

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образование
высшего образования
Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова**

БИОХИМИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ

Направления подготовки
**35.03.07 Технология производства и
переработки сельскохозяйственной продукции**

Биодогическая химия: метод. указания по выполнению лабораторных работ для студентов специальности 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции /Сост.: П.В. Смутнев // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2018 - 44 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ составлены в соответствии с программой дисциплины и предназначены для студентов специальности 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции

Содержат краткое описание лабораторных методов исследования основных классов биологически активных соединений (аминокислот, белков, ферментов, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, их превращения и связанные с ними превращения энергии в организме животных). Направлены на формирование у студентов навыков проведения физико-химического и биологического анализов и использования их результатов в профессиональной деятельности.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия является одним из важнейших разделов химической науки. В соответствии с требованиями ФГОС ВПО с учетом рекомендаций и ПрООп ВПО по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции дисциплина изучает химические закономерности биологически активных веществ; основные физические, химические основы жизнедеятельности организма и процессы, происходящие в организме с точки зрения общебиологической науки. Современная биологическая химия – настолько обширная область естествознания, что многие ее разделы представляют собой самостоятельные, хотя и связанные между собой научные дисциплины.

В результате изучения дисциплины студенты должны знать физические и химические основы жизнедеятельности организма; химические закономерности биологически активных веществ. Уметь грамотно объяснять процессы, происходящие в организме с точки зрения общебиологической науки; оценивать химические реакции; использовать результаты в профессиональной деятельности; пользоваться лабораторным оборудованием. Владеть знаниями об основных биохимических законах и их использовании в ветеринарии; навыками работы на лабораторном оборудовании, методами наблюдения и эксперимента. Основное назначение биохимии сводится к тому, чтобы решать на молекулярном уровне задачи фундаментальные и общебиологические.

Задачей лабораторной практики является закрепление основных разделов теоретического курса, ознакомление студентов с методикой проведения качественных и количественных анализов биологически активных веществ, конечных продуктов обмена.

Конечная цель обучения: сформировать у студентов на базе усвоенной системы знаний, умений и практических навыков в области биологической химии, способности для оценки последствий его профессиональной деятельности при участии в решении практических вопросов в области ветеринарии.

По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования и реактивов, пример расчета, необходимые химические реакции, форма записи и список литературы.

ТЕМА 1. СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Цель: сформировать практические навыки по установлению качественного анализа аминокислотного состава белков, исследованию их физико-химических свойств и количественного определения.

I. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ И АМИНОКИСЛОТЫ

При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков – это общие (универсальные) цветные реакции на белки. К таким реакциям относятся биуретовая и нингидриновая. Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка той или иной аминокислоты (таблица 1) и характерны только для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота, т.е. данная реакция на радикал, входящий в состав аминокислоты (специфические цветные реакции). С помощью этих реакций легко составить общее представление о качественном аминокислотном составе белка. К таким реакциям относятся ксантопротеиновая, реакция Адамкевича, Фоля и др.

Значение цветных реакций состоит также в том, что они дают возможность обнаружить присутствие белка в растворах, биологических жидкостях. Эти реакции используют не только для установления качественного аминокислотного состава, но и для количественного определения белка и содержащихся в нем аминокислот.

Материал исследования: 1%-й раствор белка куриного яйца

Реактивы и оборудование: NaOH, 10% и 20%-й растворы; CuSO₄, 1%-й раствор; нингидрин, 0,1% водный раствор; HNO₃, концентрированная; ледяная (концентрированная) уксус-

ная кислота; H₂SO₄, концентрированная; формальдегид, 2,5%-й раствор; Pb(CH₃COO)₂, 5%-й раствор; NaNO₂, 1%-й раствор; сахароза, 20%-й раствор; штатив с пробирками; держатель для пробирок; газовая горелка; глазные пипетки; пипетки ёмкостью 1-5 мл.

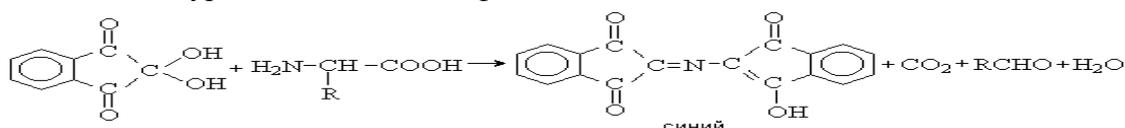
1. Биуретовая реакция

Обусловлена наличием в белке пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с сернокислой медью окрашенные медные солеобразные комплексы.

Ход работы: К 1,0 мл раствора белка приливают равный объём 10% раствора гидроксида натрия и 2-3 капли 1% раствора сульфата меди. Появляется фиолетовое окрашивание с красным или синим оттенком.

2. Нингидриновая реакция на α-аминокислоты

Свободные α-аминокислоты, полипептиды и белки дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином (трикетогидриндегидратом). При нагревании белка с водным раствором нингидрина α-аминокислоты окисляются и распадаются с образованием двуокиси углерода, аммиака и соответствующего альдегида и восстановленного нингидрина. Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и со второй молекулой нингидрина, образуя краситель типа мурексида, имеющий фиолетово-синий цвет.

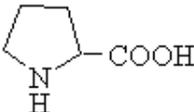


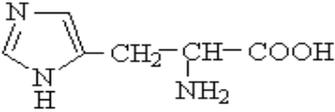
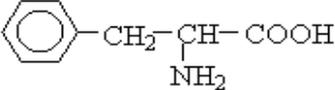
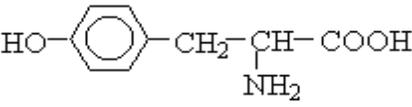
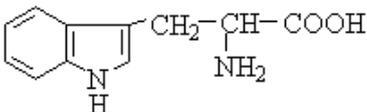
Эта реакция широко используется в методе хроматографического разделения аминокислот для открытия отдельных аминокислот и определения их количества.

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл белка, приливают 1 мл 0,1% водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 мин. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

Таблица 1

Протеиногенные аминокислоты (классификация – по полярности радикала)

Название	Химическое строение
1	2
Неполярные R-группы	
аланин (ала)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">МАМК</p>
лейцин (лей)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">МАМК</p>
валин (вал)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">МАМК</p>
пролин (про)	 <p style="text-align: right;">ГетероЦК</p>
изолейцин (иле)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">МАМК</p>
глицин (гли)	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p style="text-align: right;">МАМК</p>
Полярные, незаряженные R-группы	

серин (сер)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАМК
цистеин (цис)	$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАМК
треонин (тре)	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАМК
метионин (мет)	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАМК
глутамин (гли)	$\text{H}_2\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	ДАМК
аспарагин (асп)	$\text{H}_2\text{NCO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	ДАМК
Название	Химическое строение	
Отрицательно заряженные R-группы		
глутаминовая кислота (глу)	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАДК
аспарагиновая кислота (асп)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	МАДК
Положительно заряженные R-группы		
лизин (лиз)	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	ДАМК
гистидин (гис)		ГетероЦК
аргинин (арг)	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\text{C}}=\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	ДАМК
Ароматические R-группы		
фенилаланин (фен)		ГомоЦК
тирозин (тир)		ГомоЦК
триптофан (три)		ГетероЦК

3. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты

Реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), которые при обработке концентрированной азотной кислотой подвергаются нитрованию. Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде дают соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. После охлаждения в пробирку добавляют по каплям 10% раствор едкого гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания, что свидетельствует об образовании натриевой соли динитротирозина.

4. Реакции на триптофан

а) Реакция Адамкевича. При добавлении к раствору белка незначительных количеств глиоксиловой кислоты в присутствии концентрированной серной кислоты наблюдают красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция связана с присутствием в молекуле белка аминокислоты триптофана и основана на способности триптофана в кислой среде вступать в реакцию с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.

Глиоксиловая кислота всегда присутствует в небольших количествах в ледяной уксусной кислоте, поэтому последнюю используют в реакции как источник глиоксиловой кислоты.

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл раствора белка, прибавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты и осторожно по стенке подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей появляется красно-фиолетовое окрашивание.

б) Реакция Шульце-Распайля. Под влиянием серной кислоты происходит гидролиз сахарозы до моносахаридов, которые обезвоживаются, превращаясь в оксиметилфурфурол. Триптофан, реагируя с оксиметилфурфуролом, образует комплекс, окрашенный в вишнево-красный цвет.

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл раствора белка, 2 капли 20% раствора сахарозы и перемешивают. Затем осторожно по стенке, следя за тем, чтобы жидкости не смешивались, добавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. Приблизительно через 10 минут на границе двух слоев появляется окрашивание в виде кольца.

в) Реакция Ваузене. Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.

Ход работ: К 2 мл раствора яичного белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют *осторожно*, по каплям, 6 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 мин добавляют, перемешивая, 10 капель 1% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

5. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие серу (цистеин, цистин)

При добавлении к раствору белка едкой щёлочи, ацетата свинца и последующем кипячении раствор начинает темнеть. При интенсивном кипячении образуется чёрный осадок сернистого свинца.

Метионин, хотя и является серосодержащей аминокислотой, но данной реакции не даёт, поскольку сера в нём прочно связана.

Ход работы: В пробирку наливают 1 мл 0,5%-го раствора ацетата свинца и понемногу прибавляют раствор 20% гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца. Приливают несколько капель белка и смесь осторожно нагревают. Раствор начинает темнеть.

II. СВОЙСТВА БЕЛКОВ

1. Испытание белков на полноценность

Белки, содержащие все незаменимые аминокислоты, считаются полноценными.

Исследуемый материал: белок куриного яйца; желатин; казеин (в качестве его источника можно взять творог); сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: NaOH, 10% и 20%-й растворы; CuSO₄, 1%-й раствор; нингидрин, 0,1% водный раствор; HNO₃, концентрированная; ледяная (концентрированная) уксусная кислота; H₂SO₄, концентрированная; формальдегид, 2,5%-й раствор; Pb(CH₃COO)₂, 5%-й раствор; NaNO₂, 1%-й раствор; сахароза, 20%-й раствор; штатив с пробирками; держатель для пробирок; газовая горелка; глазные пипетки; пипетки ёмкостью 1-5 мл.

Аминокислоты открывают качественными реакциями (см. занятие 1). Результаты опытов внести в таблицу 2:

Таблица 2

Испытание белков на полноценность

Белок	Р е а к ц и я				
	биуретовая	нингидриновая	ксантопротеиновая	триптофан	Фоля
Яичный					
Желатин					
Казеин					
Сыворотка крови					

Результаты позволяют сравнить по составу белки различного происхождения. Сделать вывод об их полноценности.

2. Качественные реакции на сложные белки (гликопротеины)

Сложные белки – это белки, содержащие в своей структуре компоненты небелковой природы, так называемые простетические группы. В зависимости от химической природы этого компонента сложные белки делятся на глико-, липо-, нуклео-, фосфо-, хромопротеины.

Гликопротеины содержат в своей молекуле помимо простого белка углеводный компонент. Гликопротеины присутствуют почти во всех тканях и жидкостях организма, в секретах слизистых желез (муцины), входят в состав костной, хрящевой и соединительной тканей (мукоиды). В организме они играют важную роль, выполняя опорную, защитную функции, препятствуют проникновению инфекций в организм, участвуют в процессах межклеточного взаимодействия.

Материал исследования: слюна.

Реактивы и оборудование: ледяная (концентрированная) уксусная кислота; H₂SO₄, концентрированная; α-наф-тол, 1%-й раствор в 70% спирте; NaOH, 30%-й раствор; CuSO₄, 2%-й раствор; вода дистиллированная.

Оборудование: штатив с пробирками; фильтры бумажные; воронки, пробирки, пипетки глазные; держатель для пробирок; газовая горелка; глазные пипетки; пипетки ёмкостью 1-5 мл.

Ход работы: 1) *Выделение муцина из слюны.* В пробирку собирают 1-2 мл слюны и по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту (2-3 капли). Выпадает осадок муцина. Через 3 мин. жидкость фильтруют, сгусток на фильтре промывают водой, осторожно переносят в пробирку и добавляют 30% раствор гидроксида натрия до полного растворения осадка (около 2 мл). С содержимым пробирки (щелочной раствор муцина) проводят следующие реакции.

2) *Реакция на белковый компонент.* К 1 мл щелочного раствора муцина прибавляют 1-2 капли 2% раствора сульфата меди. Положительная биуретовая реакция доказывает присутствие в пробе белка.

3) *Реакция на углеводный компонент.* К 1 мл щелочного раствора муцина добавляют 2 капли раствора α-нафтола, хорошо перемешивают. Раствор нейтрализуют, осторожно добавляя 3 капли концентрированной серной кислоты. После остановки реакции осторожно подслаивают равное суммарному объему количество концентрированной серной кислоты (15-20 капель). На границе раздела жидкостей появляется окрашенное кольцо фиолетового цвета.

3. Растворимость белков

Многие белки растворяются в воде, что обусловлено наличием на поверхности белковой молекулы свободных гидрофильных групп. Растворимость зависит от структуры белка, реакции среды, присутствия электролитов. В кислой среде лучше растворяются белки, обладающие кислыми свойствами, а в щелочной – белки, обладающие основными свойствами. Так, альбумины хорошо растворяются в дистиллированной воде, а глобулины растворимы в воде только в присутствии электролитов. Не растворяются в воде белки опорных тканей (коллаген, кератин, эластин и др.).

Материал исследования: неразведенный яичный белок; шерсть; волосы.

Реактивы и оборудование: KCl, 5%-й раствор; вода дистиллированная; штатив с пробирками; пипетки глазные.

Ход работы: 1) К 2 каплям неразведенного яичного белка прибавляют 1 мл дистиллированной воды и перемешивают. При этом яичный альбумин растворяется, а яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка.

2) К 2 каплям яичного белка прибавляют 1 мл 5% раствора хлорида калия. В слабом солевом растворе растворяются как альбумины, так и глобулины.

3) Проверяют растворимость в воде и 5% растворе хлористого калия белка кератина, содержащегося в шерсти и волосах.

4. Высаливание и осаждение белков

Реакции осаждения белков, в зависимости от применяемого осадителя, бывают необратимыми и обратимыми.

Материал исследования: 1% раствор белка; плазма крови.

