вещества.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Общая характеристика витаминов. Классификация и номенклатура витаминов. Понятие о провитаминах, антивитаминах, авитаминозах, гиповитаминозах, гипервитаминозах.

2. Охарактеризовать по схеме: номенклатура, химическое строение, физические свойства, биологическая роль, патобиохимия витамина, основные источники:

а) жирорастворимые витамины: А, D, Е, К, Q, F;

б) водорастворимые витамины: B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_c , B_{12} , Н, Р, U, С.

3. Витаминоподобные вещества: парааминобензойная кислота, B_{15} , инозин, холин, липовая кислота, их участие в обмене веществ.

4. Патологические изменения, возникающие при недостатке, отсутствии или избытке витаминов в организме животных, птиц и рыб. Потребность и источники витаминов.

5. Составной частью каких ферментов являются витамины В₁, В₂, В₃, РР, В₆?

6. Какие витамины входят в состав коферментов общего пути катаболизма?

7. Какие витамины, исходя из их роли в метаболизме, следует включить в поливитаминный препарат прежде всего?

8. Какие витамины преимущественно участвуют в процессах катаболизма и освобождения энергии?

9. Какие витамины преимущественно участвуют в процессах биосинтеза?

10. Какие витамины участвуют в процессах карбоксилирования и декарбоксилирования?

11. Какие витамины участвуют в процессах аминирования и дезаминирования?

12. Качественные реакции на витамин А и витамин D.

Тесты для самоконтроля

1. Какой витамин необходим для нормального зрительного акта:

- а) витамин А;
- б) токоферол;
- в) рибофлавин;
- г) биотин?

2. Какой из перечисленных витаминов является одним из самых сильных природных антиоксидантов:

- а) викасол;
- б) витамин D;
- в) витамин А;
- г) витамин Е;
- д) витамин С?

3. Какой витамин обладает антиксерофтальмическим действием:

- а) витамин D;
- б) витамин К;
- в) витамин А;
- г) витамин Р;
- д) витамин С?

4. Какой витамин является составной частью кофермента, способного присоединять и отдавать водород по изоаллоксазиновому кольцу:

- а) витамин РР;

- б) рибофлавин;
- в) пиридоксамин;
- г) аскорбиновая кислота;
- д) карнитин?

5. Какой витамин принимает участие в реакциях карбоксилирования:

- а) тиамин;
- б) рибофлавин;
- в) биотин;
- г) пантотеновая кислота;
- д) фолиевая кислота?

6. Какой витамин синтезируется в живом организме из триптофана:

- а) никотиновая кислота;
- б) рибофлавин;
- в) пантотеновая кислота;
- г) викасол;
- д) токоферол?

7. Какой витамин входит в состав кофермента, участвующего в реакциях трансминирования и декарбоксилирования аминокислот:

- а) убихинон;
- б) витамин В₆;
- в) витамин В₂;
- г) витамин РР;
- д) витамин Р?

8. Какой витамин является составной частью кофермента А:

- а) парааминобензойная кислота;
- б) пиридоксин;
- в) карнитин;
- г) оротовая кислота;
- д) пантотеноваф кислота?

9. Какой витамин оказывает влияние на проницаемость капилляров:

- а) никотинамид;
- б) рибофлавин;
- в) пиридоксин;
- г) рутин;
- д) пангамовая кислота?

10. Какой витамин участвует в переносе электронов и протонов при окислительном фосфорилировании:

- а) витамин Е;
- б) витамин К;
- в) витамин В₁;
- г) пантотеновая кислота;
- д) пангамовая кислота?

11. Отсутствие какого витамина вызывает заболевание роговицы глаза:

- а) витамина С;
- б) витамина В₁;
- в) витамина А;
- г) витамина D;
- д) витамина Е?

Тема 2. ФЕРМЕНТЫ

Цель. Изучить строение, механизм действия, свойства ферментов. Ознакомиться с методами исследования ферментов и применением этих методов в животноводстве и промышленном рыбоводстве.

Ферменты (энзимы) – это белки, синтезируемые клетками живых организмов и выполняющие специфичные функции катализаторов биохимических реакций. Изменяя количество или активность ферментов в клетке можно регулировать обменные процессы в организме.

По строению ферменты, как все другие белки, бывают простые (однокомпонентные) – протеины и сложные (двухкомпонентные) – протеиды. При биосинтезе двухкомпонентных ферментов в качестве небелковой части организм может использовать витамины, ионы металлов, органические кислоты, фосфорные эфиры сахаров, нуклеотиды и т. д.

В зависимости от того, какие типы химических реакций катализируют ферменты, их делят на шесть классов:

- 1) оксидоредуктазы – катализируют биологические ОВР;
- 2) трансферазы – осуществляют перенос атомных группировок от одного соединения к другому;
- 3) гидролазы – осуществляют разрыв связей с участием воды;
- 4) лиазы – катализируют негидролитический разрыв связей с образованием двойных связей или присоединение по двойным связям;

- 5) изомеразы – катализируют реакции изомеризации веществ;
6) лигазы (синтегазы) – ускоряют реакции синтеза и требуют присутствия макроэргических соединений.

Название ферментов производят от названия вещества (субстрата), на которое действует фермент или от типа химической реакции, которую он катализирует с добавлением окончания – «аза».

Ферменты – это белки, обладающие каталитической активностью. В клетках и жидкостях организма они выполняют роль биологических катализаторов, осуществляя свое действие путем снижения энергии активации. Ферменты, выступая в роли биокатализаторов, не смещают положения равновесия реакции, а ускоряют его достижения, сами при этом выходят из реакции в неизменном виде, поэтому могут использоваться организмом многократно. Для ферментативных реакций характерен почти 100 % выход продуктов без наблюдаемых побочных явлений. Ферментативная реакция протекает по следующей схеме:



Фермент (E) вступает во взаимодействие с субстратом (S) и образует с ним переходный фермент – субстратный комплекс (ES). Молекула субстрата в таком комплексе обладает более высоким запасом энергии или активируется. Индуцируется напряжение разрываемых связей, они становятся менее стабильными, и происходит отделение конечных продуктов. В реальных ферментативных реакциях переходных фермент-субстратных комплексов может быть несколько. Обнаружить фермент в биологическом материале можно по исчезновению субстрата (S) или по появлению продукта реакции (P) в реакционной смеси.

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. Веще-

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

Лабораторная работа 6. **Обнаружение ферментов в биологическом материале**

Материалы и оборудование. Сахароза, 5%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; реактив Фелинга; фенолфталеин, 5%-ный раствор; препарат уреазы или кристаллическая уреазы, 0,01%-ный раствор; пероксид водорода, 1%-ный; бензидин, 0,5%-ный раствор; пероксид водорода, 3%-ный раствор; пирогаллол, 2%-ный раствор; крахмал, 1%-ный раствор; 0,1%-ный спиртовой раствор; фенолфталеин; гидроксид калия, 0,05 моль/л раствор; соляная кислота, 0,1%-ный раствор; йод, 0,1%-ный раствор в 0,2%-ном растворе йодида калия; крахмал, 1%-ный раствор, содержащий 0,3%-ный хлорид натрия; раствор Люголя (0,3 г кристаллического йода и 3 г йодида калия растворяют в 5 мл воды и после полного растворения йода объем доводят до 100 мл водой); слюна в разведении 1:9; водная вытяжка корня хрена; растительное масло; размолотый солод; NaOH, 10%-ный раствор; препарат липазы; пробирки; штативы; пипетки градуированные на 1–2 мл; ступки; колбочки; шуттель-аппарат; термостат.

1. Получение амилазы слюны и определение ее активности. Амилазы – ферменты, ускоряющие реакцию гидролиза крахмала. Они содержатся в тканях животных и растений, микроорганизмах, слюне, молоке, крови и других жидкостях организма. Высокой амилазной активностью обладают слюна и солод. Слюна и другие пищеварительные соки животных и рыб являются концентрированными растворами ферментов. В слюне содержится α -амилаза – фермент, гидролизующий крахмал.

Хорошо прополоскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой, набрать в рот 2–3 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1%-ного и держать 4–5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения ее активности из полученного раствора отливают около 1 мл во 2-ю чистую пробирку и приливают двойной объем 1%-ного раствора крахмала и содержимое перемешивают путем плавного одноразового переворачивания про-

бирки, закрыв ее пальцем. Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37–38 °С в течение 10 мин.

По истечении указанного времени наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом: в пробирку вносят 1–2 капли раствора Люголя (по 1-й капли на 1 мл содержимого) и встряхивают. По окраске, появившейся в пробирке, можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента. В табл. 2 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица 2. Продукты гидролиза крахмала

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

По результатам реакции сделать вывод о глубине гидролиза и активности ферментов.

2. Выделение амилаз из солода. Пророщенные зерна ячменя, пшеницы и других злаковых растений обладают высокой амилазной активностью. Амилазы (3.3.1) – ферменты, катализирующие гидролиз крахмала и родственных полисахаридов, относятся к классу гидролаз (3), подклассу гликозидаз (3.2), подподклассу D-гликозидаз (3.2.1). Амилазы гидролизуют как неизмененные крахмальные зерна, так и оклейстеризованный крахмал. Причем действие амилаз на оклейстеризованный крахмал значительно эффективнее, чем на неизмененные зерна, поэтому в спиртовой промышленности перед осахариванием крахмала солодом производят заваривание муки или картофеля.

По свойствам, распространению в природе и способу действия на крахмал различают: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу и амилопектин-1,6-глюканогидролазу.

α -Амилаза (КФ 3.2.1.1) – систематическое название 1,4- α -D-глюканглюканогидролаза, старые названия – диастаза, птиалин, гликогеназа, декстриногенамилаза. Этот фермент содержится в слюне, соке поджелудочной железы, плесневых грибах, проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя. Обнаружена активность α -амилазы в непроросших семенах ржи и сорго. α -Амилаза катализирует без определенного по-

рядка гидролиз внутренних 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три и более остатков α -D-глюкозы. При действии α -амилазы на крахмал образуются главным образом декстрины небольшой молекулярной массы и незначительное количество мальтозы. α -Амилаза чувствительна к подкислению (оптимум pH 5,6-6,3), но термостабильна (температурный оптимум – 65 °C). При высокой α -амилазной активности пшеничной муки, полученной из проросшего зерна пшеницы и ржи происходит накопление декстринов.

β -Амилаза (КФ 3.2.1.2) – систематическое название 1,4- α -D-глюкан-мальтогидролаза, старые названия – диастаза, сахарогенамилаза, гликогеназа. Этот фермент содержится в непроросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя, соевых бобах. Он катализирует гидролиз 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей. β -Амилаза расщепляет амилозу полностью до мальтозы. Амилопектин она гидролизует с образованием мальтозы и декстринов, дающих коричнево-красное окрашивание с йодом (декстрины более высокой молекулярной массы по сравнению с декстринами, образующимися при действии α -амилазы). Действие β -амилазы прекращается в точках ветвления молекулы амилопектина. β -Амилаза более активна в кислой среде (оптимум pH 4,8), но термолабильна (температурный оптимум 51 °C). Этот фермент способствует накоплению мальтозы в тесте, что приводит к более интенсивному брожению.

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3), или экзо-1,4- α -D-глюкозидаза, имеет систематическое название 1,4- α -D-глюкан-глюкогидролаза. Она гидролизует крахмал с образованием преимущественно глюкозы и небольшого количества декстринов. Препараты глюкоамилазы получают из плесневых грибов. С помощью этого фермента получают из крахмала глюкозную патоку и кристаллическую глюкозу.

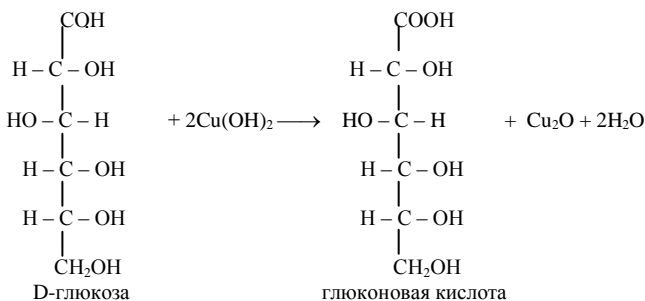
Амилопектин-1,6-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.41) подвергает гидролизу 1,6- α -гликозидные связи в амилопектине, гликогене.

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

3. Выделение сахарозы из дрожжей. Сахароза из дрожжей имеет более правильное рабочее название β -фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26), катализирует гидролиз β -гликозидных связей в молекулах как сахарозы, так и раффинозы. При этом сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу, а раффиноза – на фруктозу и мелибиозу.

В фарфоровую ступку вносят 1 г прессованных пекарских дрожжей и тщательно растирают в 3 мл воды в течение 5 мин. Затем добавляют 17 мл воды, перемешивают и ставят ступку в термостат при 37 °С на 20 мин. Через каждые 5 мин содержимое перемешивают. По истечении указанного времени смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3,5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и используют как водный экстракт сахарозы.

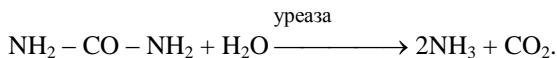
В две пробирки берут по 1 мл экстракта сахарозы. Одну пробирку нагревают до кипения, чтобы разрушить фермент. После охлаждения в обе пробирки прибавляют 2–3 мл 5%-ного раствора сахарозы и ставят в термостат на 30 мин. В пробирке должен произойти гидролиз сахарозы. Под действием сахарозы в растворе появится глюкоза и фруктоза, наличие которых открывают с помощью реакции Троммера:



Обнаружить продукты гидролиза можно с помощью реактива Фелинга. В пробирки вносят 0,5–1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и прибавляют по каплям 1%-ный раствор сульфата меди. Образующийся гидроксид меди окрашивает раствор в голубой цвет. Верхнюю часть жидкости нагревают до появления желтого, переходящего в красный цвет, осадка. Изменение цвета и появление осадка говорит об окислении глюкозы и восстановлении меди.

4. Обнаружение уреазы. Уреаза – фермент, катализирующий расщепление мочевины с образованием углекислого газа и аммиака. В

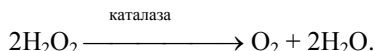
преджелудках жвачных уреазы выделяется микроорганизмами и способствует использованию мочевины, вводимой с кормами, как источника азота при синтезе микробияльного белка:



В две пробирки наливают по 1 мл 5%-ного раствора мочевины и по 5 капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина. В одну пробирку вносят 5 мл препарата уреазы или 0,01%-ный раствор кристаллической уреазы и встряхивают. В пробирке с уреазой образующийся аммиак сдвигает pH среды в щелочную сторону, и раствор окрашивается в розовый цвет. В пробирке без уреазы цвет раствора не изменяется.

Препарат уреазы готовят заранее. К 8 г соевой муки приливают 46 г воды, 2 мл 0,1 моль/л раствора HCl и несколько капель толуола, перемешивают и оставляют на 10–12 ч. Фильтрат используют как препарат уреазы.

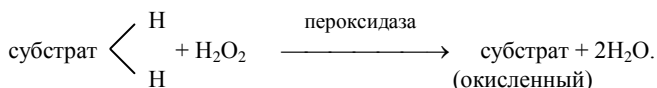
5. Обнаружение каталазы в крови. Каталаза – фермент, катализирующий окисление пероксида водорода с образованием кислорода и воды:



Фермент присутствует во многих тканях и эритроцитах крови, где обезвреживает постоянно образующийся в процессе окисления веществ пероксид водорода.

В две пробирки вносят по 10 капель 1%-ного раствора пероксида водорода. В одну из них добавляют 5 капель крови (разведение 1:500), в другую – 5 капель воды. При наличии каталазы происходит выделение пузырьков газа – кислорода.

6. Обнаружение пероксидазы. Пероксидаза – фермент, ускоряющий реакцию окисления веществ (фенолов, аминов, альдегидов и т. д.) в присутствии пероксида водорода по схеме:



Фермент содержится во многих тканях, в молоке, лейкоцитах, корне хрена. Обнаружить пероксидазу крови можно бензидином, ко-

торый в присутствии пероксидазы окисляется до соединения оранжевого цвета.

В две пробирки вносят по 1 мл 0,5%-ного раствора бензидина и по 2 мл 3%-ного раствора пероксида водорода. В одну из пробирок капают 1 каплю крови и наблюдают изменение цвета.

Пероксидазу, содержащуюся в корне хрена, можно обнаружить реакцией окисления пирогаллола. Пирогаллол в присутствии пероксидазы окисляется в пурпурогаллин – соединение красного цвета.

В две пробирки вносят по 5 мл вытяжки хрена. Вытяжку хрена готовят заранее. Измельчают 100 г хрена, заливают 100 мл 0,05%-ного раствора карбоната натрия, настаивают 4 часа, фильтрат используют как раствор пероксидазы. В обе пробирки вносят по 1 мл 3%-ного раствора пероксида водорода. В одну из пробирок вносят 2 мл 2%-ного раствора пирогаллола и наблюдают изменение окраски.

Результаты опытов по обнаружению ферментов в биоматериале перенести в таблицу.

№ опыта	Субстрат	Фермент	Второй реагент	Наблюдаемые изменения	Вывод
1					
2					
3					
4					

Лабораторная работа 7. Свойства ферментов

Материалы и оборудование. Разбавленная слюна (слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды, примерно 15–20 мл и ополаскивают рот в течении 1–2 мин собранную в стаканчик или пробирку жидкость профильтровывают и употребляют для анализа); крахмал, 1%-ный раствор; свежеприготовленный раствор йода в йодистом калии; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; серноокислая медь, 1%-ный раствор; фосфатный буфер со следующими значениями pH: 6,2; 6,8; 7,2; 8,0; штатив с пробирками, стаканчики, воронки с фильтром, пипетка, термостат или водяная баня, снабженная термометром, стеклянные палочки, капельницы.

Помимо общих свойств для ферментов характерны специфические свойства, отличающие их от небиологических (химических) катализаторов. Важнейшими из них являются: высокая специфичность дей-

ствия, термолабильность, влияние реакции среды, активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

1. Специфичность действия ферментов. Ферменты оказывают каталитическое действие на конкретное вещество (субстрат) или группу сходных веществ. Различают:

1. Абсолютную (индивидуальную) специфичность. В этом случае фермент катализирует превращение конкретного вещества и не действует ни на какие другие. Например, уреaza гидролизует мочевины.

2. Относительная (групповая) специфичность характерна для ферментов, катализирующих превращение группы сходных веществ. Например, амилаза гидролизует 1–4 гликозидгликозные связи у крахмала и гликогена, пепсин гидролизует пептидные связи любых белков, липаза гидролизует сложноэфирные связи жиров.

3. Стерическая специфичность наблюдается тогда, когда фермент катализирует превращение одного из стереоизомеров α - или β -, цис- или транс-, L- или D-изомера.

В четыре пробирки вносят по 2 мл субстрата и 2 мл ферментного препарата согласно таблице.

Препарат сахаразы готовят по схеме, изложенной в лабораторной работе 7, опыт 1.

Препарат амилазы здесь и далее готовит каждый студент индивидуально. Для этого следует 1 раз тщательно ополоснуть ротовую полость дистиллированной водой, набрать новую порцию воды и подержать ее во рту 2–3 мин, стимулируя отделение слюны, порцию выпускают в стаканчик и используют как препарат амилазы и мальтазы (при необходимости слюну, разведенную водой, можно отфильтровать).

№ пробирки	Раствор субстрата	Ферментный препарат	Наблюдаемые явления в присутствии реактива Фелинга	Выводы
1	Сахароза	Сахараза (дрожжи)		
2	Сахароза	Амилаза (слюна)		
3	Крахмал	Сахараза (дрожжи)		
4	Крахмал	Амилаза (слюна)		

Пробирки помещают в термостат на 25–30 мин при температуре 37–40 °С. Затем вынимают, добавляют по 0,5 мл реактива Фелинга и ставят на водяную баню на 5–10 мин. По окончании нагревания убеж-

даются в гидролизе субстратов в 1-й и 4-й пробирках и отсутствии гидролиза во 2-й и 3-й пробирках.

Таблицу оформить в тетради. Опыты подтвердить написанием реакций гидролиза крахмала и сахарозы.

2. Термолабильность ферментов. Каталитическая активность ферментов проявляется в условиях нормальной температуры (температура тела) и давления. Большинство ферментов проявляют высокую каталитическую активность в границах от 30 до 50 °С. Увеличение температуры до 60 °С и выше приводит к тепловой денатурации белка, следовательно ферменты, являясь белками, теряют свою активность (инактивируются). Сухие препараты ферментов способны выдерживать нагревание до 100 °С без заметной потери своей активности. Низкие температуры, как правило, вначале снижают, затем прекращают каталитическое действие ферментов, но не инактивируют их. Возвращение фермента в оптимальные температурные условия (37–40 °С) восстанавливает его активность.

Нумеруют 4 пробирки, вносят в них по 1–2 мл раствора слюны. 1-ю и 2-ю пробирки охлаждают в сосуде со снегом, криостате или холодильной камере в течение 15–20 мин. Содержимое 3-й пробирки кипятят в течение 1–2 мин. В 3-ю и 4-ю пробирки вносят по 2–3 мл 1%-ного раствора крахмала и ставят в термостат при температуре 37–40 °С на 20–30 мин.

В 1-ю и 2-ю пробирки после охлаждения тоже вносят по 2–3 мл раствора крахмала, 1-ю пробирку возвращают в холод, 2-ю ставят в термостат на 20–30 мин. По окончании времени охлаждения и термостатирования во все четыре пробирки вносят 1 мл реактива Фелинга и производят пробу на восстанавливающие сахара. При правильно выполненной работе в 1-й и 3-й пробирках реакция должна быть отрицательной, во 2-й и 4-й пробирках – положительной.

Результаты опыта и выводы оформить в виде таблицы.

№ пробирки	Раствор амилазы (слюны), мл	Субстрат (крахмал), мл	Производимые действия	Реагент на восстанавливающие сахара, мл	Выводы
1	1–2 охлаждают	2–3	Охлаждение	1	
2	1–2 охлаждают	2–3	Термостатирование	1	
3	1–2 кипятят	2–3	-«-	1	
4	1–2	2–3	-«-	1	

3. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов. Активаторы – вещества, повышающие активность ферментов или приводящие ферменты в активное состояние из неактивного. Многие ферменты синтезируются в неактивной форме в виде проферментов (зимогенов) – пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, панкреатическая липаза и т. д. и только в присутствии активаторов преобразуются в активные, способные к каталитическому действию формы. Механизм активации большинства ферментов, особенно пищеварительных, заключается в расщеплении пептидных связей и отщеплении от фермента низкомолекулярного пептида. При этом происходит открытие и формирование активного центра фермента.

Активаторами могут выступать минеральные соли, кислоты, органические вещества (желчные кислоты), специальные ферменты, ионы металлов. Иногда для активации требуется присутствие сразу нескольких активаторов.

Ингибиторы – вещества, способные снижать или полностью прекращать активность ферментов. В большинстве случаев действие ингибиторов сводится к блокированию или изменению конформации активного центра фермента. В качестве ингибиторов могут выступать яды, медпрепараты, промежуточные продукты метаболизма.

Одни и те же вещества могут выступать как ингибиторами, так и активаторами для различных ферментов.

Желчь содержит поверхностно активные соли желчных кислот, которые выступают активаторами липазы. Кроме этого, желчь способствует диспергированию жиров с образованием эмульсии, что увеличивает площадь соприкосновения субстрата (жира) и фермента (липазы) и облегчает их взаимодействие.

В две колбочки помещают по 2 мл растительного масла. В первую вносят 6 мл дистиллированной воды, во вторую – 6 мл 10%-ного раствора желчи. В обе колбочки вносят по 4 мл препарата липазы и ставят в термостат при температуре 37–40 °С на 25–30 минут. По окончании инкубирования в колбы вносят по 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,05 моль/л раствором гидроксида калия. В присутствии желчи на титрование расходуется больше раствора гидроксида калия. Объясните наблюдаемое явление и сделайте вывод.

4. Влияние реакции среды на активность амилазы. Образование фермент-субстратного комплекса в ходе ферментативной реакции зависит от степени ионизации функциональных групп активного центра

фермента и субстрата. В свою очередь степень ионизации ионогенных групп зависит от реакции среды, в которой находится фермент и субстрат. Большинство ферментов максимально активны в зоне рН, близкой к нейтральной. Значение рН, при котором скорость ферментативной реакции максимальна, называют оптимумом рН данного фермента. Например, оптимум рН для амилазы слюны лежит в пределах 6,8–7,0, пепсина – 1,5–2,5, липазы панкреатической – 7,0–8,5. Смещение рН в любую сторону от этого значения снижает активность фермента. Значение рН, соответствующее оптимальному, не всегда совпадает со значением рН, характерным для внутриклеточной среды организма и может быть одним из факторов, характеризующим и отвечающим за регулирование активности ферментов внутри клетки.

В 6 пронумерованных пробирок наливают пипеткой по 1 мл дистиллированной воды. В 1-ю пробирку вносят 1 мл 0,1%-ного раствора соляной кислоты. Перемешивают жидкость, затем переносят 1 мл полученной смеси из 1-й пробирки во 2-ю. Перемешивают содержимое 2-й пробирки и переносят 1 мл полученной смеси в 3-ю и т. д. Из 6-й пробирки 1 мл смеси выливают. В итоге получают различное разбавление соляной кислоты во всех шести пробирках.

