

БИОХИМИЯ



Учебное пособие

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет
имени М.В. Ломоносова»

БИОХИМИЯ

Учебное пособие

Архангельск
САФУ
2021



УДК 577.1
ББК 28.072
Б63

*Рассмотрено и рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией
высшей школы естественных наук и технологий
Северного (Арктического) федерального университета
имени М.В. Ломоносова*

Составители:

М.В. Емельянова, доцент, канд. техн. наук; К.С. Вашукова, доцент, канд. техн. наук;
К.Ю. Терентьев, доцент, канд. техн. наук; В.А. Рудакова, доцент, канд. техн. наук;
А.С. Аксенов, профессор, канд. техн. наук; А.В. Сухорукова, мл. науч. сотр.
лаборатории функциональной геномики (Институт физиологии растений
им К.А. Тимирязева РАН); И.А. Хадыко, ассистент; А.В. Кондаков, доцент,
канд. техн. наук; Д.Г. Чухчин, профессор, канд. техн. наук

Рецензент

А.В. Канарский, д-р. техн. наук, профессор КНИТУ

Б63 Биохимия: учеб. пособие / сост. М.В. Емельянова, К.С. Вашукова,
К.Ю. Терентьев [и др.]; Сев. (Арктич.) федер. ун-т им. М.В. Ломоносова. –
Архангельск: САФУ, 2021. – 117 с. – Текст: электронный.
ISBN 978-5-261-01556-7

В пособии изложены краткие теоретические сведения о составе и свойствах основных компонентов клетки; рассмотрены способы их качественного и количественного определения, методы обнаружения и количественного определения белков, ферментов, углеводов, липидов и витаминов в биологических объектах, приемы выделения этих соединений, а также практические аспекты в исследованиях.

Рекомендуется в качестве руководства для лабораторного практикума и самостоятельной работы студентов бакалавриата, специалитета и магистратуры всех форм обучения по направлениям: 19.03.01; 19.04.01 «Биотехнология»; 18.03.01 «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии»; 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»; 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия».

УДК 577.1
ББК 28.072

На обложке фото из открытых интернет-источников

Издательский дом им. В.Н. Булатова САФУ
163060, г. Архангельск, ул. Урицкого, д. 56

ISBN 978-5-261-01556-7

© Северный (Арктический)
федеральный университет
им. М.В. Ломоносова, 2021



ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| 1. УГЛЕВОДЫ | 5 |
| 1.1. Общие свойства углеводов | 9 |
| 1.1.1. Качественные реакции на моносахариды | 10 |
| 1.1.2. Восстанавливающие свойства дисахаридов | 12 |
| 1.1.3. Изучение свойств пектиновых веществ | 13 |
| 1.1.4. Оптическая микроскопия в изучении крахмальных зерен | 14 |
| 1.2. Методы количественного определения моносахаридов | 15 |
| 1.2.1. Глюкозооксидазный метод определения глюкозы на анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра» | 16 |
| 1.2.2. Определение глюкозы с использованием набора «Фотоглюкоза» | 18 |
| 1.2.3. Определение восстанавливающих сахаров по методу Шомоди–Нельсона | 19 |
| 1.2.4. Эбулиостатический метод определения моносахаридов | 20 |
| 1.3. Количественное определение полисахаридов | 26 |
| 1.3.1. Поляриметрическое определение сахаров на сахариметре | 26 |
| 1.3.2. Поляриметрический метод определения содержания сахарозы в мелассе | 29 |
| 1.3.3. Определение крахмала поляриметрическим методом Эверса | 30 |
| 2. БЕЛКИ | 34 |
| 2.1. Качественные цветные реакции на белки и аминокислоты | 35 |
| 2.1.1. Биуретовая реакция | 35 |
| 2.1.2. Нингидриновая реакция | 36 |
| 2.1.3. Ксантопротеиновая реакция | 36 |
| 2.1.4. Реакции на серосодержащие аминокислоты | 37 |
| 2.2. Физико-химические свойства белков | 38 |
| 2.2.1. Определение изоэлектрической точки казеина | 39 |
| 2.2.2. Изменение белков при нагревании | 41 |
| 2.2.3. Осаждение белков | 42 |
| 2.2.4. Методы выделения и фракционирования белков | 44 |
| 2.3. Анализ продуктов белкового обмена | 46 |
| 2.3.1. Определение содержания аминного азота формольным титрованием | 46 |
| 2.3.2. Разделение смеси аминокислот методом радиальной хроматографии на бумаге | 48 |
| 2.4. Методы количественного определения белка | 51 |
| 2.4.1. Определение белка методом Кьельдаля | 51 |
| 2.4.2. Определение общего азота методом Несслера | 54 |
| 2.4.3. Количественное определение белка по методу Брэдфорда | 55 |
| 2.4.4. Количественное определение белка по методу Лоури | 56 |
| 3. ФЕРМЕНТЫ | 59 |
| 3.1. Выделение ферментов и обнаружение их действия | 60 |
| 3.1.1. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле | 60 |
| 3.1.2. Получение амилазы слюны и обнаружение активности | 61 |
| 3.2. Свойства ферментов | 62 |
| 3.2.1. Выделение сахаразы дрожжей и определение оптимальной температуры действия | 63 |



| | |
|--|-----|
| 3.2.2. Специфичность действия уреазы | 64 |
| 3.2.3. Влияние pH на активность ферментов | 65 |
| 3.2.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы | 67 |
| 3.3. Методы количественного определения активности ферментов | 68 |
| 3.3.1. Определение активности липазы | 69 |
| 3.3.2. Определение активности уреазы | 70 |
| 3.3.3. Определение активности трипсина | 71 |
| 3.3.4. Определение активности пероксидазы | 73 |
| 3.3.5. Определение активности каталазы | 74 |
| 3.3.6. Выделение α - и β - амилаз из солода и определение их активности | 75 |
| 3.3.7. Определение активности сычужного фермента | 78 |
| 3.3.8. Определение активности целлюлаз | 79 |
| 3.3.9. Определение амилазной (диастазной) активности мёда | 81 |
| 4. ЛИПИДЫ | 84 |
| 4.1. Физико-химические свойства жиров | 86 |
| 4.2. Определение технических характеристик жиров | 88 |
| 4.2.1. Определение кислотного числа жира | 88 |
| 4.2.2. Определение йодного числа жира | 88 |
| 4.2.3. Определение числа омыления и эфирного числа | 89 |
| 4.3. Определение массовой доли сырого жира в аппарате Э-8 | 90 |
| 5. НУКЛЕОПРОТЕИНЫ. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ | 94 |
| 6. ВИТАМИНЫ | 96 |
| 6.1. Водорастворимые витамины | 96 |
| 6.2. Жирорастворимые витамины | 99 |
| 6.3. Количественное определение витамина С | 101 |
| 6.3.1. Определение витамина С титриметрическим методом | 101 |
| 6.3.2. Колориметрическое определение витамина С | 103 |
| 7. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА | 105 |
| 7.1. Исследование холестерина и стерина растительных масел | 105 |
| 7.1.1. Реакция Сальковского на холестерин | 106 |
| 7.1.2. Реакция Витби на наличие стерина в растительных маслах | 106 |
| 7.2. Гормоны | 106 |
| 7.2.1. Гормоны мозгового слоя надпочечников | 106 |
| 7.2.2. Гормоны поджелудочной железы | 107 |
| 7.3. Определение дубильных веществ | 109 |
| 7.3.1. Качественные реакции на дубильные вещества в растительном сырье | 109 |
| 7.3.2. Количественное определение дубильных веществ объемным методом | 110 |
| 7.4. Алкалоиды | 111 |
| 7.5. Растительные пигменты | 112 |
| Библиографический список | 116 |
| Приложение. Аминокислоты | 117 |



1. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – самые распространенные в природе органические соединения, в больших количествах накапливаются в растительных тканях, как правило, в виде полисахаридов. Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(\text{CH}_2\text{O})_n$, а также производные этих соединений.