Реактивы и оборудование: концентрированные кислоты (H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , H_3PO_4); $CuSO_4$, 1% и 7%-й растворы; $Pb(CH_3COO)_2$, 5%-й раствор; $AgNO_3$, 5%-й раствор; сульфосалициловая кислота, 10%-й раствор; трихлоруксусная кислота, 10%-й раствор; пикриновая кислота, 10%-й раствор; CH_3COOH , 1% и 10%-й растворы; железистосинеродистый калий, 5%-й раствор; NaOH, 10%-й раствор; NaCl, насыщенный раствор; $(NH_4)_2SO_4$, кристаллический и насыщенный раствор; дистиллированная вода; органический растворитель (спирт или хлороформ, или ацетон, или эфир); штатив с пробирками; газовые горелки; держатель для пробирок; воронки; фильтровальная бумага; стеклянные палочки; пипетки глазные; пипетки на 1-5 мл.

А) Необратимое осаждение белков (денатурация)

Денатурация белка (необратимое осаждение) сводится к нарушению пространственной структуры белка и потере им биологических свойств. При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворимы в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся: осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков неорганическими осадителями

а) осаждение белков минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка и образуют комплексные соли белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется.

Ход работы: В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной азотной кислоты. Затем, наклонив пробирку, медленно по стенке добавляют 1 мл 1% раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок в виде белого кольца.

Такую же реакцию проделывают с концентрированной соляной, серной и ортофосфорной кислотами.

б) осаждение белков солями тяжелых металлов

Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей нитрата серебра и хлорида ртути), но нерастворимые в воде. Способность белка прочно связывать ионы тяже-

лого металла в виде нерастворимых осадков в воде используется как противоядие при отравлениях солями ртути, меди, свинца и т.д.

Ход работы: В три пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка и добавляют по 3-4 капли: в первую пробирку – 7% раствора сульфата меди, во вторую – 5% раствора ацетата свинца, в третью – 5% раствора нитрата серебра. Во всех пробирках образуется осадок.

Осаждение белков органическими осадителями

Ход работы: **а) осаждение белков органическими кислотами**

В 2 пробирки наливают по 2 мл 1% раствора белка и добавляют в одну пробирку 4-5 капель 10% раствора сульфосалициловой кислоты, в другую – 5-10 капель 10% трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

б) осаждение белков органическими растворителями

К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96% этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

в) осаждение белков реактивами на алкалоиды

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

Осаждение белков при нагревании

Ход работы: В пять пробирок наливают по 0,5 мл 1% раствора яичного белка.

Содержимое первой пробирки нагревают до появления опалесценции (помутнения раствора).

К раствору белка во второй пробирке осторожно добавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты, нагревают и наблюдают вначале появление опалесценции, а затем выпадение белого хлопьевидного осадка белка. Это объясняется тем, что белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии.

К раствору белка в третьей пробирке добавляют 1-2 капли 10% раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок не образуется, так как в кислой среде частицы белка перезаряжаются и приобретают положительный заряд.

К раствору белка в четвертой пробирке добавляют 1-2 капли 10% раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Выпадает осадок вследствие адсорбции ионов электролита (образование двойного электрического слоя) и нейтрализации заряда на частицах белка.

К раствору белка в пятой пробирке добавляют 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка усиливается.

Б) Обратимое осаждение белков (высаливание)

При добавлении к водным растворам белков сульфатов или хлоридов щелочных и щелочно-земельных металлов (Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4 и др.) происходит дегидратация и нейтрализация белковых частиц, при этом белки выпадают в осадок без изменения нативной структуры. Такой тип осаждения белков называется *высаливанием*. Высаливание – обратимый процесс, и после удаления соли (разбавлением водой, диализом) белок вновь приобретает природные свойства. Поскольку разные белки высаливаются при различных концентрациях солей, этот метод используется для фракционирования белков. Для разделения белков методом высаливания широко применяется сульфат аммония.

Фракционное осаждение белков плазмы крови сульфатом аммония. Фибриноген выпадает в осадок при насыщении плазмы сернокислым аммонием, глобулины – при полунасыщении, а альбумины – при полном насыщении.

Ход работы: **1)** К 2 мл плазмы крови добавляют 5 мл дистиллированной воды, 3,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадает фибриноген (можно наблюдать лишь незначительное помутнение), который отделяют фильтрованием.

Наличие белка на фильтре проверяют биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром переносят в чистую пробирку и на фильтр наливают 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди. Фильтрат №1 используют для дальнейшей работы.

2) К 4 мл фильтрата №1 добавляют 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. В осадок выпадают глобулины, которые отделяют фильтрованием. Получают осадок, с которым проделывают биуретовую реакцию, и фильтрат №2.

3) К фильтрату №2 добавляют при постоянном перемешивании стеклянной палочкой кристаллический сульфат аммония до насыщения (пока соль не перестанет растворяться). Выпадают в осадок альбумины, наличие которых проверяют биуретовой реакцией: 1 мл смеси переносят в чистую пробирку, добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди.

5. Определение изоэлектрической точки белка

Молекулы белка имеют электрический заряд, возникающий в результате ионизации свободных карбоксильных групп и аминокрупп. Заряд белка зависит, во-первых, от аминокислотного состава белка, во-вторых, от pH среды. При определенном значении pH суммарный заряд молекулы белка может стать равным нулю. Это значение pH называется *изоэлектрической точкой белка* (ИЭТ). Различные белки имеют различные ИЭТ. У кислых белков ИЭТ лежит при $pH < 7$, у основных – при $pH > 7$.

В изоэлектрическом состоянии белок максимально неустойчив и легко может быть осажден из раствора. Эта особенность поведения белка используется для экспериментального определения его ИЭТ.

Материал исследования: 1% раствор желатина.

Реактивы и оборудование: спирт этиловый; буферные растворы с pH 3,0; 4,0; 5,0 и 6,0; пипетки, штатив с пробирками.

Ход работы: В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл буферного раствора с разными значениями pH (3,0; 4,0; 5,0; 6,0) и по 2 мл 1% раствора желатина. Содержимое перемешивают, не допуская образования пены, затем в каждую пробирку осторожно, не перемешивая, насаивают по 1 мл спирта. Через 30 мин отмечают пробирку, в которой наблюдается наиболее интенсивное помутнение на границе раздела жидкостей. pH раствора в этой пробирке соответствует ИЭТ данного белка.

Степень помутнения обозначают так: (-) – отсутствие помутнения; (+) – слабое помутнение; (++) – выраженное помутнение; (+++) – максимальное помутнение.

Результаты эксперимента занести в таблицу 3:

Таблица 3

Определение изоэлектрической точки желатина

№ пробирки	pH буферного раствора	Степень помутнения на границе раздела сред

На основании полученных результатов сделать вывод о значении изоэлектрической точки и об особенностях аминокислотного состава данного белка.

6. Количественное определение белка с помощью рефрактометра

Рефрактометрия - показатель преломления луча света в растворе испытуемого вещества. Показателем преломления (n_D) называют отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Приборы называются рефрактометрами. Применяют для установления подлинности, чистоты веществ и определения их концентрации в растворе. Следует учитывать, что при повышении температуры показатель преломления уменьшается, а при понижении - увеличивается. Поправку рассчитывают по формуле: $n_t = n_D^{20} + (20 - t) \cdot 0,0002$, где n_D^{20} - показатель преломления при 20°C для желтой линии натрия D (5893Å), t - температура, при которой проводились измерения.

Материал исследования: раствор белка; сыворотка крови.

Реактивы и оборудование: вода дистиллированная; рефрактометр; пипетки; вата.

Ход работы: Работу следует выполнять в проходящем свете, для чего необходимо направить световой поток в окно верхней камеры рефрактометра.

Перед определением прибор устанавливают в рабочее положение. Для этого открывают крышку камеры, на призму наносят несколько капель дистиллированной воды и камеру закрывают. Температура на термометре прибора должна быть 18-20°C.

Глядя в окуляр и перемещая рычаг окуляра вверх-вниз, устанавливают пунктирную линию на значение 1,333 по шкале показателя преломления. Граница светотени должна в этом случае совпадать с пунктирной линией. Если она не совпадает, то ключом её совмещают с этой линией.

После этого воду с линзы удаляют кусочком фильтровальной бумаги и насухо протирают тампоном ваты.

Нанося несколько капель раствора белка (или сыворотки крови) на линзу, закрывают крышку камеры и смотрят в окуляр. Граница светотени смещается вверх. Перемещая рычаг окуляра вверх, добиваются совмещения пунктирной линии с границей светотени. Отмечают значение на шкале показателей преломления по месту расположения совмещённой границы светотени и пунктирной линии.

По таблице 4 находят процентное содержание белка в растворе (или сыворотке).

Таблица 4

Пересчёт показаний рефрактометра на показатель преломления и процент белка

Показатель преломления	Белок, %	Показатель преломления	Белок, %
1,33705	0,63	1,34575	5,47
1,33743	0,86	1,34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33858	1,52	1,34724	6,55
1,33896	1,74	1,34761	6,77
1,33934	1,96	1,3498	6,98
1,33972	2,18	1,34836	7,20
1,34010	2,40	1,34873	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34162	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34350	4,38	1,35205	9,35
1,34388	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

7. Экстракция белков из мышечной ткани

Характерным компонентом мышечной клетки являются сократительные элементы – миофибриллы. Они содержат сократительные белки – миозин и актин и регуляторные белки – тропомиозин и тропонин. Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие

белки саркоплазмы (гиалоплазма мышечных клеток) растворимы в воде или солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). Эта фракция содержит также и такие белки, которые имеются не только в мышечных, но и в других клетках. При экстракции мышечной ткани 5%-ным раствором КСl извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Материал исследования: мышечная кашица.

Реактивы и оборудование: КСl, 5%-й раствор; NaOH, 0,1 н раствор; трихлоруксусная кислота, 10%-й раствор; ступка и стеклянный песок; центрифуга; центрифужные пробирки; штатив с пробирками; стеклянная палочка; пипетки; фильтровальная бумага; марля; воронки; как для работ 12 и 19.

Ход работы: 1) Для разрушения клеток 2 г измельчённой ножницами мышечной ткани помещают в ступку, добавляют 2 мл 5% раствора хлорида калия и растирают со стеклянным песком до гомогенного состояния. Продолжая экстракцию белков, добавляют ещё 3 мл раствора хлорида калия и растирают кашицу в течение 5 минут, затем ещё раз добавляют 5 мл 5% раствора хлорида калия и растирают еще 5 минут.

2) Полученный экстракт сливают в две центрифужные пробирки, оставляя в ступке стеклянный песок. Затем пробирки помещают в центрифугу. Гомогенат центрифугируют в течение 15 минут при 4000 об./мин. При этом осаждаются обломки клеток, неразрушенные целые клетки, волокна соединительной ткани. Надосадочную жидкость, содержащую белки мышечной ткани, сливают в чистую пробирку.

3) С экстрактом прodelьвают цветные реакции (см. занятие 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>

ТЕМА 2. СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Цель: сформировать практические навыки по обнаружению ферментов в биологических системах и исследованию свойств энзимов как БАВ.

Биохимические реакции, протекающие в живой клетке, требуют участие биокатализаторов – *ферментов (энзимов)*. Это вещества сложного строения, белковой структуры, чаще, это сложные белки с небелковой простетической группой. Вещества, которые ферменты подвергают химическому превращению, называются *субстратами*. Каталитическая активность ферментов зависит от нативной трехмерной структуры белковой молекулы. Большинство ферментов обладает четвертичной структурой, и их размеры значительно превышают размеры субстратов. Ферменты контролируют практически все химические процессы, протекающие в живых организмах. В отличие от небелковых катализаторов каждый фермент способен катализировать лишь очень небольшое число реакций, часто только одну (таблица 5).

1. Качественная реакция на каталазу

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Этот фермент содержится во всех тканях и жидкостях организма, но особенно активен в строме эритроцитов и печени, а также зеленых листьях растений, где участвует в процессе фотодыхания. В процессе окисления некоторых веществ образуется перекись водорода, ядовитая для организма, которая может в нём накапливаться. Биологическая роль каталазы заключается в разложении вредной для организма перекиси водорода на молекулярный кислород и воду: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Фермент каталаза содержит гемм.

Материал исследования: кровь; печень; проростки бобов, тыквы; листья элодеи.

Реактивы и оборудование: H_2O_2 , 3%-й раствор; вода; штатив с пробирками; предметное стекло; спиртовка; часовое стекло; пипетки; стакан; ступка с пестиком; спички или лучинка; скальпель; лупа.

Ход работы: **а) Действие каталазы крови.** В две пробирки берут по 1 мл воды, добавляют по 2 капли крови. Одну пробирку кипятят 2-3 минуты для инактивации фермента. После охлаждения в обе пробирки добавляют по 5-10 капель 3% раствора перекиси водорода, встряхивают и наблюдают за выделением пузырьков кислорода. При встряхивании кипячёной пробы выделение пузырьков не происходит.

б) Действие каталазы печени. В пробирку помещают 0,5 г растёртой печени, приливают 10 мл воды и перемешивают. Добавляют 3% раствор перекиси водорода до верха пробирки и сразу, закрыв её пальцем, опрокидывают в стакан с водой, не выливая жидкости. Происходит выделение пузырьков кислорода в пробирке и вытеснение ими жидкости в стакан. Для доказательства того, что собранный газ – кислород, пробирку закрывают пальцем, осторожно вынимают из воды, переворачивают и быстро вносят в пробирку тлеющую лучинку или спичку. Появление пламени указывает на усиление горения за счёт выделившегося кислорода.

в) Обнаружение каталазы в тканях растений. С проростков делают срезы толщиной 0,5-1,0 мм, а с побегов элодеи отрывают отдельные листья. Часть срезов и листьев убивают, нагревая их в капле воды на предметном стекле над пламенем спиртовки. Живые и убитые срезы и листья помещают в воду на часовое стекло и добавляют несколько капель раствора пероксида водорода. Под лупой наблюдают появление пузырьков газа у поверхности живых срезов и листьев. Это выделяется кислород в результате разложения пероксида под воздействием каталазы. Отмечают отсутствие пузырьков у убитых объектов.

