

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

**Кафедра химии**

# **ХИМИЯ**

**Лабораторный практикум**

**Лабораторная работа  
Обмен белков.**

## Лабораторная работа

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 физиологическим действием. Поэтому тканевое декарбоксилирование аминокислот носит избирательный характер. Конечными продуктами распада аминокислот в организме являются: аммиак, мочева кислота, мочевины, углекислый газ и вода.

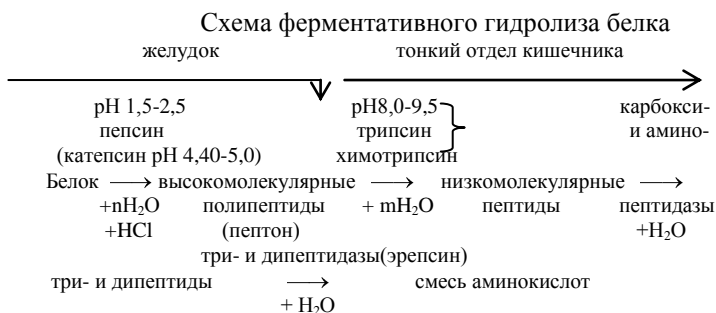
**Цель занятия.** Провести ферментативный гидролиз белка и обнаружить продукты гидролиза. Изучить особенности переваривания белка у различных видов животных и рыб. Познакомиться с методами количественного определения веществ белкового обмена.

**Материалы и оборудование.** Соляная кислота, 0,2% и 1% раствор; желудочный сок или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте;

гидрокарбонат натрия, 1 % раствор; моноиодуксусная кислота, 0,002М в 0,1% растворе гидрокарбоната калия; гидроксид натрия 10% раствор; сульфат меди, 5% раствора; этиловый спирт, 75% раствор; нингидрин, 1 % раствор в 95% ацетоне; трихлоруксусная кислота, 10% раствор; насыщенный раствор гидроксида калия; салициловый альдегид, 2% 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.

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



В реальных условиях на любом этапе гидролиза может образоваться часть свободных аминокислот, а часть переварившихся 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.

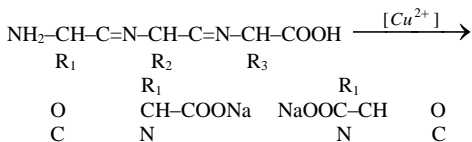
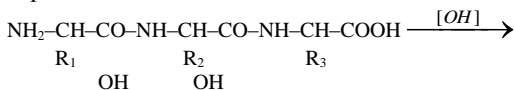
Протеолитические ферменты расщепляют пептидные связи специфично. Пепсин производит гидролиз связей, образованных с одной стороны ароматическими, с другой – дикарбоновыми аминокислотами.

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.

Нумеруют четыре пробирки и вносят в первую – 3-4 мл 0,2% раствора соляной кислоты; во вторую – 3-4 мл желудочного сока (или раствора пепсина в HCl); в третью – 3-4 мл раствора пепсина, нейтрализованного предварительно до слабощелочной реакции раствором соды; в четвертую – 3-4 мл предварительно прокипяченного раствора пепсина. Затем во все четыре пробирки вносят равные по объему кусочки фибрина или коагулированного яичного белка. Все пробирки ставят в термостат на 45-60 минут при 37-40°C. После термостатирования продельвают биуретовую реакцию. Для этого во все пробирки вносят по 1 мл 10% раствора NaOH и 2-3 капли 5% 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. В реакцию с гидроксидом меди (II) полипептиды вступают в енольной форме, и фиолетовая Cu–Na– комплексная соль полипептидов и белков имеет следующее строение:



Cu

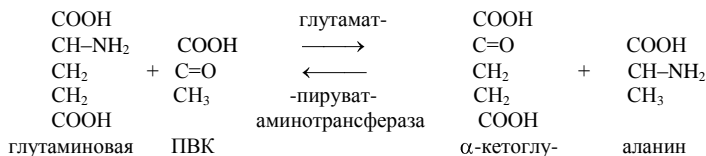


(разводят вытяжку) и 3-4 капли раствора нингидрина. Полученную смесь тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане при  $t$   $70^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. Появляется сине-фиолетовая окраска, свидетельствующая о наличии в пробе  $\alpha$ -аминокислот.

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

**Опыт 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -кетокислот. Катализируют реакции переаминирования аминотрансферазы (трансаминазы), коферментом которых выступает фосфопиридоксаль ( $\text{B}_6$ ).

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.



кислота

таровая кислота

Мышечную ткань измельчают ножницами в фарфоровой чашке и растирают с пятикратным объемом 0,1% 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 <sub>3</sub> с СН <sub>2</sub> 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. Моноидоуксусную кислоту вносят для предотвращения гликолиза.

Пробу № 1 на инкубацию не ставят, мышечную кашку помещают только после внесения 1 мл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы № 2 и 3 после внесения гомогената перемешивают, ставят на инкубацию в термостат на 60-90 минут при температуре 37-40°С, периодически встряхивая (через 5-10 минут). По окончании инкубации для удаления белка во 2 и 3 пробы вносят 1 мл трихлоруксусной кислоты и через 10 минут 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% раствора салицилового альдегида. Содержимое пробирок перемешивают и помещают на 10 минут в водяную баню (t 37-38°С) для развития окраски.

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

**Опыт 3. Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом.** Одним из методов определения общего белка в сыворотке крови является рефрактометрический метод.

В основе данного метода лежит способность исследуемого раствора преломлять проходящие из другой среды лучи света. Степень преломления света, или величина рефракции сыворотки крови, зависит в основном от содержания в ней белков. Поэтому количественно оцени-

вая величину рефракции по показателю преломления сыворотки с помощью специального прибора – рефрактометра, можно определить содержание белков в сыворотке крови.