Все углеводы подразделяются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды содержат альдегидную или кетонную группы и несколько спиртовых гидроксильных групп. По числу атомов углерода различают низшие триозы и тетразы, обычные пентозы и гексозы и высшие гептозы и октозы. Среди моносахаридов наиболее распространены гексозы (глюкоза, фруктоза, галактоза, манноза) и пентозы (рибоза, дезоксирибоза, арабиноза, ксилоза). В зависимости от функциональной группы альдогексозами являются глюкоза, галактоза и манноза, кетогексозой – фруктоза. Они имеют формулу $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ и являются изомерами (рис. 1).

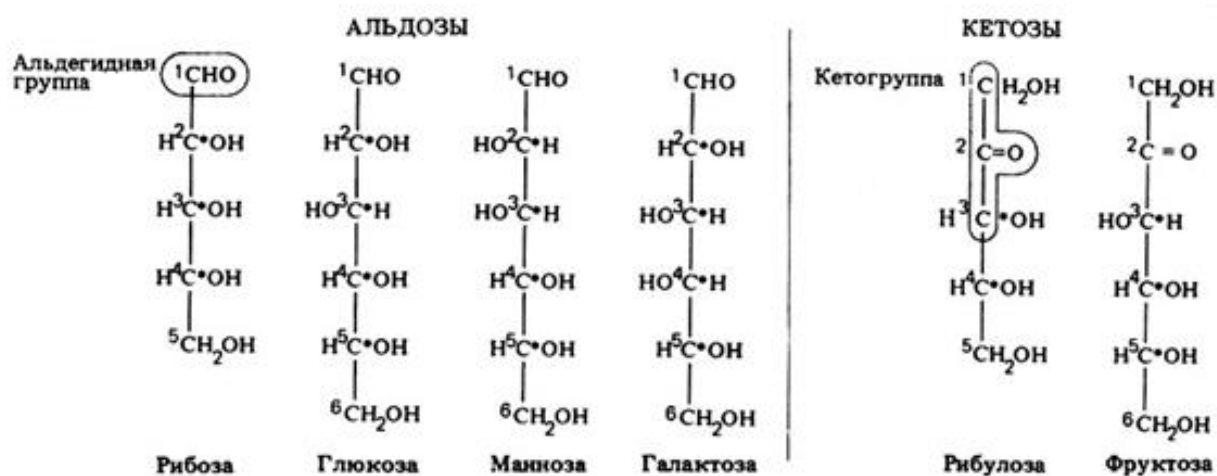


Рис. 1. Моносахариды – представители альдоз и кетоз

Моносахариды могут существовать в открытой (в виде проекционных формул Фишера) и циклической (формулы Хеуорса) форме. В результате внутримолекулярного взаимодействия образуются фуранозные (пятичленные) и пиранозные (шестичленные) циклы. При этом углеродные цепи принимают выгодную клешнеобразную конформацию, и альдегидная группа при C_1 оказывается сближенной с $-\text{OH}$ у C_4 или C_5 , образуется циклическая полуацеталь. Возникают дополнительный ассиметричный атом C^* (прежде альдегидный) и гликозидный гидроксил: в α -форме располагается справа,



в β -форме – слева. При написании проекционных формул пользуются правилом: заместители, находящиеся в фишеровской форме справа, рисуются ниже плоскости кольца, слева – выше. Образование β -D-глюкопиранозы представлено на рис. 2.

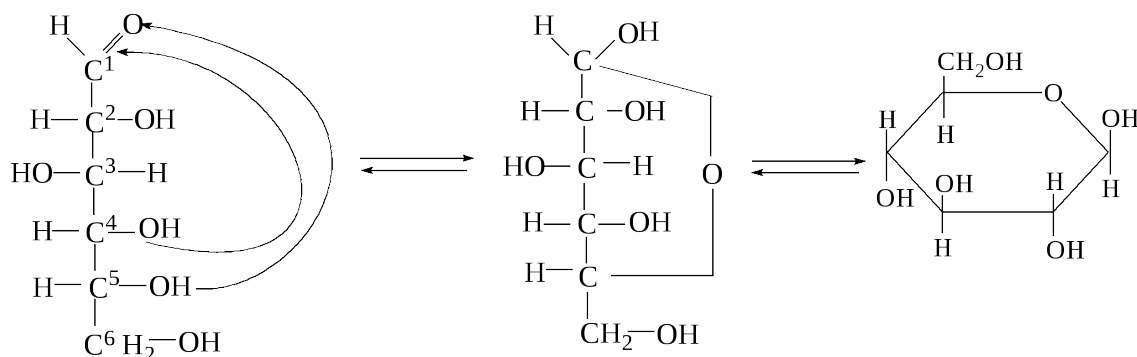


Рис. 2. Образование β -D-глюкопиранозы

Молекулы олигосахаридов состоят из нескольких (двух или трех) простых моносахаридов (дисахариды, трисахариды и т.д.). К наиболее распространенным дисахаридам относятся сахароза, лактоза, мальтоза, целлобиоза и др.

Мальтоза (солодовый сахар) – продукт расщепления крахмала под действием амилаз, выделяемых слюнной железой или содержащихся в солоде. В мальтозе остатки двух молекул D-глюкопиранозы соединены α -(1-4)-гликозидной связью (рис. 3).

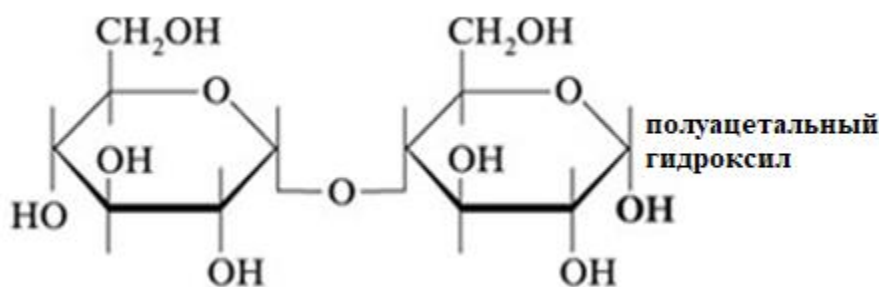


Рис. 3. Молекула мальтозы

В *целлобиозе* остатки двух молекул глюкопиранозы связаны β -(1-4)-гликозидной связью.

Лактоза (4- β -D-галактопиранозил-D-глюкопираноза) – это восстанавливающий дисахарид, состоит из глюкозы и галактозы, связанных β -(1-4)-гликозидной связью (рис. 4). Является основным дисахаридом молока (молочный сахар).