Таблица 5

Классификация ферментов

Наименование класса, подклассов, представители	Биологическая функция фермента
1. Оксидоредуктазы	катализируют окислительно-восстановительные реакции
1. Аэробные дегидрогеназы (оксидазы):	переносят протоны и электроны от окисляемого субстрата на кислород
а) альдегидоксидаза	окисляет альдегиды в кислоты
б) пируватдегидрогеназа	окисляет пировиноградную кислоту в ацетил-КоА
2. Анаэробные дегидрогеназы (оксигеназы):	переносят протоны и электроны от окисляемого субстрата на другой субстрат, но не на кислород
а) лактатдегидрогеназа	превращает пировиноградную кислоту в молочную и наоборот – молочную в пировиноградную
б) малатдегидрогеназа	окисляет яблочную кислоту в щавелево-уксусную
3. Цитохромы (b, c ₁ , c, a, a ₃)	переносят электроны
4. Пероксидаза	переносит водород субстрата на перекись водорода: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$
5. Каталаза	разложение пероксида водорода: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
2. Трансферазы	межмолекулярный перенос атомов, атомных групп или радикалов
а) фосфотрансферазы (киназы)	переносят остаток фосфорной кислоты

б) аминотрансферазы	переносят аминокруппы от аминокислоты на кетокислоту
в) тиотрансферазы	переносят серу
3. Гидролазы	разрывают внутримолекулярные связи путем присоединения воды
Эстеразы: липаза фосфоэстераза	гидролизуют сложноэфирные связи
Гликозидазы: мальтаза, сахараза	расщепляют гликозидные связи в углеводах
Пептидазы: пепсин, трипсин	гидролизуют пептидные связи
4. Лиазы	отщепляют от субстрата негидролитическим путем ту или иную группу с образованием двойных связей
1. Углерод-углерод - лиазы	катализируют разрыв С-С-связи
пируватдекарбоксилаза	выделяет CO ₂ из карбоксильной группы пировиноградной кислоты
фруктозодифосфатальдолаза	разрушает 1,6-дифосфатфруктозу на две триозы
2. Углерод-кислород -лиазы	отщепляют от субстрата водород и гидроксил с образованием H ₂ O
карбоангидраза	разлагает H ₂ CO ₃ на CO ₂ и H ₂ O
5. Изомеразы	катализируют взаимопревращения субстратов
фосфоглюкомутаза	превращает 1-фосфат-глюкозу в 6-фосфат-фруктозу
фосфогексоизомераза	превращает 6-фосфат-глюкозу в 6-фосфат-фруктозу
триозофосфатизомераза	превращает фосфодиоксиацетон в 3-фосфо-глицериновый альдегид
6. Лигазы (синтетазы)	осуществляют синтез сложных органических соединений с использованием энергии макроэргических связей АТФ или других нуклеозидфосфатов
аспарагинсинтетаза	синтезирует аспарагин из аспарагиновой кислоты и NH ₃
пируваткарбоксилаза	синтезируют щавелевоуксусную кислоту (ЩУК) из пировиноградной кислоты и CO ₂ , в присутствии АТФ
в) ацетил-КоАсинтетаза	синтез ацетил-КоА из уксусной кислоты и HS-КоА

2. Изучение свойств ферментов

Материал исследования: слюна; пекарские дрожжи; 2% суспензия соевой муки.

Реактивы и оборудование: крахмал, 0,5 и 1%-й растворы; сахароза, 1%-й раствор; реактив Фелинга; вода дистиллированная; реактив Люголя; фосфатный буфер с pH 4.9, 6.8 и 8.0; йод, 1%-й раствор; NaCl, 1%-й раствор; CuSO₄, 1%-й раствор; лед; 5%-е растворы мочевины и тиомочевины; фенолфталеин; формальдегид, 5%-й раствор; штатив с пробирками; держатель для пробирок; воронки; фильтры; термостат; газовые горелки; кипящая водяная баня; пипетки глазные; пипетки ёмкостью 1-5 мл.

А) Специфичность ферментов

В отличие от неорганических катализаторов, ферменты обладают специфичностью (абсолютной, относительной, стереоспецифичностью). Это свойство определяется уникальным строением активного центра каждого фермента.

Ход работы: а) *Определение активности амилазы*

Для исследования специфичности амилазы берут слюну, разведенную в 5 раз, и наливают в 2 пробирки по 1 мл. В 1-ю пробирку добавляют 1 мл 1% раствора крахмала, во 2-ю – 1 мл 1% раствора сахарозы, полученные результаты внесите в табл.6:

Таблица 6

Результаты активность амилазы

№ пробы	Фермент амилаза, мл	Раствор сахарозы, мл	Раствор крахмала, мл	Реакция Фелинга (+ или -)
1	1	1	-	
2	1	-	1	

Обе пробирки помещают на 10-15 минут в термостат при 38°C, после чего проводят реакцию Фелинга для обнаружения глюкозы.

Реакция Фелинга: к 15 каплям исследуемого раствора прибавить равный объем реактива Фелинга и довести до кипения верхний слой жидкости. При положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание, которое дает закись меди.

б) Определение активности сахаразы: Фермент сахаразы катализирует гидролитическое расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную качественную реакцию Фелинга вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального гидроксила. Сахароза этой реакции не даёт, так как полуацетальный гидроксил в её глюкозном остатке участвует в соединении с фруктозой.

Ход работы: Для получения сахаразы из дрожжей навеску высушенных пекарских дрожжей массой 0,5 г тщательно растирают в ступке для разрушения дрожжевых клеток, затем добавляют 5 мл воды и растирают дрожжи с водой. Полученную суспензию фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат содержит фермент сахаразу.

Готовят 2 инкубационные смеси, как указано в таблице 7, используя в качестве субстрата сахаразы 2 вещества (сахарозу и крахмал):

Таблица 7

Результаты активности сахаразы

№ пробы	Фермент сахаразы, мл	Раствор сахарозы, мл	Раствор крахмала, мл	Реакция Фелинга (+ или -)
1	1	1	-	
2	1	-	1	

Пробирки выдерживают в термостате 10-15 минут при 38°C, затем проводят реакцию Фелинга (см. п. а) данной работы. Делают соответствующие выводы.

в) Определение активности уреазы. Субстратом для уреазы является мочевины, которая расщепляется с образованием аммиака и углекислого газа. Тиомочевина отличается от мочевины только тем, что атом кислорода в её молекуле заменен на атом серы. Но даже такое незначительное изменение в структуре субстрата приводит к тому, что фермент уже не оказывает действия на субстрат. Фермент уреазы в большом количестве содержится в семенах сои, поэтому в эксперименте используется 2% суспензия соевой муки.

Ход работы: В две пробирки наливают по 2 мл суспензии соевой муки, содержащей фермент, затем в первую – 2 мл мочевины, во вторую – 2 мл тиомочевины. В обе пробирки добавляют по 5 капель фенолфталеина. Содержимое пробирок перемешивают и пробирки оставляют стоять 15 мин при комнатной температуре. Опишите полученные результаты, сделайте выводы.

Б) Влияние температуры на активность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является термоллабильность, т.е. чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция. Для большинства ферментов температурный оптимум наблюдается при 38-40°C. Ферменты при нагревании свыше 70°C, как правило, утрачивают свойства биологических катализаторов.

Оптимум температуры для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии её с крахмалом. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции с раствором йода. При оптимальном значении температуры расщепление крахмала произойдёт полностью (окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от точки оптимального значения температуры в большую или меньшую сторону расщепление крахмала произойдёт только частично до стадии декстринов (красно-бурая или фиолетовая окраска) или крахмал вообще расщепляться не будет (синяя окраска).

Ход работы: В 4 пробирки отмерить по 3-4 мл 0,5% раствора крахмального клейстера. Одну пробирку поместить в кипящую водяную баню (100°C), вторую – в термостат с температурой 37-40°C, третью – оставить при комнатной температуре (20°C), а четвертую – поместить в ледяную воду (0°C). Оставить пробирки в этих условиях на 10 минут. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл слюны, предварительно разведенной водой, и отмечать степень гидролиза крахмала через каждые 5 мин. Для этого отмерить около 0,5 мл гидролизата в пробирку и проделать с ним реакцию с реактивом Люголя.

В) Влияние pH на активность ферментов

Для разных ферментов существует свой оптимум pH, при котором фермент наиболее активен. Например, для пепсина оптимум pH – 1,5-2,5, для аргиназы – 9,5.

Ход работы: В 3 пробирки отмерить по 2 мл фосфатного буфера со следующими значениями pH: 4,9; 6,8; 8,0. Затем приливают по 1 мл 0,5% раствора крахмала и по 1 мл разведенной слюны. Пере-

мешивают содержимое пробирок и помещают в термостат при 38°C на 10-15 мин. Затем во все пробирки добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают, наблюдают окраску и отмечают pH, при котором амилаза действует наиболее активно. Сделать вывод, при каком значении pH среды лежит оптимум действия амилазы слюны.

Г) Активаторы и ингибиторы активности ферментов

Активаторы и ингибиторы влияют на активность фермента, способствуя формированию или блокированию его активного центра. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и, тем самым, также менять ферментативную активность. Нередко ингибиторы – продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных веществ. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами. Например, большинство лекарственных препаратов оказывает свое действие, влияя на соответствующие ферментативные реакции. Многие такие препараты сходны с природными субстратами и потому могут действовать как конкурентные ингибиторы ферментов.

Ход работы: **а) Влияние хлористого натрия и сернокислрой меди на активность амилазы слюны:** В одну пробирку внести 1 мл 1% раствора хлористого натрия, во вторую – 1 мл 5% раствора сернокислрой меди, в третью – 1 мл дистиллированной воды. Во все пробирки добавить по 2-3 мл 0,5% крахмального клейстера и по 5-6 капель разведенной водой слюны. Пробирки поместить в термостат с температурой 37-40°C. Затем через каждые 5 минут из пробирок отмеривать по 0,5 мл жидкости и проделывать с ней пробу с реактивом Люголя. Гидролиз крахмала проводить до стадии эритродекстрина (красный цвет). Отметить время появления красного окрашивания (в минутах). Сравнить время, необходимое для гидролиза крахмала в первых двух пробирках с контрольной – третьей. Сделать вывод – какое влияние оказывают хлористый натрий и сернокислрая медь на активность амилазы слюны.

б) Влияние формальдегида на активность амилазы. Формальдегид – высокореакционное карбонильное соединение, способное реагировать с белками, разрушая их структуру. В этом заключается его токсическое действие на организм человека.

В опытную пробирку наливают по 1 мл разведенной слюны, 1% раствора крахмала и 5% раствора формальдегида. В контрольную пробирку наливают по 1 мл разведенной слюны, 1% раствора крахмала и воды.

Пробирки встряхивают и выдерживают 20 минут при температуре 37-40°C. Затем в обе пробирки добавляют по 1-2 капли 1% раствора йода. Синее окрашивание в пробирке с формальдегидом свидетельствует об инактивации амилазы.

3. Белки как противоядие для ионов тяжелых металлов

Взаимодействие ионов металлов с белками лежит в основе использования молока как противоядия при отравлении тяжелыми металлами.

Материал исследования: слюна.

Реактивы и оборудование: крахмал, 1%-й раствор; CuSO₄, 1%-й раствор; йод, 1%-й раствор; молоко.

Ход работы: В опытную пробирку наливают по 1 мл *молока*, разведенной слюны, 1% раствора крахмала и 1% раствора сульфата меди. В контрольную пробирку наливают по 1 мл *воды*, разведенной слюны, 1% раствора крахмала и 1% раствора сульфата меди.

Пробирки встряхивают и выдерживают 20 минут при температуре 37-40°C. Затем в обе пробирки добавляют по 1-2 капли 1% раствора йода. В обеих пробирках есть ионы меди, инактивирующие амилазу. Но в присутствии молока активность амилазы сохраняется, о чем свидетельствует отсутствие синего окрашивания раствора при добавлении йода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 3. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Цель: сформировать навык выделения нуклеопротеидов из дрожжей и исследования их компонентного состава

Нуклеиновые кислоты в клетках находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

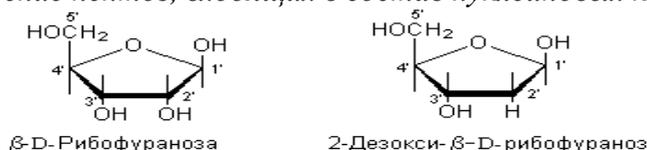


Для качественного анализа химического состава нуклеопротеинов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеинами.

При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белок (протамины и гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на со-

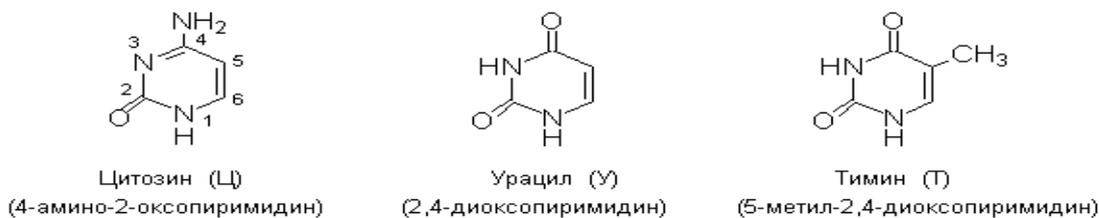
ставляющие их компоненты по схеме: Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды) → мононуклеотиды → азотистые основания, углеводный компонент и остаток фосфорной кислоты.

Строение пентоз, входящих в состав нуклеиновых кислот

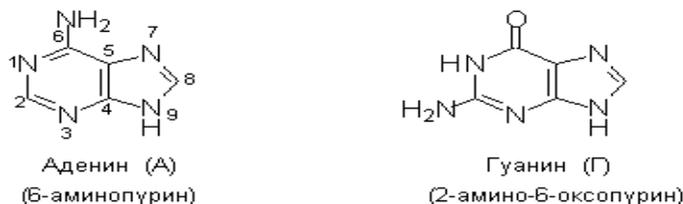


Строение азотистых оснований

Пиримидиновые основания



Пуриновые основания



ВЫДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ И ИХ АНАЛИЗ

Материал исследования: прессованные дрожжи.