Во все пробирки наливают по 2 мл раствора крахмала и по 1 мл слюны, разбавленной в 10 раз (условно). Затем содержимое пробирок перемешивают и ставят их в термостат при 37°. Через 30 мин пробирки вынимают из термостата, охлаждают и добавляют в каждую из них по 2–3 капли раствора йода, перемешивают содержимое и наблюдают окраску жидкости в пробирках. Выясняют, при какой концентрации кислоты начинается гидролиз крахмала. Данные опыта сводят в таблицу.

Влияние реакции среды на активность амилазы

Кислотность раствора	№ пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Концентрация раствора, %						
Концентрация раствора, г-экв.						
Концентрация ионов водорода (Сн ⁺)						
Вычисленное значение рН						
Окраска раствора с йодом						

Расчет значения рН производят по формуле $pH = -\lg C_{H^+}$.

5. Определение оптимума рН для действия амилазы. Для каждого фермента имеется определенное значение рН среды, при котором он является наиболее активным. Для того чтобы исследовать влияние ак-

тивной реакции среды на каталитическое действие фермента, нужно приготовить ряд растворов с различными значениями pH, добавить к ним субстрат, фермент и определить после инкубации, в какой среде катализ идет с наибольшей скоростью.

В 5 пробирок отмеривают по 10 капель фосфатного буфера (1/15 M со следующими значениями pH: 5,4; 6,2; 6,8; 7,2; 8,0.

Во все пробирки прибавляют по 10 капель 0,5%-ного раствора крахмала и по 1 капле разведенной водой слюны.

Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, тотчас же помещают их в термостат при 37 °C и отмечают время.

Для выявления скорости гидролиза через интервалы в 1–2 мин из всех 5 пробирок отбирают по 1 капле жидкости в другие пробирки и продельвают реакции с раствором йода в йодистом калии. Гидролиз в каждой пробирке проводят до стадии эритродекстрина, который дает красно-бурое окрашивание с йодом. Отмечают время (в минутах) появления эритродекстрина в каждой из пяти пробирок.

Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, при котором проводился гидролиз крахмала, а по оси ординат – время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина. Сделать вывод, при каком значении pH оптимум действия фермента.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Химическая природа и структура ферментов. Классификация и номенклатура ферментов.
2. Понятие о холоферментах, кофакторах, коферментах, их роль в катализе.
3. Понятие об изоферментах и мультиферментных системах, их значение для живой клетки.
4. Методы выделения и очистки ферментов. Определение ферментативной активности, единицы активности.
5. Строение активных центров. Аллостерический центр ферментов и его значение в регуляции активности ферментов.
6. Общие свойства и отличия неорганических катализаторов и ферментов.
7. Специфичность ферментов, виды, характеристика, примеры.
8. Структурная организация ферментов. Роль белковой и небелковой части сложных ферментов.

9. Функциональная организация ферментов: активный центр ферментов, строение, роль в реакциях ферментативного катализа.
10. Аллостерический центр.
11. Стадии ферментативного катализа. Механизм действия.
12. Изоферменты.
13. Зависимость активности ферментов от температуры, pH, концентрации ферментов.
14. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
15. Классификация ингибиторов ферментов.
16. Конкурентные ингибиторы, механизм действия. Конкурентные ингибиторы как лекарственные препараты.
17. Активаторы ферментов. Регуляция активности ферментов.
18. Основные свойства ферментов: высокая каталитическая активность, специфичность и обратимость действия, термолабильность, влияние реакции среды на активность ферментов.
19. Влияние температуры, концентрации веществ и pH среды на скорость ферментативной реакции.
20. Применение ферментов в ветеринарной и зоотехнической практике.

Тесты для самоконтроля

1. Какой фермент обладает абсолютной специфичностью к субстрату:

- а) химотрипсин;
- б) папаин;
- в) уреазы;
- г) аргиназы;
- д) лизоцим?

2. Какой оптимум pH имеет фермент пепсин:

- а) 1,5–2,5;
- б) 4–5;
- в) 6–7;
- г) 8–9;
- д) 10–11?

3. Какой оптимум pH имеет фермент амилаза:

- а) 1,5–2;
- б) 7–7,5;
- в) 8–9;

г) 3,5–4;

д) 4,5–5?

4. При каком рН большинство ферментов проявляют максимальную активность:

а) кислом, рН 1,5–2;

б) щелочном, рН 8–9;

в) близком к нейтральному;

д) только при рН 7?

5. Для какого класса ферментов коферментом является тиамин-пирофосфат:

а) трансфераз;

б) оксидоредуктаз;

в) гидролаз;

г) лиаз;

д) лигаз?

6. Для какого класса ферментов коферментом является CoA:

а) гидролаз;

б) трансфераз;

в) оксидоредуктаз;

г) лигаз;

д) лиаз?

7. Какие коферменты содержат витамин B_{12} :

а) пиридоксальные;

б) флавиновые;

в) кобамидные;

г) никотинамидные;

д) железопорфириновые?

8. Для какого класса ферментов коферментом является убихинон:

а) оксидоредуктаз;

б) трансфераз;

в) гидролаз;

г) изомераз;

д) лиаз?

9. При какой температуре ферменты денатурируют:

а) 0 °С;

б) 80–100 °С;

в) 20–30 °С;

г) 30–40 °С?

10. Какая температура является оптимальной для действия большинства ферментов:

- а) 50–60 °С;
- б) 15–20 °С;
- в) 80–100 °С;
- г) 35–40 °С?

11. Какие коферменты содержат витамин В₆:

- а) кобамидные;
- б) пиридоксальные;
- в) флавиновые;
- г) никотинамидные;
- д) железопорфириновые?

12. Для какого класса ферментов коферментом являются фосфаты углеводов:

- а) оксидоредуктаз;
- б) гидролаз;
- в) трансфераз;
- г) лиаз;
- д) изомераз?

13. В активации и переносе какой определенной группы принимает участие биотин:

- а) ацетильной;
- б) метильной;
- в) СО₂;
- г) фосфорильной;
- д) аденозильной?

14. Какие коферменты содержат витамин В₁:

- а) флавинадениндинуклеотид;
- б) тиаминпирофосфат;
- в) никотинамидадениндинуклеотид;
- г) пиридоксальфосфат;
- д) кобаламин?

15. Какие коферменты связаны с классом ферментов оксидоредуктаз:

- а) тиаминпирофосфат;
- б) НАД и НАДФ;
- в) ФМН и ФАД;
- г) глутатион;
- д) убихиноны?

Тема 3. ГОРМОНЫ

Цель. Изучить химическую природу гормонов, влияние на обмен веществ и изменения, вызываемые в организме при недостатке или избытке того или иного гормона.

Гормоны – биологически активные вещества, вырабатываемые эндокринными железами в ничтожно малых количествах и оказывающие регуляторное влияние на обмен веществ. Работа эндокринных желез контролируется центральной нервной системой. Механизм регуляции физиологических и биохимических процессов в организме, осуществляемый гормонами под контролем центральной нервной системы, называется нейрогуморальным. Нарушение этого механизма регуляции служит причиной серьезных заболеваний и даже гибели животных.

Гормоны обладают высокой специфичностью, их влияние на обмен веществ может проявляться различными путями. Гормоны могут изменять скорость биохимических реакций, активизируя уже имеющиеся в клетке ферменты, ускорять биосинтез ферментов, изменять проницаемость клеточных мембран.

По химической природе все гормоны делят на:

1. Гормоны белковой и пептидной природы. К этой группе относятся гормоны гипофиза, тимуса, паращитовидных желез, поджелудочной железы.

2. Гормоны – производные аминокислот. К этой группе относят йодсодержащие гормоны щитовидной железы и гормоны мозгового слоя надпочечников.

3. Стероидные гормоны. Это гормоны коры надпочечников и половые гормоны.

Недостаток или избыток синтеза гормона эндокринной железой определяется как гипо- или гиперфункция эндокринной железы и, как правило, может определяться по специфичным признакам.

Лабораторная работа 8.

Качественные реакции на гормоны

Материалы и оборудование. Штатив, пробирки, пипетки, ступка и пестик, колба с обратным холодильником, стеклянная палочка, лакмусовая бумага. Моча; сыворотка крови; гормоны стероидной природы; гормоны белковой природы и полипептидной природы (инсулин, пролактин, окситоцин, вазопрессин и т. д.); тиреоидин; высушенная ткань щитовидной железы; адреналин для инъекций, 0,1%-ный раствор; салициловая кислота, 20%-ный раствор; гидроксид натрия, 5%-ный, 10%-ный, 30%-ный растворы; сульфатамид, 1%-ный раствор; динитробензол в этаноле, 2%-ный раствор; хлорид железа (III), 1%-ный раствор; серная кислота, концентрированная и 10%-ный раствор; дихромат калия, 2,5%-ный раствор; крахмал, 1%-ный раствор; йодат калия, 2%-ный раствор.

1. Осаждение инсулина сульфосалициловой кислотой. Инсулин – гормон белковой природы. Вырабатывается клетками поджелудочной железы. Инсулин снижает содержание глюкозы в крови, усиливает образование гликогена в печени и мышцах, стимулирует процессы окислительного фосфорилирования, синтеза жирных кислот и белков.

Принцип метода основан на том, что инсулин, как белок, легко осаждается из раствора под влиянием различных веществ и в том числе органических кислот.

В пробирку наливают 1 мл раствора инсулина и добавляют 3–5 капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты и наблюдают выпадение осадка.

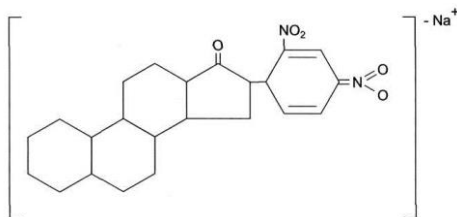
2. Биуретовая реакция с гормонами белковой и пептидной природы. Биуретовая реакция является универсальной для определения веществ белковой и пептидной природы, содержащих не менее двух пептидных связей.

Принцип метода основан на образовании окрашенного комплекса между ионами меди и пептидными связями. В пробирку вносят 3–5 капель раствора соответствующего гормона, добавляют 3–5 капель 5%-ного гидроксида натрия и 1 каплю сульфата меди. Появляется фиолетовая окраска. При избытке ионов меди наблюдается голубая окраска гидроксида меди, что снижает точность биуретовой реакции.

3. Обнаружение гормонов 17-кетостероидов. Гормоны коры надпочечников и половые гормоны, являясь 17-кетостероидами, взаимодействуя с м-динитробензолом, образуют продукт конденсации

сложного строения, имеющий вишнево-красную окраску. Насыщенность цвета зависит от концентрации гормона в биологической жидкости.

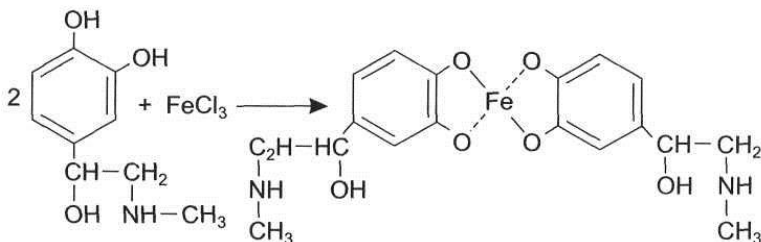
В пробирку наливают 0,5–1 мл мочи (сыворотки крови), туда же вносят 5–10 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 5 капель 2%-ного раствора м-динитробензола. Смесь перемешивают стеклянной палочкой. При наличии 17-кетостероидов через 3–5 мин наблюдают характерное окрашивание. Реакция открытия 17-кетостероидов в моче основана на способности 17-кетостероидов давать в щелочной среде с мета-динитробензолом продукт конденсации красного или красно-фиолетового цвета за счет метиленовой группы (CH₂), соседней с кетогруппой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.



4. Качественные реакции на адреналин. Адреналин синтезируется из тирозина в мозговом слое надпочечников. Адреналин усиливает работу сердца и сужает периферические сосуды, усиливает газообмен и окислительные процессы, стимулирует обмен веществ, особенно углеводный, повышая гликогенолиз, стимулирует секрецию гормонов коры надпочечников. Адреналин, окисляясь, превращается в красный пигмент адренохром и далее в продукт его полимеризации – меланин.

Реакция с хлоридом железа (III) основана на способности пирокатехинового кольца, лежащего в основе адреналина, образовывать с ионами железа окрашенные соединения по типу фенолятов.

В пробирку помещают 10 капель 0,1%-ного раствора адреналина и добавляют 1 каплю 1%-ного раствора FeCl₃. Наблюдают появление изумрудной окраски. При добавлении к раствору капли щелочи или концентрированного аммиака возникает вишнево-красное окрашивание.

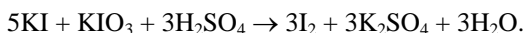


В основе химической структуры адреналина лежит ядро пирокатехина. При взаимодействии адреналина с хлорным железом возникает изумрудно-зеленое окрашивание. Реакция обусловлена наличием пирокатехиновой группировки в молекуле адреналина. Образуется соединение типа фенолята зеленого цвета.

Реакция с дихроматом калия. В 1-ю пробирку вносят 5 капель раствора адреналина, во 2-ю – 5 капель дистиллированной воды, затем в обе добавляют по 2 капли 2,5%-ного раствора дихромата калия. В пробирке с адреналином жидкость окрашивается в красно-коричневый цвет.

5. Обнаружение йода в гидролизате щитовидной железы.

Гормоны щитовидной железы оказывают регулирующее влияние на обмен белков, липидов и углеводов. По химической природе их относят в группу производных аминокислот, и они содержат йод. При гидролизе гормонов образуется йодид калия, который окисляется йодатом калия в кислой среде с образованием молекулярного йода



Йод обнаруживают по синему окрашиванию с раствором крахмала. В фарфоровой ступке тщательно растирают 5 таблеток тиреоидина или 100–200 мг высушенной ткани щитовидной железы. Все переносят в колбу для гидролиза, добавляют 5 мл 10%-ного раствора NaOH и 5 мл воды. Кипятят в течение 10–15 мин. К 3 мл охлажденного гидролизата прибавляют 10%-ный раствор серной кислоты до кислой реакции (проба на лакмус). После подкисления приливают 5 капель 1%-ного раствора крахмала и 5–10 капель (без избытка) 2%-ного раствора йода калия. Наблюдают синее окрашивание.

Лабораторная работа 9. Гормоны половых желез

Материалы и оборудование. Фолликулин, масляный раствор (в

ампулах); сульфаниловая кислота, 1%-ный раствор; нитрит натрия, 5%-ный раствор; карбонат натрия, 10%-ный раствор; спиртовой раствор фолликулина; концентрированная серная кислота; вода; 30%-ный раствор гидроксида натрия; реактив Фолина; штатив с пробирками, капельницы.

В основе структуры половых гормонов лежит кольцо циклопентанпергидрофенантрена. Их биосинтез может происходить в коре надпочечников, однако образование основной массы этих гормонов сосредоточено избирательно: андрогенов – в мужских половых железах, эстрогенов – в яичниках (во время беременности также в плаценте).

Женские половые гормоны (эстрадиол, эстрон, эстриол) содержат фенольное кольцо (А) и поэтому дают ряд реакций, характерных для фенолов. При взаимодействии diazo-реактива с эстроном образуется соединение, окрашенное в желтый цвет.

Порядок выполнения работы. Получают diazo-реактив: в пробирке смешивают 3 капли 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 3 капли 5%-ного раствора азотистокислого натрия.

Открытие фолликулина. К diazo-реактиву добавляют 3 капли масляного раствора фолликулина и 2 капли 10%-ного раствора углекислого натрия. Пробирку встряхивают и наблюдают постепенное окрашивание жидкости в желтый цвет. Сделать вывод.

1. Реакция с концентрированной серной кислотой. В пробирку берут 1 мл спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5–10 мин для испарения спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую водяную баню на 5–10 мин. Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый и имеющий зеленую флюоресценцию.

2. Образование фенолята фолликулина. В 2 сухие пробирки приливают по 0,5 мл раствора фолликулина. В 1-ю добавляют 1 мл воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во 2-ю добавляют такое же количество 30%-ного раствора гидроксида натрия – помутнения не возникает, так как в щелочной среде происходит образование фенолята фолликулина.

3. Реакция на фенольную группу. К 2 мл раствора фолликулина добавляют 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Возникает синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Гормоны. Классификация по химической природе, механизму и характеру действия. Метод биосинтеза. Понятие гипо- и гиперфункций эндокринных желез.

2. В чем заключается механизм действия гормонов? Объясните его на примере действия инсулина.

3. Гормоны гипоталамуса, гипофиза. Структура, свойства, регулирующее действие на функции эндокринных желез.

4. Механизм действия гормонов полипептидной и стероидной природы. Гормоны щитовидной железы. Структура, свойства, стимулирующее действие на обмен веществ. Патология щитовидной железы.

5. Гормоны паращитовидных желез. Структура, свойства, биологическая роль паратормона и кальцитонина.

6. Гормоны мозгового слоя надпочечников. Структура, свойства, возбуждающее действие адреналина норадреналина. Гипо- и гиперфункция надпочечников.

7. Гормоны поджелудочной железы. Структура, свойства. Влияние инсулина и глюкагона на углеводный и другие обмены веществ.

8. Гормоны коркового слоя надпочечников. Химическая природа глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Их влияние на обмен белков, жиров и углеводов.

9. Гормоны половых желез. Место биосинтеза, химическая природа. Биологическая роль гормонов воспроизводства.

10. Использование гормонов в животноводстве и ветеринарии.

Тесты для самоконтроля

1. Какой гормон регулирует водный баланс и осмотическое давление плазмы крови, стимулирует сокращение гладких мышц:

- а) пролактин;
- б) соматостатин;
- в) кортиколиберин;
- г) вазопрессин;
- д) кинины?

2. В каких железах внутренней секреции синтезируются пептидные гормоны:

- а) паращитовидная железа;
- б) поджелудочная железа;
- в) щитовидная железа;

- г) гипофиз;
 - д) яичники?
3. В каких железах синтезируются стероидные гормоны:
- а) семенниках;
 - б) мозговом веществе надпочечников;
 - в) щитовидной;
 - г) поджелудочной;
 - д) коре надпочечников?
4. Какой из гормонов обладает эстрогенным действием:
- а) соматотропин;
 - б) релаксин;
 - в) телергоны;
 - г) тестостерон;
 - д) тиролиберин?
5. Какой гормон регулирует функцию щитовидной железы:
- а) тиролиберин;
 - б) тиреокальцетонин;
 - в) транскортин;
 - г) тиротропин;
 - д) тироксин?
6. Какие гормоны синтезируются островковой тканью поджелудочной железы:
- а) тиреоидные;
 - б) вазопрессин;
 - в) глюкагон;
 - г) окситоцин;
 - д) адренокортикотропин?
7. Какие гормоны синтезируются в околощитовидной железе:
- а) адреналин;
 - б) пиридоксин;
 - в) паратгормон;
 - г) кальцитонин;
 - д) окситоцин?
8. Возникновение сахарного диабета связано с нарушением функции одной из желез, какой именно:
- а) гипофиза;
 - б) половых желез;
 - в) паращитовидной железы;
 - г) поджелудочной железы;
 - д) тимуса?

9. Какой гормон принимает участие в регуляции обмена электролитов:

- а) тироксин;
- б) инсулин;
- в) альдестерон;
- г) кортикостерон;
- д) глюкагон?

10. Какие гормоны регулируют содержание кальция и фосфора в крови:

- а) паратгормон;
- б) кальцитонин;
- в) адренкортикотропин;
- г) тестостерон;
- д) простерон?

11. Какое заболевание возникает при разрушении коры надпочечников:

- а) кретинизм;
- б) микседема;
- в) меланотропин;
- г) болезнь Аддисона;
- д) тетания?

12. Какие гормоны пептидной природы секретируются слизистой кишечника:

- а) инсулин;
- б) гастрин;
- в) соматолиберин;
- г) секретин;
- д) фоллиберин?

13. Какой из гормонов стимулирует развитие вторичных половых признаков у особей мужского пола:

- а) тестостерон;
- б) эстрадион;
- в) андростерон;
- г) эквилин;
- д) андростендиол?

14. Какой гормон стимулирует распад гликогена печени до глюкозы, а гликогена мышц до молочной кислоты:

- а) норадреналин;
- б) глюкагон;
- в) инсулин;

г) адреналин;

д) эстриол?

15. Какой гормон стимулирует биосинтез гликогена и усиливает анаболические процессы:

а) адреналин;

б) норадреналин;

в) холецистокенин;

г) инсулин;

д) тироксин?

Тема 4. БЕЛКИ

Цель. Изучить реакции осаждения и качественные цветные реакции аминокислот и белков, а также методы исследования белков в биологическом материале.

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. единиц. 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 белков и количественное их определение в биологических объектах и продуктах питания, а также их выделение из тканей и биологических жидкостей основаны на физических и химических свойствах этих соединений.

Для обнаружения белков существует две группы реакций: цветные реакции и реакции осаждения. 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.

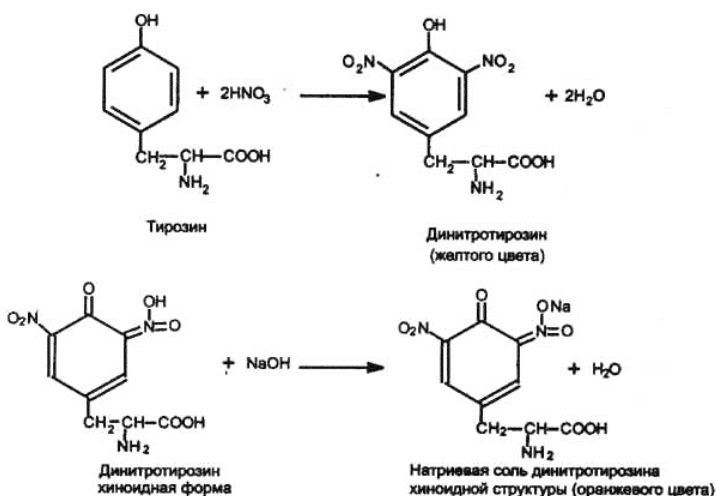
Лабораторная работа 10.

Цветные реакции на белки и аминокислоты

Материалы и оборудование. 1%-ный раствор глицина; раствор яичного белка или разбавленная сыворотка; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; реактив Милона: состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO_3 с примесью HNO_2 ; фенол, 0,1%-ный раствор; желатина, 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; концентрированная азотная кислота; ледяная уксусная кислота (в ней в виде примеси всегда содержится глиоксилевая кислота); концентрированная серная кислота; сахароза, 10%-ный раствор; ацетат свинца (II), 5%-ный раствор; нингидрин, 0,2%-ный раствор в спирте; индикатор метиловый красный; 40%-ный раствор формальдегида; штатив с пробирками, капельницы или пипетки.

Цветные реакции на белки являются реакциями на структурные элементы белка – аминокислоты или образуемые ими химические группировки. При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции, обусловленные присутствием в белках определенных аминокислот и групп.

1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского). Реакция обусловлена наличием в белках пептидных связей, соединяющих остатки аминокислот в молекуле белка путем отнятия элементов частицы воды из —COOH-группы одной аминокислоты и —NH₂- группы другой:



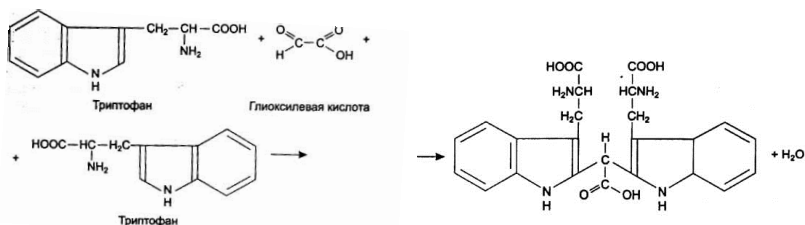
Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и т. п. при попадании на них концентрированной азотной кислоты. Белки, не содержащие тирозина и триптофана, не дают ксантопротеиновой реакции (желатина, сальмин и др.). В отличие от тирозина и триптофана, фенилаланин подвергается нитрованию с большим трудом и, по-видимому, не обуславливает ксантопротеиновой реакции. Поскольку ксантопротеиновая реакция обусловлена нитрованием ароматического кольца, она может быть положительной с более простыми ароматическими соединениями, например, с фенолом.

В пробирку наливают 5 капель раствора белка и 3 капли концентрированной азотной кислоты. Образуется осадок белка под действием кислоты. При нагревании осадок окрашивается в желтый цвет (нитрование) и постепенно растворяется (происходит гидролиз белка), сообщая желтую окраску раствору.

Содержимое пробирки охлаждают под краном. К охлажденной смеси прибавляют по каплям 10%-ный раствор гидроксида натрия. Когда реакция жидкости делается щелочной, появляется оранжевое окрашивание вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

4. Реакция Адамкевича. Реакция обусловлена присутствием в белке остатков аминокислоты триптофана. Она основана на способности триптофана в кислой среде вступать в реакцию с глиоксиловой кислотой, образуя при этом окрашенные продукты конденсации. В

качестве источника глиоксиловой кислоты обычно используют ледяную уксусную кислоту, содержащую примесь глиоксиловой. Две молекулы триптофана, реагируя с глиоксиловой кислотой, образуют соединение красно-фиолетового цвета:

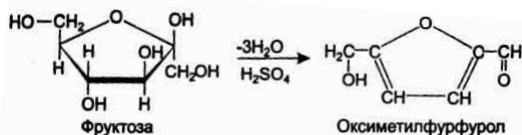


К 1 капле неразбавленного белка или 5–10 каплям сыворотки добавляют 10 капель ледяной уксусной кислоты (или глиоксиловой кислоты) и слегка нагревают до растворения белка.