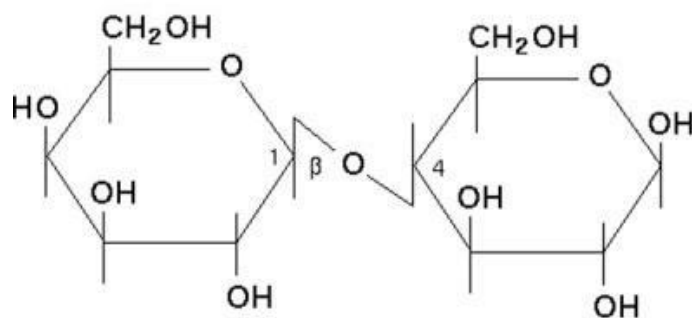


Рис. 4. Молекула лактозы

Перечисленные дисахариды, образованные за счет гликозидного гидроксила одного мономерного звена и спиртовой группы другого, являются восстанавливающими. За счет обратимого раскрытия свободного крайнего гидроксила образуется свободная альдегидная группа, которая окисляется, восстанавливая при этом другие соединения, например гидроксид меди (II) до оксида меди (I), серебра и других.

Сахароза (α -D-глюкопиранозил- β -D-фруктофуранозид) – дисахарид, состоящий из остатков α -D-глюкопиранозы и β -D-фруктофуранозы, соединенных (1 \rightarrow 2)-гликозидной связью (рис. 5).

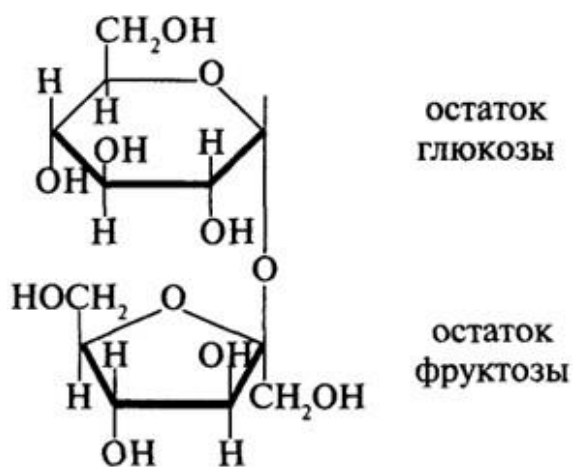


Рис. 5. Молекула сахарозы

Сахароза относится к невосстанавливающим дисахаридам, т.к. оба гидроксила задействованы в образовании гликозидной связи и не способны к раскрытию цикла.

Полисахариды – высокомолекулярные углеводы, состоящие из большого количества моносахаридов. К ним относятся крахмал, гликоген, целлюлоза, пектиновые вещества, хитин и др.

Полисахаридные цепи могут быть неразветвленными линейными или разветвленными. По составу входящих моносахаридов полисахариды



делятся на гомо- (состоят из остатков одного моносахарида) и гетерополисахариды (состоят из остатков разных моносахаров). Например, общая формула гомоглюканов $(C_6H_{10}O_5)_n$ – к ним относятся запасные (крахмал, гликоген) и структурные полисахариды (целлюлоза).

Крахмал является запасяющим полисахаридом растительных клеток. Состоит из двух полисахаридов – *амилозы* и *амилопектина*, элементарным звеном в которых является остаток α -D-глюкопиранозы.

Амилоза представляет собой линейный полисахарид, остатки глюкозы которого соединены друг с другом α -1,4-гликозидной связью. В зависимости от вида растения молекулярная масса амилозы составляет $(1,5 \dots 5,0) \cdot 10^5$ Да.

Амилопектин является разветвленным полисахаридом, у которого к длинным основным цепям амилозы присоединяются боковые цепи. Точка ответвления формируется за счет α -1,6-гликозидной связи (рис. 6). Молекулярная масса амилопектина составляет $10^6 \dots 10^9$ Да.

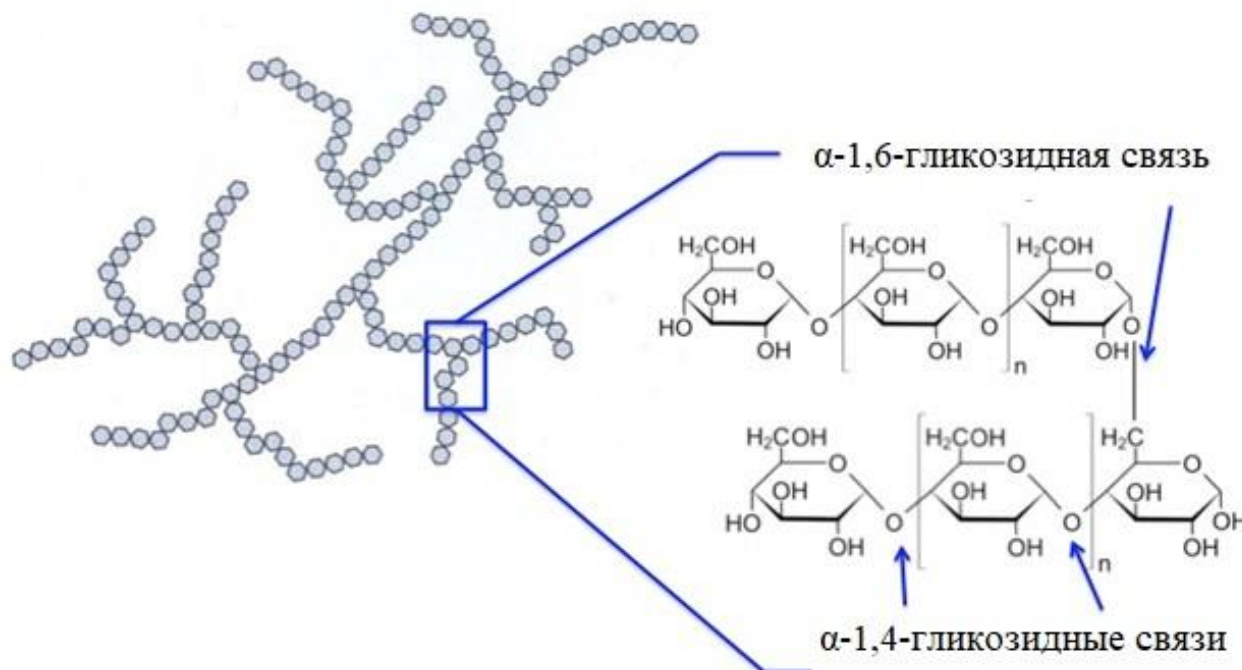


Рис. 6. Молекула амилопектина

Целлюлоза (клетчатка) построена также из остатков D-глюкопиранозных остатков, но соединенных связями β -(1-4). Макромолекулярная цепь не имеет разветвлений, содержит до 20 000 остатков в зависимости от источника происхождения (рис. 7). Благодаря β -конфигурации макромолекула целлюлозы имеет строго линейное строение, что придает высокую механическую прочность и нерастворимость в воде.



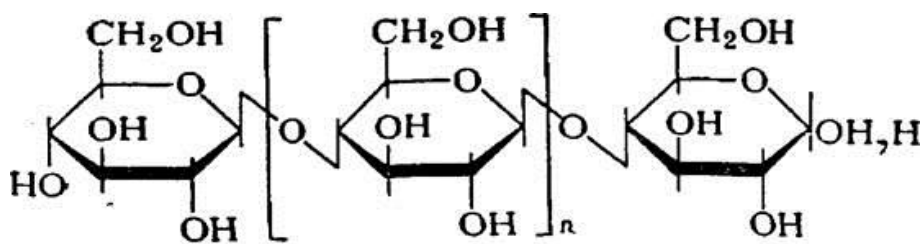


Рис. 7. Молекула целлюлозы

Основой *пектиновых веществ* (рис. 8) является молекулярная цепь, состоящая из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных 1,4-α-гликозидной связью (галактан). Пектины из разных растительных источников обладают отличающейся степенью этерификации карбоксильных групп.