Реактивы и оборудование: этиловый эфир; CH_3COOH , 3%-й раствор; H_2SO_4 , 10%-й раствор и концентрированная; дифениламинный реактив; тимол, 1%-й спиртовой раствор; α -нафтол, 0,2%-й спиртовой раствор; NaOH , 0,1 н и 10%-й растворы; реактив Фелинга; молибденовый реактив; CuSO_4 , 1%-й раствор; водный раствор аммиака; AgNO_3 , 1%-й раствор; центрифуга; водяная баня; термостат; штатив с пробирками.

1) Выделение рибонуклеопротенна из дрожжей и анализ его компонентов

Ход работы: В химическую пробирку помещают 8 г прессованных дрожжей и, проверив, что в лаборатории погашены все горелки и нет включенных электроплиток, добавляют 2-4 мл эфира для разрушения клеточных оболочек. Содержимое пробирки растирают стеклянной палочкой. Эфир разрушает оболочки дрожжевых клеток, после чего нуклеопротенины можно извлечь раствором гидроксида натрия.

В пробирку добавляют 5 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия и перемешивают содержимое стеклянной палочкой. Через 20 мин. экстракт, содержащий нуклеопротенины, отделяют фильтрованием через бумажный фильтр в центрифужную пробирку с делениями. Если фильтрование идет медленно, в воронку добавляют несколько мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Отфильтровав 3-4 мл экстракта, добавляют к нему двойной объем 3% уксусной кислоты. При этом нуклеопротенины выпадают в осадок. Осадок отделяют центрифугированием, предварительно уравнив пробирки.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, а осадок нуклеопротенинов промывают уксусной кислотой. Для этого в пробирку наливают 3% уксусную кислоту до метки 5 мл, осадок размешивают стеклянной палочкой и, уравнив пробирки, отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость сливают. Промывку повторяют еще 2-3 раза.

Гидролиз рибонуклеопротенинов. В широкую пробирку для гидролиза помещают осадок нуклеопротенинов и 4 мл 10% раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой, в ко-

тору вставлен обратный холодильник, и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку газовой горелки.

Через 1 ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, к остывшему гидролизату для нейтрализации прибавляют по каплям 10% раствор гидроксида натрия. Гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов.

2) Реакции на компоненты нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей

Ход работы: **а) Биуретовая реакция на полипептиды.** К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди (II). Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

б) Серебряная проба на пуриновые основания. К 10 каплям гидролизата добавляют 5 капель 1% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в бурый цвет.

в) Проба Троммера на пентозу (рибозу и дезоксирибозу): К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30% раствора гидроксида натрия и 1-3 капли 7% раствора сульфата меди до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II); перемешивают. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) или красный осадок оксида меди (I).

г) молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2-3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденового аммония:



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Суслянок. — М. : ИНФРА-М, 2017. — 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)

ТЕМА 4. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ

Цель: сформировать навык проведения качественного анализа гормонов белковой природы, производных аминокислот и стероидов.

К низкомолекулярным биорегуляторам относится группа природных веществ с относительно небольшой молекулярной массой и высокой биологической активностью, выполняющих разнообразные функции в живых организмах: терпеноиды, стероиды, гормоны, витамины, флавоноиды, антибиотики, алкалоиды, сердечные яды и т.д.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГОРМОНОВ

Живой организм существует как единое целое благодаря тому, что многочисленные процессы обмена веществ, протекающие в его органах и тканях, объединены в чрезвычайно тонко сбалансированную саморегулирующуюся систему. Одним из механизмов саморегуляции является гормональная регуляция.

Гормоны (греч. *hormao* – возбуждаю) наряду с витаминами принадлежат к БАВ. Гормоны регулируют соподчиненность и взаимосвязь разнообразных химических реакций, протекающих в различных органах, тканях и организме в целом. Механизм действия чаще сводится к регуляции активности ферментов, синтеза белка и нуклеиновых кислот (таблица 8). По химической природе гормоны могут быть разделены на следующие группы: гормоны белковой и пептидной природы; гормоны – производные аминокислот; стероидные гормоны.

1. Качественный анализ гормонов белковой природы (на примере инсулина)

Материал исследования: препарат инсулина в ампулах (в разведении 1:100).

Реактивы и оборудование: NaOH, 10%-й раствор; CuSO₄, 5%-й раствор; Pb(CH₃COO)₂, 5%-й раствор; HNO₃, концентрированная; штатив с пробирками.

Ход работы: **а) Биуретовая реакция:** К 1 мл раствора инсулина добавляют 5-6 капель раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди (II), перемешивают. Жидкость окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

б) Реакция Фоя К 5-10 каплям раствора инсулина (использовать неразбавленный препарат) добавляют 2-3 мл раствора NaOH и кипятят 10 мин на маленьком пламени горелки. После охлаждения добавляют 1-2 капли раствора Pb(ONa)₂ – появляется бурое окрашивание. При нагревании бурое окрашивание может перейти в черное и выпасть черный осадок. *Примечание.* Раствор Pb(ONa)₂ приготовить в отдельной пробирке. Для этого к одной капле раствора ацетата свинца добавляют по каплям раствор 10% гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца.

в) Реакция Геллера: К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем (10 капель) раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

2. Качественный анализ гормонов производных аминокислот

Материал исследования: адреналина гидрохлорид, 0,1%-й раствор; трийодтиронин.

Реактивы и оборудование: H₂SO₄, концентрированная; FeCl₃, 1%-й раствор; NaOH, 10%-й раствор; диазореактив; сульфаниловая кислота, 0,5%-й раствор; NaNO₂, 0,5%- и 10%-й растворы; йод, 0,1 н раствор; нингидрин, 0,01%-й раствор; аммиак, 25%-й раствор; этанол, 5%-й раствор; HCl, 10%-й раствор; штатив с пробирками; пробки.

Железы внутренней секреции и характеристика гормонов

Какие гормоны образуются	Химическая природа	Какой основной обмен регулируется
Гипоталамус		
рилизинг-факторы: Либерины, Стадины	низкомолекулярные пептиды	усиливают биосинтез гормонов передней доли гипофиза
Передняя доля: соматотропный (СТГ)	белок: 191 аминокислота	все виды обмена
адренокортико-тропный (АКТГ)	полипептид: 39 аминокислот	усиливает биосинтез кортикостероидов
Тиреотропный (ТТГ)	сложный белок	усиливает биосинтез гормонов щитовидной железы
фолликулостимулирующий (ФСГ)		усиливает биосинтез гормонов половых желез
лактотропный (ЛТГ)	сложный белок	стимулирует развитие молочных желез и лактацию
Средняя доля: меланоцитстимулирующие: α - и β -, меланотропины	полипептиды: 13 и 18 аминокислот	усиливает биосинтез пигментов: меланинов
Задняя доля: вазопрессин (АДГ)	нонапептиды	регуляция водного обмена
окситоцин		стимуляция сокращения гладких мышц матки при родах и секреции молока
Паращитовидные железы		
паратгормон	Полипептид: 84 аминокислоты	обмен кальция и фосфора
Щитовидная железа		
тиреоглобулин	гликопротеин	все виды обмена
тироксин, трийодтиронин	производные тирозина	все виды обмена
кальцитонин	Полипептид: 32 аминокислоты	обмен кальция и фосфора
Поджелудочная железа		
инсулин: β -клетки	полипептид: 51 аминокислота	углеводный, липидный и белковый обмены
глюкагон: α -клетки	Полипептид: 29 аминокислот	
Мозговой слой: адреналин норадреналин	катехоламины	углеводный обмен, медиатор
Корковый слой: кортизон кортизол	стероиды	углеводный и белковый обмены
альдостерон		водно-солевой обмен
Яичники и семенники		
Ж: фолликулин, прогестерон, эстрадиол	стероиды (C_{18})	репродуктивная функция, все виды обмена
М: тестостерон, андростерон	стероиды (C_{19})	
Эпифиз		
окситоцин, мелатонин	метокси-N-ацетилсеротонин	водно-солевой обмен и биоритмы

А) Качественные реакции на адреналин

Ход работы: а) Реакция с хлорным железом. Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет. При взаимодействии с нитритом наблюдается желто-

оранжевое окрашивание, с диазореактивом – красное и с хлорным железом – зеленое. Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина и норадреналина.

В пробирку наливают 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю хлорного железа. Наблюдается зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. Добавив 3 капли 10% раствора едкого натра, наблюдают вишнево-красное окрашивание.

б) Диазореакция. При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа диазокрасителя.

К 6 каплям 0,5% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 6 капель 0,5% раствора нитрата натрия (смесь диазореактива), 10 капель раствора адреналина и 3 капли 10% раствора едкого натра. Жидкость окрашивается в красный цвет.

в) Реакция с йодом. Эта реакция основана на образовании окрашенных продуктов окисления адреналина. При нагревании 1 мл раствора адреналина с каплей 0,1 н раствора йода появляется розовое или красное окрашивание.

г) Реакция с нитритом натрия. К 1 мл раствора адреналина добавляют 1 мл 10% свежеприготовленного раствора нитрита натрия, слегка нагревают на горелке. Через 3-4 минуты наблюдается красное окрашивание продуктов окисления адреналина, одним из которых является адренохром, образование которого зависит от значения рН.

Б) Качественные реакции на трийодтиронин (проводить под тягой!)

Ход работы: **а) Реакция обнаружения органически связанного йода:** одну таблетку трийодтиронина растирают в ступке. Порошок вносят в сухую пробирку и закрывают пробкой. При нагревании порошка на огне выделяются пары йода.

- 0,1 г препарата или порошок, полученный из одной таблетки, помещают в сухую пробирку, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, закрывают пробкой и нагревают. Выделяются фиолетовые пары йода.

б) Реакция с нингидрином. Трийодтиронин, являясь производным аминокислоты, взаимодействует с нингидрином: 0,1 г растертых в порошок таблеток взбалтывают с 5 мл воды и фильтруют. К фильтрату прибавляют 0,5 мл свежеприготовленного 0,01% раствора нингидрина. Кипятят в течение 2-3 мин. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

в) Реакция с нитритом натрия. При взаимодействии трийодтиронина с нитритом натрия в кислой среде появляется желтое окрашивание: Растворяют 0,005 г препарата в 2 мл 50% спирта, добавляют 1 каплю 10% соляной кислоты и 1 каплю 10% раствора нитрита натрия, нагревают. Появляется желтое окрашивание. После охлаждения добавляют 5 мл раствора аммиака. Раствор окрашивается в красный цвет.

В) Качественный анализ стероидных гормонов и их синтетических аналогов

Материал исследования: кортизона ацетат; гидрокортизон; преднизолон; дезоксикортикостерона ацетат; метилтестостерон; тестостерона пропионат; метиландростендиол; этинилэстрадиол; фолликулин; прогестерон; прегнин.

Реактивы и оборудование: H_2SO_4 , конц.; хлороформ; щелочной раствор гидроксиламина; HCl , 8%-й раствор; $FeCl_3$, 10% раствор в 0,1 н растворе HCl ; $NaOH$, 10%-й раствор; диазореактив (0,1 г стрептоцида растворяют при нагревании в 2 мл 8% соляной кислоты, после охлаждения добавляют 2 мл 1% раствора нитрита натрия).

Реакция с концентрированной серной кислотой и хлороформом: Концентрированная серная кислота является общим внутригрупповым специфическим реактивом, подтверждающим наличие стероидного цикла. По окраске продуктов реакции, наличию или отсутствию флюоресценции УФ-области спектра, изменению окраски после разбавления водой, а в некоторых случаях хлороформом, можно отличить препараты в данной группе.

Ход работы: **а)** 2 мг препарата (см. табл. 9) растворяют в 2 мл конц. серной кислоты. Наблюдают окраску, а через 20 мин. флюоресценцию в УФ-свете. Прибавляют 5 мл воды, встряхивают и наблюдают окраску и флюоресценцию (см. табл. 9).

б) 2 мг препарата (см. табл. 10) растворяют в 2 мл концентрированной серной кислоты. Прибавляют 3 мл воды, встряхивают. Наблюдают окраску и флюоресценцию. После охла-

ждения раствора прибавляют 3 мл хлороформа, встряхивают. Наблюдают окраску верхнего и нижнего слоя (см. табл. 10).

Таблица 9

Окраска продуктов реакции стероидных гормонов

Препарат	После добавления конц. серной кислоты		После добавления воды	
	окраска	флюоресценция	окраска	флюоресценция
Кортизона ацетат	желтая	желтая	светло-желтая	нет
Гидрокортизон	желтая	зеленая	светло-желтая	зеленая
Преднизолон	зеленовато-желтая	зеленовато-желтая	светло-коричневая	слабо-желтая
Метил-тестостерон	желтая	зеленая	желтовато-оранжевая	нет
Метил-андростендиол	желто-оранжевая	зеленая	желтовато-оранжевая	слабо-зеленая
Этинидил-эстрадиол	оранжево-красная с зеленой флюоресценцией	красная	красный осадок	нет
Фолликулин	желто-оранжевая	зеленая	—	—

Таблица 10

Окраска продуктов реакции стероидных гормонов

Препарат	После добавления воды		После добавления хлороформа	
	окраска	флюоресценция	окраска нижнего слоя	окраска верхнего слоя
Дезоксикортикостерона ацетат	фиолетово-красная с флюоресценцией	голубая	желтая	зеленая
Прогестерон	желтая	зеленая	бесцветная	бесцветная
Прегнин	малиновая	зеленая	светло-оранжевая	почти бесцветная

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)

7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. – М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. – 113 с. – ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)

8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 552 с. (16 экз.)

9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)

10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. – 127 с. – ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)

11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 5. ВИТАМИНЫ

Цель: приобрести навык проведения анализа витаминов

Витамины (от лат. *vita* – жизнь) – это группа разнообразных по структуре органических веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности организма, синтез которых в организме отсутствует или ограничен. Источником витаминов для человека и животных служит пища и кишечные бактерии. Последние сами синтезируют многие витамины и являются важным источником их поступления в организм.

Витамины являются регуляторами обмена веществ, многие из них – составные части ферментов. В отличие от других пищевых веществ витамины не включаются в структуру тканей и не используются организмом в качестве источника энергии.

Нарушение баланса витаминов в организме проявляется как в виде недостатка, так и избытка. Частичный недостаток витамина называется *гиповитаминозом*, полное отсутствие какого-либо витамина – *авитаминозом*. Избыточное накопление в тканях витамина (или витаминов), сопровождающееся клиническими и биохимическими признаками нарушений, называется *гипервитаминозом*. Это явление характерно для жирорастворимых витаминов.