Содержимое пробирки охлаждают и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке подслаивают из пипетки около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе соприкосновения двух слоев жидкости возникает красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца. Окраска постепенно распространяется на весь раствор. При нагревании в кипящей водяной бане окрашивание развивается быстрее.

5. Реакция Шульце-Распайля. Данная реакция обусловлена наличием в белке остатка триптофана. Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфулом, дает продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфул в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из фруктозы), получающихся при гидролизе сахарозы под влиянием концентрированной серной кислоты.

Образование оксиметилфурфула из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты происходит в результате следующей реакции:

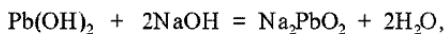
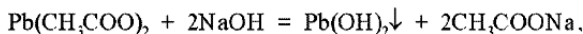
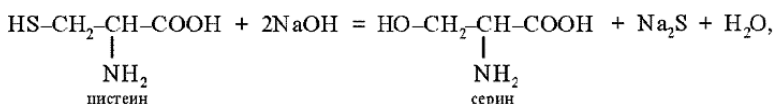


К 1 капле неразбавленного яичного белка или к 5–10 каплям сыво-

ротки добавляют 1–2 капли 10%-ного раствора сахарозы и пипеткой осторожно по стенке пробирки подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты.

Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H_2SO_4 в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегрелась выше $70\text{ }^\circ\text{C}$, так как иначе под влиянием H_2SO_4 происходит обугливание органического вещества и раствор буреет.

6. Реакция Фоля. Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода. Последний в щелочной среде дает сернистый натрий, который, реагируя с плумбитом натрия, образует черный осадок сернистого свинца. Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в его плумбит. В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета:



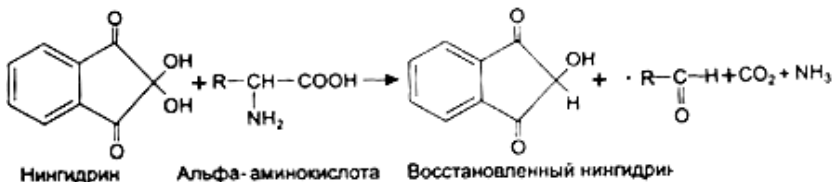
Другая серосодержащая аминокислота метионин более устойчива и при слабом щелочном гидролизе не разрушается.

Наливают в пробирку 10 капель 5%-ного раствора ацетата свинца (II) и по каплям прибавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия до растворения образующегося вначале осадка гидроксида свинца (II) (Реактив Фоля). Приливают несколько капель белка и смесь кипятят. Через некоторое время жидкость буреет и выпадает черный осадок сульфида свинца (II).

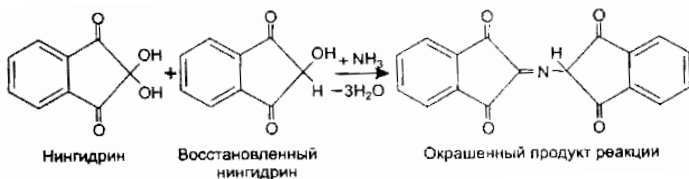
7. Нингидриновая реакция (реакция Рузмана). Реакция обусловлена наличием в белке остатков α -аминокислот. При нагревании растворов белка, пептидов и α -аминокислот с нингидрином образуются

окрашенные соединения.

Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α -аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, двуокси углерода, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина:



Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации сине-фиолетового цвета:

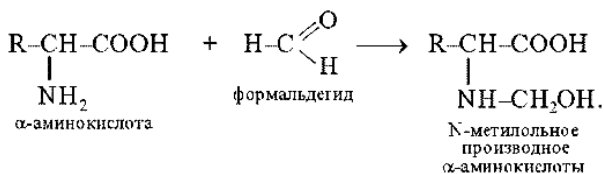


В случае аминокислот (пролина и оксипролина) образуется продукт ярко-желтого цвета. Нингидриновую реакцию дают некоторые амины, амиды кислот, а также аммонийные соли и другие соединения.

В пробирку наливают 10 капель раствора белка, добавляют 3–6 капель 0,2%-ного раствора нингидрина и кипятят. Через 1–3 мин наблюдают появление розового, красного, а затем сине-фиолетового окрашивания. Через некоторое время раствор становится синим.

Каждая из рассмотренных выше цветных реакций в отдельности не является специфичной для белка. Доказательством присутствия белка может служить лишь положительный результат нескольких реакций.

8. Реакция с формальдегидом. При взаимодействии α -аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



Эта реакция лежит в основе количественного определения α-аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

В пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-ного раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание (кислая среда).

Результаты работы оформить в виде таблицы. В выводах указать, на чем основаны цветные реакции на белки. Написать формулы определяемых аминокислот.

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Определяемые аминокислоты

Лабораторная работа 11.

Выделение белков из биологических объектов

Материалы и оборудование. Растворы с массовыми долями: хлорида натрия 10 %, этанола 70 %, гидроксида натрия 10 %, сульфата меди (II) 1 %, насыщенный раствор хлорида натрия; гороховая, пшеничная, ячменная мука.

Процесс выделения белков включает следующие операции:

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

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

Выделение простых белков

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

Альбумины – белки, хорошо растворимые в воде и в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4–10 % и выпадающие в осадок из этих растворов при насыщении их этими же солями и сульфатом аммония. Альбумины содержатся в клетках всех организмов.

Глобулины – белки, нерастворимые в воде, хорошо растворимые в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4–10 %, выпадающие в осадок при полунасыщении этих растворов. Глобулины встречаются во всех видах организмов, наиболее распространены в растениях, особенно много их в семенах бобовых.

Проламины – белки, хорошо растворимые в растворе с массовой долей этанола 60–80 %. Эта группа белков найдена только в растениях и только в семенах злаковых.

Выделение альбуминов.

Порядок выполнения работы. В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной или ячменной муки, во 2-ю – гороховой. В обе наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6–10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах.

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

Выделение глобулинов.

Порядок выполнения работы. В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной или ячменной муки, во 2-ю – гороховой. В обе наливают

по 10 мл раствора хлорида натрия с массовой долей 10 %, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6–10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах.

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

Выделение проламинов.

Порядок выполнения работы. В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной или ячменной муки, во 2-ю – гороховой. В обе наливают по 10 мл раствора этанола с массовой долей 70 %, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6–10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах.

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

Содержание простых белков в пшенице и горохе

Объекты исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Мука пшеничная			
Горох			

Лабораторная работа 12. Реакции осаждения белков

Материалы и оборудование. Вода дистиллированная; раствор белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, разбавляют водой до 250 мл, тщательно перемешивают и фильтруют через двойной слой марли); растворы с массовыми долями: уксусной кислоты 1 % и 10 %, гидроксида натрия 10 %, сульфосалициловой кислоты 10 %, трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 10 %, сульфата меди (II) 6 %, ацетата свинца (II) 5 %, нитрата серебра (I) 3 %, насыщенный раствор хлорида натрия; концентрированные кислоты: азотная, серная, соляная; этанол 96%-ный.

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

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

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

Реакции осаждения применяют для обнаружения белка в растворе, получения безбелковых фильтратов (например, при определении сахаров в молоке или крови), выделения из раствора отдельных групп белков (фракционирования белков).

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

нейтральных солей.

Порядок выполнения работы. В 5 пробирок вносят по 1 мл раствора белка яиц (альбумина). Альбумин яиц – кислый белок и в нейтральной среде имеет отрицательный заряд.

Содержимое 1-й пробирки нагревают. Жидкость мутнеет (появление опалесценции), но осадок не образуется или его очень мало. Это объясняют тем, что частицы белка в нейтральной среде имеют отрицательный заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во 2-ю пробирку добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 1 % и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок белка. Это объясняют тем, что pH среды приближается к изоэлектрической точке и молекула белка теряет заряд.

В 3-ю пробирку добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 10 % и содержимое нагревают. Осадок белка в этом случае не образуется, так как в сильно кислой среде частицы белка приобретают значительный положительный заряд.

В 4-ю пробирку добавляют две капли раствора с массовой долей уксусной кислоты 10 %, одну каплю раствора насыщенного хлоридом натрия и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок, так как вследствие адсорбции ионов хлорида натрия (образование двойного электрического слоя) происходит нейтрализация положительного заряда на частицах белка; наступает момент, когда силы притяжения между молекулами превышают силы отталкивания, и белок выпадает в осадок.

В 5-ю пробирку добавляют две капли раствора с массовой долей гидроксида натрия 10 % и нагревают. Осадка белка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

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

Осаждение белков при нагревании

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

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

Порядок выполнения работы. В 3 пробирки вносят 1,5–2,0 мл следующих концентрированных кислот: в 1-ю – соляной, во 2-ю – серной, в 3-ю – азотной. Затем, наклонив пробирки под углом 45°, осторожно по стенке настилают 0,5–1,0 мл раствора белка (молоко или раствор яичного белка). На границе соприкосновения двух слоев образуется осадок в виде белого кольца. Пробирки осторожно встряхивают и наблюдают за состоянием осадка. Осадок, выпавший при действии азотной кислоты, увеличивается, а осадки, выпавшие при действии соляной и серной кислот, растворяются в их избытке. Результаты этой и всех последующих реакций вносят в таблицу.

3. Осаждение белков органическими кислотами. Из органических кислот в качестве осадителей белков широко применяют трихлоруксусную кислоту (ТХУ) и сульфосалициловую кислоту.

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

Порядок выполнения работы. В 2 пробирки наливают по 1 мл раствора белка яиц и добавляют равный объем: в 1-ю – раствора с массовой долей ТХУ 10 %, во 2-ю – раствора с массовой долей сульфосалициловой кислоты 10 %. Выдерживают 5 мин и результат опыта вносят в таблицу.

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

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

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

Порядок выполнения работы. В 3 пробирки наливают по 1 мл раствора белка яиц и медленно, по каплям при встряхивании прибавляют до появления осадка: в 1-ю – раствор с массовой долей сульфата меди 6 %, во 2-ю – раствор с массовой долей ацетата свинца 5 %, в 3-ю – раствор с массовой долей нитрата серебра 3 %. Затем содержимое 1-й и 3-й пробирок делят пополам. Одну половину содержимого разбавляют 2–3 мл воды, другую – 2–3 мл соответствующего осадителя и оставляют на 10 мин. Результаты опыта вносят в таблицу.

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

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

Порядок выполнения работы. В пробирку наливают 1 мл раствора яичного белка, добавляют на кончике ножа (0,2 г) хлорида натрия и энергично встряхивают. Затем постепенно (каплями) приливают 2 мл этанола. Энергично встряхивают и оставляют в штативе. Через 4–6 мин появляется мелкий осадок белка. Результаты записать в таблицу.

Осаждение белков

№	Название осадителя	Характер осадка	Растворимость осадка в избытке осадителя
1	Соляная кислота		
2	Серная кислота		
3	Азотная кислота		
4	Сульфосалициловая кислота		
5	Трихлоруксусная кислота		
6	Сульфат меди		

7	Ацетат свинца		
8	Нитрат серебра		
9	Этанол		

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Строение простых белков (протеинов).
2. Какие функции выполняют протеины?
3. Какой принцип положен в основу деления протеинов на группы?
4. Общая характеристика альбуминов.
5. Общая характеристика глобулинов.
6. Общая характеристика проламинов.
7. Основные операции выделения простых белков.
8. Значение превращения биоматериала в гомогенную массу.
9. Выделение, обнаружение и осаждение альбуминов.
10. Выделение, обнаружение и осаждение глобулинов.
11. Выделение, обнаружение и осаждение проламинов.
12. Основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе.
13. Каковы причины осаждения белков нагреванием при pH около 7,0?
14. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения.
15. Почему в растворе при $\text{pH} > 7,0$ белки при нагревании не выпадают в осадок?
16. Почему в растворе при $\text{pH} < 7,0$ с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
17. Механизм действия минеральных кислот на молекулы белков.
18. Механизм осаждения белков органическими кислотами.
19. Механизм осаждения белков солями тяжелых металлов.
20. Механизм осаждения белков органическими растворителями.

Тема 5. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Цель. Изучить механизмы реакций биологического окисления и методы исследования активности некоторых.

Живая клетка и организм в целом поддерживают свое существование путем постоянного усвоения химических соединений из окружающей среды. Непрерывно совершающийся процесс превращения материи в живых организмах называют обменом веществ. Часть поступающих в клетку извне веществ используется для синтеза собственных

веществ (процессы ассимиляции), часть окисляется с выделением энергии, требуемой при синтезе собственных веществ клетки и выполнения физиологических функций (процессы диссимиляции).

Органические вещества в организме в процессе окисления превращаются в углекислый газ, воду и аммиак в случае азотсодержащих соединений. Окисление веществ протекает путем присоединения к ним кислорода (оксигеназы) или путем отнятия от них водорода (дегидрирование) в аэробных условиях.

Дегидрирование может происходить в присутствии другого акцептора, без кислорода (анаэробно), окисление по третьему пути происходит без присоединения кислорода или отнятия водорода, освобождающиеся электроны переносятся на другие атомы или ионы. Реакции переноса электронов водорода (дегидрирование) более легко осуществимы и поэтому преобладают над другими реакциями окисления.

Биологическое окисление в отличие от горения происходит при сравнительно низких температурах, носит многоступенчатый характер и осуществляется ферментами класса оксидоредуктаз. Окисление белков, жиров и углеводов происходит в несколько этапов (фаз), на последнем этапе промежуточные продукты окисления этих веществ вступают в цепь реакций цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является связующим звеном между обменами различных веществ в нем путем аэробного дегидрирования субстратов, заканчивают окисление продукты обмена аминокислот, жирных кислот, моносахаридов и т. д.

Атомы водорода в виде электронов и протонов передаются в специализированную цепь ферментов (дыхательную цепь ферментов) и, пройдя через нее, соединяются с кислородом с образованием воды. В результате реакций биоокисления отщепляемые электроны и протоны водорода соединяются с атмосферным кислородом, поэтому этот процесс получил название тканевое дыхание. Перенос электронов и протонов по дыхательной цепи ферментов на кислород сопровождается высвобождением энергии, которая при необходимости аккумулируется в высокоэнергетических (макроэргических) связях АТФ.

Процесс синтеза АТФ из АДФ и фосфорной кислоты за счет энергии окисления веществ при участии дыхательной цепи ферментов называется окислительным фосфорилированием.

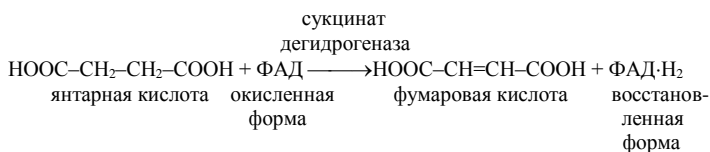
Реакции биологического окисления в живой клетке являются не только поставщиками энергии, но и промежуточных веществ (метабо-

литов), используемых клеткой для построения необходимых собственных веществ.

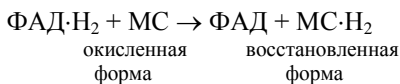
Лабораторная работа 13. Биологическое окисление

Материалы и оборудование. Мышечная кашица; 3%-ный раствор янтарной кислоты, нейтрализованной 10%-ным раствором гидроксида натрия и доведенной до слабощелочной реакции по лакмусу; метиленовая синь, 0,02%-ный раствор; раствор формальдегида; пероксид водорода, 1%-ный и 3%-ный раствор; серная кислота, 10%-ный раствор; перманганат калия (из фиксанала), 0,1 н раствор; бикарбонат кальция; градуированный цилиндр и пипетка; колбочки на 50 мл; пробирки и подобранные к ним пробки; штативы; ступки с пестиком; стеклянная палочка; кварцевый песок; марля; мерные колбы на 100 мл; водяная баня; термостат; мышца; молоко свежее; кровь в разведении 1:1000.

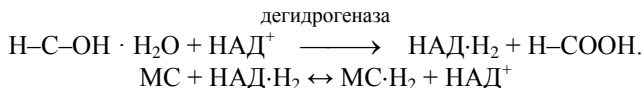
1. Качественная реакция на дегидрогеназы мышц. Оксидоредуктазы, осуществляющие дегидрирование субстратов, называют дегидрогеназами. Все дегидрогеназы являются двухкомпонентными ферминами. В качестве активной группы дегидрогеназ чаще выступают нуклеотиды НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или ФАД (флавинадениндинуклеотид). Все ткани, и мышечная в том числе, содержат дегидрогеназы, катализирующие окисление субстратов в цепи реакций цикла трикарбоновых кислот. Одним из субстратов окисления этого цикла является янтарная кислота (сукцинат), окисляющаяся до фумаровой кислоты по схеме:



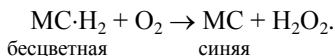
Водороды, отщепляемые дегидрогеназами у субстратов, передаются другому акцептору. В качестве акцептора можно использовать метиленовую синь (МС), которая будет восстанавливаться в бесцветную лейкоформу и позволит проследить процесс окисления субстрата.



Затем гидратная форма муравьиного альдегида взаимодействует с активной группой дегидрогеназы молока, передавая ей два атома водорода:



Переход окрашенной формы метиленовой сини в бесцветную (восстановленную) указывает на происходящее окисление альдегида в кислоту. Лейкоформа метиленовой сини, взаимодействуя с молекулярным кислородом воздуха, может, обратимо окисляясь, превращаться в исходную окисленную форму:

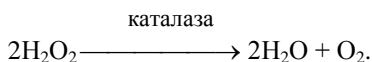


В две пробирки наливают по 5–6 мл молока (в одну – кипяченое, в другую – некипяченое). В обе пробирки прибавляют по 8–10 капель раствора формальдегида и по 1–2 капли раствора метиленовой сини. Закрывают пробирки пробками, перемешивают их содержимое и помещают в водяную баню при 70 °С.

Через 10–15 мин можно заметить, что в пробирке с некипяченым молоком смесь обесцвечивается, а в контрольной пробирке остается окрашенной. Пробирку с молоком, в которой окрашивание смеси исчезло, открывая пробку, несколько раз встряхивают для обеспечения лучшего контакта содержимого пробы с воздухом. Вскоре вновь появляется синее окрашивание вследствие окисления лейкоформы метиленовой сини кислородом воздуха.

Если эту пробирку опять поместить в водяную баню, то ее содержимое вновь обесцветится. Иногда обратимое окисление-восстановление метиленовой сини можно в одной пробе наблюдать неоднократно.

3. Определение каталазной активности крови. Каталаза – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление и восстановление пероксида водорода путем переноса двух атомов водорода с одной молекулы пероксида водорода на другую, превращая токсичный для клетки пероксид водорода в безвредные воду и кислород.



У млекопитающих каталаза наиболее активна в клетках крови, печени, почек. Активность каталазы крови у коров в норме находится в среднем в пределах 4,76–5,47 мгН₂О₂/0,001 мл крови или соответственно составляет 131,8–151,5 мкатал. Коэффициент пересчета составляет 27,7(1,7·10⁶:(34·1800)). Снижение активности каталазы происходит при некоторых инфекционных заболеваниях (туберкулез, рожа свиней и т. д.). Повышение активности фермента наблюдается при отравлениях, кетозах. Определение каталазной активности крови основано на определении количества пероксида водорода, расщепляемого каталазой, содержащейся в определенном объеме крови, в единицу времени. Это количество Н₂О₂ определяется титриметрически с помощью перманганата калия.

Готовят 2 колбочки и нумеруют их. В 1-ю вносят точно 1 мл крови (разведение 1:1000), 7 мл дистиллированной воды и 2 мл 1%-ного раствора Н₂О₂. Во 2-ю – 2 мл раствора Н₂О₂ и 8 мл воды. Обе колбочки оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем в обе колбочки вносят по 10 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Серная кислота изменяет реакцию среды и тем самым прекращает действие фермента (каталаза активна в слабо щелочной среде крови) и создает необходимые условия для титрования. Титруют жидкости обеих колбочек 0,1 н раствором перманганата калия до бледно-розовой окраски.

Результаты титрования записывают в тетрадь.

Расчет активности крови производят по формуле:

$$X = \frac{(k \cdot O) \cdot 1,7 \cdot 10^6}{34 \cdot 1800} \text{ (мкатал/л)},$$

где k – количество мл 0,1 н КМnО₄, пошедшее на титрование пробы, не содержащей кровь;

O – количество мл 0,1 н КМnО₄, пошедшее на титрование пробы, содержащей кровь;

1,7 – масса Н₂О₂ в мг, соответствующая 1 мл 0,1 н раствора КМnО₄;

10⁶ – коэффициент пересчета на 1 л цельной крови;

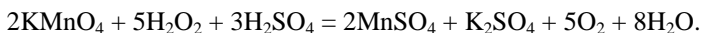
34 – молярная масса Н₂О₂ в мг;

1800 – число секунд в 30 минутах;

X – каталазная активность крови, выраженная в мкатал/л.

4. Определение активности каталазы по Баху и Опарину. Активность каталазы в испытуемом материале оценивается по количеству распавшегося под воздействием фермента пероксида водорода,

причем количество его, разложенного каталазой, можно определить путем оттитровывания оставшегося неразложенного пероксида водорода перманганатом:



Навеску (3 г мышцы) растирают в ступке с кварцевым песком, добавляя около 0,3 г (на кончике шпателя) бикарбоната кальция и 20 мл дистиллированной воды. Тщательно растертую массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем болтушки до метки. Через 30–40 мин смесь фильтруют. Две порции фильтрата по 10 мл помещают в колбы на 100 мл. Содержимое первой колбы кипятят 2–3 мин для инактивации фермента и затем охлаждают.

В обе колбы приливают по 10 мл воды и по 1,5 мл 1%-ного раствора пероксида водорода. Пробы оставляют на 20–30 мин. По истечении указанного срока к содержимому обеих колб добавляют 2,5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и титруют 0,1 н раствором перманганата калия до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение минуты.

Активность каталазы вычисляют по разности (в мл) 0,1 н перманганата калия, пошедшего на титрование в контрольном и основном опытах. Ее можно выразить также в весовых частях (мг) пероксида водорода в расчете на 1 г исходного материала, исходя из того, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата отвечает 1,7 мг пероксида водорода. Вычисления производят по формуле

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 1,7}{H},$$

где X – активность каталазы (в мг) пероксида водорода на 1 г материала;

a – мл 0,1 н раствора перманганата, пошедшего на титрование кипяченой пробы;

b – мл 0,1 н раствора перманганата, пошедшего на титрование опытной пробы;

T – поправка к титру раствора перманганата;

1,7 – количество миллилитров пероксида водорода, соответствующее 1 мл перманганата;

H – навеска вещества, г.

Методику опыта и вывод оформить в тетради.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Какие ферменты участвуют в реакциях биологического окисления и каков механизм их действия?
2. Как устроена и функционирует дыхательная цепь ферментов в живой клетке?
3. Какие витамины необходимы для построения оксидоредуктаз?
4. В чем значение реакций биологического окисления для организма?
5. Общая характеристика обмена веществ и энергии. Понятия о лимитирующих этапах, узловых метаболитах.
6. Соотношение анаболических и катаболических процессов у растущих животных и при патологии.
7. Биоэнергетика. Свободная энергия. Участие высокоэнергетических фосфатов в обмене энергии.
8. Биологическое окисление и его особенности. Ферменты и коферменты, участвующие в биологических ОВР.
9. Характеристика дыхательной цепи ферментов.
10. Механизмы аккумулялирования энергии в клетке. Окислительное и субстратное фосфорилирование.

Тема 6. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Цель. Изучить процессы переваривания углеводов у животных с различным строением желудочно-кишечного тракта. Обнаружить продукты ферментативного гидролиза крахмала, ознакомиться с методами исследования углеводного обмена.

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 другими, 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 фосфоролиза ферментом фосфорилазой.

Основным источником энергии для организма являются углеводы, они покрывают его потребности на 60–70 %. Источником углеводов для организма служат растительные ткани, содержащие до 90 % углеводов от сухого вещества и в меньшей степени животные ткани, содержащие до 2 % от сухого вещества.