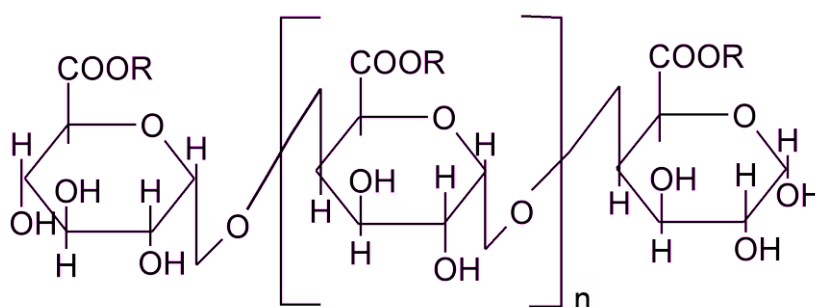


Рис. 8. Молекула пектина

Структурные растительные (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектиновые вещества и др.) и запасные (крахмал, фруктозаны и др.) полисахариды являются основным сырьем в биотехнологии и источником моносахаридов. Знание строения, методов идентификации и количественного определения углеводов крайне важно для студентов, изучающих химический анализ природного сырья, биотехнологию и аналитическую химию.

1.1. ОБЩИЕ СВОЙСТВА УГЛЕВОДОВ

Углеводы дают ряд цветных реакций, которые являются основой качественных и количественных методов определения моно-, ди- и полисахаридов в продуктах растительного и животного происхождения.

Все моносахариды, а также те дисахариды, которые имеют свободную карбонильную группу, являются восстанавливающими (редуцирующими) сахарами. За счет обратимого раскрытия циклической формы образуется свободная альдегидная группа, которая способна окисляться в щелочной среде, восстанавливая при этом другие соединения, например щелочные растворы окиси меди, серебра и др. Например, глюкоза, а также другие восста-

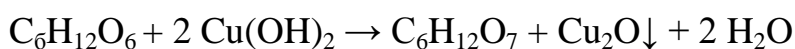


навливающие сахара в щелочной среде превращают гидроксид меди (II) в оксид меди (I) за счет восстанавливающих свойств альдегидной группы.

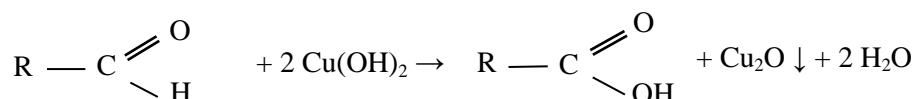
Материалы: 1- и 5%-ный растворы глюкозы; сок или водная вытяжка из ягод, фруктов.

1.1.1. Качественные реакции на моносахариды

Реакция Троммера. В пробирку к 1 мл 1 %-ного раствора глюкозы или растительной вытяжки приливают 0,5 мл 10 %-ного раствора NaOH и затем осторожно по каплям 2 %-ный раствор CuSO₄ до появления не исчезающей при взбалтывании голубой мути гидроксида меди. Затем жидкость нагревают, выпадает красный осадок оксида меди (Cu₂O):

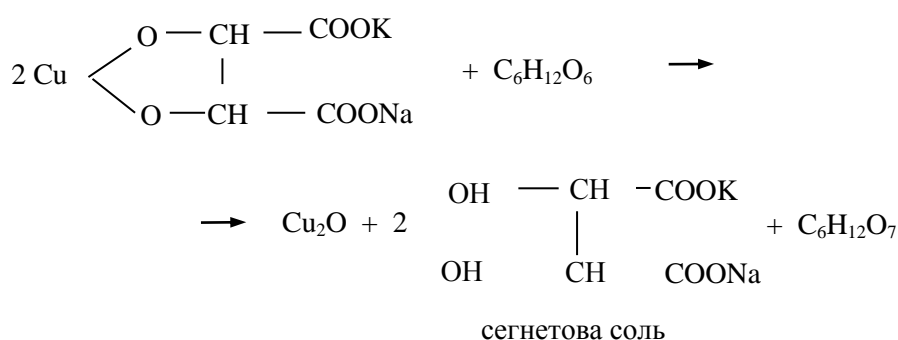


или



Альдегидная группа глюкозы восстанавливает Cu²⁺ в Cu⁺, окисляясь при этом до глюконовой кислоты, т.е. проявляет восстанавливающие свойства.

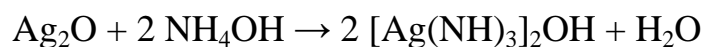
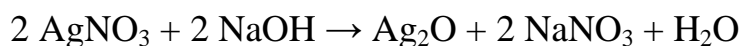
Реакция Фелинга. К 1 мл испытуемой жидкости приливают 1 мл реактива Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок закиси меди. Входящая в состав фелинговой жидкости сегнетова соль в данной реакции обеспечивает удержание в растворе гидроксида меди:



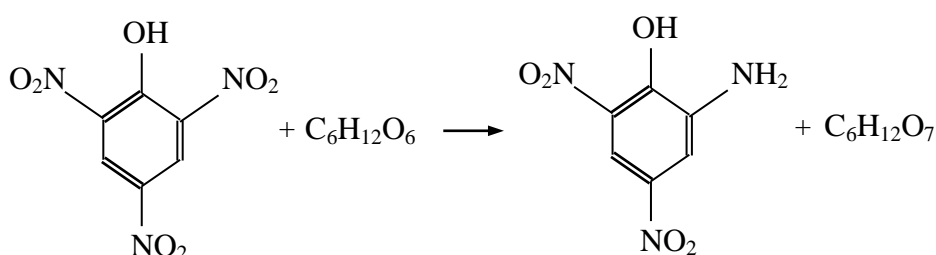
Реакция с AgNO₃. К 1 мл 2 %-ного раствора нитрата серебра приливают 0,5 мл 2 %-ного раствора NaOH. Выпавший осадок оксида серебра растворяют в аммиаке, прибавляя последний по каплям (во избежание образования избытка). Затем в пробирку приливают 1 мл испытуемого раствора и нагревают на спиртовке. На стенках пробирки появляется серебряное зеркало – осадок металлического серебра (положительный результат во многом



зависит от чистоты внутренних стенок пробирки). Реакция протекает по следующей схеме:

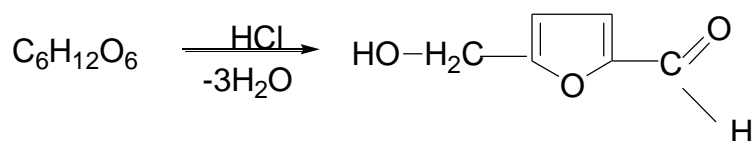


Реакция с пикриновой кислотой. К 1...2 мл 1 %-ного раствора глюкозы приливают 0,5 мл 10 %-ного раствора NaOH, 1 мл раствора пикриновой кислоты и нагревают. Раствор приобретает темно-красное окрашивание вследствие восстановления пикриновой кислоты (тринитрофенол) до пикраминовой:



Реакция с метиленовой синью. Метод основан на способности глюкозы восстанавливать метиленовую синь, которая в восстановленном состоянии бесцветна. В пробирку наливают 1 мл 5 %-ного раствора глюкозы, 2–3 капли 20 %-ного раствора карбоната натрия, 3–4 капли раствора метиленовой сини и нагревают. Происходит обесцвечивание краски. Если же после обесцвечивания пробирку несколько раз встряхнуть, то вновь появляется синее окрашивание, так как метиленовая синь окисляется за счет кислорода воздуха. При стоянии раствор снова обесцвечивается. Это повторяется до тех пор, пока весь сахар не окислится.