Таблица 11

Классификация и номенклатура витаминов

Буквенное обозначение	Химическое название	Клиническое название
ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ		
V ₁	тиамин	антиневритный
V ₂	рибофлавин	витамин роста
V ₃	пантотеновая кислота	антидерматитный
V ₅ (PP)	никотиновая кислота	антипелларгический
V ₆	пиридоксин	антидерматитный
V ₁₂	цианкобаламин	антианемический
V ₁₃	оротовая кислота	антиинтоксикационный
H	биотин	антисеборейный
C	аскорбиновая кислота	антискорбутный
P	рутин (цитрин)	капилляроукрепляющий
V _c	птероилглутаминовая кислота (фолиевая)	антианемический
ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ		
A	ретинол	антиксерофтальмический
D	кальциферол	антирахитический
E	токоферол	антистерильный
K	филлохинон	антигеморрагический
F	эссенциальные ненасыщенные жирные кислоты	антисклеротический

ВИТАМИНОПОДОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ		
—	парааминобензойная кислота	антибактериальный
B _T	карнитин	антисклеротический
Q	убихинон	транспорт электронов
B ₁₅	пангамовая кислота	антианотоксический

Каждый витамин имеет *три* названия (таблица 11):

- название по наименованию того заболевания, которое развивается при отсутствии данного витамина в пище с приставкой *анти-*;
- название обозначают буквой латинского алфавита (A,B,C);
- химическое название.

В зависимости от *растворимости* различают:

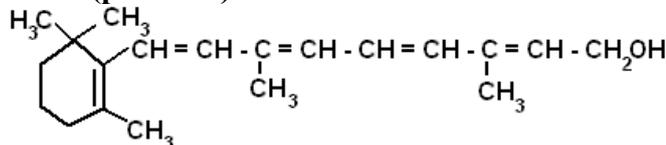
- *Жирорастворимые витамины* - растворяются в органических растворителях, термостабильны, устойчивы к изменению pH среды, могут откладываться в тканях организма.
- *Водорастворимые витамины* - растворимы в воде, термолабильны, неустойчивы к изменениям pH, не могут откладываться в тканях и многие являются составными частями ферментов.

1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Материал исследования: растворы ретинола, кальциферола и токоферола (или рыбий жир); викасол, 0,05%-й раствор.

Реактивы и оборудование: хлороформ; H₂SO₄, концентрированная; анилиновый реактив (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты); FeCl₃, 1%-й раствор; абсолютный спирт; HNO₃, концентрированная; NaOH, 10%-й раствор; цистеин, 0,025%-й раствор; водяная баня; пипетки; штатив с пробирками.

а) Реакции на витамин А (ретинол)

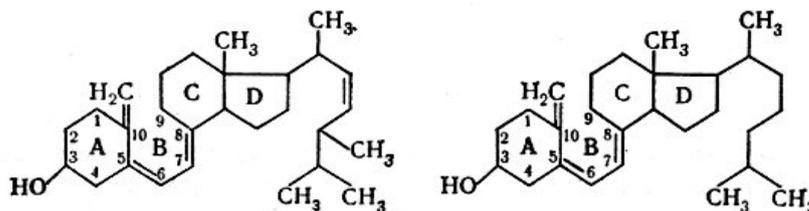


Ход работы: а) Небольшое количество рыбьего жира в сухой пробирке растворить в 5-6 каплях хлороформа и прибавить 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Отметить появление фиолетового окрашивания, переходящее в красно-бурое.

б) В пробирку налить 1 мл подсолнечного масла и прибавить 2-3 капли 1% раствора хлорида железа (III). При наличии витамина А появляется ярко-зеленое окрашивание.

б) Реакция на витамин D (кальциферол)

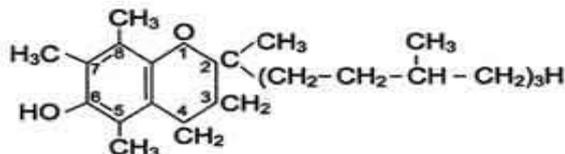
D₂ (эргокальциферол) и D₃ (холекальциферол) соответственно:



Ход работы

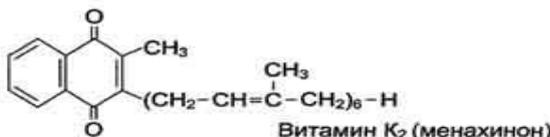
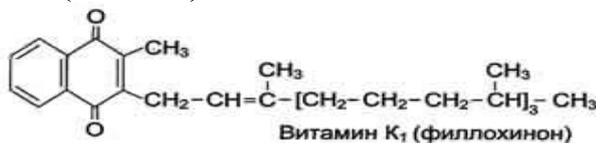
К небольшому количеству рыбьего жира прибавить 1-2 капли анилинового реактива, перемешать и нагреть. Отметить появление красно-бурого окрашивания. Сделать соответствующие выводы.

в) Реакция на витамин E (токоферола ацетат)



Ход работы: Около 0,02 г препарата растворяют в 10 мл абсолютного спирта, добавляют 2 мл концентрированной азотной кислоты и нагревают в течение 15 мин на водяной бане при температуре около 80°C; появляется красно-оранжевое окрашивание.

г) Реакция на витамин К (викасол)



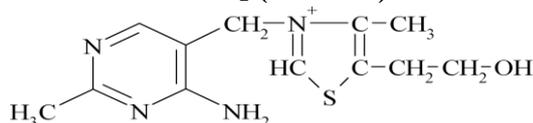
Ход работы: В пробирке смешивают по 1 мл 0,05% раствора викасола и 0,025% раствор цистеина. Добавляют 1-2 капли 10% раствора гидроксида натрия. Смесь окрашивается в желто-оранжевый цвет.

2. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

Материал исследования: тиамин хлорид, рибофлавин, никотиновая кислота (никотинамид), пиридоксин, фолиевая кислота, аскорбиновая кислота, рутин, порошки и 5%-е растворы.

Реактивы и оборудование: бутанол (или изоамиловый спирт); ацетон; гексацианоферрат (III) калия, 5%-й раствор; NaOH, 30%-й и 0,1 н растворы; AgNO₃, 2%-й раствор; реактивы Драгендорфа (*раствор йодида висмута в йодиде калия*) и Люголя (*раствор йода в йодиде калия*); H₂SO₄, концентрированная и 20%-й раствор; HCl, концентрированная, 0,1 н, 2%- и 5%-й растворы; гидросульфит натрия; металлический цинк; натрия гидрокарбонат, порошок; Na₂CO₃, безводный и 10%-й раствор; CuSO₄, 1%-, 5%- и 10%-й растворы; 2,4-динитрохлорбензол; этанол, 96%-й раствор; FeCl₃, 1%- и 5%-й растворы; аммиачный буферный раствор; раствор 2,6-дихлорхинонхлоримида, Pb(CH₃COO)₂, 1%- и 5%-й растворы; NaNO₂, 5%- и 10%-й растворы; KMnO₄, 0,1 н раствор; H₂O₂, 30%-й раствор перекиси водорода; сульфаниловая кислота, 1%-й раствор; β-нафтол, щелочной раствор; 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н раствор; реактив Фелинга; Fe₂SO₄; KI, 1%-й раствор; крахмал, 1%-й раствор; йодат калия, 0,1 н раствор; установка для титрования; колбы для титрования; фарфоровый тигель; пестик; воронки; фильтровальная бумага; часовые стекла; мерный цилиндр; пипетки; пробирки.

А) Качественные реакции на витамин В₁ (тиамин)



Ход работы: 1) Тиамин легко подвергается окислению в щелочной среде. Эта реакция протекает через открытую тиольную форму с образованием трициклического соединения – тиохрома. Превращение тиамин в тиохром в щелочной среде происходит под влиянием только сильных окислителей (калия перманганата, водорода пероксида, калия гексацианоферрата (III)). Окисление идет за счет раскрытого тиазольного кольца: растворяют 0,05 г тиамин хлорида в 25 мл воды. К 5 мл раствора приливают 1 мл 5% раствора гексацианоферрата (III) калия, 1 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, 5 мл бутанола или изоамилового спирта. Хорошо встряхивают и дают отстояться. В верхнем слое возникает синяя флюорес-

ценция, наблюдаемая в УФ-свете. Флюоресценция исчезает при подкислении и вновь возникает при подщелачивании раствора.

2) Раствор тиамин при добавлении к нему диазобензолсульфата и щелочи окрашивается в оранжевый или красный цвет, вследствие образования соединения тиамин с диазобензолсульфо кислотой: к 5 каплям 1% раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель 5% раствора азотистокислого натрия. К полученному раствору прибавляют немного порошка тиамин (или раствора), 5-7 капель 10% раствора углекислой соды. Жидкость окрашивается в оранжевый или красный цвет.

Если раствор соды осторожно приливать по стенке наклоненной пробирки, то на границе двух жидкостей образуется красное кольцо.

3) Являясь азотистым органическим основанием, тиамин образует осадки с реактивами Драгендорфа и Люголя: к 1 мл 0,25 раствора препарата прибавляют по каплям один из вышеперечисленных реактивов и наблюдают образование осадков.

Б) Качественные реакции на витамин В₂ (рибофлавин)



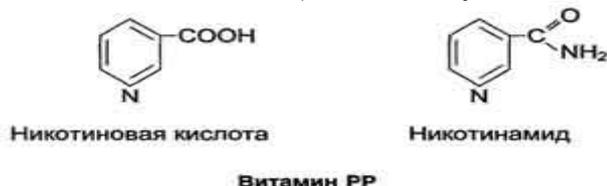
Ход работы: 1) Растворяют 1 мг рибофлавина в 100 мл воды. Раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску при дневном свете и зеленую флюоресценцию при облучении УФ-светом. Флюоресценция исчезает при добавлении растворов кислот и щелочей, а под действием гидросульфита натрия пропадает и флюоресценция, и окраска.

2) За счет комплексообразующих группировок ($-C=O$; $-N=$) рибофлавин с солями некоторых металлов образует нерастворимые интенсивно окрашенные комплексы. В качестве металлов в таких комплексах участвуют Ag^+ , Hg^+ , Cu^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} и др.: к 2 мл 0,1% раствора рибофлавина прибавляют 1 мл 2% раствора нитрата серебра, появляется оранжево-красное окрашивание, переходящее со временем в красное.

3) Гидроксильные группы рибитильной цепочки обуславливают образование сложных эфиров, в частности с концентрированной серной кислотой. Крупинка препарата, смоченная каплей концентрированной серной кислоты (в фарфоровом тигле) дает вишнево-красное окрашивание.

4) Отмерить в пробирку 10 капель раствора рибофлавина в воде, добавить 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Тотчас же наступает бурное выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно окрашивается в розовый или красный цвет, затем окраска бледнеет и, наконец, жидкость обесцвечивается.

В) Качественные реакции на витамин В₃ (никотиновую кислоту, никотинамид)



Ход работы: 1) Нагревают 0,1 г никотиновой кислоты (никотинамида) с 0,1 г безводного карбоната натрия, развивается запах пиридина.

2) Никотиновая кислота за счет своих кислотных свойств обладает способностью образовывать нерастворимые соли с ионами тяжелых металлов. Так, с ионами меди (II) образуется осадок синего цвета (меди никотинат): к 3 мл теплого раствора никотиновой кислоты (1:100) приливают 1 мл 10% раствора сульфата меди. Выпадает осадок синего цвета.

Для получения медной соли никотиновую кислоту также предварительно переводят в

ионизированное состояние (натриевую соль) путем растворения в щелочи. Необходимо учитывать реакцию среды после добавления раствора щелочи, она должна быть нейтральной во избежание образования гидроксида меди: 0,05 г препарата растворяют в 2 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, фильтруют, добавляют по каплям 10% раствор сульфата меди; постепенно образуется осадок синего цвета.

3) Реакция образования глутаконового альдегида: к 0,01-0,05 г никотиновой кислоты прибавляют 0,05 г 2,4-динитрохлорбензола, 3 мл 95% этилового спирта и кипятят в течение 2-3 мин. После охлаждения прибавляют по каплям 0,1 н раствор гидроксида натрия – появляется красно-бурое окрашивание.

4) 0,1 г никотинамида нагревают с 2 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, появляется запах аммиака.

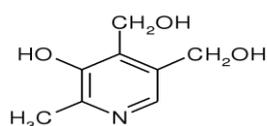
5) Обнаружение никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в дрожжах. НАД, одним из компонентов которого является никотинамид, встречается во многих органах и тканях человека, животных и растений, много его в микроорганизмах и грибах. Этот кофермент легко извлекается из дрожжей горячей водой (он термостабилен) и может быть обнаружен по образованию флуоресцирующего комплекса с ацетоном.

В пробирку помещают небольшой кусочек дрожжей (около 0,5 г), добавляют 5 мл воды и кипятят 20-30 с., затем фильтруют.

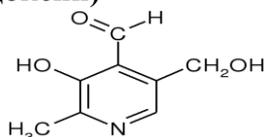
К 5-10 каплям полученного экстракта добавляют 3-5 капель ацетона и 1-2 капли 30% раствора гидроксида натрия. Оставляют пробирку стоять 2 мин., затем добавляют 1 каплю фенолфталеина и по каплям концентрированную соляную кислоту до обесцвечивания раствора.

Пробирку помещают на 2 мин. в кипящую водяную баню, после чего вынимают, охлаждают и просматривают во флуориметре. Ацетоновый комплекс НАД флуоресцирует синим цветом.

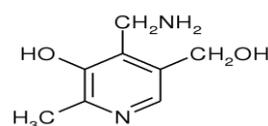
Г) Реакции на витамин B_6 (пиридоксин)



пиридоксол



пиридоксаль



пиридоксамин

Ход работы: 1) Растворяют 0,01 г пиридоксина гидрохлорида в 10 мл воды. К 0,1 мл полученного раствора прибавляют 1 мл воды, 2 мл аммиачного буферного раствора, 1 мл раствора 2,6-дихлорхинонхлоримида, 2 мл бутанола и встряхивают в течение 1 мин. В слое бутанола появляется голубое окрашивание.

2) К 1 мл того же раствора (см. п. 1.) прибавляют по каплям 5% раствор хлорида железа (III), появляется красное окрашивание, исчезающее при добавлении разведенной серной кислоты.