Превращение углеводов в организме начинается с процессов переваривания. Углеводы кормов (полисахариды и дисахариды) подвергаются в желудочно-кишечном тракте расщеплению до моносахаридов и только в таком виде всасываются в кровь и используются организмом. У животных с многокамерным желудком образующиеся моносахариды (глюкоза) под действием ферментов микроорганизмов подвергаются процессам различного вида брожения, и только часть поступает в кровь. Основными продуктами сбраживания глюкозы являются низкомолекулярные жирные кислоты, которые за свою летучесть при нагревании названы летучие жирные кислоты (ЛЖК). Тканевый обмен поступивших в организм моносахаридов (в основном глюкозы) включает в себя реакции синтеза (гликогена, лактозы и т. д.) и реакции окисления углеводов до углекислого газа и воды с выделением энергии. Окисление углеводов происходит поэтапно, сначала в анаэробных условиях (гликолиз), затем в аэробных условиях (цикл трикарбоновых кислот, пентозофосфатный путь), поставляя организму энергию и промежуточные вещества окисления (метаболиты) для синтеза собственных веществ. Контролируют тканевый обмен углеводов в основном гормоны поджелудочной железы (инсулин и глюкагон) и мозгового слоя надпочечников (адреналин и норадреналин). Судить об изменениях, возникающих в организме при нарушении обмена углеводов, можно по содержанию глюкозы в крови. В норме концентрация сахара (глюкозы) в крови показатель относительно постоянный и зависит от вида животного. Для большинства сельскохозяйственных животных содержание глюкозы находится в пределах 60–100 мг% (3,3–5,5 ммоль/л). Для КРС этот показатель 46,0–54,0 мг% в связи с поступлением в кровь не глюкозы, а ЛЖК, кур 130–260 мг%, у рыб 40–60 мг%. Коэффициент пересчета в ммоль/л – 0,0055. Снижение уровня сахара в крови (гипогликемия) наблюдается при углеводном голодании, заболеваниях печени, почек, отравлении бензолом, хлороформом, фосфором и его солями, при гиперфункции поджелудочной железы,

заболевании лейкозом, ацетонемии, диспепсии. Повышение сахара в крови (гипергликемия) имеет место при обильном кормлении углеводистыми кормами, гиперфункции щитовидной железы, коры надпочечников, гипофиза, при панкреатитах и сопровождается гликозурией (выделением сахара с мочой).

Лабораторная работа 14. Определение содержания гликогена

Материалы и оборудование. 50%-ный раствор гидроксида калия, 96-, 60- и 80%-ный этиловый спирт, эфир, концентрированная химически чистая серная кислота, антрон (производное антрахинона), гликоген или глюкоза (для построения калибровочного графика), 95%-ная серная кислота (к 50 мл воды прибавляют 1 л концентрированной H_2SO_4 и охлаждают), свежеприготовленный 0,2%-ный раствор антрона в 96%-ной серной кислоте. 0,2 г антрона помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют и доводят до метки 95%-ной серной кислотой, после выдержки в течение 1 ч раствор готов для использования (на 1 день работы), 30%-ный водный раствор гидроксида калия, свежеприготовленный 0,2%-ный раствор антрона в 95%-ной серной кислоте (0,2 г антрона в 100 мл 95%-ной серной кислоты), центрифуга, центрифужные пробирки, технические весы, пробирки, штатив, водяная баня, сифон, пипетка, стеклянная палочка, спектрофотометр.

Окрашенный от зеленого до сине-зеленого цвета продукт реакции имеет максимум поглощения при длине волны 620 мкм. Интенсивность окраски раствора измеряют на спектрофотометре СФ-4 или фотоэлектроколориметре ФЭК-М или фотометре ФТ-2 с красным светофильтром с максимумом пропускания при той же длине волны.

1. Определение содержания гликогена в мышечной ткани. Метод основан на выделении гликогена из мышечной ткани и цветной реакции с антроном. Метод состоит из следующих основных операций: гидролиз белков мышечной ткани щелочью, выделение гликогена из раствора этиловым спиртом, промывание гликогена и его растворение, реакция с антроном и развитие окраски, измерение интенсивности окраски. При нагревании навески мышечной ткани с крепким раствором щелочи происходит гидролиз мышечных белков, при этом гликоген освобождается из клеток. Гликоген не растворяется в спирте, поэтому он выпадает в осадок при добавлении довольно большого количества спирта. Прибавление сюда же нескольких капель кон-

центрированной серной кислоты способствует осаждению гликогена вследствие образования сульфата аммония.

Порядок выполнения работы. В центрифужные пробирки размером 25×160 мм вносят 5 мл 50%-ного раствора едкого кали и около 2,5 г мяса, взвешенного на технических весах с точностью до 0,01 г. Пробирки помещают в специальный штатив, вместе с которым их ставят в кипящую водяную баню. После образования однородного раствора (все частички мяса растворились) пробирки охлаждают, добавляют 5 мл дистиллированной воды, осаждают гликоген 40 мл 96%-ного спирта и вносят несколько капель концентрированной серной кислоты.

Пробирки оставляют на 24 ч, после чего центрифугируют в течение 30 мин при 3000 об/мин, жидкость над осадком сливают тонким сифоном или осторожно удаляют пипеткой. Осадок последовательно промывают 15 мл 60%-ного, затем 80%-ного спирта и, наконец, 96%-ным спиртом, а затем эфиром.

Для отделения промывных жидкостей пробирки с содержимым центрифугируют 30 мин. После каждого центрифугирования жидкость над осадком сливают, пользуясь вышеуказанным приемом. При обработке эфиром центрифугирования не требуется, после 10 мин настаивания эфир сливают из пробирки, а его следы удаляют на водяной бане.

Каждую порцию промывной жидкости добавляют не сразу, а в два приема. Сначала вносят небольшую часть жидкости и тщательно распределяют в ней остаток, перемешивая его стеклянной палочкой, а затем добавляют оставшееся количество, тщательно смывая в пробирку приставшие к палочке частицы.

После удаления следов эфира к остатку добавляют 5 мл горячей воды, раствор перемешивают вращательным движением пробирки и нейтрализуют соляной кислотой по лакмусу (сначала двумя каплями концентрированной, а затем 2%-ным раствором).

Из пробирки раствор гликогена переносят в мерную колбу соответствующей емкости (если парное мясо – в колбу на 500 мл, если же мясо, выдержанное в течение 1–2 суток, – на 25–50 мл). Для проведения цветной реакции в две пробирки молибденового стекла размером 30×200 мм помещают аликвотные части раствора гликогена (например, 0,5 и 1,5 мл), добавляют до 5 мл дистиллированной водой и погружают в водяную баню со льдом. Осторожно, непрерывно перемешивая, приливают тонкой струей 10 мл свежеприготовленного рас-

твора антрона в 95%-ной серной кислоте. Затем жидкости еще раз осторожно перемешивают вращательным движением и пробирки помещают на 10 мин в сильно кипящую водяную баню. По окончании нагревания пробирки быстро охлаждают в воде со льдом и измеряют оптическую плотность в отношении контрольного раствора. Образовавшаяся зеленая окраска при использовании реактивов высокой чистоты устойчива на протяжении 4–5 ч.

Контрольный опыт проводят в аналогичных условиях, помещая в пробирку 5 мл дистиллированной воды и 10 мл раствора антрона в серной кислоте.

Оптическая плотность контрольного раствора, измеренная относительно серной кислоты, не должна быть более 0,08.

При помощи калибровочного графика находят концентрацию гликогена во взятом на цветную реакцию количестве раствора и затем пересчитывают на содержание его в мясе.

$$x = \frac{\alpha \cdot 25 \cdot 100}{ne} \text{ мг\%,}$$

где α – количество гликогена, вычисленного по калибровочному графику, мг;

25 – емкость мерной колбы, в которой был растворен осадок гликогена;

100 – множитель перевода в проценты;

n – количество исследуемого раствора, взятого на цветную реакцию, мл;

e – навеска мяса, г.

Чтобы построить калибровочный график, готовят стандартный раствор. Для приготовления стандартного раствора применяют тщательно очищенный и высушенный в эксикаторе гликоген, полученный из печени только что убитого кролика, или пользуются химически чистым препаратом глюкозы; для перевода глюкозы в гликоген результаты определения делят на 1,11.

Взвешивают на аналитических весах 16 мг гликогена, навеску растворяют теплой, дистиллированной водой в мерной колбе на 200 мл, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем водой до метки и тщательно перемешивают. Такой раствор содержит в 1 мл 0,08 мг гликогена. Из него готовят серию растворов для построения калибровочного графика, помещая в пробирки количества, указанные в таблице.

Серия растворов для построения калибровочного графика

Количество гликогена, мг	Количество раствора гликогена, мл	Количество воды, мл	Количество раствора антраона, мл
0,01	0,125	4,875	10,0
0,02	0,25	4,75	10,0
0,04	0,50	4,50	10,0
0,06	0,75	4,25	10,0
0,08	1,00	4,00	10,0
0,12	1,50	3,50	10,0
0,16	2,00	3,00	10,0
0,20	2,50	2,50	10,0

После добавления антраона пробирку помещают точно на 10 мин в сильно кипящую водяную баню и через определенный промежуток времени (например, 5 мин) заливают раствором антраона следующую пробирку и нагревают ее так же, как и предыдущую.

Если интенсивность окраски раствора не изменяется в течение некоторого промежутка времени, то можно подготовить для измерения сразу несколько растворов. Для этого предварительно устанавливают время, в течение которого измерение возможно. После 10 мин нагревания и охлаждения раствора до комнатной температуры измеряют его оптическую плотность, держатель с кюветами вынимают из камеры спектрофотометра и оставляют на 5 или 10 мин, после чего вновь ставят в камеру прибора и измеряют светопоглощение раствора. Такую операцию повторяют несколько раз в течение, например, 1 ч. Если практически получается одна и та же величина оптической плотности, то окраску раствора можно считать стабильной на протяжении исследованного периода времени. Это дает право одновременно подготовить для измерения нужное число пробирок с растворами, что значительно экономит время, затрачиваемое на анализ.

Для построения калибровочного графика необходимо провести не менее трех серий определений, используя каждый раз вновь приготовленный раствор гликогена или глюкозы.

2. Определение содержания гликогена в печени. В пробирку молибденового стекла (или стекла пирекс) размером 20 × 160 мм помещают навеску 1,00 г тщательно измельченной печени, добавляют 3 мл 30%-ного раствора едкого кали и нагревают на сильно кипящей водяной бане в течение 20 мин. По истечении этого времени пробирку охлаждают в холодной воде, содержимое пробирки количественно переносят в мерную колбу и доводят объем дистиллированной водой

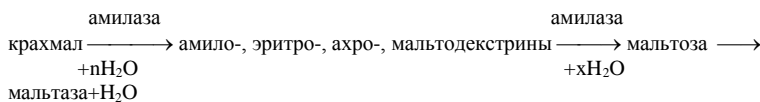
до метки. Емкость мерной колбы подбирают в зависимости от возможного содержания гликогена в печени: если анализируют печень только что убитого животного, измельченную при охлаждении, то выбирают колбу на 200–600 мл; для анализа печени, хранившейся длительное время, берут колбу на 25–50 мл.

Цветную реакцию с антроном и измерение проводят так же, как при определении содержания гликогена в мышечной ткани.

Лабораторная работа 15. Обмен углеводов

Материалы и оборудование. Крахмал, 1%-ный раствор, содержащий 0,3 % NaCl; кристаллический йод; йод, 0,1%-ный раствор в 0,2%-ном растворе йодида калия; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; реактив Фелинга; сульфат меди (II), 5%-ный раствор; гидроксид калия, 60%-ный и 15%-ный раствор; медицинский спирт; хлорид железа (III), 1%-ный раствор; щавелевая кислота, 0,1 н раствор; свежеприготовленный 1%-ный раствор гидросульфита натрия; 0,1 н и 0,01 н растворы йода; тиосульфат натрия, 0,1 н раствор; гидрокарбонат натрия, насыщенный раствор; стандартный раствор глюкозы 5 ммоль/л (900 мг глюкозы довести дистиллированной водой до 1 л); антроновый реактив (100 мл концентрированной серной кислоты, осторожно перемешивая, добавить к 5 мл дистиллированной воды и внести 200 мг антрона, раствор годен в течение 4–5 дней). Препарат амилазы и мальтазы (слюна в разведении 1:9); мышечная ткань; моча; безбелковый центрифугат крови. Пробирки, пипетки градуированные, штативы, колбочки на 50 мл, предметные стекла, водяная баня, центрифуга, ножницы, ступка с пестиком, марля, стеклянная палочка, термостат, фотоэлектроколориметр.

1. Ферментативный гидролиз крахмала. Крахмал является универсальным пищевым полисахаридом. Построен крахмал из остатков α -D-глюкопиранозы, последовательно связанных α -(1,4)-гликозид-гликозными связями, а в точках ветвления α -(1,6)-связями. В результате ферментативного гидролиза крахмал поэтапно расщепляется через промежуточные продукты гидролиза декстрины и мальтозу до α -D-глюкозы по схеме:



—————→ α -D-глюкоза.

Гидролиз крахмала в ЖКТ происходит при участии амилаз (амилазы слюны, амилазы микроорганизмов, амилазы панкреатического и кишечных соков). В природе выделены α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза, различающиеся по своим свойствам, распространению и способу действия на крахмал. Кроме амилазы в гидролизе участвует мальтаза (α -глюкозидаза), содержащаяся в слюне, панкреатическом и кишечном соке. Наиболее активными являются амилаза и мальтаза панкреатического сока. Продукты глубокого гидролиза крахмала (глюкоза и мальтоза) имеют свободные гликозидные гидроксилы, поэтому легко окисляются и дают положительную реакцию Троммера и с фелинговой жидкостью. Промежуточные продукты гидролиза декстрины обнаруживаются по характерному окрашиванию с йодом. Крахмал и более близкие к крахмалу амилодекстрины дают синее окрашивание с йодом, эритродекстрины – красно-бурое и мальтодекстрины окрашивания не дают.

В 2 пробирки наливают по 3–5 мл крахмала (1%-ный раствор, содержащий 0,3 % NaCl). В 1-ю пробирку (контрольную) добавляют 2–3 мл дистиллированной воды, во 2-ю пробирку (опытную) – 2–3 мл разбавленной слюны и ставят их в термостат при 37–40 °С на 30–40 мин. Время от времени периодически берут стеклянной палочкой из каждой пробирки каплю жидкости, наносят на предметное стекло и добавляют каплю йода. Пробы капель, взятые из опытной пробирки, вначале с йодом дают синее окрашивание, затем – красно-бурое и к концу времени инкубации перестают давать окрашивание с йодом. Капли, взятые из контрольной пробирки, все время дают с йодом синее окрашивание. По окончании времени инкубации с содержимым обеих пробирок проделывают реакцию Троммера или с фелинговой жидкостью.

С раствором крахмала реакция будет отрицательная, с раствором крахмала со слюной вследствие гидролиза – положительная, наблюдается выпадение красного осадка оксида меди (I).

Результаты опытов и выводы оформить в виде таблицы и подтвердить написанием реакций поэтапного гидролиза крахмала.

№ пробирки	Исследуемое вещество	Время инкубации в термостате	Пробы с йодом			Реакция Троммера	Выводы
			1	2	3		
1	Раствор крахмала						

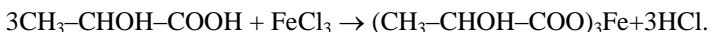
2	Раствор крахмала и слюны (амилаза, мальтаза)						
---	--	--	--	--	--	--	--

Подобный опыт можно провести с гликогеном. Гликоген сходен по строению и имеет ряд общих свойств с крахмалом. Гидролиз идет через те же промежуточные продукты, что и у крахмала, но гликоген с йодом дает не синее, а красно-бурое окрашивание, исчезающее при охлаждении. Гликоген для проведения опыта можно получить из тканей мышц или печени только что убитого животного. Содержание гликогена в печени достигает 1–4 % веса, но может достигнуть и 20 %, в мышцах до 2 % от сухого вещества.

В центрифужную пробирку наливают 2 мл 60 % раствора КОН, туда же кладут 1,5–2 г ткани (печени, мышц). Пробирку ставят на час в кипящую водяную баню, часто взбалтывают. Через час пробирку вынимают из бани, охлаждают и добавляют в нее 8–10 мл спирта. Выпадает осадок гликогена. Пробирку ставят в центрифугу и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают. Осадок растворяют в 2 мл 15%-ного раствора КОН и снова добавляют 8–10 мл спирта. Опять центрифугируют и сливают надосадочную жидкость. Осадок растворяют в воде и используют для опытов.

2. Обнаружение молочной кислоты в мышечном экстракте.

Молочная кислота является конечным продуктом гликолиза. Поэтому она всегда присутствует в мышечной ткани. Открытие наличия молочной кислоты основано на образовании лактата железа, обуславливающего зеленовато-желтую окраску.



30–50 г мышц тщательно измельчают ножницами, а затем растирают в ступке, добавляя небольшими порциями (60–100 мл) дистиллированной воды. Полученную взвесь переносят в колбочку, встряхивают в течение 10 мин и затем фильтруют через несколько слоев марли.

Затем в две пробирки наливают по 15–20 мл раствора фенола и добавляют по каплям раствор хлорида железа, образуется фенолят железа и появляется фиолетовая окраска. В одну из пробирок добавляют экстракт из мышечной ткани. Фиолетовая окраска в этой пробирке переходит в зеленовато-желтую за счет образования лактата железа.

3. Определение глюкозы в крови антроновым методом. Метод основан на том, что при взаимодействии глюкозы с концентрированной серной кислотой образуется гидроксиметилфурфурол, который

при нагревании на кипящей водяной бане в кислой среде конденсируется с антроном, образуя продукт зеленого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы.

Для опыта готовят безбелковый центрифугат крови. Для этого в пробирку отмеряют 0,5 мл воды, 0,5 мл крови, 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин. Затем центрифугируют 15 мин при 2500 об/мин и используют для опыта надосадочную жидкость.

Приготовьте три пробирки и подпишите их: опытная (0), стандартная (с), контрольная (к). В опытную прилейте 0,1 мл безбелкового центрифугата крови, в стандартную – 0,1 мл стандартного раствора глюкозы, в контрольную – 0,1 мл дистиллированной воды. Во все три пробирки из бюретки добавьте по 2,5 мл антронового реактива, осторожно перемешайте и поставьте на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения растворов произведите измерения на фотозлектроколориметре при длине волны 590–650 нм (красный светофильтр) против контроля в кювете с толщиной стенок 5 мм.

Содержание глюкозы в исследуемой крови, ммоль/л вычисляют по формуле

$$x = \frac{E_{\text{оп.}} \cdot 5 \cdot 4}{E_{\text{ст.}}},$$

где x – концентрация глюкозы в крови, ммоль/л;

$E_{\text{оп.}}$ – экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст.}}$ – экстинкция стандартной пробы;

5 – концентрация глюкозы в стандартном растворе, ммоль/л;

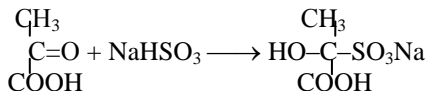
4 – степень разведения крови.

Для пересчета моль/л в мг% результат умножают на 18 (180:10=18).

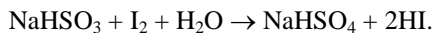
4. Количественное определение пирувиноградной кислоты в моче. Пирувиноградная кислота (ПВК) образуется в основном при биологическом окислении углеводов (так как они являются главным источником энергии в организме) в качестве промежуточного продукта. В норме в плазме крови содержится 0,8–1,5 мг% пирувиноградной кислоты. За сутки с мочой выделяется до 200 мг пирувиноградной кислоты. При авитаминозе и гиповитаминозе V_1 в крови и в других тканях, особенно в нервной, пирувиноградная кислота накапливается в большом количестве. Происходит это потому, что V_1 входит в состав пируватдегидрогеназного комплекса, осуществляющего окисление

ПВК. Накопление ПВК наблюдается при тяжелой мышечной работе паренхиматозных поражениях печени, кетозах.

Принцип метода количественного определения пировиноградной кислоты основан на способности ее образовывать в кислой среде соединения с гидросульфитом (NaHSO_3 или KHSO_3).



Избыток добавленного гидросульфита затем связывают йодом (при этом одновременно окисляются органические соединения мочи).



После этого разрушают гидросульфитное соединение пировиноградной кислоты в щелочной среде (добавкой гидрокарбоната натрия). Количество освободившегося при этом гидросульфита эквивалентно количеству пировиноградной кислоты. Гидросульфит оттитровывают йодом. По количеству пошедшего на титрование йода рассчитывают содержание пировиноградной кислоты.

В колбу вносят 1 мл мочи, 1 мл 0,1 н раствора щавелевой кислоты, 9 мл воды (для осаждения кальция мочи) и 10 капель свежеприготовленного раствора гидросульфита. Все перемешивают и ставят в темное место на 15 мин для удаления избытка гидросульфита. Затем добавляют 2–3 капли раствора крахмала и 0,1 н раствора йода до синего окрашивания. Избыток йода удаляют, добавляя по каплям 0,1 н раствор тиосульфата натрия до обесцвечивания. Избыток тиосульфата удаляют, добавляя по каплям 0,01 н раствор йода до появления синего окрашивания от одной избыточной капли раствора йода. После этого приливают 10 капель насыщенного раствора гидрокарбоната натрия (синяя окраска при этом исчезает). Содержимое колбочки оттитровывают 0,01 н раствором йода до появления синего окрашивания, не исчезающего в течение 20–30 с.

Количество 0,01 н раствора йода, пошедшее на титрование, эквивалентно количеству пировиноградной кислоты. Количество пировиноградной кислоты вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 0,01 \cdot 100}{H},$$

где x – содержание пировиноградной кислоты, мг%;

a – количество (мл) 0,01 н раствора йода, пошедшее на титрование;

0,01 – нормальность раствора йода;

100 – пересчет, мг%;

H – количество мочи (в мл), взятое для анализа (1 мл).

Пересчет в ммоль/л производят, умножая результат в мг% на 0,1135.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. В каких отделах ЖКТ, с участием каких ферментов и до каких продуктов превращаются углеводы? Ответ подтвердить написанием схемы гидролиза крахмала, клетчатки, лактозы, сахарозы.

2. В результате каких реакций происходит полное окисление глюкозы в тканях?

3. В чем особенности течения этих реакций и их значение для организма?

4. Каковы особенности превращения углеводов в ЖКТ у животных с многокамерным желудком?

5. Каким образом можно обнаружить продукты гидролиза углеводов?

6. Зачем следует определять концентрацию глюкозы в крови?

7. Углеводы, их значение для животных, птицы, рыб.

8. Переваривание и всасывание углеводов в ЖКТ.

9. Охарактеризовать ферменты, участвующие в переваривании углеводов.

10. Особенности переваривания углеводов в преджелудках жвачных и толстом отделе кишечника у животных с однокамерным желудком.

11. Виды брожения.

12. Тканевый обмен углеводов: гликолиз, цикл Кребса, пентозофосфатный путь окисления, синтез гликогена, глюконеогенез.

13. Баланс энергии гликолиза, ЦТК, значение этих процессов для организма.

14. Роль печени в углеводном обмене.

15. Регуляция и патология углеводного обмена.

Тестовые задания

1. Дисахарид лактоза образована:

- а) α -глюкозой и α -глюкозой;
б) β -глюкозой и α -глюкозой;
в) β -глюкозой и β -глюкозой.
2. Дисахарид мальтоза образована:
а) α -глюкозой и α -глюкозой;
б) β -глюкозой и α -глюкозой;
в) β -глюкозой и β -глюкозой.
3. Дисахарид целобиоза образована:
а) α -глюкозой и α -глюкозой;
б) β -глюкозой и α -глюкозой;
в) β -глюкозой и β -глюкозой.
4. Дисахарид сахараза образована:
а) α -глюкозой и α -глюкозой;
б) β -глюкозой и α -глюкозой;
в) β -глюкозой и β -глюкозой.
5. Какие ферменты участвуют в переваривании углеводов:
а) амилаза, мальтаза;
б) липаза, пепсин;
в) сахараза, лактаза?
6. Какие ферменты принимают участие в переваривании белков:
а) липаза;
б) пепсин, трипсин;
в) сахараза, лактаза?
7. Какие ферменты принимают участие в переваривании липидов:
а) липаза;
б) пепсин, трипсин;
в) сахараза, лактаза?
8. Что является конечным продуктом гликолиза:
а) пировиноградная кислота;
б) молочная кислота;
в) глюкоуроновая кислота?
9. Определите основное назначение пентозофосфатного пути:
а) окисление глюкозы;
б) снабжение тканей пентозами;
в) образование лактата.
10. Какова главная функция ЦТК:
а) окисление ацетил-КоА с образованием двух молекул CO_2 , моля ГТФ (АТФ), ЗНАДН₂ и ФАДН₂;
б) окисление ацетата до CO_2 и H_2O ;
в) окисление пирувата до CO_2 и H_2O ;

г) окисление лактата до CO_2 и H_2O с выделением энергии?

11. Какие ферменты пищеварительного тракта принимают участие в превращении гликогена и крахмала до молекул глюкозы:

- а) β -амилаза;
- б) α -амилаза, мальтаза;
- в) β -амилаза, β -фруктозидаза?

12. Какие из перечисленных соединений являются конечными продуктами маслянокислого брожения:

- а) бутират; 2CO_2 и 2H_2 ;
- б) бутират и CO_2 ;
- в) бутират и H_2 ?

13. Какое количество АТФ образуется при полном окислении глюкозы:

- а) 70;
- б) 76;
- в) 38?

14. Что является конечным продуктом гликолиза:

- а) пировиноградная кислота;
- б) молочная кислота;
- в) пировиноградная кислота и молочная кислота;
- г) этанол и CO_2 ;
- д) пропионат?

15. При каких условиях происходит ЦТК:

- а) анаэробных;
- б) аэробных;
- в) при любых?

Тема 7. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Цель. Изучить процессы переваривания жиров у различных видов животных. Обнаружить продукты ферментативного гидролиза жиров. Исследовать мочу на содержание кетоновых тел и количественно определить содержание свободных жирных кислот в сыворотке крови.

Липиды – большая группа природных соединений, обладающих гидрофобными свойствами. В нее входят нейтральные жиры и свободные жирные кислоты, фосфолипиды, гликолипиды, воска, терпены, стероиды.