Реакция на фруктозу (Селиванова). К 1 мл 5 %-ного раствора фруктозы добавляют равное количество 25 %-ного раствора HCl и несколько кристалликов резорцина. Смесь кипятят 20...30 с. В присутствии фруктозы появляется красное окрашивание. Принцип реакции основан на способности фруктозы при нагревании с крепкой HCl терять три молекулы воды и превращаться в оксиметилфурфурол:



Оксиметилфурфурол с резорцином дает вещество, окрашивающее раствор в красный цвет. Такая же реакция происходит с раствором сахарозы вследствие присутствия в ее молекуле фруктозы.

1.1.2. Восстанавливающие свойства дисахаридов

Дисахариды образованы двумя молекулами моносахаридов и могут быть соединены двумя типами связей:

- за счет гликозидного –ОН одного и любой спиртовой ОН-группой другого моносахарида. Имеется свободный полуацетальный гидроксил (концевой справа), способный к раскрытию цикла и обладающий восстанавливающими свойствами, поэтому такие дисахариды относятся к *восстанавливающим*;

- если связь формируется между двумя гликозидными гидроксилами – *невосстанавливающие* дисахариды.

Реакция с сахарозой. В одной пробирке к 1 мл 2 %-ного раствора сахарозы приливают 2 мл реактива Фелинга и нагревают, осадок не выпадает.

В другой пробирке к 1 мл раствора сахарозы приливают 2–4 капли 20 %-ного раствора HCl и кипятят в течение 1 мин. После охлаждения добавляют 2 мл реактива Фелинга и кипятят. Объясните наблюдаемые различия реакции Фелинга в двух пробирках. Напишите уравнение реакции, протекающей во второй пробирке.

Реакция с другими дисахаридами. К 1 мл раствору лактозы прибавляют 2 мл реактива Фелинга и нагревают. Делают вывод о восстанавливающих свойствах лактозы.

Задание

1. Провести качественные реакции на восстанавливающие свойства моносахаридов, по результатам работы заполнить табл. 1.

Таблица 1. Восстанавливающие свойства моносахаридов

| Название реакции | Исследуемый материал | Наблюдения | Реагирующая группа | Объяснение |
|------------------|----------------------|------------|--------------------|------------|
| | | | | |

2. Провести сравнение восстанавливающих свойств дисахаридов (табл. 2), привести структурные формулы исследуемых сахаров.



Таблица 2. Восстанавливающие свойства дисахаридов

| Исследуемый дисахарид | Кипячение с HCl (реакция) | Реакция с реактивом Фелинга | Объяснение | Формула дисахарида с указанием свойств |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|------------|--|
| | | | | |

1.1.3. Изучение свойств пектиновых веществ

Пектины являются структурными элементами ткани растений, способствуют поддержанию тургора клетки и засухоустойчивости всего растения. Пектины представляют собой полисахариды, состоящие из уроновых кислот. Подразделяются на галактуронаны и рамногалактуронаны. У галактуронанов основная цепочка представлена галактуроновой кислотой. Галактуронаны делятся на гомогалактуронаны, ксилогалактуронаны и рамногалактуронаны I и II. У рамногалактуронанов I галактуроновая кислота чередуется с рамнозой. У рамногалактуронанов II рамноза находится в боковой цепи. Пектины широко используются в качестве загустителей, гелеобразователей, влагоудерживающих агентов и средств для капсулирования. Сырьем для получения пектина служат яблоки, корки цитрусовых, свекловичный жом, шляпки подсолнечника и т.д.

Осаждение пектиновых веществ из раствора. В пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора пектина, приливают двойной объем этанола и по каплям хлористый кальций (4 %). В пробирке образуется хлопьевидный осадок пектата кальция. Наблюдения записывают.

Проба на галактуроновую кислоту (по Эрлиху). В пробирку наливают 0,5 мл 1%-ного раствора пектина, добавляют несколько капель 0,1 н раствора ацетата свинца и нагревают до кипения в пламени спиртовки. Если образовавшийся вначале белый осадок постепенно окрашивается в оранжевый цвет, значит, в пектине содержится галактуроновая кислота. Наблюдения записывают.

Испытание желеобразующей способности пектина. Оптимальные условия образования желе системы пектин–сахар–кислота: 60 %-ное содержание сахара, 1%-ное содержание пектина при pH 2,6–3,1. В фарфоровую чашку наливают 25 мл 1 %-ного раствора пектина, добавляют 15 г сахарозы. Полученную смесь перемешивают стеклянной палочкой и нагревают до кипения. После 10 мин кипячения в слегка выпаренную смесь вносят 1 мл 40 %-ного



раствора лимонной кислоты, хорошо перемешивают и разливают в плоские формочки. Через 2–3 ч среда застынет. Наблюдения записывают.

Задание

Провести реакции и привести структурные формулы фрагмента макромолекулы пектина (галактуронида). Записать наблюдения и выводы по работе.

1.1.4. Оптическая микроскопия в изучении крахмальных зерен

Крахмал – распространенное запасное вещество растений. Первичный крахмал образуется из продуктов фотосинтеза в листьях растений и имеет вид мелких крупинок. Крахмал здесь не хранится, а транспортируется для построения органов растений или откладывается в виде запасного вещества в плодах. Вторичный, или запасной, крахмал образуется в лейкопластах (амилопластах) в специализированных органах – корневищах, клубнях, семенах, плодах. Из этого крахмала образуются простые, полусложные и сложные зерна (рис. 9).