Перед началом работы проводят установку прибора на ноль (юстировку) по дистиллированной воде, коэффициент преломления которой равен 1,333. Для этого на поверхность измерительной призмы наносят несколько капель воды и осторожно закрывают измерительную камеру. Осветительным зеркалом пучок света направляют через осветительную призму так, чтобы он равномерно осветил поле зрения. Маховичком устанавливают индекс отсчета (неподвижный горизонтальный штрих сетки) на 1,333, винтом компрессора устраняют окрашенность границы светотени. При правильной настройке прибора граница раздела светлого и темного полей должна совпадать с визирным перекрестием.

Настроив прибор, тщательно вытирают воду в призме. Для определения общего белка сыворотки крови 1-2 капли ее наносят на измерительную призму и, глядя в окуляр, вращением маховичка совмещают границу темного и светлого полей с перекрестием визирных линий. Затем по шкале показателей преломления снимают отчет.

Определив показатель преломления исследуемой сыворотки, по таблице Рейса находят соответствующее процентное содержание белка. Показатель преломления определяют при рассеянном дневном свете при 20°C. Если показатель преломления определяют при какой-либо другой температуре, то вводят поправку на отклонения температуры. При отклонении температуры на 1°C показатель преломления изменяется на 0,00035. При понижении температуры – поправка отнимается, а при повышении – прибавляется.

**Содержание общего белка в сыворотке крови, г/л**

Коэффициент рефракции	г/л белка	Коэффициент рефракции	г/л белка
1,3409	28,4	1,3484	72,0
1,3412	30,6	1,3487	74,2
1,3416	32,8	1,3491	76,3
1,3420	35,0	1,3495	78,5
1,3424	37,2	1,3498	80,6
1,3428	39,4	1,3502	82,8
1,3431	41,6	1,3506	84,9
1,3435	43,8	1,3510	87,10
1,3439	46,0	1,3513	89,2
1,3443	48,1	1,3517	91,4
1,3446	50,3	1,3521	93,5

1,3450	52,5	1,3524	95,7
1,3454	54,7	1,3528	97,8
1,3458	56,8	1,3532	99,9
1,3461	59,0	1,3535	102,0
1,3465	61,2	1,3539	104,1
1,3469	63,4	1,3542	106,2
1,3472	65,5	1,3546	108,3
1,3476	67,7	1,3550	110,4
1,3480	69,8	1,3553	112,5

По окончании работы смывают водой с призм прибора сыворотку, удаляют воду фильтровальной бумагой и осушают призмы спирто-эфирной смесью. На нижнюю призму накладывают кусочек фильтровальной бумаги и закрывают камеру. В таком состоянии прибор оставляют до следующего определения.

*Вывод: коэффициент рефракции исследуемой сывотки крови составил ....., что по таблице соответствует ..... г/л белка.*

## ЛИТЕРАТУРА

### *Основная*

1. Барковский, Е. В. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: учеб. пособие / Е. В. Барковский, С. В. Ткачев, Г. Э. Атрахимович и др. – М.: Высшая школа, 1997. – 126 с.
2. Биохимия животных: Учебник для студ. зооинженер. и ветеринарн. ф-тов с/х вузов / А.В. Четкин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский /Под ред. проф. А.В.Четкина. – М., Высш. школа, 1982. – 511 с.
3. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов обучающихся по агрономическим специальностям 6-ое изд, стереотипное. – Дрофа:– 2004. – 672 с.
4. Князев Д. А. Неорганическая химия/ Д. А. Князев, С. Н. Смарицын. – М.: Высш. шк., 1990. - 425 с.
5. Кононский, А.И. Биохимия животных: учебник пособие для вузов/ А. И. Кононский. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. – 432 с.
6. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие/А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная, И. В. Ковалева, Т. В. Булак.–Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
7. Химия. Общая химия с основами аналитической : учебно-методическое пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Горки : БГСХА, 2012. – 204 с. ISBN 978-985-467-393-6.
8. Цыганов, А.Р. Биохимия практикум: учебное пособие / А.Р. Цыганов, И.В. Сучкова, И.В. Ковалева. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
9. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии : учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск : ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

### *Дополнительная*

1. Алешин, В.А. и др. Практикум по неорганической химии - М.: Издат. Центр "академия", 2004. – 384 с.
2. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. - 704 с.
3. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
4. Введение в лабораторный практикум по неорганической химии: Учеб. пособие / В.В. Свиридов, Г.А.Попкович и др. – Мн: Выш. шк., 2003. – 96с.
5. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 382с.
6. Кудряшов Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 160 с.
7. Ленский, А. С. Введение в биоорганическую и биофизическую химию / А. С. Ленский. – М.: Высшая школа, 1989.
8. Метревели, Т.В. Биохимия животных. Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 295с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцепродуктов. /Под ред. Дж. К.Мида; пер. с англ. И.С.Горожанкиной.- М.: Профессия, 2009. - 384с.
10. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. - 566 с.
11. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов: учебник для вузов/ Ю.А. Ершов, В.А. Попков и др. 6-е изд.,стер. М.: Высш. шк., 2007. – 560с.
12. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб: Химиздат, 2001.
13. Угай, Я. А. Общая и неорганическая химия: учеб. для вузов. 4-е изд. - М.: Высш. шк., 2004. – 440 с.

14. Хазипов, Н.З. Биохимия животных: учебник / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.

*Справочники*

1. Кольман, Я., Рем, К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. - 469 с.

2. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ/ Под ред. Р.А. Лидина. – 5-е изд., стер. – М.: КолосС, 2008, - 480 с.: ил.

Составители

**Поддубная** Ольга Владимировна

**Ковалева** Ирина Владимировна

**Мохова** Елена Владимировна