По химическому составу и месту расположения в организме различают резервные (запасные) и структурные (протоплазматические) липиды. Резервные липиды представлены на 90 % смесью триацилглице-

ринов и накапливаются прежде всего в подкожной клетчатке, соединительнотканых капсулах органов и соединительной ткани мышц. В организме выполняют защитную, энергетическую, резервную функции. Состав резервного жира относительно постоянен в пределах одного вида животных и насыщен ровно настолько, чтобы находиться в жидком состоянии при температуре тела.

Протоплазматические липиды представлены в основном фосфолипидами. В комплексе с белком фосфолипиды образуют матрикс практически всех мембран клетки, где составляют до 50 % от всех липидов биологических мембран.

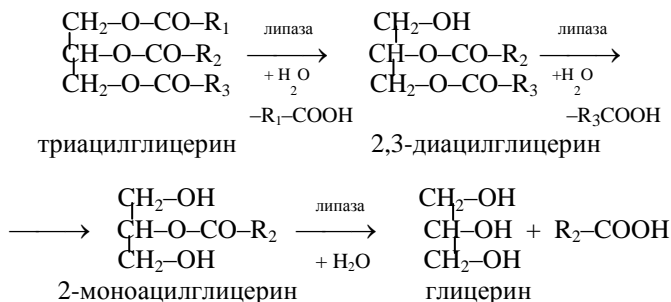
В процессе пищеварения жиры расщепляются до глицерина высших жирных кислот и частично образуются моно-, и диацилглицерины. Всасываясь, часть этих веществ уже в эпителии кишечника ресинтезируется в специфические жиры данного организма. Другая часть поступает в ткани и подвергается биологическому окислению до углекислого газа и воды с выделением энергии. Окисление 1 г жира составляет организму 39 кДж энергии, что в два раза больше, чем окисление 1 г углеводов. Поэтому с энергетической точки зрения жиры превосходят другие питательные соединения.

Лабораторная работа 16. Обмен липидов

Материалы и оборудование. Фенолфталеин, 0,1%-ный спиртовой раствор; гидроксид натрия, 0,1 н и 10%-ный раствор; нитропруссид натрия, 10%-ный раствор; концентрированная уксусная кислота; пероксид водорода, 3%-ный раствор; гидроксид аммония, 25%-ный раствор; хлороформ; медный реактив (состоит из 10 объемов 6,45%-ного раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 9 объемов 1 моль/л раствора триэаноламина и 1 объема моль/л раствора уксусной кислоты); диэтилдитиокарбомат натрия, 0,1%-ный раствор; стандартный раствор пальмитиновой кислоты (25,6 мг доводят хлороформом до объема 100 мл); растительное масло; раствор желчи (1:10); моча животных; сыворотка крови. Колбочки на 30 мл, пробирки с притертыми пробками, центрифужные пробирки, центрифуга, фотоэлектроколориметр, пипетки, штативы, стеклянные палочки.

1. Ферментативный гидролиз жира. Жиры, попадая в желудочно-кишечный тракт животных, расщепляются в конечном итоге до глицерина и высших жирных кислот при участии панкреатических и кишечных липаз (оптимум pH 7,0–8,5). Но прежде чем подвергнуться гидролитическому расщеплению, жиры эмульгируются, образуя мелкие капельки, слипанию которых препятствуют желчные кислоты (холевая,

дезоксихолевая, таурохолевая, литохолевая), выделяемые в составе желчи, соли жирных кислот, углекислый газ, образующийся в просвете кишки. Помимо эмульгирования жиров, желчные кислоты активизируют липазу и способствуют всасыванию жирных кислот, образуя с ними растворимые комплексы. В желудочном соке содержится желудочная липаза (оптимум pH 4,0–5,0), способная гидролизовать эмульгированный жир молока, она активна у молодых животных. Гидролиз триацилглицеринов идет поэтапно:



Вначале отщепляется одна из крайних кислот и образуется диацилглицерин, затем отщепляется вторая крайняя кислота с образованием моноацилглицерина. Связи 1 и 3 гидролизуются быстро, а потом идет медленно гидролиз 2-моноголицерина.

Порядок выполнения работы. Обнаружить свободные жирные кислоты, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза жира, можно титрованием щелочью в присутствии фенолфталеина.

В четыре колбочки вносят компоненты согласно таблицы.

Компоненты смеси, мл	№ колбочки			
	1	2	3	4
Растительное масло	2	2	2	2
Раствор желчи	–	–	6	6
Дистиллированная вода	6	6	–	–
Экстракт липазы	2	–	2	–
Экстракт липазы (прокипяченной)	–	2	–	–

Встряхивают содержимое всех проб, предварительно закрыв их пробками. Затем прибавляют во все пробы по 2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором щелочи до появления устойчивого в течение одной минуты слабо-розового окрашивания. После титрования колбочки ставят в термостат при температуре 37–40 °С на 50 мин.

По окончании времени термостатирования повторно титруют содержимое тех колбочек, где окрашивание исчезло.

Первое титрование производят, чтобы связать свободные жирные кислоты, образующиеся при хранении жира. Результаты второго титрования записывают в тетрадь и по ним судят о наличии жирных кислот, образовавшихся при гидролизе жира в различных условиях. Активность липазы определяется в мкмольх щелочи, израсходованной на титрование жирных кислот, образовавшихся под действием липазы за 1 ч. Пересчет мл 0,1 н NaOH на мкмоль производят исходя из того, что в 1000 мл 0,1 н раствора NaOH содержится 0,1 г NaOH, или 100 мг NaOH. Составляем пропорцию:

$$\begin{aligned} 1000 \text{ мл} &- 100 \text{ мг NaOH} \\ A \text{ мл} &- x \text{ мг NaOH}, \end{aligned}$$

где A – это количество щелочи, израсходованной на титрование пробы.

Например: на титрование пробы в 1 колбе затрачено 1,5 мл 0,1 н NaOH, тогда

$$x = \frac{1,5 \cdot 100}{1000} = 0,15 \text{ мг}.$$

0,15 мг или 150 мкг, что соответствует 150 мкмоль в единицах системы СИ.

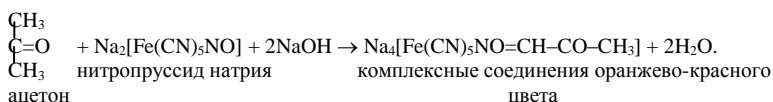
Перенести в тетрадь таблицу и оформить выводы.

2. Качественные реакции на кетоновые тела. В результате окисления различных веществ и прежде всего жирных кислот в организме образуются промежуточные соединения, называемые кетоновыми телами. К кетоновым телам относят ацетон, β -оксимасляную и ацетоуксусную кислоты. Эти соединения образуются в основном в печени и используются как энергетический материал периферическими тканями. Концентрация кетоновых тел в крови возрастает при длительной мышечной работе, так как в этом состоянии основным источником энергии служат жирные кислоты. При определенных условиях (голодание, недостаток сухих веществ и углеводов в рационе, резкой смене рациона, атонии преджелудков, сахарном диабете и т. д.) организм теряет способность быстро утилизировать кетоновые тела (кетоз), что приводит к значительному накоплению кетоновых тел в крови (кетонемия) и моче (кетонурия). В норме концентрация кетоновых тел в крови составляет 0,2–0,6 ммоль/л. Кетозы сопровождаются увеличени-

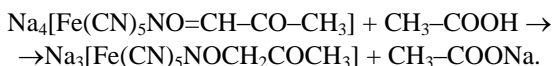
ем концентрации кетоновых тел в крови, моче, молоке в десятки и сотни раз. Выявление повышенного содержания кетоновых тел в моче и крови служит показателем нарушения обмена липидов, углеводов и диагностическим признаком ряда заболеваний.

Реакции обнаружения ацетона, ацетоуксусной и β -оксимасляной кислот основаны на взаимодействии этих веществ с нитропруссидом натрия с образованием окрашенных комплексных соединений.

3. Проба на ацетон и ацетоуксусную кислоту. Ацетон и ацетоуксусная кислота взаимодействуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде с образованием комплексного соединения оранжево-красного цвета.



При добавлении к смеси концентрированной уксусной кислоты образуется соединение, окрашенное в темно-красный цвет



Реакция не является специфичной для ацетона и ацетоуксусной кислоты, так как креатинин мочи реагирует с нитропруссидом и дает аналогичное окрашивание, но в этом случае при добавлении концентрированной уксусной кислоты жидкость не окрашивается в темно-красный цвет.

В пробирку вносят 5 мл мочи, приливают 1 мл 10 % раствора NaOH и 1 мл нитропруссида натрия. Содержимое пробирки перемешивают. При наличии ацетона или ацетоуксусной кислоты в растворе наблюдают оранжево-красный цвет. Добавление 2 мл концентрированной уксусной кислоты приводит к изменению окраски до темно-красной и подтверждает наличие в моче ацетона и ацетоуксусной кислоты.

4. Проба на β -оксимасляную кислоту. Мочу предварительно освобождают от ацетона и ацетоуксусной кислоты. Для этого в химический стаканчик наливают 10 мл мочи, 10 мл воды и несколько капель концентрированной уксусной кислоты. Содержимое стакана наполовину упаривают, вливают 1 мл 3%-ного пероксида водорода, опять нагревают в течение 1 мин и охлаждают. В результате такой об-

работки происходит окисление β -оксимасляной кислоты. Затем в стаканчик вносят 10 капель 10%-ного раствора нитроприсида натрия и 2 мл 25%-ного раствора NH_4OH . При наличии в моче β -оксимасляной кислоты через некоторое время в растворе образуется кольцо пурпурного цвета.

Нужное отметить в выводе.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. В чем состоят особенности переваривания и всасывания жиров у различных видов животных и рыб?
2. Какие вещества можно обнаружить в моче при нарушении тканевого обмена липидов?
3. Протекание каких процессов в организме может привести к понижению или повышению концентрации свободных жирных кислот в крови?
4. Напишите схему ресинтеза пальмитолеостеарина в слизистой кишечника.
5. Биологическое значение липидов.
6. Переваривание липидов в ЖКТ.
7. Ферменты, участвующие в переваривании липидов, и роль желчных кислот в этом процессе.
8. Внутриклеточный обмен липидов: окисление глицерина и жирных кислот, особенности окисления жирных кислот, биосинтез жирных кислот и триацетилглицеринов, метаболизм орахидоновой кислоты, обмен фосфолипидов, холестерина.
9. Регуляция и патология обмена липидов.
10. Биохимические причины возникновения кетозов.

Тестовые задания

1. Какие функции выполняют липиды:

- а) являются структурными компонентами биомембран;
- б) служат формой, в которой запасается метоболическое топливо;
- в) служат формой транспортировки топлива;
- г) несут генетическую информацию;
- д) выполняют защитную функцию?

2. Какие соединения относятся к липидам:

- а) фосфатиды;
- б) кефалины;

- в) нейтральные жиры;
- г) холестерол;
- д) гексуроновые кислоты?

3. *Какие свойства характерны для жирных кислот, входящих в состав липидов высших растений и животных:*

- а) наличие четного числа атомов углерода;
- б) преобладание ненасыщенных жирных кислот;
- в) более низкая температура плавления ненасыщенных жирных кислот;
- г) наличие альдегидных или кетонных групп;
- д) оптическая плотность?

4. *Какие соединения являются фосфолипидами:*

- а) кефалин;
- б) лецитин;
- в) фосфотидилсерин;
- г) спермацет;
- д) ланолин?

5. *Какой из указанных показателей характеризует степень ненасыщенности жирных кислот:*

- а) эфирное число;
- б) йодное число;
- в) число омыления;
- г) кислотное число?

6. *Какой из указанных показателей дает возможность определить содержание свободных жирных кислот в нейтральных жирах:*

- а) число омыления;
- б) йодное число;
- в) кислотное число;
- г) эфирное число?

7. *Какой процесс называется омылением жиров:*

- а) ферментативный гидролиз;
- б) щелочной гидролиз;
- в) гидрогенизация;
- г) реакция с ацетатом свинца;
- д) эмульгирование жиров?

8. *По какому пути идет (преимущественно) распад высших жирных кислот:*

- а) декарбоксилирования;
- б) восстановления;

- в) ω -окисления;
- г) β -окисления;
- д) α -окисления?

8. В каких клеточных компонентах происходит окисление жирных кислот:

- а) ядре;
- б) митохондриях;
- в) рибосомах;
- г) микросомах;
- д) цитоплазме?

9. Какое низкомолекулярное азотистое основание принимает участие в переносе остатка жирной кислоты через мембрану митохондрий:

- а) карнозин;
- б) карнитин;
- в) креатинин;
- г) анзерин?

10. Как называются ферменты, катализирующие образование КоА-эфиров жирных кислот:

- а) ацилтрансфераза;
- б) ацетил-КоА-синтетаза;
- в) тиокеназа жирных кислот;
- г) ацетил-КоА-дегидрогеназа;
- д) β -кетотиолаза?

11. Какие реакции входят в цикл β -окисления жирных кислот:

- а) активация жирных кислот за счет КоА-SH (с участием АТФ);
- б) декарбоксилирование;
- в) дегидрирование;
- г) дегидротация;
- д) гидротация?

12. Какие пути окисления жирных кислот, кроме β -окисления происходят в живых клетках:

- а) окислительное фосфорилирование;
- б) α -окисления;
- в) ω -окисления?

13. Какие ферменты принимают участие в одном цикле β -окисления жирных кислот:

- а) КоА-SH;
- б) ФАД;

- в) НАД⁺;
- г) кобаламин;
- д) тиаминпирофосфат?

14. В какой части клетки идет синтез высших жирных кислот:

- а) ядре;
- б) митохондри;
- в) эндоплазматическом ретикуле цитоплазмы;
- г) микросоме;
- д) рибосоме?

15. Какое соединение является конечным продуктом распада высших жирных кислот:

- а) α -глицеролфосфат;
- б) β -гидроксибутират;
- в) ацетил-КоА;
- г) метилмалонил-КоА;
- д) ацил-КоА?

Тема 8. ОБМЕН БЕЛКОВ

Цель. Провести ферментативный гидролиз белка и обнаружить продукты гидролиза. Изучить особенности переваривания белка у различных видов животных и рыб. Познакомиться с методами количественного определения веществ белкового обмена.

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

Белки являются основной составной частью протоплазмы. Обмен белков в общем обмене веществ занимает ведущее место.

Белки обеспечивают воспроизводство основных структурных элементов клеток, тканей и органов, выполняют регуляторную, каталитическую, транспортную, защитную и энергетическую функции.

Питательная ценность белка для животных организмов определяется аминокислотным составом. Белок считается полноценным, если содержит все жизненноважные аминокислоты (незаменимые). Одного грамма такого белка достаточно для восстановления одного грамма тканевого белка.

Белок, поступая в составе пищи в организм, расщепляется в ЖКТ при участии группы протеолитических ферментов до смеси аминокислот. Аминокислоты всасываются и поступают вначале в печень. Часть аминокислот используется клетками печени для синтеза различных белков, а также превращения в гликоген (гликогенные кислоты) и липидов (кетогенные кислоты). Часть аминокислот разносится кровью дальше к различным органам и тканям и используется для синтеза специфических тканевых белков. Только незначительная часть аминокислот используется как энергетический материал.

Тканевое превращение аминокислот включает синтез заменимых аминокислот (в реакциях восстановительного аминирования и переаминирования), а из них далее пептидов и белков организма и расщепление аминокислот, образовавшихся в результате гидролиза устаревших биомолекул белка. Окисление аминокислот происходит вначале в реакциях декарбоксилирования и дезаминирования и заканчивается в цикле трикарбоновых кислот. В процессе декарбоксилирования образуются биогенные амины – вещества, обладающие сильным физиоло-

гическим действием. Поэтому тканевое декарбоксилирование аминокислот носит избирательный характер. Конечными продуктами распада аминокислот в организме являются: аммиак, мочевая кислота, мочевина, углекислый газ и вода.

Лабораторная работа 17. **Определение активности протеаз (по методу Ансона)**

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

Метод определения активности протеаз основан на определении тирозина (или тирозинсодержащих пептидов), освобождающихся при гидролизе раствора стандартного белка (гемоглобина, казеина, альбумина) протеазами (пептидгидролазами). Оставшийся нерасщепленный белок осаждают раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и фильтруют. С фильтратом проводят цветную реакцию с реактивом Фолина

и оптическую плотность полученного раствора измеряют при 280 нм на ФЭКе .

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

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

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

Принцип определения, порядок работы, результат анализа записывают и делают вывод об активности ферментного препарата.

Лабораторная работа 18. Обмен белков

Материалы и оборудование. Соляная кислота, 0,2%-ный и 1%-ный раствор; желудочный сок или 0,1%-ный раствор пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте; гидрокарбонат натрия, 1%-ный раствор; моноиодук-

сусная кислота, 0,002М в 0,1%-ом растворе гидрокарбоната калия; гидроксид натрия 10%-ный раствор; сульфат меди, 5%-ный раствор; этиловый спирт, 75%-ный раствор; нингидрин, 1%-ный раствор в 95%-ном ацетоне; трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор; насыщенный раствор гидроксида калия; салициловый альдегид, 2%-ный раствор; фибрин или коагулированный яичный белок; сухой размолотый биологический материал (ткань животного, фиксированная этанолом при нагревании и переведенная в сухой порошок), мышечная ткань, сыворотка крови.

Пробирки, пипетки на 1 и 5 мл, штативы, ступки, воронки, складчатые фильтры, чашки для выпаривания, термостат, водяная баня, рефрактометр.

1. Переваривание белков пепсином. В желудочно-кишечном тракте животных расщепление белка до смеси аминокислот происходит при участии группы протеолитических ферментов (протеаз) по схеме:

Схема ферментативного гидролиза белка



В реальных условиях на любом этапе гидролиза может образоваться часть свободных аминокислот, а часть непереважившихся белков и пептидов – перейти в толстый отдел кишечника без изменения. Протеолитические ферменты синтезируются в неактивной форме. В активное состояние пепсин приводит соляная кислота, трипсинэнтерокиназа (фермент слизистой кишечника), химотрипсин активируется активной формой трипсина.

Протеолитические ферменты расщепляют пептидные связи специфично. Пепсин производит гидролиз связей, образованных с одной стороны ароматическими, с другой – дикарбоновыми аминокислотами. Как правило, эти связи расположены далеко внутри полипептидной цепи.

Трипсин расщепляет пептидные связи, образованные между карбоксильной группой аргинина (лизина) и любой другой кислоты. Химотрипсин катализирует связи, образованные карбоксильной группой ароматических аминокислот и аминогруппой любой другой кислоты. Амино- и карбоксипептидазы отщепляют свободные аминокислоты с соответствующего конца пептидной цепи.

Действию пепсина поддаются почти все белки, но с трудом перевариваются белки соединительной ткани – коллаген и эластин. Кератины, муцин, мукоиды совсем не перевариваются. Это их свойство защищает стенки желудка от самопереваривания.

Порядок выполнения работы. Нумеруют 4 пробирки и вносят в 1-ю – 3–4 мл 0,2%-ного раствора соляной кислоты; во 2-ю – 3–4 мл желудочного сока (или раствора пепсина в HCl); в 3-ю – 3–4 мл раствора пепсина, нейтрализованного предварительно до слабощелочной реакции раствором соды; в 4-ю – 3–4 мл предварительно прокипяченного раствора пепсина. Затем во все 4 пробирки вносят равные по объему кусочки фибрина или коагулированного яичного белка. Все пробирки ставят в термостат на 45–60 мин при 37–40 °С. После термостатирования проделывают биуретовую реакцию. Для этого во все пробирки вносят по 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 2–3 капли 5%-ного раствора сульфата меди, все встряхивают и наблюдают характерное окрашивание. Биуретовую реакцию способны давать вещества, содержащие не менее двух пептидных связей. В щелочной среде белок реагирует с ионами меди с образованием биуретового комплекса фиолетового цвета. Интенсивность окраски зависит от концентрации белка. Цвет комплекса зависит от длины пептидной цепи, тетрапептиды и более длинные цепи образуют комплекс красного цвета, трипептиды – фиолетовый, дипептиды – синий.

Выводы записать в тетрадь.

2. Выделение свободных аминокислот из биологического материала. Свободные аминокислоты извлекают из биологического материала 75–80%-ным водным раствором этанола. Аминокислоты в вытяжке из биологического материала обнаруживают реакцией с нингидрином.

При нагревании (до 70 °С) α -аминокислоты окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию с образованием аммиака, углекислого газа и альдегида. Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и с молеку-

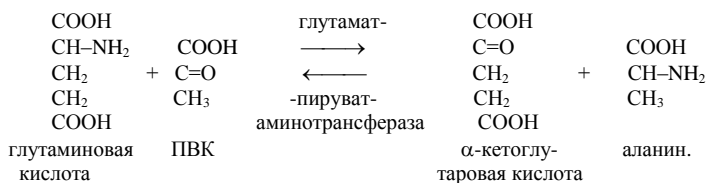
лой окисленного нингидрина. В результате образуется соединение, енольная форма которого окрашена в сине-фиолетовый цвет.

В ступку помещают 2 г размолотого сухого биологического материала и заливают 10 мл 75%-ного раствора этилового спирта, нагретого до температуры 60–70 °С на водяной бане. Полученную смесь тщательно растирают в течение 15 мин и фильтруют через вставленный в воронку складчатый бумажный фильтр в чашку для выпаривания, используя ее в качестве приемника. Чашку помещают на кипящую водяную баню и полностью выпаривают спирт. Полученный сухой остаток растворяют в 1 мл раствора соляной кислоты и тщательно его растирают стеклянной палочкой в течение 10–15 мин. Для обнаружения аминокислот в вытяжке к 5 каплям смеси добавляют 2 мл дистиллированной воды (разводят вытяжку) и 3–4 капли раствора нингидрина. Полученную смесь тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане при температуре 70 °С в течение 5 мин. Появляется сине-фиолетовая окраска, свидетельствующая о наличии в пробе α -аминокислот.

Если плотность окраски вытяжки с нингидрином измерить с помощью колориметра и сопоставить с плотностью окраски нингидрином смеси α -аминокислот известной концентрации, то можно рассчитать концентрацию α -аминокислот в исследуемой пробе.

3. Переаминирование между глутаминовой и пировиноградной кислотой. Пути образования заменимых аминокислот в организме разнообразны. Одноосновные аминокислоты могут образовываться путем декарбоксилирования двух основных. Путем восстановительного аминирования α -кетокислот синтезируются преимущественно аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Другие аминокислоты образуются в результате реакций переаминирования или трансаминирования. В реакциях переаминирования происходит перенос аминогруппы между аминокислотами и α -кетокислотами без промежуточного образования аммиака. В обмене белка переаминирование играет центральную роль. Это реакция распада одних аминокислот и синтеза других. Все аминокислоты участвуют в этой реакции и именно реакции переаминирования создают необходимый организму набор аминокислот. Наиболее интенсивно процесс протекает при участии дикарбоновых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) и соответствующих им α -кетокислот. Катализируют реакции переаминирования аминотрансферазы (трансминазы), коферментом которых выступает фосфопиридоксаль (B_6).

Изучить процесс переаминирования можно на примере переаминирования глутаминовой и пировиноградной кислот при участии фермента, содержащегося в мышцах. Об интенсивности реакции можно судить по убыли в результате переаминирования пировиноградной кислоты, которая с салициловым альдегидом дает оранжевое окрашивание. В качестве источника фермента используют мышечный гомогенат. Готовят его после подготовки реакционных смесей.



Мышечную ткань измельчают ножницами в фарфоровой чашке и растирают с пятикратным объемом 0,1%-ного гидрокарбоната калия (лучше провести гомогенизацию в специальном гомогенизаторе). Полученный гомогенат фильтруют через двойной слой марли, отжимают и используют для опыта.

Реакционные смеси для опыта готовят в широких пробирках по схеме, внося гомогенат в последнюю очередь.

Схема подготовки реакционных смесей

№ пробы	КНСО ₃ с СН ₂ ІСООН, мл	Глутаминовая кислота, мл	Пировиноградная кислота, мл	Вода, мл	Гомогенат, мл
1	0,5	0,5	0,5	—	1,5
2	0,5	0,5	0,5	—	1,5
3	0,5	—	0,5	0,5	1,5

Раствор гидрокарбоната калия вносят для создания оптимального рН. Моноидуксусную кислоту вносят для предотвращения гликолиза.

Пробу № 1 на инкубацию не ставят, мышечную кашицу помещают только после внесения 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы № 2 и 3 после внесения гомогената перемешивают, ставят на инкубацию в термостат на 60–90 мин при температуре 37–40 °С, периодически встряхивая (через 5–10 мин). По окончании инкубации для удаления белка во 2-ю и 3-ю пробы вносят 1 мл трихлоруксусной кислоты и через 10 мин все три пробы фильтруют в отдельные пробирки.

Отбирают по 1 мл безбелкового фильтрата из всех трех проб и в каждую вносят 1 мл насыщенного раствора гидроксида калия и 0,5 мл 2%-ного раствора салицилового альдегида. Содержимое пробирок перемешивают и помещают на 10 мин в водяную баню (37–38 °С) для развития окраски.

Сравнивают окраску во всех трех пробах и делают выводы об интенсивности процесса переаминирования.

Лабораторная работа 19.

Переваривание белков ферментами поджелудочной железы

Материалы и оборудование. 2%-ный раствор панкреатина в 0,5%-ном растворе карбоната натрия или глицериновая вытяжка поджелудочной железы; фибрин или денатурированный белок куриного яйца; уксусная кислота, 1%-ный раствор; синий лакмус; штатив с пробирками; термостат (37–40 °С).