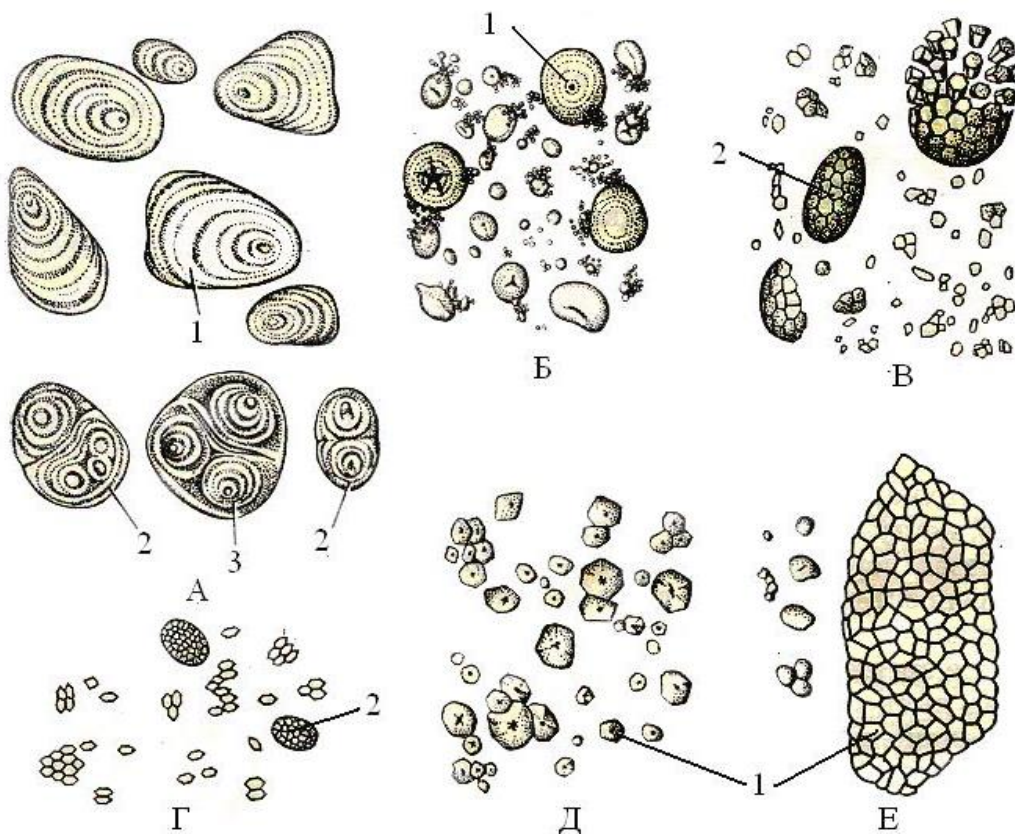


Рис. 9. Крахмальные зерна различных видов растений:

А – из клубней картофеля: 1 – простое, 2 – сложное, 3 – полусложное;

Б – пшеница (простое); В – овес (сложное); Г – кукуруза (простое);

Д – рис (сложное); Е – гречиха (простое)



Если в лейкопласте имеется одна точка, вокруг которой откладываются слои крахмала, то формируется простое крахмальное зерно (А1, Б, Г). Сложное зерно образуется, если точек отложения две и больше (А2; В, Д, Е). Полусложные зерна образуются в том случае, если крахмал сначала откладывается вокруг нескольких точек, а затем после их соприкосновения образуются общие слои (А3). Простые крахмальные зерна имеют пшеница, рожь, кукуруза, сложные – рис, овес, гречиха. В клубнях картофеля встречаются все три типа крахмальных зерен. Форма, размер, строение крахмальных зерен специфичны для каждого вида растений. Поэтому при анализе продовольственного сырья растительного происхождения, в частности муки, по строению крахмальных зерен можно идентифицировать и установить в них наличие примесей.

Задание

1. Изготовить препараты крахмальных зерен картофеля, пшеницы, овса, риса, гречихи. Предварительно зерна замочить в воде для набухания. Препарат крахмальных зерен делают, производя соскабливание ткани зерна или плода, суспендируя образец в капле воды на предметном стекле. Сверху препарат закрывают покровным стеклом. Можно для контрастирования произвести окраску крахмальных зерен раствором йода (раствором Люголя).

2. Зарисовать при большом увеличении (400х) крахмальные зерна указанных выше растений, сохраняя при этом их пропорции. Подписать рисунки, указав вид растения и тип крахмальных зерен.

1.2. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНОСАХАРИДОВ

Все многочисленные методы определения содержания моносахаридов можно разделить на несколько групп.

Редуктометрические методы основаны на восстанавливающих свойствах сахаров и способности восстанавливать Cu (II) в Cu (I) , при этом количество образующейся закиси меди может быть определено различными способами:

– в *методе Бертрана* образовавшийся при восстановлении тартрата меди (реактив Фелинга) осадок Cu_2O определяются титриметрически перманганатным или йодометрическим способом;

– *эбулиостатический метод* определения редуцирующих веществ основан на горячем титровании в присутствии метиленовой сини (как индикатора) и желтой кровяной соли (для предотвращения выпадения осадка).



Колориметрические методы основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии сахаров с определёнными реактивами:

– *динитросалициловый метод (ДНС)* – основан на восстановлении 3,5-динитросалициловой кислоты в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту и пропорциональном нарастании красной окраски раствора;

– *метод Шомоди–Нельсона* – основан на восстановлении Cu(II) в Cu₂O, которая восстанавливает арсеномолибдатный реактив с образованием молибденовой сини;

– *о-толуидиновый метод* – альдегидная группа глюкозы взаимодействует с ароматическим амином с образованием сине-зеленого соединения.

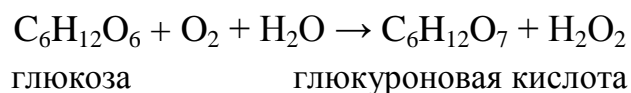
Физические методы:

– *рефрактометрический* – основан на определении коэффициента преломления сахаров, извлеченных из навески после удаления нес сахаров;

– *поляризметрический* – основан на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света.

Ферментативные методы в настоящее время широко используются для определения глюкозы, например в клинической биохимии. Они основаны на специфическом взаимодействии ферментов (глюкозооксидазы, гексокиназы) с глюкозой.

В глюкозооксидазном методе глюкозооксидаза окисляет D-глюкозу до глюкуроновой кислоты с образованием в эквимолярном количестве перекиси водорода:



При этом количество H₂O₂ пропорционально содержанию глюкозы в исследуемой пробе. Количество H₂O₂ можно определить колориметрически или амперометрически, что заложено в принцип действия глюкометров.

1.2.1. Глюкозооксидазный метод определения глюкозы на анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра»

Работа анализатора глюкозы «Энзискан Ультра» основана на измерении амперометрическим способом концентрации H₂O₂, образующейся в результате окисления глюкозы ферментом глюкозооксидазой. Принцип действия схематически изображен на рис. 10.



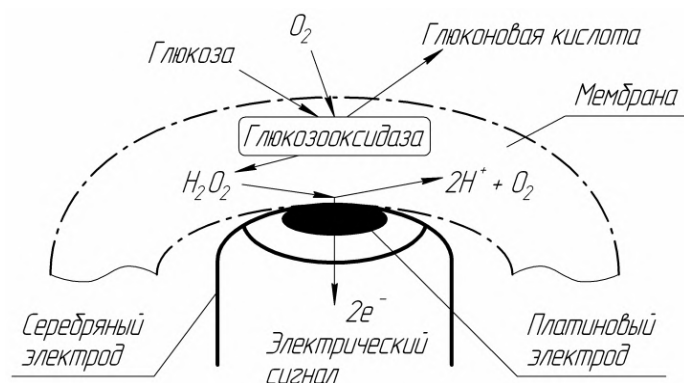


Рис. 10. Рабочая поверхность мембранного датчика

На рабочую поверхность амперометрического датчика установлена мембрана, на которую нанесена глюкозооксидаза, и где происходит реакция окисления глюкозы. При введении исследуемой пробы в реакционную камеру измерительной ячейки в ферментной мембране происходит ферментативное окисление глюкозы с образованием H_2O_2 и глюконовой кислоты. В результате распада H_2O_2 на платиновом электроде датчика появляется электрический сигнал (ток), который преобразуется в постоянное напряжение и измеряется аналогово-цифровым преобразователем.

Анализатор предназначен работать в диапазоне концентраций глюкозы от 2 до 30 ммоль/л. Очень важно, чтобы прибор был откалиброван раствором с известной концентрацией глюкозы (10 ммоль/л). Результатом измерений будет электрический ток, величина которого пропорциональна концентрации глюкозы. Неизвестная концентрация глюкозы в пробе рассчитывается относительно данной калибровки.

Калибровка. Калибровка анализатора проводится раствором глюкозы 10 ммоль/л.