Д) Реакции на витамин B_c (фолиевую кислоту)

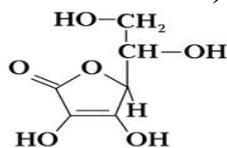
Ход работы: 1) Кислота фолиевая является амфотерным соединением. За счет кислотных свойств кислота фолиевая с солями тяжелых металлов образует нерастворимые окрашенные комплексы, что используется для ее идентификации: 0,01 г препарата взбалтывают с 1,0-1,5 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия в течение 2-3 мин. и фильтруют; по 1-2 капли фильтрата переносят на часовое стекло и прибавляют 1 каплю раствора соли металла. При этом образуются окрашенные осадки: со свинца ацетатом лимонно-желтый; с меди (II) сульфатом – зеленый; с серебра нитратом – темно-желтый; с железа (III) хлоридом – красно-желтый.

2) Кислота фолиевая способна окисляться под действием перманганата калия с образованием птеридин-6-карбоновой кислоты, обладающей голубой флуоресценцией: Растворяют 0,01 г препарата в 5 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, приливают 5 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия. Раствор помещают на 3 мин. в водяную баню с температурой 80-85°C. После охлаждения прибавляют по каплям 0,2 мл 30% раствора перекиси водорода и фильтруют. Фильтрат имеет голубую флуоресценцию в УФ-свете.

3) 0,005-0,010 г препарата растворяют в 1 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, добавля-

ют 0,02-0,03 г цинковой пыли, оставляют смесь на 2-3 мин и фильтруют. При подкислении соляной кислотой и прибавлении нескольких капель 1% раствора нитрита натрия получается соль диазония, образующая со щелочным раствором β-нафтола азокраситель красного цвета.

Е) Реакции на витамин С (аскорбиновая кислота)



Ход работы: 1) При действии на аскорбиновую кислоту раствором нитрата серебра происходит восстановление серебра; сама же аскорбиновая кислота окисляется и превращается в кетоформу: к 2 мл 2% раствора аскорбиновой кислоты добавляют по каплям 1% раствор нитрата серебра. Выпадает темный осадок.

2) При действии на аскорбиновую кислоту раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (окрашенного в синий цвет) последний восстанавливается, превращаясь в бесцветное лейкооснование: к 2 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты добавляют по каплям 0,001 н раствор 2,6-дихлор-фенолиндофенола. Синяя окраска реактива исчезает.

3) При добавлении к 5 мл 2% раствора аскорбиновой кислоты 4 мл реактива Фелинга и последующем нагревании происходит образование оранжево-желтого осадка меди (I) оксида.

4) С раствором перманганата калия происходит обесцвечивание раствора вследствие восстановления иона MnO_4^- до иона Mn^{2+} : к 5 мл 0,1% раствора аскорбиновой кислоты добавляют по каплям 0,1 н раствор перманганата калия. Происходит обесцвечивание последнего.

5) С раствором соли сульфата железа (II) образуется аскорбинат железа, окрашенный в фиолетовый цвет: к 2 мл 2% раствора аскорбиновой кислоты прибавляют 0,1 г натрия гидрокарбоната и около 0,02 г железа (II) сульфата, встряхивают и оставляют стоять. Появляется темно-фиолетовое окрашивание, исчезающее при добавлении 5 мл 20% серной кислоты.

6) При добавлении к 2 мл 2% раствора аскорбиновой кислоты 2-3 капель 15% соляной кислоты, 1 мл 5% раствора гексацианоферрата (III) калия и 2 мл 5% раствора хлорида железа (III) образуется синее окрашивание – берлинская лазурь.

7) **Количественное определение аскорбиновой кислоты.** *Рефрактометрический метод* – метод анализа, основанный на измерении показателя преломления света (n_D) исследуемым веществом. *Показателем преломления* называют отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе. Следует учитывать, что при повышении температуры показатель преломления уменьшается, а при понижении – увеличивается. Поправку рассчитывают по формуле:

$$n_t = n_D^{20} + (20 - t) \cdot 0,0002,$$

где n_D^{20} – показатель преломления при 20°C для желтой линии натрия D (5893Å);

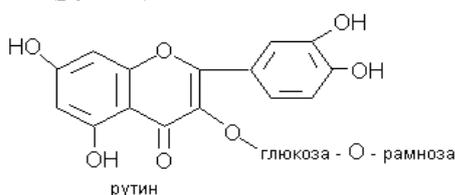
t – температура, при которой проводились измерения.

Ход работы: Перед началом работы с прибором проверяют нулевую точку нанесением нескольких капель дистиллированной воды на полированную поверхность измерительной призмы. Линию лупы устанавливают на деление 1,3330 при 20°C. Если граница светотени проходит через точку пересечения визирных линий, то прибор установлен на ноль. Если этого нет, то при помощи ключа устанавливают границу светотени на точку пересечения визирных линий. Затем на сухую и чистую поверхность призмы наносят несколько капель исследуемой жидкости, вращением корректирующего винта устраняют окрашенность светового поля и достигают лупой границы светотени, которую устанавливают в точке пересечения визирных линий. Затем по шкале производят отсчет показаний преломления исследуемого вещества и по таблице 12 находят соответствующую концентрацию.

Зависимость показателя преломления растворов от концентрации аскорбиновой кислоты

Показатель преломления	Концентрация раствора, %	Показатель преломления	Концентрация раствора, %
1,3340	0,62	1,3420	5,72
1,3350	1,24	1,3430	6,36
1,3360	1,88	1,3440	7,00
1,3370	2,52	1,3450	7,64
1,3380	3,16	1,3460	8,28
1,3390	3,80	1,3470	8,92
1,3400	4,44	1,3480	9,56
1,3410	5,03	1,3490	10,20

Ж) Реакции на витамин Р (рутин)



Ход работы: 1) 10 мг препарата растворяют в 5 мл горячей воды, прибавляют по каплям 5% раствор ацетата свинца. Выпадает оранжевый осадок.

2) К аналогичному раствору рутина прибавляют по каплям 5% раствор хлорида железа (III). Появляется интенсивное зеленое окрашивание.

3) При восстановлении рутина металлическим магнием или цинком в присутствии концентрированной соляной кислоты образуются цианидин-хлорид и цианин-хлорид (соли бензопирилия или бензопироксония): к 2 мл 0,1% спиртового раствора рутина добавляют несколько капель концентрированной соляной кислоты и порошок цинка. Появляется пурпурно-красное окрашивание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Суслынок. — М. : ИНФРА-М, 2017. — 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)

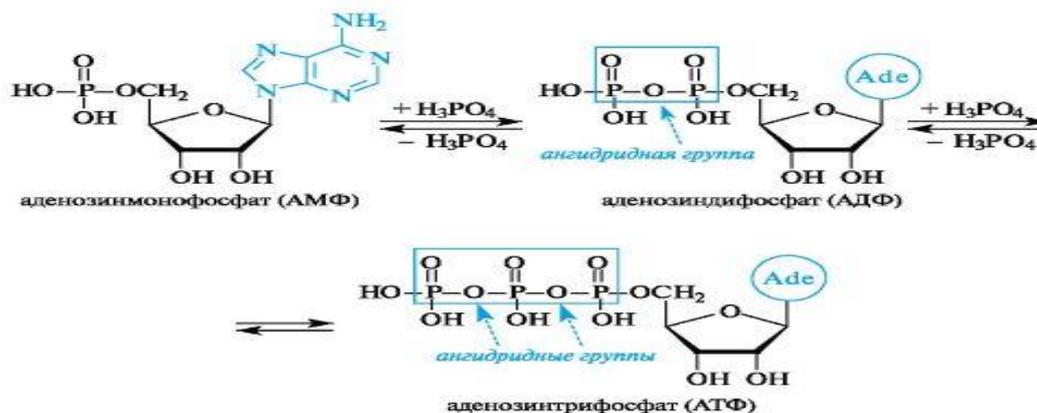
ТЕМА 6. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН

Цель: приобрести навык проведения количественного определения макроэргических соединений

Процессы катаболизма в клетках животных сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии. Небиологические системы могут совершать работу за счёт тепловой энергии, биологические системы функционируют в изотермическом режиме и для осуществления процессов жизнедеятельности используют химическую энергию. Изучением превращений энергии, сопровождающих химические реакции, занимается биоэнергетика, или биохимическая термодинамика. Живые организмы с точки зрения термодинамики - открытые системы. Между системой и окружающей средой возможен обмен энергии, который происходит в соответствии с законами термодинамики.

В живых организмах существует целая группа органических фосфатов (АТФ, енолфосфаты, ангидриды и фосфогуанидины), гидролиз которых приводит к освобождению большого количества свободной энергии. Такие соединения называют *высокоэнергетическими фосфатами*.

Центральное место среди этих соединений занимает АТФ - молекула, богатая энергией, т.к. она содержит две фосфоангидридные связи (β , γ). При гидролизе концевой фосфоангидридной связи АТФ превращается в АДФ и ортофосфат P_i . Использование АТФ как источника энергии возможно только при условии непрерывного синтеза АТФ из АДФ за счёт энергии окисления органических соединений. Цикл АТФ-АДФ - основной механизм обмена энергии в биологических системах, а АТФ - универсальная "энергетическая валюта".



1. Сукцинатдегидрогеназа мышц и конкурентное торможение её активности

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином и прочно связана с клеточной структурой. В качестве окисляемого субстрата берут янтарную кислоту, а в качестве акцептора водорода – краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол (синего цвета), который, восстанавливаясь, превращается в бесцветную лейкоформу. Источником фермента служит отмытая мышечная ткань (кашица). Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты (HOOC - CH₂ - COOH), являющейся структурным аналогом янтарной кислоты.

Материал исследования: мышечная кашица.

Реактивы и оборудование: янтарная кислота, 1%-й раствор; малоновая кислота, 1%-й раствор; 2,6-дихлор-фенолиндофенол, 0,01%-й раствор; штатив с пробирками; воронки; стеклянные палочки; бюретки; ступки; марлевые фильтры; пинцеты; водяная баня; термостат.

Ход работы: а) Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельчённой ножницами, растирают в ступке с небольшим количеством воды, затем мышечную кашицу переносят на двойной слой марли, помещённой на воронку, и промывают 25 мл ди-

стиллированной воды. Промытую кашицу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой с 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки (табл.13):

Таблица 13

Концентрация веществ в опытных пробирках

№ пробы	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Краситель, капли
1	1	0,5	—	2
2	1	0,5	—	2
3	-	0,5	—	2
4	1	—	0,5	2

б) Содержимое первой пробирки кипятят в течение 1-2 минут для инактивации фермента. Затем в пробирки приливают 0,01% 2,6-дихлорфенолиндофенол. Через 15 минут наблюдают исчезновение синей окраски только во второй пробирке.

2. Количественное определение макроэргических соединений мышц (АТФ и креатинфосфата)

В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения – АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцы большим количеством энергии.

Основным путём образования АТФ в тканях является окислительное фосфорилирование в процессе тканевого дыхания. Креатинфосфат образуется в мышце при участии АТФ в состоянии покоя и служит резервом высокоэргического фосфата для синтеза АТФ из АДФ при активной мышечной работе.

Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфорный остаток в креатинфосфате, легко отщепляются при непродолжительном гидролизе в кислой среде – так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после гидролиза даёт представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на долю макроэргических соединений мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Материал исследования: мышечная ткань.

Реактивы и оборудование: кислота трихлоруксусная (ТХУ), 2,5%-й раствор; HCl, 1 н раствор; NaOH, 1 н раствор; молибдат аммония, 1%-й раствор; аскорбиновая кислота, 1%-й раствор; штатив с пробирками; пипетки; воронки; фильтры; мерная пробирка или цилиндр вместимостью 10 мл; лед; водяная баня; фотоэлектроколориметр.

Ход работы: **а)** 0,5 г мышечной кашицы помещают в пробирку, стоящую в ледяной бане, и добавляют в неё 5 мл охлаждённого раствора ТХУ. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой для экстрагирования АТФ и креатинфосфата в течение 5 минут. Экстракт фильтруют в мерную колбу, стоящую в ледяной бане. Остаток мышечной кашицы в пробирке заливают 5 мл дистиллированной воды и продолжают экстракцию 5 минут на холоде. Полученный экстракт фильтруют в ту же мерную колбу и доводят общий объём до 10 мл дистиллированной водой.

б) В две пробирки отбирают по 0,5 мл безбелкового фильтрата. Первая пробирка – контрольная, вторая – опытная. В опытную пробирку добавляют 1 мл 1 н HCl, закрывают фольгой и помещают в кипящую водяную баню на 10 минут для гидролиза фосфорных связей. Затем раствор охлаждают и добавляют 1 мл 1 н гидроксида натрия.

В контрольную пробирку (без предварительного кипячения) добавляют 1 мл 1 н раствора соляной кислоты и 1 мл 1 н гидроксида натрия. В опытную и контрольную пробирки добавляют из бюретки по 7,5 мл дистиллированной воды для получения объёма 10 мл.

в) Дальнейшие процедуры обязательно проводят одновременно с опытной и контрольной пробами. Из обеих пробирок отбирают по 5 мл жидкости, переносят в две другие пробирки и добавляют в каждую из них по 0,5 мл раствора молибдата аммония, 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 2 мл дистиллированной воды. Смесь в каждой пробирке быстро пере-

мешивают и оставляют стоять при комнатной температуре точно 10 минут.

г) Пробы колориметрируют на ФЭК с красным светофильтром (длина волны 670 нм) против воды. В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе – только фосфатные соли.

д) Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Расчёт. Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 100 г сырой ткани, учитывая разведение: $X = A \cdot 3,3 \cdot 400 \cdot 100$, где X – содержание макроэргических соединений в пересчёте на 1 мг АТФ в 100 г сырой ткани, мг/100 г; A – содержание АТФ в пробе, мг; $3,3 \cdot 400$ – коэффициент пересчёта на 1 г ткани с учётом разведения растворов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 7. ОБМЕН БЕЛКОВ

Цель: приобрести навык исследования в биологических жидкостях конечных продуктов обмена белков.

Выполняя ряд уникальных функций белки определяют не только микро- и макроструктуру отдельных субклеточных образований, специфику организации клеток, органов и целостного организма, но и в значительной степени динамическое состояние между организмом и окружающей его средой. Белковый обмен строго специфичен, направлен на обеспечение непрерывности воспроизводства и обновления белков организмов.