Переваривание белков в двенадцатиперстной кишке происходит под действием ферментов поджелудочной железы трипсина и химотрипсина, которые действуют как на белки, так и на продукты расщепления белков – полипептиды, расщепляя их до коротких пептидов и небольшого количества свободных аминокислот. В качестве источника ферментов в опыте используют 2%-ный раствор панкреатина в 0,5%-ном растворе карбоната натрия или глицериновую вытяжку из поджелудочной железы. В качестве субстрата – кусочки фибрина или яичного белка.

Порядок выполнения работы. В 3 пробирки наливают по 1 мл раствора панкреатина или вытяжки поджелудочной железы. Содержимое 1-й пробирки кипятят 2 мин и охлаждают под струей холодной воды. Содержимое 2-й пробирки нейтрализуют 1%-ным раствором уксусной кислоты до кислой реакции на лакмус.

Во все 3 пробирки опускают по кусочку фибрина или яичного белка и помещают их в термостат при 37–40 °С.

Через 40–60 мин пробирки вынимают, перемешивают, отмечают видимые изменения и прodelьвают биуретовую реакцию со всеми пробирками.

Полученные результаты вносят в таблицу и делают выводы.

№ пробы	Субстрат	Фермент	Реакция среды	Видимые изменения	Биуретовая проба	Выводы

Лабораторная работа 20. Анализ желудочного сока

Материалы и оборудование. Фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор. Интервал перехода окраски при рН 8,2–10,0 стабилен при хранении при комнатной температуре; 4-диметиламиноазобензол (метиловый желтый, диметиловый желтый), 0,5%-ный спиртовой раствор. Интервал перехода окраски при рН 2,9–4,0 стабилен при хранении при комнатной температуре; ализаринсульфоновокислый натрий (ализариновый красный), 1%-ный водный раствор. Интервал перехода окраски при рН 4,3–6,3 стабилен при хранении при комнатной температуре; пепсин; гидроксид натрия, 0,1 н раствор; пипетки на 5 мл, конические колбы на 50 мл, бюретки на 25, 50 или 100 мл.

Путем последовательного действия протеолитических ферментов белки лишаются видовой и тканевой специфичности. Примерно 95–97 % белков пищи всасывается в виде свободных аминокислот. Ферментный аппарат осуществляет поэтапное, избирательное расщепление пептидных связей. Превращение профермента пепсиногена в активный фермент пепсин происходит в желудке и протекает в присутствии соляной кислоты.

Кислоты желудочного содержимого оттитровывают 0,1 н раствором гидроксида натрия. Для установления момента полного оттитрования свободной соляной кислоты и других кислореагирующих соединений применяют различные индикаторы с разными зонами перехода окраски. Титруют на белом фоне.

Порядок выполнения работы. В колбу наливают 5 мл профильтрованного желудочного содержимого, добавляют 1–2 капли 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина, 1–2 капли 0,5%-ного спиртового раствора диметиламиноазобензола и титруют при постоянном помешивании 0,1 н раствором гидроксида натрия до перехода первоначального красного цвета в желто-розовый («цвет семги»). Количество щелочи, израсходованной на титрование, соответствует количеству свободной соляной кислоты и выявляется индикатором диметиламиноазобензолом.

Не доводя уровень щелочи в бюретке до первоначального, продолжают титрование до перехода окраски в стойкий красный цвет. Общее количество щелочи, считая от начального уровня ее в бюретке, соответствует общей кислотности и выявляется индикатором фенолфталеином.

В другую колбу отмеривают 5 мл желудочного содержимого, до-

бавляют 1–2 капли 1%-ного водного раствора ализаринсульфоново-кислого натрия и титруют при постоянном помешивании до перехода первоначальной желтой окраски в фиолетовую. Количество щелочи, использованной на титрование, соответствует сумме всех веществ, дающих кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты, и выявляется индикатором ализаринсульфоновокислым натрием. В каждой порции извлеченного желудочного содержимого определяют свободную соляную кислоту, общую кислотность и в случае необходимости связанную соляную кислоту.

Результаты титрования выражают в мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, затраченных на нейтрализацию свободной соляной кислоты и других кислореагирующих соединений в 100 мл желудочного содержимого (условные титрационные единицы). Так как для титрования берут 5 мл желудочного содержимого, а расчет ведут на 100 мл, то количество потраченной щелочи умножают на 20. Одна условная титрационная единица соответствует концентрации соляной кислоты, равной 1 ммоль/л.

Пример расчета

Первая порция (первая колба):

1,5 мл 0,1 н NaOH (желто-розовый цвет).

Свободная соляная кислота: $1,5 \cdot 20 = 30$ титр. ед. (30 ммоль/л).

2,6 мл 0,1 н NaOH (красный цвет).

Общая кислотность: $2,6 \cdot 20 = 52$ титр. ед. (52 ммоль/л).

Вторая порция (вторая колба): 2 мл 0,1 н NaOH (фиолетовый цвет).

Все вещества, дающие кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты: $2,0 \cdot 20 = 40$ титр. ед. (40 ммоль/л).

Связанная соляная кислота: $52 - 40 = 12$ титр. ед. (12 ммоль/л).

Нормальные величины: свободная соляная кислота – 20–40 титр. ед. (20–40 ммоль/л), общая кислотность – 40–60 титр. ед. (40–60 ммоль/л), связанная соляная кислота – 4–20 титр. ед. (4–20 ммоль/л).

Результаты титрования записать в таблицу.

Количество жидкости, взятой для титрования	Количество 0,1 н раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование, мл			Количество титрационных единиц, ммоль/л		
	до желто-розового цвета	до красного цвета	до фиолетового цвета	свободная соляная кислота	общая кислотность	связанная соляная кислота

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Каково строение и биологическое назначение белков в живом организме?
2. От чего зависит питательная ценность белка?
3. В каких отделах ЖКТ и при участии каких ферментов происходит гидролиз белка?
4. В результате каких реакций происходит синтез и распад аминокислот в тканях? Подтвердите свой ответ написанием реакций декарбоксилирования и дезаминирования конкретной аминокислоты.
5. Существует ли взаимосвязь между процессами расщепления и синтеза аминокислот и в чем она проявляется?
6. Какими известными вам методами можно обнаружить и определить содержание аминокислот и белка в биологическом материале?
7. Биологическое значение и классификация белков.
8. Баланс азота и его разновидности.
9. Пищевая ценность белка, понятие незаменимых аминокислот.
10. Переваривание белка в ЖКТ, охарактеризовать ферменты, участвующие в гидролизе белка корма.
11. Особенности переваривания белка корма в преджелудках жвачных и в толстом отделе кишечника.
12. Механизм обезвреживания ядовитых продуктов, образующихся в процессе гниения белка.
13. Биосинтез аминокислот в организме.
14. Особенности обмена отдельных аминокислот.
15. Пути расщепления аминокислот в тканях (дезаминирование, декарбоксилирование), превращение углеродных остатков аминокислот.
16. Пути обезвреживания аммиака в организме.
17. Основные этапы синтеза белка.
18. Особенности обмена сложных белков (нуклеопротеидов, хромопротеидов).
19. Регуляция и патология обмена белков.
20. Взаимосвязь белкового, углеводного и жирового обменов.

Тестовые задания

1. Какие аминокислоты относятся к гетероциклическим:

- а) глицин;
- б) лейцин;
- в) гистидин;

- г) аланин;
д) триптофан?
2. В состав каких аминокислот входит гидроксильная группа:
- а) аланин;
б) тирозин;
в) треонин;
г) метионин;
д) серин?
3. Какие аминокислоты содержат серу:
- а) глицин;
б) метионин;
в) аланин;
г) цистеин;
д) цистин?
4. Какие из указанных соединений являются аминокислотами:
- а) креатин;
б) серин;
в) глицин;
г) ансерин;
д) изолейцин?
5. Какой заряд имеет белок в изоэлектрической точке:
- а) положительный;
б) отрицательный;
в) электрически нейтрален?
6. Какие свойства характерны для белков:
- а) амфотерность;
б) отсутствие способности кристаллизоваться;
в) отсутствие способности вращать плоскость поляризованного луча;
г) термостабильность?
7. Какие вещества дают биуретовую реакцию:
- а) все аминокислоты;
б) глутатион;
в) дипептиды;
г) трипептиды и белки?
8. Под влиянием каких ферментов происходит расщепление белков в желудке:
- а) пепсиногена;
б) трипсина;
в) пепсина;
г) энтерокиназы;

д) химозина?

9. *Какие кислоты образуются при восстановительном пути дезаминирования аминокислот:*

- а) α -гидроксикислоты;
- б) предельные кислоты;
- в) непредельные кислоты;
- г) α -кетокислоты?

10. *Какие продукты образуются при трансминировании между аланином и α -кетоглутаровой кислотой:*

- а) глутаминовая кислота и пировиноградная;
- б) аспарагиновая кислота и пировиноградная;
- в) молочная кислота и пировиноградная;
- г) глутаминовая кислота и молочная?

11. *При декарбоксилировании какой аминокислоты образуется триптомин:*

- а) аланин;
- б) триптофан;
- в) тирозин;
- г) серин?

12. *Какие аминокислоты являются незаменимыми для животных:*

- а) аланин;
- б) серин;
- в) лизин;
- г) глутамат;
- д) валин?

13. *Какое соединение является конечным продуктом азотистого обмена у птиц:*

- а) креатин;
- б) мочевины, NH_3 и мочевины; и мочевины;
- г) мочевины?

14. *Какой главный конечный продукт азотистого обмена у млекопитающих:*

- а) мочевины;
- б) мочевины;
- в) мочевины и аммиака?

15. *Что образуется при декарбоксилации α -аланина:*

- а) амина;
- б) этиламина;
- в) имина?

Тема 9. ОБМЕН МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Цель. Познакомиться с методами исследования минерального обмена. Изучить роль отдельных химических элементов в обмене веществ.

В организме животных и сельскохозяйственной птицы содержится до 70 химических элементов, что составляет 2–5 % от массы тела. Поступают они в организм в составе пищи и потребляемых жидкостей. В процессе пищеварения минеральные вещества усваиваются в основном в тонком отделе кишечника, часть может всасываться в желудке (преджелудках) и толстом отделе кишечника. Путем пассивной диффузии всасывается небольшая доля ионов, основная масса солей в виде ионов и катионов переносится активно с затратой энергии и контролируется нейрогуморальным путем.

Минеральные вещества поступают в организм с пищей и водой. Основную часть этих соединений составляют хлористые, сернокислые, фосфорнокислые и углекислые соли калия, натрия, магния и кальция. В небольших количествах (мг, мкг) поступают йод, бром, фтор, железо, медь, марганец, цинк, кобальт, молибден и другие микроэлементы.

Минеральные вещества в организме содержатся в двух состояниях: в виде свободных ионов и в связанной с органическими веществами форме (белками, ферментами, витаминами). Что касается микроэлементов, то все они находятся в связанном состоянии (кобальт – в витамине В₁₂, медь – в тирозиназе и церулоплазмине, цинк – в карбоангидразе, в инсулине). Минеральные вещества связываются с органическими молекулами ковалентными (йод – в тиреоглобулине, в тироксине), электростатическими (магний и кальций – с различными ферментами) и координационными связями (железо – в гемопротеидах).

В организме минеральные вещества избирательно откладываются в различных органах и тканях и извлекаются по мере необходимости, благодаря чему регулируется и поддерживается относительно постоянный состав тканей и жидкостей организма. Так, в костной ткани сосредоточено до 99 % всех минеральных веществ организма прежде всего это катионы кальция и магния в виде апатитов, фосфатов, карбонатов, а также фтор, стронций, цезий, алюминий, свинец, олово и другие микроэлементы. В печени концентрируется железо, медь, кобальт, марганец, никель, молибден, селен. Кожа и мышцы накапливают натрий и калий.

В зависимости от содержания в организме различают группу макроэлементов и микроэлементов. К макроэлементам относят элементы, содержание которых превышает сотые доли процента (фосфор, кальций, калий, магний, сера, хлор, натрий). Содержание микроэлементов в организме исчисляется тысячными и десятитысячными долями процентов (железо, кобальт, цинк, марганец, йод, бром, никель и др.). Как правило, в организме больше тех элементов, которые образуют в воде растворимые соединения, нежели тех, что не образуют в воде растворимых соединений.

Минеральные вещества присутствуют в организме в различных формах:

1) прочно связанные с органическими веществами (S – в составе белка, P – в нуклеиновых кислотах, Fe – в гемоглобине, Zn и Cu – в молекулах ферментов);

2) в форме нерастворимых отложений (Ca и P в костной ткани);

3) в растворенном состоянии в биологических жидкостях и цитозоле клеток (катионы K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , анионы Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}).

Основная роль минеральных веществ в организме заключается в регуляции кислотно-щелочного равновесия, проницаемости мембран, поддержании на постоянном уровне осмотического давления клеток, крови, лимфы. Минеральные вещества участвуют в построении и формировании молекул белка и других соединений, изменяют активность ферментов, отвечают за передачу нервного импульса.

Характерной особенностью обмена минеральных элементов является антагонизм, синергизм их действия и взаимозаменяемость. Так, там, где ионы K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} выступают активаторами ферментов, ионы Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu соответственно – ингибиторами. Изменения степени окисления элемента в процессе его обмена сопровождается резкой сменой его физиологической активности. Так, Cr^{2+} стимулирует белковый, углеводный и жировой обмен в организме, а Cr^{6+} блокирует окислительное фосфорилирование. Всасывание Fe^{2+} происходит легче, чем Fe^{3+} .

Минеральные вещества в организме, как и все другие вещества, постоянно обновляются, часть выводится в составе продукции (с 1 литром молока выводится 1 г Ca, с одним яйцом весом 56 г выводится 2 г кальция и 0,12 г фосфора).

Для организма важно не только количество поступающих отдельных химических элементов, но и их соотношения (кальций и фосфор 2:1, натрий : калий : кальций 1:1:1,5). Нарушение поступления количе-

ства и соотношения отдельных элементов в кормах приведет к дисбалансу этих элементов в организме и проявится различными заболеваниями.

Лабораторная работа 21. Определение кальция и фосфора

Материалы и оборудование. NaOH, 10%-ный раствор; мурексид, 1%-ный раствор; трилон Б, 0,005M раствор (1,84 г сухого вещества, доведенного дистиллированной водой до 1 л); ТХУ, 10%-ный раствор; молибдат аммония (5 г молибденово-кислого аммония доводят до 100 мл 5 н серной кислотой); 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты в 0,1 н растворе HCl; стандартные растворы фосфора: а) основной – 4,394 KН₂Р₀₄, высушенного до постоянного веса и доведенного дистиллированной водой до 1 л, в 1 мл такого раствора содержится 1 мг фосфора; б) рабочий – 1 мл основного стандартного раствора доводят до 50 мл, в 1 мл данного раствора содержится 0,02 мг фосфора; хлорид натрия, 0,4%-ный раствор; ализариновый красный, 1%-ный раствор водный; HCl, 0,01 н раствор из фиксанала; сыворотка крови; колбочки, цилиндры, пробирки, центрифужные пробирки, стеклянные палочки, центрифуга, фотоэлектроколориметр.

1. Комплексонометрический метод определения кальция в сыворотке крови. Кальций составляет почти треть всех минеральных веществ в организме. Около 97 % кальция сосредоточено в костной ткани в виде фосфатов и карбонатов, 1 % кальция находится в ионизированном состоянии.

Балансовая норма содержание кальция в сыворотке крови зависит от вида, возраста и физиологического состава животного и представлена в таблице.

Животные	мг%	моль/л
Коровы	11,0–13,0	2,74–3,24
Телята	11,0–12,0	2,74–2,99
Свиньи	11,0–13,0	2,74–3,24
Куры	13,0–20,0	3,24–4,99
Лошади	12–14	2,74–4,03

Снижение концентрации кальция в крови (гипокальцемия) наблюдается при неполноценном кормлении, рахите, остеомаляции, нефрите, неврозах, родильном парезе, а повышение (гиперкальцемия) – при гипervитаминозе витамина D, гиперфункции передней доли гипофиза,

метаболическом ацидозе, острой атрофии костей. Определение концентрации кальция в сыворотке крови позволяет диагностировать эти заболевания, а также установить кальций-фосфорное соотношение.

Кальций образует с мурексидом (пурпутат аммония) комплексное соединение розового цвета. Под действием более сильного комплексообразователя трилона Б (ЭДТА или динатриевая соль этилендиаминтетраацетата) мурексидокальциевый комплекс разрушается и образуется новый трилонкальциевый комплекс. Освобождающийся мурексид окрашивает раствор в сине-фиолетовый цвет. По количеству израсходованного на титрование трилона Б рассчитывают концентрацию кальция в крови.

В две колбочки при помощи цилиндра вносят по 25 мл дистиллированной воды, по 1 мл 10%-ного раствора NaOH и по 10 капель 1%-ного раствора мурексида. Раствор в колбочках приобретает сине-фиолетовую окраску. Одну колбочку оставляют для контроля цвета. Во вторую колбочку добавляют 1 мл сыворотки крови, при этом сине-фиолетовая окраска меняется на розовую. Содержимое второй колбочки оттитровывают 0,005 М раствором трилона Б до появления сине-фиолетовой окраски как в контроле.

Содержание кальция в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$X = n \cdot 0,2 \cdot 100,$$

где X – концентрация кальция в сыворотке крови, мг%;

n – количество мл 0,005 М раствора трилона Б, израсходованного на титрование опытной пробы;

0,2 – количество кальция, которое соответствует 1 мл 0,005 М раствора трилона Б;

100 – коэффициент пересчета количества кальция на 100 мл сыворотки крови.

Для пересчета мг% в моль/л (единицы СИ) результат умножают на 0,25 ($10 : 40 = 0,25$).

2. Определение неорганического фосфора в сыворотке крови. В крови содержится фосфор, связанный с органическими соединениями (форменные элементы крови), в сыворотке в основном содержатся неорганические фосфаты. Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови зависит от вида, возраста и физиологического состояния организма. В норме содержание фосфора в сыворотке крови находится в пределах 3–7 мг% или 0,97–2,26 ммоль/л. Повышение концентрации неорганического фосфора в крови (гиперфосфатемия) наблюдается при высоком уровне концентратов в рационе, при гипервитаминозе D,

интенсивной мышечной работе, почечной недостаточности, лейкозах, в период заживления костной ткани.

Пониженное содержание фосфора в сыворотке (гипофосфатемия) имеет место при рахите, остеомаляции, избытке кальция в рационе, при нарушении всасывания фосфатов в кишечнике.

Определение неорганического фосфора в крови, помимо диагностирования ряда заболеваний, позволяет контролировать кальций-фосфорное соотношение. У здоровых животных в норме оно должно состоять 1,6:2. Изменение этого соотношения говорит о нарушении кальций-фосфорного обмена. Неорганический фосфор реагирует с молибденовой кислотой с образованием фосфомолибденовой кислоты, которая восстанавливается аскорбиновой кислотой до фосфомолибденового комплекса, окрашенного в синий цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству неорганического фосфора. Белки сыворотки предварительно осаждают трихлоруксусной кислотой.

В центрифужную пробирку последовательно вносят 3 мл дистиллированной воды, 1 мл сыворотки крови, 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой и через 5 мин центрифугируют при 2500–3000 об/сек в течение 15–20 мин.

В опытную пробирку (0) последовательно вносят 2,5 мл центрифугата крови (что соответствует 0,5 мл сыворотки крови), добавляют 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 6,5 мл дистиллированной воды. Перемешивают путем переливания из одной пробирки в другую.

Одновременно готовят стандартную пробу (С). В пробирку вносят 1 мл рабочего стандартного раствора фосфора: 0,5 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, 0,5 мл молибдата аммония, 0,51%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 7,5 мл дистиллированной воды. Через 10 мин опытную и стандартную пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром при длине волны 660–680 нм в кювете на 10 мм против дистиллированной воды.

Количество неорганического фосфора в крови находят по формуле

$$X = \frac{E_0 \cdot 0,02 \cdot 100}{E_c \cdot 0,05},$$

где X – количество неорганического фосфора в исследуемой сыворотке крови, мг%;

E_0 – экстинкция опытной пробы (показания фотозлектроколориметра при исследовании опытной пробы);

E_c – экстинкция стандартной пробы;

0,02 – количество фосфора в 1 мл рабочего стандартного раствора фосфора, мг;

0,5 – количество мл сыворотки крови, взятой для конечного определения;

100 – коэффициент пересчета количества фосфора на 100 мл сыворотки крови.

При пересчете мг% в моль/л результат нужно умножить на коэффициент 0,323 (10:31).

Оформить работу и вывод записать в тетрадь.

3. Определение резервной щелочности крови по методу Раевского. Резервная щелочность крови представляет собой запас основных катионов, необходимых для поддержания слабощелочной реакции крови и характеризует состояние кислотно-щелочного баланса в организме. Нарушение кислотно-щелочного баланса проявляется в виде ацидоза (увеличение в крови кислот) и алкалоза (увеличение в крови оснований). Ацидоз и алкалоз, протекающие без изменения рН крови, называют компенсированными, а сопровождающиеся изменением рН – декомпенсированными.

Как правило, у животных говорят о метаболическом ацидозе и алкалозе. Это состояние возникает при избыточном поступлении в кровь отдельных промежуточных метаболитов обмена веществ. При хроническом нефрите, отравлениях, нарушениях функции печени, микроэлементах в кровь начинают поступать органические кислоты, и в крови наблюдается дефицит анионов HCO_3^- . Алкалоз наблюдается реже при ожогах, избыточной потере калия и хлора через ЖКТ, поражениях тканей.

У КРС может наблюдаться компенсированный ацидоз при избытке в рационах кислых и недоброкачественных кормов (жом, барда, силос), концентратов, при недостатке в рационе калия и натрия, кальция, магния, особенно в стойловый период.

В норме резервная щелочность крови сельскохозяйственных животных находится в пределах 400–800 мг%, что соответствует 100–200 ммоль/л гидроксида натрия (коэффициент пересчета 0,25 или 10:40). При определении резервной щелочности щелочные продукты крови нейтрализуют кислотой и учитывают в расчете на кристаллический едкий натр.

В две пробирки отмеряют по 2 мл 0,4%-ного раствора хлорида натрия и по 2 капли 1%-ного раствора ализаринового красного. Жидкость в пробирках приобретает одинаковый вишнево-красный цвет. В 1-ю пробирку добавляют 0,2 мл сыворотки крови (опытная проба), а во 2-ю – 2 капли 0,01 н раствора соляной кислоты (контрольная проба). Содержимое опытной пробы оттитровывают 0,01 н раствором соляной кислоты до перехода вишнево-красного цвета в желтый, соответствующий цвету жидкости контрольной пробы.

Резервную щелочность крови в мг% в пересчете на кристаллический едкий натр находят по формуле

$$X = \frac{a \cdot 0,4 \cdot 100}{0,2},$$

где X – резервная щелочность, мг% NaOH;

a – количество 0,01 н HCl, израсходованной на титрование;

0,4 – количество мг NaOH, соответствующее 1 мл 0,01 н HCl;

0,2 – количество мл сыворотки крови, взятой для исследования;

100 – коэффициент пересчета, мг%.

Лабораторная работа 22.

Определение фосфатов и роданидов в слюне

Материалы и оборудование. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 10%-ный раствор; аммоний молибденовокислый, 5%-ный раствор в 5 н растворе H_2SO_4 с добавлением 0,5%-ного раствора аскорбиновой кислоты; хлорное железо, 0,01%-ный раствор; соляная кислота, 2%-ный раствор; фильтровальная бумага, воронки для фильтрования, термостат, пробирки.

1. Определение фосфатов.

Порядок выполнения работы. 2 мл слюны осаждают 2 мл 10%-ного раствора ТХУ. Фильтруют.

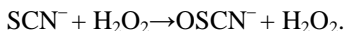
К 2 мл фильтрата прибавляют 4 мл 5%-ного раствора молибденовокислого аммония в 5 н H_2SO_4 с добавлением 0,5%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и инкубируют в термостате при 45 °С в течение 20 мин.

Наблюдают появление синего проходящего окрашивания и выпадение осадка желтого цвета комплексного соединения фосфорномолибденовокислого аммония. Связать обнаружение фосфатов кальция в слюне с состоянием эмали зуба.

2. Обнаружение роданидов в слюне. Роданиды слюны обнаруживаются по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Это типичная и чувствительная реакция на роданиды обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образования различных комплексов, имеющих состав от $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NCS}^{2+}$ до $\text{Fe}(\text{NCS})_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот препятствуют образованию окраски.

Порядок выполнения работы. К 5 каплям слюны добавляют 2 капли 2%-ного раствора HCl и 2 капли 0,01%-ного раствора FeCl_3 . Развивается красное окрашивание.

В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, которая окисляет имеющийся в слюне роданид с помощью перекиси водорода бактериального происхождения в гипотиоционат:



Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами действует антикариесогенно. Содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма.

При составлении протокола сравните интенсивность окраски роданида железа в слюне курильщика и у некурящих табак.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. По какому принципу находящиеся в организме химические элементы делят на макро- и микроэлементы? Какие относят к макроэлементам, какие – к микроэлементам?
2. В какой форме находятся и как распределены в организме минеральные вещества?
3. Напишите формулы буферных систем крови, их локализацию в других биологических жидкостях.
4. Какие изменения в обмене веществ вызывают недостаток в организме калия, натрия, магния, железа, селена, серы?
5. Назовите форму и пути удаления из организма конкретных макро- и микроэлементов.
6. Вода, ее содержание и роль в обмене веществ.
7. Регуляция обмена воды. Нарушение водного обмена.
8. Содержание минеральных веществ в органах и тканях.