1. Однократно промывают реакционную камеру ячейки, нажав кнопку «Промывка».

2. Дозатором набирают раствор глюкозы из флакона с калибратором путем нажатия кнопки «Пуск» дозатора до первого упора. В пробе плавно отпустить кнопку «Пуск», при этом наконечник заполнится. Вводят дозатор в канал ввода пробы до упора. Дозатор держат строго вертикально. Вводят пробу путем безостановочного нажатия кнопки дозатора до второго положения (полное нажатие). При этом калибровочный раствор глюкозы впрыснется в реакционную камеру ячейки с одновременной активацией синхронизирующего датчика, который запустит автоматический цикл «Измерение–промывка». Не отпуская кнопки (с нажатым пуском), вынуть наконечник дозатора из канала ввода пробы (иначе раствор засосет обратно в наконечник). После полного вынимания наконечника из канала ввода пробы можно отпустить кнопку.



3. Через 10 с на дисплее появится результат. Результат представлен в условных единицах, характеризующих ток датчика. Значение обычно должно быть в диапазоне от «0400» до «1300».

4. Повторить введение калибратора. При калибровке, если последующее значение тока совпадает с предыдущим, – анализатор откалиброван (надпись Калибр.ОК)/«калибровка» меняется надписью «Вв-те пробу»/«измерение»).

Внимание! Во избежание порчи мембраны анализируемый раствор должен быть прозрачным, перед измерением необходимо отцентрифугировать пробу! Необходимо помнить, что в основе работы прибора лежит действие фермента, чувствительного к ингибирующим веществам, поэтому нельзя использовать для анализа агрессивных сред.

Измерение. 1. В случае необходимости производят промывку и повторную калибровку анализатора. Рекомендуется проводить калибровку через каждые 2 ч работы прибора.

2. Чтобы проверить правильность измерений в пробах, вводят вместо пробы калибровочный раствор глюкозы 5 и 10 ммоль/л.

3. Набирают дозатором пробу и вводят ее в канал «Ввод пробы».

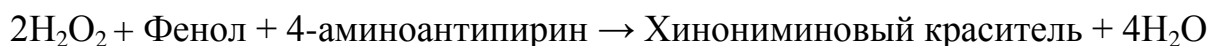
4. Через 10 с на дисплее появится результат и автоматически включится «Промывка». Результат будет высвечиваться на дисплее в течение всей длительности промывки, после чего анализатор подаст звуковой сигнал и появится информация «Вв-те пробу». Анализатор будет готов к следующему измерению.

Задание

Определить концентрацию глюкозы в анализируемом образце в трех повторностях, вычислить среднее значение. Перевести получаемые данные прибора в единицы измерения г/л (или в %).

1.2.2. Определение глюкозы с использованием набора «Фотоглюкоза»

При окислении β-D-глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквимольное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет 4-аминоантипирин (4-ААП) в присутствии фенольных соединений в окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 500 нм:



Ход определения

1. Анализируемый образец при необходимости предварительно разбавляют до концентрации в интервале 2...30 ммоль/л.

2. В пробирку № 1 (опыт) наливают 0,025 мл анализируемого раствора, в пробирку № 2 (калибровочная) – 0,025 мл стандартного раствора глюкозы с концентрацией 10 ммоль/л, в пробирку № 3 (контроль) – 0,025 мл дистиллированной воды. Затем во все пробирки добавляют по 2 мл рабочего реактива субстратно-ферментной смеси (фосфатный буфер, содержащий глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-аминоантипирин и фенол).

3. Пробы перемешивают и инкубируют в течение 25 мин при комнатной температуре.

3. Измеряют оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной в кюветах на 10 мм при длине волны 500 нм.

4. Рассчитывают концентрацию глюкозы, ммоль/л,

$$C_{\text{глюкозы}} = \frac{D_{\text{опыт}}}{D_{\text{калибр}}} \cdot 10 \cdot n,$$

где 10 – концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л; $D_{\text{калибр}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы; $D_{\text{опыт}}$ – оптическая плотность опытной пробы; n – разбавление.

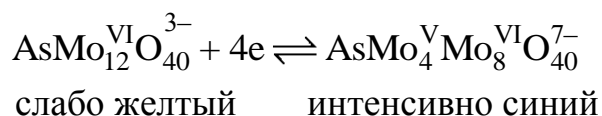
Задание

Определить концентрацию глюкозы в анализируемом образце, перевести получаемые данные прибора в единицы измерения г/л (или в %).

1.2.3. Определение восстанавливающих сахаров по методу Шомоди–Нельсона

Метод основан на реакции восстановления ионов Cu (II) альдегидной группой сахаров в щелочной среде до закиси меди, которая затем количественно восстанавливает арсеномолибдатный реактив до молибденовой сини.

На первой стадии происходит восстановление Cu(II) в щелочных условиях в присутствии смешанного тартрата Na–K (реагент Шомоди). На второй стадии – окисление меди (I) под действием арсеномолибдатного реагента Нельсона (молибдат аммония → образование молибденовой сини):



Колориметрическое определение сахаров проводят по калибровочной кривой, построенной по растворам глюкозы в интервале концентраций 0,02...0,2 г/л.

Внимание! При приготовлении новых партий реактивов проводят новую калибровку.

Ход определения

1. В эппендорф объемом 2 мл вводят 200 мкл анализируемого раствора, добавляют 200 мкл реактива Шомоди и инкубируют в термостате при 100 °С в течение 40 мин (если раствор покраснел, пробу необходимо разбавить).

2. Затем охлаждают в том же термостате в течение 5 мин. После охлаждения добавляют 200 мкл реактива Нельсона и выдерживают 15 мин.

3. Добавляют 400 мкл ацетона и 1 мл дистиллированной воды. Определяют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 610 нм против контрольной пробы, где вместо анализируемого раствора – дистиллированная вода.

4. Рассчитывают концентрацию сахаров (в г/л) по уравнению калибровочной кривой с учетом разведения.

1.2.4. Эбулиостатический метод определения моносахаридов

Эбулиостатический метод предназначен для определения восстанавливающих сахаров (ВС) в водных растворах и имеет два варианта: один – для бесцветных или слабоокрашенных растворов с концентрацией ВС 0,08...0,13 %; второй – для темноокрашенных растворов и растворов с концентрацией ВС 0,001... 0,08 %.

Метод основан на реакции восстановления двухвалентной меди восстанавливающими сахарами в щелочной среде при кипячении в присутствии желтой кровяной соли. Образующаяся закись меди не выпадает при этом в осадок, так как реагирует с желтой кровяной солью и дает растворимое комплексное соединение. Это позволяет определять количество образовавшейся при восстановлении закиси меди прямым титрованием раствором сахаров. Индикатором конца реакции служит метиленовая синь, которая в окислительной среде имеет синюю окраску, а в восстановительной среде она бесцветна.

При выполнении анализа следует помнить, что окисление восстанавливающих сахаров меднощелочным раствором является сложным процессом, который состоит из нескольких реакций, протекающих одновременно. Малейшие изменения условий анализа, особенно соприкосновение реагирующей жидкости с кислородом воздуха, оказывают сильное влияние на количество восстановленной меди. Проведение анализа прямым титрованием в



эбулиостате обеспечивает стандартные, легко воспроизводимые условия для окисления сахаров меднощелочным раствором в токе водяного пара при отсутствии доступа кислорода воздуха к реагирующей жидкости. Это дает возможность получать хорошо воспроизводимые результаты.