В животных организмах из белков состоит мышечная ткань, эпидермис, гладкая мускулатура, форменные элементы крови, хрящи. Все необходимые аминокислоты получают с белковой пищей. В процессе пищеварения, разлагая белки пищи до исходных аминокислот, используют их для создания своих специфических белков.

1. Исследование действия пепсина

В желудке имеются все условия для переваривания белков: активный фермент *пепсин* и *свободная соляная кислота*, которая переводит неактивный пепсиноген в активный пепсин и создает оптимальные условия для его действия (рН 1,5-2,5). Пепсин, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных остатками ароматических аминокислот, расщепляет практически все природные белки, исключение составляют некоторые кератины, проламины, гистоны и мукопротеины. У молодняка эту функцию выполняет белок – *ренин*.

О действии пепсина на белок, например, на фибрин (нерастворимый белок плазмы), можно судить, наблюдая растворение кусочков фибрина. Полученный раствор дает положительную биуретовую реакцию, указывающую на появление в растворе пептидов.

Материал исследования: желудочный сок или 0,1%-й раствор пепсина в 0,2%-м растворе соляной кислоты.

Реактивы и оборудование: кусочки фибрина или кусочки белка вареного яйца; NaHCO_3 , 10%-й раствор; биуретовый реактив; универсальная индикаторная бумага; термостат; штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы: а) В три пробирки наливают по 1 мл раствора пепсина или желудочного сока. Содержимое первой пробирки кипятят 2 мин. и охлаждают под струей воды. Содержимое второй пробирки нейтрализуют раствором гидрокарбоната натрия до щелочной реакции (3-4 капли 10% гидрокарбоната натрия). Третью пробирку оставляют без изменений.

б) Во все три пробирки добавляют по маленькому кусочку фибрина или яичного белка. Пробирки выдерживают в термостате при 37°C 30-45 мин. Затем их вынимают, встряхивают, отмечают видимые изменения белка (растворение, набухание) и проводят биуретовую реакцию. Положительная биуретовая реакция получается только в третьей пробирке.

2. Обнаружение конечных продуктов обмена белков в моче

Млекопитающие и человек выводят аммиак в виде мочевины и называются *уреотелическими* организмами. Птицы и наземные рептилии выделяют полужидкую мочу, в которой содержатся кристаллы мочевой кислоты и называются *урикотелическими* организмами. Следовательно, аммиак, мочевина, мочевая кислота являются конечными продуктами белкового обмена.

Материал исследования: свежая моча.

Реактивы и оборудование: NaNO_2 , 10%-й раствор; HCl , 2 н раствор; HNO_3 , концентрированная; раствор аммиака; NaOH , 10%-й раствор; штатив с пробирками; пипетки; тигель.

Ход работы: 1) **Обнаружение мочевины** - к 2-3 мл мочи прибавить равный объем 10% раствора азотистокислого натрия и 2-3 капли 2 н раствора соляной кислоты. Отметить появление пузырьков газа.

2) **Обнаружение мочевой кислоты.** 10 мл мочи выпарить досуха на огне, добавить к сухому остатку 1-2 капли азотной кислоты и осторожно выпарить под тягой на открытом огне. Коричнево-красному остатку дать остыть, после чего смочить его раствором аммиака. Отметить появление пурпурно-красного окрашивания. Если вместо аммиака остаток обработать раствором едкого натрия, то образуется сине-фиолетовое окрашивание.

3. Качественные реакции на креатинин

В форме креатинина, который образуется из креатина и креатинфосфата, из организма выделяется значительная часть азота аминокислот.

Материал исследования: моча.

Реактивы и оборудование: пикриновая кислота, насыщенный раствор; NaOH , 10%-й раствор; нитропруссид натрия, свежеприготовленный 10%-й раствор; CH_3COOH , концентрированная.

Ход работы: **а) Реакция Яффе.** При взаимодействии креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде образуется пикрат креатинина оранжево-красного цвета: в пробирке смешивают 1 мл мочи, 0,5 мл раствора пикриновой кислоты и столько же гидроксида натрия. Появляется оранжево-красная окраска.

б) Реакция Вайля. Креатинин при взаимодействии с нитропруссидом в щелочной среде превращается в нитрозокреатинин красного цвета. Такую же окраску при обработке нитропруссидом дает ацетон. Для того чтобы различить реакцию, даваемую креатинином и ацетоном, необходимо знать, что:

- окраска креатинина быстро исчезает, а окраска ацетона стабильна;
- при добавлении уксусной кислоты красное нитрозопроизводное креатинина обесцвечивается, а окраска, даваемая ацетоном, напротив, усиливается.

К 1 мл мочи добавляют 2 капли раствора нитропрусида натрия и 2 капли раствора гидроксида натрия. Возникает красное окрашивание, при стоянии переходящее в желтое. Переход красной окраски в желтую можно ускорить, добавив несколько капель уксусной кислоты.

4. Качественная реакция на аммиак

Увеличение содержания газов в молоке отражает загрязнение его газообразующими бактериями. Появление в молоке большого количества аммиака свидетельствует о выдаивании или хранении молока в плохо проветриваемых скотных дворах и о плохом уходе за животными.

Материал исследования: молоко.

Реактивы и оборудование: известковая вода; универсальная индикаторная бумага.

Ход работы: К 2 мл молока прибавляют 1 мл известковой воды. В отверстие пробирки помещают влажную универсальную индикаторную бумагу. Синий цвет индикаторной бумаги при небольшом нагревании содержимого пробирки свидетельствует о присутствии в молоке аммиака.

5. Реакция на индикан

В кишечнике под влиянием микроорганизмов происходит разложение аминокислот с образованием ядовитых для организма продуктов (индол, скатол и др.), которые всасываются в кровь и обезвреживаются в печени путем образования нетоксичных веществ (серной и глюконовой кислот).

Индикан – это калиевые или натриевые соли индоксилсерной кислоты. При действии на мочу серной кислотой происходит их гидролиз, а при последующем добавлении хлороформа и перманганата калия индоксил окисляется в синее индиго. Полученное индиго переходит в хлороформный слой и окрашивает его в синий цвет. Интенсивность полученной окраски является показателем количества индикана в моче.

Материал исследования: моча

Реактивы и оборудование: H_2SO_4 , концентрированная; $KMnO_4$, 2%-й раствор; хлороформ; штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы: В пробирку наливают 2-3 мл мочи и добавляют, при перемешивании, равный объем концентрированной серной кислоты. Затем добавляют 2-3 капли 2% раствора перманганата калия и 2 мл хлороформа. Закрывают пробирку пробкой и несколько раз переворачивают, не встряхивая. Пробирку ставят в штатив и наблюдают за появлением синего окрашивания нижнего хлороформного слоя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>

2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>

3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. [Рогожин, В.В.](#) Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 8. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ.

Цель: приобрести навык исследования конечных продуктов обмена углеводов.

1. Анаэробный распад углеводов

Распад углеводов в организме происходит двумя путями – аэробным и анаэробным. При анаэробном превращении углеводов, позволяющем выполнять работу в условиях недостаточного снабжения клеток кислородом, конечным продуктом распада является молочная кислота.

В клетках микроорганизмов анаэробный распад глюкозы (брожение) заканчивается образованием различных продуктов: этилового спирта, уксусной, пропионовой, масляной и других кислот и т.д.

Материал исследования: дрожжи; молочная сыворотка; мышечная ткань.

Реактивы и оборудование: глюкоза, 5%-й раствор; NaOH, 10%-й раствор; FeCl₃, 1%-й раствор; фенол, 1%-й раствор; кислота молочная, 0,5%-й раствор; прибор для брожения; термостат; штатив с пробирками; пипетки; ступка с пестиком; воронка; марля.

Ход работы: **а) Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани.**

1-2 г мышечной ткани, измельченной ножницами, растирают с 3-5 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке. Полученную мышечную кашицу фильтруют через двойной слой марли, фильтрат кипятят в течение 1 мин., охлаждают, фильтруют через марлевый фильтр.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% фенола и в каждую из них прибавляют по каплям 1% хлорид железа до появления интенсивного фиолетового окрашивания (реактив Уффельмана). Затем в одну пробирку приливают 1 мл 0,5% молочной кислоты, во вторую – вытяжку из мышечной ткани, а в третью – 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают. В первой и второй пробирках фиолетовый цвет переходит в зеленовато-желтый, указывающий на наличие молочной кислоты, в третьей пробирке цвет раствора не изменяется.

б) Молочнокислородное брожение. В процессе прокисания молока под действием микроорганизмов происходит анаэробный распад углеводов молока. Одним из продуктов брожения является молочная кислота: к 2 мл молочной сыворотки добавляют 3 мл фенолята железа (реактив Уффельмана). В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости пере-

ходит в желто-зеленую, обусловленную образованием молочнокислого железа.

в) Спиртовое брожение – процесс распада глюкозы под влиянием ферментов дрожжей с выделением углекислого газа и этилового спирта. До стадии образования пировиноградной кислоты (ПВК) спиртовое брожение протекает так же, как и гликолиз. Затем ПВК последовательно декарбоксилируется, и образовавшийся ацетальдегид восстанавливается в этиловый спирт.

Ход работы: Растереть в ступке 0,5 г дрожжей, прибавляя в нее порциями 10 мл 5% раствора глюкозы. Полученную массу вносят в бродильную трубку так, чтобы заполнить закрытое колено, и ставят в термостат при температуре 37°C на один час.

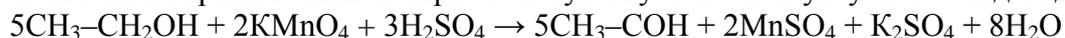
По истечении времени вынуть трубку, отметить скопление газа в закрытом колене и сделать качественные реакции на углекислый газ и этиловый спирт:

1) обнаружение углекислого газа: В бродильную трубку налить до краев 10% раствор гидроксида натрия. Закрывать отверстие трубки большим пальцем и несколько раз перевернуть ее, перемешивая содержимое. Углекислый газ поглощается щелочью, создавая вакуум, и палец присасывается к отверстию трубки.

2) обнаружение этилового спирта: Реакция с бихроматом калия: в пробирку наливают 1-2 мл хромовой смеси и добавляют по каплям при встряхивании 0,5 мл этилового спирта. Цвет смеси изменяется от оранжево-красного до зеленого. При этом ощущается запах уксусного альдегида, напоминающий запах зеленого яблока (*нюхать осторожно!*). Изменение окраски раствора связано с переходом хрома из степени «+6» (оранжево-красное окрашивание) в степень окисления «+3» (зеленое окрашивание):



Реакция с перманганатом калия: в сухую пробирку, закрепленную в штативе, аккуратно пипеткой, не смачивая стенок, вносят 2-3 мл концентрированной серной кислоты. По стенке пробирки другой пипеткой приливают 2-3 мл этилового спирта таким образом, чтобы получилось два слоя. Затем насыпают 0,5-1,0 г перманганата калия, который будет размещаться на границе раздела двух слоев. Через 1-2 мин. начинает протекать реакция, сопровождающаяся появлением ярких вспышек. При этом чувствуется запах уксусного альдегида:



2. Аэробный распад углеводов

Аэробный распад углеводов является главным источником энергии для клетки. При этом накапливается 38 молекул АТФ из расчета на одну молекулу глюкозы. В аэробных условиях пировиноградная кислота (ПВК) в результате окислительного декарбоксилирования превращается в ацетил-КоА, который в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса) окисляется до углекислого газа и воды. Кислоты цикла Кребса можно обнаружить по их способности к флюоресценции.

Материал исследования: цитрат натрия; янтарная кислота; дрожжи.

Реактивы и оборудование: H₂SO₄, концентрированная; трихлоруксусная кислота (ТХУ), 20%-й раствор; резорцин, порошок; окись алюминия, порошок; штатив с пробирками; воронка; фильтры; пипетки.

а) Качественные реакции на ди- и трикарбоновые кислоты. Кислоты цикла Кребса можно легко обнаружить, так как они при взаимодействии с резорцином и серной кислотой образуют флюоресцирующие соединения.

Ход работы: В первую пробирку вносят небольшое количество (на кончике скальпеля) цитрата натрия, а во вторую пробирку – такое же количество янтарной кислоты. В обе пробирки добавляют по 1 мл воды. Затем в пробирки добавляют двойное по отношению к исходному объему количество концентрированной серной кислоты, резорцина (на кончике скальпеля) и пробирки нагревают при слабом кипении в течение 3 мин., держа их у края пламени. Затем пробирки охлаждают, в каждую добавляют 1-2 мл воды (наслаивая) и наблюдают флюоресценцию.

б) Обнаружение янтарной и лимонной кислот в дрожжах. Небольшое количество

дрожжей (0,5 г) растирают в ступке с окисью алюминия. Затем добавляют 5 мл 20% ТХУ и перемешивают в течение 5 мин. Экстракт, содержащий кислоты цитратного цикла, фильтруют и используют в ходе дальнейшей работы: к 1 мл фильтрата добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, немного резорцина, затем поступают так же, как и в предыдущем опыте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 9. ОБМЕН ЛИПИДОВ

Цель: приобрести навык исследования конечных продуктов обмена липидов.

Обмен липидов включает следующие основные процессы:

1. *Переваривание и всасывание.*
2. *Внутриклеточный обмен.* Синтез жиров из глицерина и ВЖК начинается в печени с участием ферментов. Если в печени находится недостаточное количество, в частности, аминокислот (метионина, цистеина, серина), которые являются важными компонентами для образования лецитина и кефалина, то жиры откладываются в печени. В плазме крови транспортом жиров из печени в периферические части органов и тканей являются хиломикроны, там начинается процесс распада и окисления продуктов гидролиза (глицерина и ВЖК). Важное значение в обмене также имеет холестерин, который поступает в организм с животными жирами.

3. *Образование конечных продуктов* жирового обмена: H_2O , CO_2 , низкомолекулярные жирные кислоты, кетоновые тела.

1. Гидролиз жиров молока липазой

Материал исследования: молоко.

Реактивы и оборудование: раствор панкреатина; фенолфталеин, 1%-й раствор; Na_2CO_3 , 1%-й раствор; штатив с пробирками; пипетки; термостат.