9. Микроэлементы, их биологическая роль.
10. Макроэлементы, их биологическая роль.
11. Регуляция минерального обмена.
12. Использование макро- и микроэлементов в животноводстве.

Тема 10. БИОХИМИЯ КРОВИ

Цель. Изучить химический состав крови сельскохозяйственных животных. Путем биохимического анализа определить концентрацию отдельных компонентов крови, провести сравнительную характеристику физиологического состояния организма исследуемого животного и отразить это сравнение в выводах.

Химический состав биологических жидкостей и, прежде всего крови, является относительно постоянным для одного вида животных. В организме в результате обмена веществ непрерывно расходуются одни и накапливаются другие вещества, поэтому постоянство состава крови (гомеостаз) может меняться в зависимости от типа кормления, возраста и физиологического состояния организма. Биохимические исследования концентрации компонентов крови позволяют судить о течении обменных процессов в организме. Обнаружение патологических отклонений с помощью лабораторно-биохимических исследований происходит путем сравнения величин, характерных для здорового и больного животного. Областью нормальных значений (физиологической нормой), считают обычно значения, полученные при обследовании группы здоровых животных в строго определенных условиях. Область наиболее вероятных значений исследуемых компонентов крови (или другой биологической жидкости, ткани), характерных для данного вида животных, оформляют как справочный материал и используют как эталон при объективной характеристике физиологических состояний организма. Для правильной оценки биохимических результатов следует учитывать ряд факторов: биохимическую индивидуальность исследуемого организма и данного вида в целом, условия взятия и хранения пробы, выбор метода исследования.

Для большинства сельскохозяйственных животных плотность крови колеблется в пределах 1,050–1,060. Плотность форменных элементов (1,090) выше, чем плазмы (1,025–1,030), что объясняет выпадение их в осадок при стоянии крови (СОЭ). Вязкость крови в 4,5–6,0 раз, а сыворотки – в 1,5–2,0 раза выше, чем вязкость воды. Осмотическое давление крови обусловлено поступлением и удалением из нее воды и

электронов и находится в пределах 0,697–0,793 МПа. Концентрация водородных ионов (рН) лежит в пределах 7,29–7,52 и обеспечивается буферными системами крови. Концентрация сахара (глюкозы) крови находится в пределах 1,32–5,5 ммоль/л, белков в 62,0–81,0 г/л, липидов 1,5–12,0 г/л, кальция 1,25–3,5 ммоль/л, фосфора 0,5–3,42 ммоль/л.

Лабораторная работа 23. Биохимия крови

Материалы и оборудование. Хлорид кальция (II), 3%-ный раствор; щавелево-кислый аммоний, 10%-ный раствор; ацетонциангидрин (2 ампулы по 0,5 см³ – 0,47 г); калий железосинеродистый (2 флакона по 200 мл); натрий двууглекислый (2 флакона по 1,0 г); стандартный раствор гемоглобина (концентрация гемоглобина – 59,75 мг%, что соответствует при разведении крови в 251 раз концентрации гемоглобина – 15 мг%); трихлоруксусная кислота, 10%-ный раствор; кровь; пробирки, штативы, стеклянная палочка, колбочки, стаканчик, фотоэлектроколориметр, центрифуга.

1. Значение ионов кальция в процессе свертывания крови. Свертывание крови – это многоэтапный каскадный ферментативный процесс, предупреждающий и останавливающий потерю крови из организма (гемостаз). При небольших повреждениях происходит формирование первичной тромбоцитарной пробки, что опережает свертывание крови. Вначале происходит приклеивание (адгезия) тромбоцитов к субэндотелиальным структурам сосудистой стенки. Коллаген выступает главным стимулятором этого процесса. Вторым агентом агрегации тромбоцитов выступает тромбин, он способен вызывать агрегацию тромбоцитов при концентрации, недостаточной для свертывания крови. Свертывание крови осуществляется при участии компонентов: тромбоцитов, сосудистой стенки, плазменной ферментативной системы, которая включает ряд ферментов (факторов свертывания). В плазме крови находится белок фибриноген, ионы кальция и протромбин. В тромбоцитах и клетках тканей содержится фермент тромбокиназа. При повреждении структуры клеток тромбокиназа освобождается и катализирует превращение неактивной формы протромбина в активную форму тромбин. Активация протромбина требует присутствия ионов кальция и специфичных белков крови (факторы свертывания). В свою очередь тромбин катализирует превращение белка крови фибриногена в фибрин путем расщепления четырех определенных пептидных связей в фибриногене. Молекулы фибрина образуют агрегаты, нерастворимые в воде, и формируется сгусток, или тромб.

Известен ряд веществ, выступающих активаторами, или ингибиторами реакции, превращения протромбина в тромбин и фибриногена в фибрин. Активатором первой реакции выступает тканевый трипсин, ингибиторами выступают гепарин, оксалаты, цитраты, фториды, соли желчных кислот, нуклеиновые кислоты. Вторую реакцию ускоряют яды змей, угнетают некоторые клеточные белки. Для проведения опыта следует получить оксалатную кровь, плазму и сыворотку крови.

Сыворотка крови – это светло-соломенная жидкость, которая остается после удаления из крови фибриногена и форменных элементов. Для ее получения свежесобранную кровь помещают в сухую пробирку и через 20–30 мин образовавшийся кровяной сгусток отделяют от стенки пробирки тонкой стеклянной палочкой или спицей, пробирку оставляют на 2–3 ч при комнатной температуре. Затем удаляют сгусток и центрифугируют остаток 25–20 мин при 2500–3000 об/мин.

Плазма – это соломенно-желтая жидкость, которая остается после удаления из крови форменных элементов. Получают ее путем добавления к крови антикоагулянтов – веществ, препятствующих свертыванию (гепарин, оксалаты, цитраты, фториды). В колбу с кровью вносят 1 мл 10%-ного раствора щавелевокислого аммония на 100 мл крови (или 0,1 г сухого вещества), можно внести раствор гепарина 2 капли на 2 мл крови (60 мг гепарина растворяют в 20 мл воды). После внесения антикоагулянта колбу осторожно вращают до полного перемешивания. Часть консервированной крови оставляют для опыта, оставшуюся часть центрифугируют и используют надосадочную жидкость (плазму) для опыта.

Дефибринированную кровь получают из свежезятой крови. Кровь помещают в стаканчик и помешивают осторожно круговыми движениями стеклянной палочкой. Нити фибриногена выделяются и собираются на стеклянной палочке.

Для опыта взять пять пробирок и внести в них компоненты согласно таблице.

№ п.п.	Компоненты	№ пробирки				
		1	2	3	4	5
1	Оксалатная плазма					
2	Дифибрированная кровь					
3	Сыворотка крови					
4	Оксалатная кровь					
5	3%-ный раствор CaCl_2					
	Свертывание крови					

После внесения компонентов пробирки ставят в термостат на 15–20 мин. По окончании термостатирования наблюдают, в каких пробирках произошло свертывание крови, в каких – нет. Оформляют свои наблюдения.

2. Определение концентрации гемоглобина в крови гемоглобинцианидным методом. Гемоглобин – хромопротеид, состоящий из гема и белка глобина. Гем представляет собой хелатный комплекс протопорфирина с атомом двухвалентного железа. Глобин представляет собой макромолекулу сферической формы (глобулу), состоящую из двух α - и двух β -цепей. Субъединицы упакованы в тетрамер, каждая субъединица содержит плоское кольцо гема. Глобин определяет видовую специфичность гемоглобинов. Гемоглобин сконцентрирован в эритроцитах крови. Функция гемоглобина состоит в переносе кислорода, за что его называют транспортным белком. Срок жизни эритроцитов составляет 120 дн., после чего они разрушаются как устаревшие и вместе с ними расщепляется гемоглобин. Количество гемоглобина зависит от вида, возраста, физиологического состояния животного и имеет важное диагностическое значение. У различных животных в норме содержание гемоглобина находится в пределах 70–160 г/л крови.

Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетонцианидринам окрашенный гемоглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству гемоглобина.

Для опыта готовят трансформирующий раствор. Для этого содержимое ампулы с ацетонцианидринам, калием железосинеродистым и натрием двууглекислым количественно переносят в мерную колбу, доводят дистиллированной водой до 1 дм³ (препарат хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре в течение нескольких месяцев).

К 0,02 см³ крови приливают 5,0 см³ трансформирующего раствора (разведение в 251 раз) и хорошо перемешивают. Через 10 мин измеряют на фотозлектроколориметре при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы (трансформирующего раствора).

Стандартный раствор измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Результаты измерений записывают в тетрадь и рассчитывают концентрацию гемоглобина по формуле

$$x = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 150}{E_{\text{ст}}},$$

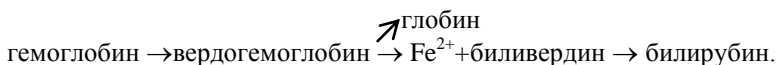
где x – концентрация гемоглобина, г/л крови;

$E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ – экстинкция стандартного раствора;

150 – количество гемоглобина в г/л, соответствующее по окраске эталонному раствору.

3. Экспресс-метод определения билирубина в сыворотке крови по Ивади и Эбрей. Утилизация устаревших эритроцитов происходит в основном в клетках печени, селезенке и костном мозге. Выделяющийся при этом гем также подвергается окислению. Происходит этот процесс по схеме:



Гемоглобин при участии оксидазы (НАДФН) превращается в зеленый пигмент вердогемоглобин, содержащий железо и глобин. Затем происходит расщепление вердогемоглобина до глобина, железа и пигмента зеленого цвета – биливердина. Биливердин восстанавливается дегидрогеназой (НАДФН) до билирубина красно-коричневого цвета. Если билирубин образован в селезенке и костном мозге, то он транспортируется кровью в форме соединений с альбумином в печень и здесь обезвреживается, образуя неядовитое парное соединение с глюкуроновой кислотой. Глюкурониды билирубина хорошо растворимы в воде и удаляются в составе желчи через кишечник. В толстом отделе кишечника под действием ферментов микроорганизмов может происходить дальнейшее превращение билирубина в бесцветные уробилиноген и стеркобилиноген. Основная масса этих веществ (95 %) выделяется с калом, часть всасывается в кровь и вновь попадает в желчь, часть может выводиться с мочой. В крови обнаруживают два вида билирубина – прямой (связанный) и непрямой (свободный). Прямой билирубин плохо растворим в воде и переносится по крови, адсорбируясь на альбуминах. Непрямой представляет собой комплекс билирубина с глюкуроновой кислотой. В норме содержание в крови прямого билирубина у большинства животных находится в пределах 0,01–0,58 мг% или 0,17–9,92 мкмоль/л (коэффициент пересчета 17,1). Общий билирубин 0,1–2,8 мг% или 0,17–47,9 мкмоль/л.

По изменению концентрации и соотношения фракций билирубина можно судить об обмене гемоглобина в организме и диагностировать ряд заболеваний. Увеличение непрямого билирубина в крови наблюдается при кровепаразитарных заболеваниях (пироплазмоз, бабезиоз), инфекционных болезнях, при отравлении гемолитическими ядами (куколь, салонин). Повышение концентрации прямого билирубина встречается при механических желтухах (закупорка желчных путей). Увеличение обеих фракций наблюдается при поражении паренхимы печени факторами инфекционного и токсического характера.

К 1,5 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты добавляют 3 капли сыроворотки крови, перемешивают и нагревают на умеренном пламени 1–2 мин. По цвету образовавшегося осадка определяют содержание билирубина. При содержании билирубина менее 1 мг% он белый или сероватый, более 1 мг% – зеленый или зелено-голубой.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Как изменится химический состав крови в зависимости от возраста и физиологического состояния организма?
2. В чем практическое значение биохимического исследования состава крови?
3. Изменение концентраций каких компонентов крови связано с нарушением обмена липидов, белков и углеводов?

Тема 11. БИОХИМИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Цель. Изучить химический состав мышечной ткани различных видов животных. Выделить из биологической ткани (мышцы) альбумины, глобулины, склеропротиды, изучить их свойства и биологическое назначение.

В среднем в организме животных 40–45 % от всей массы тела приходится на мышцы. Мышечная ткань содержит воды 70–80 % и сухого вещества 20–30 %. Сухое вещество представлено минеральными соединениями (до 1,5 %) и органическими веществами, такими как: белки, небелковые азотистые экстрактивные вещества (креатин, карнозин, ансерин), безазотистые вещества (углеводы, липиды).

Мышцы являются важнейшей тканью организма, обеспечивающей подавляющее большинство его функций. Работа мышц в организме связана с функцией их сокращения, в основе которой лежит превращение химической энергии в механическую. Основным структурным

элементом скелетных мышц является мышечное волокно. Это много-ядерная гигантская клетка длиной от нескольких миллиметров до десятков сантиметров (длиннейшая мышца спины). Важнейшей составной частью мышечной ткани являются белки, они различаются по физико-химическим и биологическим свойствам. В связи с чем выделяют белки саркоплазмы (миоген, миоглобин, глобулины), белки миофибрилл (миозин, актин, тропомиозин), белки стромы (коллаген, эластин, нейрокератин). Белки мышц можно разделить на ряд фракций с помощью последовательной экстракции водой, солевыми и щелочными растворами.

Лабораторная работа 24. Биохимия мышечной ткани

Материалы и оборудование. Гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор; сульфат аммония, кристаллический; трихлоруксусная кислота, 6%-ный раствор; сульфат аммония, насыщенный раствор; хлорид аммония, 10%-ный раствор; серная кислота (у. в. 1,84); уксусная кислота (ледяная); мышца; шуттель-аппарат, химические стаканчики, ножницы, воронки, штатив с пробирками, пипетки, марля.

1. Выделение альбуминовой фракции. Свежую мышцу освобождают от жира, соединительной ткани и тщательно измельчают. 8–10 г измельченной мышцы помещают в химический стакан, заливают тройным объемом дистиллированной воды и экстрагируют, взбалтывая на шуттель-аппарате в течение 20 мин. Вытяжку отделяют фильтрованием через три слоя марли в другой химический стакан, а оставшуюся мышечную кашицу сохраняют для последующей солевой экстракции. В водный экстракт переходят белки саркоплазмы – миоген, миоальбумин и миоглобин, с которыми проводят следующие реакции.

В 4 пробирки наливают по 2 мл полученного экстракта. Для определения белка в экстракте в 1-й пробирке проводят биуретовую реакцию (добавляют 2 мл 10%-ного NaOH и 1–3 капли 1%-ного CuSO₄ – появляется фиолетовое окрашивание). Во 2-ю пробирку добавляют порошок сульфата аммония до насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов. В других пробирках проводят реакции на осаждение белков солями тяжелых металлов (ацетат свинца, сульфат меди) и органическими кислотами (трихлоруксусная кислота, сульфосалициловая кислота).

2. Выделение глобулиновой фракции. Остаток мышечной кашицы после экстракции водой помещают в стаканчик, заливают двойным

объемом 10%-ного раствора хлорида аммония и экстрагируют при встряхивании в течение 30 мин. Солевой экстракт отфильтровывают через три слоя марли. Остаток мышечной ткани на фильтре сохраняют для дальнейшего исследования. В солевой экстракт переходят белки глобулиновой фракции – миозин и актомиозин.

В 3 пробирки наливают по 2 мл полученного солевого экстракта мышц. В 1-й пробирке наличие белка устанавливают с помощью биуретовой реакции. Во 2-ю пробирку добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, при этом наблюдают выпадение осадка миозина и актомиозина. К экстракту в 3-й пробирке добавляют дистиллированную воду до появления осадка нерастворимых в воде миозина и актомиозина.

3. Выделение склеропротеидов. В остатке мышечной ткани после экстракции водными и солевыми растворами содержатся склеропротеины (коллаген и эластин).

Остаток мышечной ткани помещают в химический стакан, заливают тройным объемом воды и кипятят в течение 30 мин, сохраняя объем жидкости в стакане периодическим добавлением горячей воды. При кипячении коллаген, подвергаясь неглубокому гидролизу, превращается в растворимую в воде желатину.

Горячий раствор отфильтровывают в пробирку и в фильтрате открывают желатину с помощью биуретовой реакции. Желатина не содержит триптофан и тирозин, но богата пролином. На фильтре остаются тонкие волокна и пленки эластина.

4. Качественная реакция на аминокислоту триптофан (реакция Адамкевича). L-триптофан (α -амино- β -индолилпропионовая кислота) находится почти во всех белках, но практически отсутствует в склеропротеинах (коллагене и эластине). Эти белки богаты пролином.

Характеристика питательной ценности мяса предусматривает определение триптофан-оксипролинового показателя. Чем больше триптофана содержится в мышцах, тем выше питательная ценность мяса.

Реакция Адамкевича основана на том, что при нагревании растворов белков со смесью крепкой серной и ледяной уксусной кислот появляется красивое красно-фиолетовое окрашивание, обусловленное взаимодействием аминокислоты триптофана с глиоксиловой кислотой, находящейся в уксусной кислоте в виде примеси.

К свежеприготовленной смеси (2 мл концентрированной серной и 4 мл ледяной уксусной кислот) прибавляют 2–3 мл экстрактов, полученных в опытах 1–3, и нагревают содержимое пробирок, при этом

через непродолжительное время смесь с экстрактом из опытов 1 и 2 приобретает красно-фиолетовую окраску, а смесь с экстрактом, где содержались белки коллаген и эластин (экстракт из опыта 3), не дает подобного окрашивания.

Лабораторная работа 25. Разделение белков мышечной ткани

Материалы и оборудование. Дистиллированная вода, солевая вытяжка, кристаллический хлористый натрий, насыщенный раствор сернокислого аммония ($1/3$ насыщения), насыщенный раствор сернокислого аммония ($2/3$ насыщения), водная вытяжка из мяса, 1 н соляная кислота, 1 н раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор пикриновой кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, солянокислая вытяжка из золы, 5%-ный раствор роданистого калия (KCNS), 1%-ный раствор желатины, 4%-ный раствор желатины, 1%-ный раствор уксусной кислоты, сухой сернокислый аммоний, насыщенный раствор танина, пробирки, капельницы, пипетки, стеклянная палочка, химический стаканчик, воронка, фильтровальная бумага.

Порядок выполнения работы. В солевой вытяжке из мышечной ткани содержатся следующие белки: миоген, миоальбумин, актомиозин, глобулин X и миоглобин. Миоген, миоальбумин и миоглобин можно извлекать также водой.

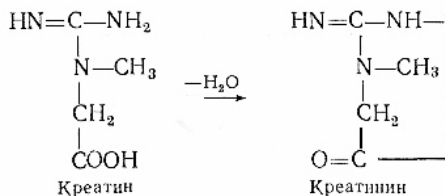
При разбавлении солевой вытяжки водой в осадок выпадают актомиозин и глобулин X. В пробирку с дистиллированной водой постепенно добавляют по каплям солевую вытяжку. В момент смешивания капли вытяжки с водой хорошо видно образование осадка водонерастворимых белков (актомиозина и глобулина X).

К солевой вытяжке, помещенной в пробирку, добавляют при энергичном встряхивании кристаллический хлористый натрий до насыщения. В осадок выпадают актомиозин, глобулин X и частично миоген.

В химический стаканчик помещают 20 мл солевой вытяжки и добавляют 10 мл насыщенного раствора сернокислого аммония. Выпавший осадок актомиозина отфильтровывают и к 20 мл фильтрата добавляют 7 мл насыщенного раствора сернокислого аммония. В осадок выпадают миоген и глобулин X.

2. Экстрактивные вещества мышечной ткани. В мышечной ткани содержится 0,2–0,3 % креатина и 0,003 % креатинина.

Метод открытия креатина основан на превращении его в креатинин, что происходит при нагревании с кислотами.



Креатинин открывается по реакции с пикриновой кислотой $[\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}]$ в присутствии щелочи; при этом образуется оранжево-красная окраска.

Порядок выполнения работы. В пробирку помещают 10 мл водной вытяжки из мяса, добавляют 5 мл 1 н соляной кислоты и нагревают в течение 1 ч в кипящей водяной бане.

Жидкость отфильтровывают и 5 мл фильтрата осторожно нейтрализуют 1 н раствором гидроксида натрия по лакмусу. Затем прибавляют 2–3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и столько же 10%-ного раствора гидроксида натрия.

Появление оранжево-красной окраски указывает на наличие креатинина. Реакция зависит отчасти от присутствия в мышечной ткани креатинина, но главным образом от креатина, превратившегося в креатинин при нагревании с соляной кислотой.

3. Минеральные вещества мышечной ткани. В состав мышечной ткани входят K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} и др. Наиболее просто их определять в остатке после озоления. Однако при температуре озоления возможны потери хлора. Поэтому, когда определяют хлор, сжигание производят только до обугливания. Большинство минеральных веществ можно определять в золе.

Для определения железа небольшое количество (несколько граммов) измельченной мышечной ткани помещают в фарфоровый тигель и озоляют обычным образом. Зола смывают в стакан 10%-ным раствором соляной кислоты, тщательно перемешивают и после настаивания в течение 5–10 мин отфильтровывают через бумажный фильтр. В фильтрате содержатся почти все минеральные составные части мышечной ткани. Реакция основана на образовании роданового железа, имеющего красную окраску: $\text{FeCl}_3 + 3\text{KCNS} = \text{Fe}(\text{CNS})_3 + 3\text{KCl}$.

Порядок выполнения работы. К 5 мл солянокислой вытяжки из зола добавляют 5%-ный раствор роданистого калия (KCNS) и наблюдают за появлением красной окраски.

4. Получение и исследование свойств желатины из сухожилий.

Сухожилия крупного рогатого скота очищают от фасций, промывают водой, разрезают на куски и заливают насыщенным раствором известкового молока $\text{Ca}(\text{OH})_2$. На 100 г сухожилий берут 200 мл известкового молока. Золка продолжается 1–2 недели. Зеленые сухожилия промывают водой, а затем нейтрализуют. При нейтрализации сухожилия заливают 1%-ным раствором соляной кислоты и после достижения слабокислой реакции (рН около 6) по универсальному индикатору на разрезе сухожилия нейтрализацию заканчивают. Сухожилия промывают водой, затем помещают в стакан, который ставят в водяную баню при 60–70 °С. Здесь выплавляется желатина. Раствор ее используют для проведения соответствующих опытов.

Порядок выполнения работы. Кипятят в пробирке 1%-ный раствор желатины и устанавливают, что этот белок не свертывается при нагревании.

В пробирку наливают 2–3 мл 4%-ного расплавленного раствора желатины, охлаждают под струей холодной воды и отмечают, что через некоторое время желатина застывает, образуя гель.

В пробирку наливают 5 мл 4%-ного расплавленного раствора желатины, добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора уксусной кислоты, кипятят 10–15 мин и после охлаждения наблюдают отсутствие желирующей способности. Желатина легко гидролизуется при кипячении с кислотами. Этим объясняется потеря желирующей способности.

Продельывают с 1%-ным раствором желатины ксантопротеиновую реакцию и убеждаются, что от азотной кислоты осадка не образуется, появляется лишь слабо-желтая окраска. Это указывает на то, что в желатине содержится очень мало аминокислот с бензольным ядром.

К 5 мл 1%-ного раствора желатины добавляют сухой сернокислый аммоний до выпадения желатины в осадок.

К 5 мл 1%-ного раствора желатины добавляют насыщенный раствор танина. Желатина выпадает в осадок. Реакции указывают на способность желатины осаждаться реактивами, применяемыми для осаждения других белков.

Лабораторная работа 26. Обнаружение молочной кислоты

Материалы и оборудование. Мышцы; кварцевый песок; дистиллированная вода; реактив Уффельманна (20 капель 1%-ного раствора фенола + 2 капли 1%-ного раствора хлорного железа); смоченная водой вата.

Молочная кислота в присутствии фенолята железа (реактив Уффельманна), окрашенного в фиолетовый цвет, образует лактат железа желто-зеленого цвета; ступка с пестиком; капельница.

Порядок выполнения работы. 1 г мышц растирают до гомогенного состояния в ступке с небольшим количеством кварцевого песка в течение 3 мин, добавив 5 капель воды. Затем приливают 3 мл дистиллированной воды и фильтруют через смоченную водой вату.

К 15 каплям фильтрата добавляют по каплям реактив Уффельманна (20 капель 1%-ного раствора фенола + 2 капли 1%-ного раствора хлорного железа) до появления фиолетовой окраски. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую, так как образуется лактат железа. Для сравнения проводят реакцию Уффельманна с раствором молочной кислоты и наблюдают развитие желто-зеленого окрашивания.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Какие различия наблюдаются в химическом составе мышц в зависимости от возраста, вида и физиологического состояния организма?
2. Какие белки мышечной ткани вы знаете, в чем их особенности?
3. Какие белки мышц непосредственно участвуют в процессе мышечного сокращения и как это происходит?
4. Как изменится химический состав мышц после убоя животных?
5. Как эти изменения влияют на пищевую ценность мяса?

Тема 12. БИОХИМИЯ МОЧИ

Цель. Изучить состав и физико-химические свойства мочи различных животных. Провести исследования по открытию нормальных и патологических компонентов мочи.