Ход работы: В две пробирки наливают по 1 мл молока. В первую пробирку добавляют 5 капель раствора панкреатина, содержащего липазу, во вторую – 5 капель воды. В обе пробирки приливают по 1 капле 1% раствора фенолфталеина и по каплям 1% раствор карбоната натрия до появления розовой окраски, одинаковой в обеих пробирках (*нельзя приливать избыток раствора карбоната натрия*). Пробирки помещают в термостат при температуре $37^\circ C$ на 30 мин. Под действием липазы нейтральные жиры расщепляются, реакция среды сдвигается в кислую сторону за счет образования жирных кислот, в результате розовая окраска фенолфталеина исчезает.

2. Обнаружение кетоновых тел в моче

Кетоновые тела (β -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон) появляются в моче и крови при нарушении углеводного и жирового обменов, в частности, при диабете, а также при голодании. В нормальной моче кетоновые тела обычными реакциями не обнаруживаются. Определение кетоновых тел в моче очень важно для диагностики заболеваний, для контроля за ходом лечения и установлением диеты для больного диабетом.

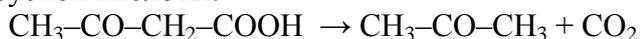
Материал исследования: моча.

Реактивы и оборудование: нитропруссид натрия, свежеприготовленный 10%-й раствор; $NaOH$, 10%-й раствор; раствор Люголя; $FeCl_3$, 5%-й раствор; CH_3COOH , концентрированная.

Ход работы: а) **Проба Люголя на ацетон.** К 2 мл мочи добавляют 3-4 капли раствора нитропруссид натрия и 2-3 капли щелочи. Появляется красно-бурое окрашивание. При подкислении KOH уксусной кислотой окрашивание становится ярко-красным. Если ацетон отсутствует в моче, при подкислении уксусной кислотой красное окрашивание переходит в желтое (реакция на креатинин в моче).

б) **Проба Либена на ацетон.** К 2 мл мочи добавляют 3-5 капель щелочи и затем по каплям раствор Люголя до слабо-желтой окраски раствора. При наличии ацетона в моче жидкость мутнеет вследствие выделения бледно-желтого кристаллического осадка йодоформа, обладающего характерным запахом.

в) **Проба Рехарда на ацетоуксусную кислоту.** К 5 мл мочи прибавляют по каплям раствор хлорида железа, выпадает осадок фосфатов в форме $FePO_4$ при наличии ацетоуксусной кислоты от прибавления лишней капли $FeCl_3$, появляется винно-красное окрашивание (реакция на енолы), постепенно бледнеющее при стоянии вследствие самопроизвольного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты:



3. Определение билирубина в моче (проба Розина)

Материал исследования: моча.

Реактивы и оборудование: йод, 1%-й спиртовой раствор; штатив с пробирками; пипетки.

Ход работы: На 3-4 мл мочи осторожно наслаивают 1-2 мл 1% спиртового раствора йода. При наличии желчных пигментов (билирубина) на границе жидкостей появляется зеленое кольцо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>

2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>

3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

ТЕМА 10 БИОХИМИЯ МЯСА И МОЛОКА

1. Получение экстракта мяса по Андриевскому. Определение процентной фильтруемости и прозрачности фильтрата мяса

Принцип метода. Метод основан на физико-химическом определении показателей качества мяса.

Материал исследования: мясо.

Реактивы и оборудование: Реактивы: бидистиллированная вода, ножницы, коническая колба на 250 мл., измерительный цилиндр на 100 мл, бумажный фильтр.

Ход работы. Берут 10 грамм мяса, по возможности, освобожденного от соединительной ткани и жира, ножницами нарезают на 20—30 кусочков и помещают в коническую колбу вместимостью в 250 см³. Затем наливают в эту колбу 100 см³ бидистиллированной воды и оставляют на 15 минут, все время потряхивая ее. Через 15 минут экстракт фильтруется через однослойный бумажный фильтр в измерительный цилиндр в 100 см³.

а) Отмечают сколько кубических см экстракта проходит через фильтр в каждые 5 минут (процент указывается измерительным цилиндром). Экстракт доброкачественного мяса фильтруется в первые 5 минут от 50 до 60 и больше процентов и в 10 минут профильтровывается весь. Недоброкачественное мясо в зависимости от степени испорченности в первые 5-10 минут дает 25-30% фильтрата и для фильтрации всего экстракта обычно требуется более 1 часа.

б) Фильтрат экстракта свежего мяса совершенно прозрачный, розоватого цвета. Фильтрат экстракта загнившего мяса, в зависимости от степени разложения, имеет опалесценцию той или иной степени, мутный цвет от бледно-розового с беловатым оттенком до серо-зеленого.

2. Определение реакции среды фильтрата мяса посредством лакмусовой бумажки и рН-метром

Принцип метода. Метод основан на измерении рН среды фильтрата мяса.

Материал исследования: мясной экстракт.

Реактивы и оборудование: индикаторная универсальная бумага, пробирки, стеклянный

стаканчик на 50 мл., рН-метр.

Ход работы. В пробирку наливают 3-4 мл фильтрата мяса, помещают в него индикаторную универсальную бумагу и по изменившейся окраске индикаторной бумаги в сравнении со стандартной шкалой определяют рН.

В стеклянный стаканчик наливают 30—40 мл фильтрата мяса, помещают в него электроды рН-метра и по шкале определяют рН.

3. Определение качества мяса

Принцип метода. Метод основан на качественных реакциях, используемых для показателей качества мяса.

Материал исследования: экстракт мяса.

Реактивы и оборудование: реактив Несслера, 1 % уксусная кислота, 1 % раствор перекиси водорода, 0,2 % спиртовой раствор бензидина, 10% раствор сульфата меди, пробирки, пипетки, водяная баня.

Ход работы 1. Реакция на аммиак. В пробирку наливают 1 мл реактива Несслера и затем приливают 10 капель экстракта мяса. В экстракте испорченного мяса появляется желтоватый и желто-коричневый цвет с аналогичного цвета осадком. В пробирке с экстрактом доброкачественного мяса никаких изменений в цвете нет, имеется цвет реактива.

2. Проба на глобулины (ставится только с мясом крупного рогатого скота). В пробирку наливают 2 мл фильтрата мяса и прибавляют 2—3 капли 1 % водного раствора уксусной кислоты. Все пробирки с пробами ставятся на 2—3 минуты в водяную баню при 75 -80°С. В пробирке с экстрактом испорченного мяса выпадает хлопчатый осадок и муть становится интенсивнее. Экстракт доброкачественного мяса, наоборот, после подогрева становится еще прозрачнее.

3. Бензидиновая проба на пероксидазу. В пробирку наливают 2 мл экстракта мяса, затем прибавляют 5 капель 0,2% спиртового раствора бензидина и 2 капли 1 % перекиси водорода. Все это взбалтывают. Экстракт свежего мяса дает синий цвет спустя 1/3 - 1 минуту с последующим побурением среды.

Экстракт сомнительного мяса дает менее интенсивную окраску и притом значительно позже (2- 3 минуты) с последующим переходом в бурый цвет. Экстракт испорченного мяса не дает синей окраски и непосредственно переходит в бурый цвет.

4. Проба с медным купоросом. В пробирку наливают 2-3 мл экстракта мяса и к нему прибавляют 5-6 капель медного купороса. Экстракт недоброкачественного мяса дает муть и осадок. В экстракте доброкачественного мяса никакого изменения не наблюдается.

4. Выделение казеиногена из молока и его гидролиз

Казеиноген (белок молока) обладает свойствами кислоты и в молоке находится в виде анионов, растворимых в воде (кальцинат казеиногена). Недиссоциированные молекулы казеиногена малорастворимы в воде. Изoeлектрическая точка казеиногена находится при рН 4,7. Этим объясняется, что при подкислении молока до рН 4,7 молоко свёртывается в результате выпадения в осадок казеиногена. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению. Свёртывание молока возможно и в присутствии молочной кислоты, образовавшейся из лактозы под влиянием молочно-кислых бактерий. При ферментативном свёртывании молока (действие пепсина) казеиноген подвергается химическим изменениям с образованием из него казеина. Кальциевая соль казеина в противоположность кальциевой соли казеиногена нерастворима в воде. Превращением казеиногена в казеин объясняется ферментативное свёртывание молока.

Материал исследования: молоко.

Реактивы и оборудование: CH_3COOH и HNO_3 , концентрированные; CuSO_4 , 1%-й раствор; NaOH , 10%-й раствор; H_2SO_4 , 10%-й раствор; молибденовый реактив; Na_2CO_3 , 0,1%-й

раствор; фенолфталеин, 0,5%-й спиртовой раствор; воронки; фильтры; штатив с пробирками; пипетки; стеклянная палочка; пробирка для гидролиза (с обратным холодильником).

Ход работы: а) *Выделение казеиногена.* К 4 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды. Осаждают казеиноген добавлением 2 капель концентрированной уксусной кислоты. Выпавший осадок казеиногена отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой два раза.

б) *Гидролиз казеиногена.* При щелочном гидролизе казеиногена, выделенного из молока или зёрен казеина, происходит его распад на фосфат и белок. После осаждения казеиногена из молока (или 100 мг казеина в виде порошка) всё содержимое с фильтра переносят в пробирку для гидролиза с обратным холодильником. Затем смывают осадок с фильтра 2 мл 0,1% раствора карбоната натрия в ту же пробирку и добавляют 4 мл 10% раствора едкого натра. Кипятят на умеренном огне (на асбестовой сетке) 15 минут с момента закипания. После охлаждения к гидролизату добавляют равный объем 0,1% раствора карбоната натрия и проводят реакции на продукты гидролизата:

- *Обнаружение белка:* Белок обнаруживают биуретовой реакцией: к 1,0 мл гидролизата приливают равный объем 10% раствора гидроксида натрия и 2-3 капли 1% раствора сульфата меди. Появляется фиолетовое окрашивание с красным или синим оттенком.

- *Обнаружение фосфата (молибденовая проба):* к 1 мл разведённого гидролизата казеиногена добавляют 1 каплю фенолфталеина и 1 каплю концентрированной азотной кислоты и только после обесцвечивания вносят 2 мл молибденового реактива. Затем доводят раствор до кипения и сразу пробирку охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется жёлтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

5. Обнаружение в молоке фосфора и кальция

Материал исследования: молоко.

Реактивы и оборудование: аммоний молибделеновокислый, 20%-й раствор; аммоний щавелевокислый, 10%-й раствор.

Ход работы: а) **Обнаружение фосфора.** К 2 мл молока приливают 2 мл раствора молибденовокислого аммония, нагревают. Наблюдается желтое окрашивание.

б) **Обнаружение кальция.** К 2 мл молока приливают 2 мл раствора щавелевокислого аммония. Выпадает осадок щавелевокислого кальция.

6. Обнаружение каталазы в молоке

Фермент каталаза содержится в некоторых сырых продуктах – молоке, мясе, картофеле и др. Каталазу обнаруживают, используя ее способность разлагать перекись водорода с выделением газа кислорода.

Материал исследования: молоко.

Реактивы и оборудование: H_2O_2 , 3%-й раствор.

Ход работы: К 2 мл сырого (некипяченого) молока добавляют по каплям 3% раствор перекиси водорода. Наблюдают выделение пузырьков газа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Суслянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). – Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>

3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ауэрман Т.Л. Основы биохимии : учеб. пособие / Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. — М. : ИНФРА-М, 2017.— 400 с. — (Высшее образование: Бакалавриат). — Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/760160>
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М.: Дашков и К, 2013. — 168 с. — ISBN 978-5-394-01790-2, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/415230>
3. Митякина, Ю.А. Биохимия : учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М. : РИОР : ИНФРА-М, 2017. — 113 с. ISBN: 978-5-9557-0268-1, Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/548297>
4. Андреев, В.П. Биологический словарь [Электронный ресурс] : слов. / В.П. Андреев, С.А. Павлович, Н.В. Павлович. — Электрон. дан. — Минск : "Вышэйшая школа", 2011. — 336 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/65176>
5. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович и др.; под общ. Ред. А.Д. Тагановича. — Минск: выш. шк., 2013. — 671 с. — ISBN 978-985-06-2321-8
6. Блинов, В.А. Биологическая химия : Краткий курс лекций / В.А. Блинов, И.А. Сазонова. — Саратов. — 2007. — 398 с. (10 экз.)
7. Митякина, Ю.А. Биохимия: учеб. пособие / Ю.А. Митякина. — М.: РИОР: ИНФРА-М, 2017. — 113 с. — ISBN 978-5-16-104852 (ИНФРА-М, online) (Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС Znanium.com)
8. Рогожин, В.В. Биохимия животных: учебник / В.В. Рогожин. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 552 с. (16 экз.)
9. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. — 3-е изд., испр. и доп. — СПб.: ГИОРД, 2009. — 472 с. — ISBN 5-98879-008-9 (10 экз.)
10. Сафарова, В.Г. Химия биологически активных веществ / В.Г. Сафарова, В.В. Зорин. — Уфа: Изд-во УГНТУ, 2007. — 127 с. — ISBN 5-7831-0693-3 (15 экз.)
11. Биологическая и физколлоидная химия: учебно-методическое пособие для студентов направления 36.03.02.62 «Зоотехния» / Древин В.Е., Спивак М., Комарова В. - Волгоград:Волгоградский ГАУ, 2015. - 152 с. Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/615100>

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Тема 1. Свойства аминокислот, пептидов и белков	4
Цветные реакции на белки и аминокислоты	4
Свойства белков	7
Список литературы	12
Тема 2. Свойства ферментов	12
Список литературы	17
Тема 3. Нуклеиновые кислоты	17
Список литературы	19
Тема 4. Низкомолекулярные биорегуляторы	20
Качественный анализ гормонов	20
Список литературы	23
Тема 5. Витамины	24
Качественные реакции на жирорастворимые витамины	25
Качественное и количественное определение водорастворимых витаминов	30
Список литературы	31
Тема 6. Энергетический обмен	31
Список литературы	33
Тема 7. Обмен белков	33
Список литературы	35
Тема 8. Обмен углеводов	36
Список литературы	37
Тема 9. Обмен липидов	38
Список литературы	39
Тема 10. Биохимия мяса и молока	40
Список литературы	43
Библиографический список	44
Содержание	45