Основной жизненно важной функцией почек является образование мочи. Моча – это биологическая жидкость, образующаяся в результате работы почечных структурных единиц – нефронов.

На первом этапе в нефронах вначале формируется первичная моча. Она содержит в основном воду и низкомолекулярные компоненты плазмы крови. 99 % ультрафильтрата крови затем реабсорбируется в проксимальных канальцах нефрона, в основном это ионы Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , вода, фосфаты неорганические, глюкоза, аминокислоты, белки. Причем глюкоза и белки реабсорбируются почти полностью, аминокислоты – на 99 %, вода – на 96 %, остальные вещества – более

чем наполовину. Формирование вторичной мочи происходит в дистальных каналах и собирательных трубках. Суточный объем мочи зависит от вида, возраста, физиологического состояния организма, количества потребленной воды и состава корма, породы и других факторов. Среднесуточный объем мочи у сельскохозяйственных животных находится в пределах от 0,1–0,4 л у кроликов до 6–23 л у КРС.

В составе мочи из организма удаляется избыток воды, конечные продукты тканевого обмена, осмотически активные вещества, яды, медпрепараты и продукты их обезвреживания.

Выделение мочи является одним из важнейших механизмов поддержания гомеостаза, исследования ее состава дает информацию об общем состоянии организма. Нарушение обмена веществ сопровождается изменением химического состава крови, в свою очередь, химический состав мочи отражает даже незначительные сдвиги в химизме крови, что позволяет диагностировать заболевание и контролировать эффективность лечения и кормления животных.

Для анализа берут или утреннюю порцию мочи, или суточное ее количество. В последнем случае ее консервируют одним мл 25%-ного раствора серной кислоты на 100 мл или кристалликом тимола для предотвращения бактериального разложения.

Лабораторная работа 27.

Исследование физических и химических свойств мочи

Материалы и оборудование. Нитрат серебра, 1%-ный раствор; азотная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; соляная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; хлорид бария, 5%-ный раствор; молибденовый реактив (18,75 г молибдата аммония растворяют в 250 мл 32%-ного раствора азотной кислоты (у. в. 1,2)); гипобромид натрия (300 г едкого натра растворяют в 1 л воды и осторожно, под тягой, вносят 50 г чистого брома (около 16 мл), у. в. брома 3,14); гидроксид натрия, 10%-ный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; уксусная кислота, 1%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; реактив Фелинга; перманганат калия, 2%-ный раствор; хлороформ; спиртовой раствор пирамидона; пероксид водорода, 3%-ный раствор; ледяная уксусная кислота; бензидин, 5%-ный раствор в ледяной уксусной кислоте. Урометр, лакмусовая бумага, электроколориметр, водяная баня.

1. Исследование цвета и прозрачности мочи. Свежая моча большинства животных прозрачна (моча лошадей и ослов мутновата) и

имеет цвет от светло-желтого до темно-коричневого. Интенсивность окраски обычно соответствует плотности мочи (исключение составляет моча животных, больных диабетом, когда моча при высокой плотности, обусловленной содержанием сахара, слабо окрашена). Цвет мочи зависит от количества в ней пигментов (урохрома, уробилина и др.). Необычную окраску мочи может приобрести в связи с присутствием в ней крови, лекарственных и некоторых пищевых пигментов. Характеристику цвета мочи дают следующую: соломенно-желтая, янтарно-желтая, шафранно-желтая, розовато-желтая, кроваво-красная, буро-красная, бурая, зеленовато-бурая и т. д. Характеристику прозрачности мочи дают следующую: прозрачная, мутноватая, мутная, молочно-мутная.

2. Исследование запаха мочи. Свежая моча животных каждого вида имеет специфический запах: у лошадей – запах аммиака, у крупного рогатого скота – затхлый, у свиней – острый, неприятный. При наличии большого количества ацетоновых тел моча приобретает «плодовый» запах. Загнившая моча имеет неприятный запах аммиака.

3. Определение плотности мочи. Плотность мочи у разных животных неодинакова: лошади – 1,025–1,060; коровы – 1,025–1,050; овцы – 1,020–1,070; козы – 1,020–1,040; свиньи – 1,010–1,040. Она зависит от физиологического состояния организма и количества потребленной воды.

Определение плотности мочи проводят с помощью урومتра, для чего мочу наливают по стенке (чтобы не образовалась пена) в цилиндр на 100 мл и осторожно погружают в нее урومتر. Когда урومتر установится, производят отсчет по нижнему мениску при температуре 15°. Если моча имеет другую температуру, то делают поправку плотности: на каждые 3° выше 15° нужно прибавить, а на каждые 3° ниже вычитать 0,001 от показания шкалы урومتра.

4. Определение реакции мочи. Активная реакция мочи в норме зависит от типа кормления животных: у травоядных она щелочная, у плотоядных – кислая, у всеядных – близкая к нейтральной. pH мочи составляет: лошади – 7,2–8,7; крупного рогатого скота – 7,7–8,7; свиньи – 6,5–7,8; козы – 8,0–8,5.

Реакцию мочи определяют колориметрическим или электрометрическим методами. Можно использовать и лакмусовую бумагу, для чего на нее наносят каплю мочи и по ее окраске определяют реакцию мочи.

5. Патологические составные компоненты мочи. При нарушении обмена веществ (особенно у высокопродуктивных животных),

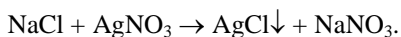
несбалансированных рационах, при некоторых заболеваниях в моче могут появляться вещества, которые не встречаются в норме или присутствуют в ничтожных количествах. При клинических исследованиях мочи особое внимание обращают на содержание белка, сахара, кетоновых (ацетоновых) тел, желчных и кровяных пигментов и индикана.

Лабораторная работа 28. **Качественный анализ нормальных составных** **компонентов мочи**

Материалы и оборудование. Нитрат серебра, 1%-ный раствор; азотная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; соляная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; хлорид бария, 5%-ный раствор; молибденовый реактив (18,75 г молибдата аммония растворяют в 250 мл 32%-ного раствора азотной кислоты (у. в. 1,2)); гипобромид натрия (300 г едкого натра растворяют в 1 л воды и осторожно, под тягой, вносят 50 г чистого брома (около 16 мл), у. в. брома 3,14); гидроксид натрия, 10%-ный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; уксусная кислота, 1%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; реактив Фелинга; перманганат калия, 2%-ный раствор; хлороформ; спиртовой раствор пирамидона; пероксид водорода, 3%-ный раствор; ледяная уксусная кислота; бензидин, 5%-ный раствор в ледяной уксусной кислоте; урометр, лакмусовая бумага, электроколориметр, водяная баня.

В норме моча может содержать до 200 компонентов. Моча состоит из воды (96 %) и сухого остатка (4 %). В сухой остаток входят неорганические вещества (1,5 %) и органические вещества (2,5 %).

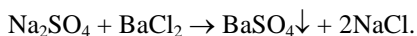
1. Определение хлоридов в моче. В пробирку вносят 10 капель мочи, приливают 2–3 капли 1%-ного раствора нитрата серебра и 2 капли 10%-ной азотной кислоты. В результате выпадает белый осадок хлорида серебра. Подкисление азотной кислотой предотвращает образование растворимого в азотной кислоте фосфата серебра



Обычно количество натрия в моче недостаточно для нейтрализации ионов хлора. Выделение хлоридов с мочой снижается при повышенной температуре, голодании, образовании эксудатов.

2. Определение сульфатов в моче. К 10 каплям мочи приливают 2 капли 10%-ного раствора соляной кислоты и по каплям 5%-ный рас-

твор хлорида бария до полного осаждения, т. е. до тех пор, пока капля хлорида бария не будет вызывать образование муты



Сульфаты мочи представлены неорганическими солями и эфир-серными кислотами (парными соединениями). Парные соединения образуются в результате окисления белков, поэтому в моче плотоядных их значительно больше. Их концентрация в моче повышается при введении в рацион концентратов, соединений фенола, при усилении процессов гниения белка в толстом отделе кишечника.

3. Обнаружение фосфатов в моче. В пробирку вносят 10 капель мочи, добавляют 20 капель молибденового реактива, содержащего молибдат аммония. Пробирку нагревают до появления желтого оттенка раствора, затем наблюдают выпадение желтого осадка – труднорастворимого фосфомолибдата аммония.

Почти весь фосфор в моче находится в виде неорганических фосфатов, 60 % из них представлены солями щелочных металлов и аммония, остальная часть – это соли щелочноземельных металлов. В моче плотоядных их много, в моче травоядных могут быть только следы. Выделение фосфатов увеличивается при молочном питании травоядных и ацидозах.

4. Обнаружение мочевины в моче. В пробирку отмеряют 10 капель мочи, 10 капель гипобромида натрия. При этом происходит разложение мочевины с выделением азота. Поскольку для разложения мочевины берут щелочной раствор гипобромида натрия, образующаяся углекислота поглощается щелочью и выделяется один азот.

Мочевина – основной конечный продукт азотистого обмена у сельскохозяйственных животных, рыб.

5. Обнаружение креатинина в моче. В пробирку вносят 10 капель мочи, 3–4 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3–4 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты, при этом появляется стойкая оранжево-красная окраска.

Креатин образуется в мышечной ткани при неферментативном распаде креатина. Доля креатинина в моче выше у животных с развитой мускулатурой и выполняющих физические нагрузки. Повышение концентрации креатинина в моче свидетельствует о патологических процессах в мышечной ткани.

Лабораторная работа 29. Качественные реакции на патологические компоненты мочи

Материалы и оборудование. Нитрат серебра, 1%-ный раствор; азотная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; соляная кислота, 10%-ный раствор и концентрированная; хлорид бария, 5%-ный раствор; молибденовый реактив (18,75 г молибдата аммония растворяют в 250 мл 32%-ного раствора азотной кислоты (у. в. 1,2)); гипобромид натрия (300 г едкого натра растворяют в 1 л воды и осторожно, под тягой, вносят 50 г чистого брома (около 16 мл), у. в. брома 3,14); гидроксид натрия, 10%-ный раствор; пикриновая кислота, насыщенный раствор; уксусная кислота, 1%-ный раствор; сульфосалициловая кислота, 20%-ный раствор; реактив Фелинга; перманганат калия, 2%-ный раствор; хлороформ; спиртовой раствор пирамидона; пероксид водорода, 3%-ный раствор; ледяная уксусная кислота; бензидин, 5%-ный раствор в ледяной уксусной кислоте; урометр, лакмусовая бумага, электроколориметр, водяная баня.

Помимо постоянно присутствующих компонентов с мочой могут выделяться несвойственные ей в норме вещества. Прежде всего, это белок, сахар, кетоновые тела, пигменты крови. В нормальной моче эти вещества присутствуют в мизерных количествах и не обнаруживаются обычными методами исследования.

Обнаружение сахара, белка, кетоновых тел и других веществ в исследуемой моче свидетельствует о нарушении обмена отдельных веществ и метаболизма в целом.

1. Качественные реакции на белок. Нарушение обмена веществ, сопровождаемое выделением белка с мочой (протеинурия или альбинурия), наблюдается при нефритах, расстройствах сердечной деятельности и других заболеваниях. Иногда наблюдается ложная протеинурия при попадании в мочу слизи, крови, гноя из мочевыводящих путей.

Для проведения качественных реакций на белок готовят три пробирки, подписывают их, вносят в каждую по 2 мл мочи и проводят исследования. Если необходимо, мочу вначале фильтруют.

а) **проба с кипячением.** В пробирку с мочой вносят несколько капель 10%-ного раствора уксусной кислоты и кипятят. При наличии белка образуется осадок, или муть. Подкисление содержимого пробирки исключает появление мути, образуемой фосфатами или карбонатами щелочных металлов.

б) **проба Геллера.** В пробирку вносят 2 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно наслаивают мочу (приготовленную заранее в начале опыта) на азотную кислоту. При наличии белка на границе двух жидкостей образуется белое кольцо коагулированного белка. Кольцо образуется в том случае, если концентрация белка в моче не менее 33 мг/100 мл мочи.

в) **проба с сульфосалициловой кислотой.** В пробирку с мочой вносят 2 мл 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. При наличии белка образуется помутнение или осадок. Проба с сульфосалициловой кислотой позволяет обнаружить белок при его концентрации 0,0015 %.

2. Открытие сахара в моче. В норме глюкоза в моче практически отсутствует. Глюкозурия (появление сахара в моче) обусловлена или гипергликемией, или нарушением пропускной способности (реабсорбции) почек. Гипергликемия чаще всего наблюдается при нарушении функции панкреатической железы (сахарный диабет).

Обнаружение глюкозы в моче основано на том, что, существуя в растворах в альдегидной форме, она, подобно альдегидам, легко окисляется слабыми окислителями, в том числе реактивом Фелинга, до глюконовой кислоты, а медь при этом восстанавливается до закиси меди (Cu_2O) кирпично-красного цвета. По появлению этой окраски и судят о присутствии глюкозы в моче. Мочу для этих целей собирают у животных натошак.

В пробирку наливают 1–2 мл мочи и добавляют 1–2 мл реактива Фелинга. Пробу перемешивают и помещают в кипящую водяную баню. Если глюкоза присутствует в моче, то появляется кирпично-красный осадок закиси меди.

Для исследования мочи можно использовать диагностические полоски глюкофан и глюкотест. В упаковках имеются инструкции по определению глюкозы в моче.

3. Качественное определение индикана в моче. В толстом отделе кишечника в результате гнилостных процессов ряд аминокислот превращается в ядовитые продукты (биогенные амины), которые обезвреживаются в печени с участием ФАФС или УДФГК. Так, из триптофана образуется индол, который в печени обезвреживается с образованием индикана (калиевая или натриевая соль индоксилсерной кислоты). Много индикана в моче травоядных животных, особенно в моче лошадей (до 220 мг на 1 л). В ничтожном количестве индикан содержится в любой нормальной моче.

Принцип метода определения индикана в моче основан на том, что индоксилсерная и индоксилглюкуроновая кислоты, содержащиеся в моче, при прибавлении крепкой соляной кислоты разлагаются на свои составные части, и освободившийся при этом индоксил окисляется KMnO_4 в синее индиго, растворимое в хлороформе.

При нормальном содержании индикана хлороформ имеет бледно-синюю окраску, при повышенном количестве – синюю окраску с фиолетовым оттенком.

К 2 мл мочи приливают 2 мл концентрированной HCl , 2 капли 2%-ного KMnO_4 и 2 мл хлороформа. Пробирку плотно закрывают пробкой и несколько раз переворачивают, извлекая индиго хлороформом. При наличии индикана хлороформ окрашивается в синий цвет, интенсивность которого зависит от количества индикана.

4. Обнаружение пигментов крови. При патологических состояниях в моче может появиться кровь (гематурия). Гематурия может наблюдаться при воспалении почек, кровотечении сосудов почек, мочевых путей, половых органов.

Для обнаружения кровяных пигментов используются следующие реакции:

а) пирамидоновая проба.

В пробирку отмерьте 2–3 мл мочи, добавьте 1 мл спиртового раствора пирамидона, 2 капли ледяной уксусной кислоты и 2–3 капли 3%-ного раствора пероксида водорода. При наличии кровяных пигментов в моче появляется фиолетовое окрашивание.

б) бензидиновая проба.

В пробирку отмерьте 1–2 мл мочи, кипятите на спиртовке, после чего охлаждайте и добавьте равный объем бензидина (5%-ный раствор в ледяной уксусной кислоте, свежеприготовленный) и несколько капель пероксида водорода. При наличии кровяных пигментов наблюдается появление синей или зеленой окраски.

Лабораторная работа 30.

Количественное определение компонентов мочи

1. Поляриметрический метод определения сахара мочи. Принцип метода заключается в использовании свойства глюкозы вращать плоскость поляризации вправо. По углу вращения поляризованного луча можно определить количество глюкозы.

Порядок выполнения работы. Моча должна быть прозрачной, не содержать белка, кислой реакции. Для этого мочу подкисляют слабой

уксусной кислотой, кипятят, охлаждают и фильтруют. Трубку поляриметра заполняют профильтрованной мочой без пузырьков воздуха, накрывают шлифованным стеклом, завинчивают плотно, насухо вытирают и помещают в аппарат.

Определение производят спустя 2–3 минуты после заполнения трубки, так как колебание частиц жидкости мешает исследованию. Оптически активный раствор глюкозы, отклоняя луч, меняет интенсивность света в окуляре; восстановить освещенность можно, повернув анализатор на определенный угол. Угол отклонения выражается в градусах шкалы прибора. Угол отклонения в 1° соответствует 1 % глюкозы при длине трубки 18,94; если длина 9,47 – полученный результат умножить на 2.

2. Определение ацетоновых тел (проба Ланге). К ацетоновым телам относятся ацетон, ацетонуксусная кислота и оксимасляная кислота. В моче встречаются совместно, поэтому раздельное их определение клинического значения не имеет. В норме в моче не содержатся.

Реактивы: смесь нитропруссидного натрия с серноокислым аммонием; раствор аммиака.

Порядок выполнения работы. В пробирку насыпают немного, так чтобы было покрыто дно нитропруссидной смеси, и приливают 5 мл мочи, взбалтывают и осторожно настилают 2 мл аммиака. Фиолетово-красное кольцо, появившееся на границе двух жидкостей, свидетельствует о наличии в моче ацетона.

Определение билирубина (проба Розина). Качественная реакция основана на превращении билирубина под воздействием окислителей (йода) в биливердин зеленого цвета.

Реактивы: раствор Люголя, или 1%-ный спиртовой раствор йода.

Порядок выполнения работы. На 3–4 мл мочи осторожно настилают 1–2 мл 1%-ного спиртового раствора йода, или раствора Люголя. При наличии желчных пигментов (билирубина) на границе жидкостей появляется зеленое кольцо. Оценка: в норме билирубин в моче не содержится.

Определение уробилина (проба Флоренса). Реактивы: концентрированная серная кислота; эфир; концентрированная соляная кислота.

Порядок выполнения работы. К 10 мл мочи добавляют 3–4 капли концентрированной серной кислоты, смешивают, приливают 2–3 мл эфира, пробирку закрывают резиновой пробкой и осторожно смешивают, не взбалтывая. В другую пробирку наливают 2 мл концентриро-

ванной соляной кислоты. Пипеткой отсасывают из первой пробирки эфирный слой и наслаивают его на соляную кислоту. На границе жидкостей при наличии уробилина образуется красно-фиолетовое кольцо различной интенсивности.

Вопросы для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Каковы физико-химические свойства мочи?
2. Какие основные компоненты входят в состав мочи?
3. Каковы причины появления в моче кетоновых тел?
4. При нарушении каких биохимических процессов в моче появляется глюкоза?
5. В каком случае в моче появляется белок? Какими методами можно определить концентрацию белка в моче?
6. Как обнаружить наличие пигментов крови в моче?
7. Какие показатели определяют при общем биохимическом анализе мочи?
8. С помощью каких реакций обнаруживают в моче белок, кровяные пигменты, креатенин, ацетон?
9. Принцип метода определения аммиака в моче.
10. Каковы причины увеличения концентрации креатинина в моче?
11. Какие компоненты мочи относят к патологическим?
12. При нарушении каких биохимических процессов в моче появляется глюкоза?

ЛИТЕРАТУРА

1. Алейникова, Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биологической химии: учебник / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова. – М.: Высш. шк., 1988. – 239 с.
2. Асатиани, В. С. Ферментные методы анализа / В. С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
3. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.]. – М.: Высш. шк., 1997. – 126 с.
4. Березов, Т. Т. Биохимия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2007. – 704 с.
5. Биологическая химия: учеб. пособие для студентов вузов / Ю. Б. Филиппович [и др.]; под ред. Н. И. Ковалевской. – М.: Academia, 2008. – 254 с.
6. Биохимия животных: учебник для студ. зооинженер. и ветеринарн. ф-тов с.-х. вузов / А. В. Четчин [и др.]. – М.: Высш. шк., 1982. – 511 с.
7. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под ред. Е. С. Северина и А. Я. Николаева. – М.: ГЭОТАР-Мед, 2001. – 448 с.
8. Ковалевская, Н. И. Биологическая химия / Н. И. Ковалевская, Г. А. Севастьянова, Ю. Б. Филиппович. – М.: Academia, 2008. – 256 с.
9. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия: учебник / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – М.: Высш. шк., 2000. – 479 с.
10. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
11. Кононский, А. И. Биохимия животных / А. И. Кононский. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1992. – 526 с.
12. Лабораторные и инструментальные исследования в диагностике: справочник / под ред. В. Н. Титова. – М.: Перспектива, 2004. – 454 с.
13. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. Т. 1–3 / А. Ленинджер; пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 1055 с.
14. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М., 2002. – 248 с.
15. Пустовалова, Л. М. Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов н/Д.: Феникс, 1999. – 542 с.
16. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб.: Химиздат, 2001. – 784 с.
17. Сухомлин, К. Г. Биохимия с основами физической и коллоидной химии. – Краснодар: КубГАУ, 2003. – 335 с.
18. Тумаков, С. А. Краткий терминологический словарь по биохимии / С. А. Тумаков. – М.: Перспектива, 2002. – 254 с.
19. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. – М.: Медицина, 2008. – 542 с.
20. Харитонов, Ю. Я. Аналитическая химия (аналитика). Кн. 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа / Ю. Я. Харитонов. – М.: Высш. шк., 2003. – 559 с.
21. Цыганов, А. Р. Биохимия. Практикум: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, И. В. Сучкова, И. В. Ковалева. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 140 с.
22. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии: учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск: ИВЦ Минфина, 2013. – 236 с.
23. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии: учеб. пособие / А. А. Чиркин. – Минск: Новое знание, 2002. – 512 с.
24. Шидловская, В. П. Ферменты молока: учебник / В. П. Шидловская. – М.: Агропромиздат, 1985. – 152 с.
25. Эллиотт, В. Биологическая химия и молекулярная биология / В. Эллиотт, Д. Эллиотт. – М.: НИИМБХ РАМН, 2000. – 692 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ.	4
2. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ.	4
Тема 1. ВИТАМИНЫ.	5
Лабораторная работа 1. Качественные реакции на витамины.	8
Лабораторная работа 2. Количественное определение витамина С по Тильмансу	26
Лабораторная работа 3. Определение витамина С йодометрическим методом. .	27
Лабораторная работа 4. Определение содержания витамина С в молоке.	29
Лабораторная работа 5. Количественное определение витамина Р (рутина). ...	30
Тема 2. ФЕРМЕНТЫ	34
Лабораторная работа 6. Обнаружение ферментов в биологическом материале. .	36
Лабораторная работа 7. Свойства ферментов.	41
Тема 3. ГОРМОНЫ.	50
Лабораторная работа 8. Качественные реакции на гормоны.	50
Лабораторная работа 9. Гормоны половых желез.	53
Тема 4. БЕЛКИ.	58
Лабораторная работа 10. Цветные реакции на белки и аминокислоты.	59
Лабораторная работа 11. Выделение белков из биологических объектов	66
Лабораторная работа 12. Реакции осаждения белков.	68
Тема 5. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ.	73
Лабораторная работа 13. Биологическое окисление.	74
Тема 6. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ.	80
Лабораторная работа 14. Определение содержания гликогена.	81
Лабораторная работа 15. Обмен углеводов.	85
Тема 7. ОБМЕН ЛИПИДОВ.	93
Лабораторная работа 16. Обмен липидов	94
Тема 8. ОБМЕН БЕЛКОВ.	101
Лабораторная работа 17. Определение активности протеаз (по методу Ансона)	102
Лабораторная работа 18. Обмен белков.	103
Лабораторная работа 19. Переваривание белков ферментами поджелудочной	108
железы	
Лабораторная работа 20. Анализ желудочного сока.	109
Тема 9. ОБМЕН МИНЕРАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ.	114
Лабораторная работа 21. Определение кальция и фосфора.	116
Лабораторная работа 22. Определение фосфатов и роданидов в слюне.	120
Тема 10. БИОХИМИЯ КРОВИ.	122
Лабораторная работа 23. Биохимия крови.	123
Тема 11. БИОХИМИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ.	127
Лабораторная работа 24. Биохимия мышечной ткани.	128
Лабораторная работа 25. Разделение белков мышечной ткани.	130
Лабораторная работа 26. Обнаружение молочной кислоты.	132
Тема 12. БИОХИМИЯ МОЧИ.	133
Лабораторная работа 27. Исследование физических и химических свойств мочи. .	134
Лабораторная работа 28. Качественный анализ нормальных составных компонен	136
тов мочи.	
Лабораторная работа 29. Качественные реакции на патологические компоненты	138
мочи.	
Лабораторная работа 30. Количественное определение компонентов мочи	140
Литература.	143

Учебное издание

Поддубная Ольга Владимировна
Ковалёва Ирина Владимировна
Мохова Елена Владимировна

ХИМИЯ.
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Методические указания по выполнению
лабораторных работ

Редактор *Т. П. Рябцева*
Технический редактор *Н. Л. Якубовская*
Корректор *С. Н. Кириленко*

Подписано в печать 25.02.2014. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Ризография. Гарнитура «Таймс». Усл. печ. л. 8,37. Уч.-изд. л. 7,69.
Тираж 125 экз. Заказ .

УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Свидетельство о ГРИИРПИ № 1/52 от 09.10.2013.
Ул. Мичурина, 13, 213407, г. Горки.

Отпечатано в УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».
Ул. Мичурина, 5, 213407, г. Горки.