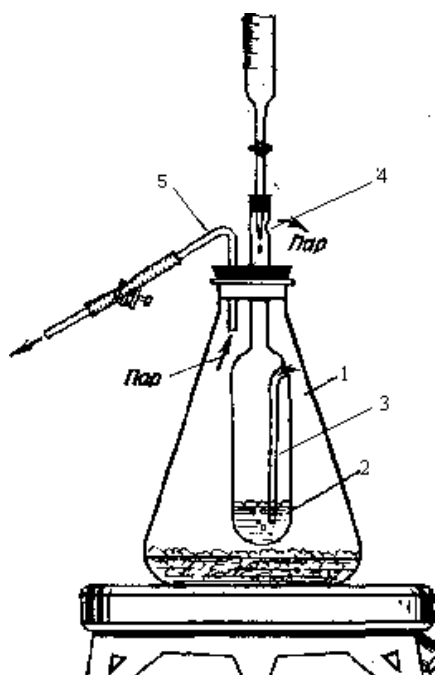


Рис. 11. Установка для определения восстанавливающих сахаров эбулиостатическим методом

Установка для определения восстанавливающих сахаров (рис. 11) состоит из конической колбы 1 – внешнего сосуда, в который наливается вода; внутреннего сосуда 2; электроплитки и бюретки с ценой деления 0,1 мл. Во время титрования внешний сосуд служит парообразователем. Внутренний сосуд, называемый эбулиостатом, является реакционным сосудом, в котором проводят титрование.

Для пропускания пара через реагирующую жидкость внутрь эбулиостата впаяна трубка 3, нижний конец которой доходит почти до дна, а сверху имеется боковое отверстие 4 для выхода пара во время титрования.

На узкую часть эбулиостата надета пробка, которая плотно вставляется во внешний сосуд. Чтобы регулировать отвод избыточного пара из сосуда 1 во время анализа, в пробку вставлена стеклянная трубка 5, на которую надета резиновая трубка с зажимом. На кончик бюретки надета резиновая пробка. При опускании кончика бюретки в эбулиостат пробка закрывает верхнее отверстие, а маленькое боковое отверстие остается открытым. Кончик бюретки во время титрования должен быть ниже бокового отверстия, чтобы образующаяся капля сахарного раствора не могла быть увлечена паром в маленькое отверстие эбулиостата.

Реактивы и их приготовление. Первый раствор – 1 %-ный раствор *сульфата меди* (CuSO_4). Приготовление: 10 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,04 г метиленовой сини отвешивают на аналитических весах, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 л с помощью дистиллированной воды, объем раствора доводят до метки и перемешивают.

Второй раствор – *щелочной раствор сегнетовой соли и желтой кровяной соли*. Приготовление: 50 г сегнетовой соли помещают в стакан и растворяют в 200...300 мл дистиллированной воды. В другом стакане в 100 мл дистиллированной воды растворяют 4 г желтой кровяной соли. В мерную



колбу вместимостью 1 л вливают 150 мл 50 %-ного раствора гидроксида натрия и раствор сегнетовой соли. Содержимое колбы перемешивают, прибавляют раствор желтой кровяной соли и дистиллированную воду до метки и снова перемешивают.

Определение титра меднощелочного раствора. Титром меднощелочного раствора называют количество миллиграммов моносахарида, которое расходуется на восстановление 10 мл меднощелочного раствора при данных условиях титрования.

Для установки титра берут навеску безводной абсолютно сухой глюкозы около 0,1 г (на аналитических весах в закрытом бюксе с точностью до 0,0002 г). Растворяют ее в дистиллированной воде, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Вычисляют концентрацию приготовленного раствора, наливают его в бюретку, предварительно сполоснув ее этим же раствором, и проводят титрование 10 мл меднощелочного раствора в эбулиостате по первому или второму варианту (см. «Ход анализа»). Делают не менее трех параллельных титрований, расхождения в результатах не должны превышать 0,03 мл (1 капля). Вычисляют средний объем раствора глюкозы, необходимый для восстановления меди в 10 мл меднощелочного раствора. На основании полученных данных вычисляют титр меднощелочного раствора (T) по формуле

$$T = C \cdot V ,$$

где C – концентрация раствора глюкозы, мг/мл; V – объем раствора глюкозы, израсходованного на титрование, мл.

Значение титра меднощелочного раствора указывается на этикетке, титр определяется предварительно, обычно при приготовлении новых растворов.

Подготовка пробы. 1. При концентрации восстанавливающих сахаров более 0,13 % пробу перед анализом разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе и анализируют по первому варианту.

2. При концентрации восстанавливающих сахаров менее 0,001 % пробу перед анализом упаривают в 5–10 раз в выпарительной чашке на кипящей водяной бане и анализируют по первому или по второму варианту.

3. Пробу, содержащую много восстанавливающих соединений неуглеводного характера, анализируют после осаждения их основным уксуснокислым свинцом.



I. Анализ светлых растворов, содержащих 0,10...0,08 % восстанавливающих сахаров (первый вариант, прямое титрование).

1. В сосуд 1 наливают воду и ставят его на электроплитку. Для равномерного образования пара, что является обязательным условием правильного проведения анализа, используют водопроводную воду, которая содержит растворенные газы, и на дно кладут кусочки разбитого стеклянного фильтра.

Бюретку споласкивают 2–3 раза анализируемым раствором и, выливая при этом раствор через кран, добиваются полного заполнения носика бюретки (пузырьки воздуха не допускаются). Затем в бюретку наливают анализируемый раствор до метки 0.

2. Когда вода закипит, внутренний сосуд (эбулиостат) вынимают и в него пипетками наливают сначала 5 мл первого раствора, а затем 5 мл второго раствора. Легкими движениями перемешивают растворы в эбулиостате и медленно вставляют его во внешний сосуд. Затем в эбулиостат вставляют кончик бюретки с анализируемым раствором так, чтобы пробка, надетая на бюретку, плотно закрыла верхнее отверстие, и ждут, когда пар начнет проходить через меднощелочной раствор.

3. Проводят предварительное титрование. Для этого раствор сахара из бюретки приливают со скоростью 1 капля в 1...2 с, наблюдая за окраской раствора в эбулиостате. Сахарный раствор прибавляют так, чтобы прохождение пара через реагирующую жидкость не прекращалось. При появлении ярко-желтой окраски реагирующей жидкости от прибавления одной капли сахарного раствора анализ заканчивают и по бюретке измеряют объем сахарного раствора, пошедший на предварительное титрование. На предварительное титрование должно уходить 4...7 мл раствора.

4. После этого делают окончательное титрование. Для этого вновь вносят в эбулиостат по 5 мл первого и второго растворов и, когда пар начнет проходить через жидкость, вливают струйкой 80...90 % того количества сахарного раствора, которое было израсходовано на предварительное титрование. Через 2 мин (по песочным часам), в течение которых пар должен непрерывно проходить через жидкость в эбулиостате, проводят дотитрование, приливая сахарный раствор со скоростью 1 капля в 6...7 с до появления ярко-желтой окраски и измеряют объем сахарного раствора, пошедший на титрование. Проводят параллельное титрование до совпадающих значений, рассчитывают среднеарифметическое. Воспроизводимость результатов титрования в среднем из трёх параллельных определений составляет $\pm 0,1$ мл раствора сахара.

5. Концентрацию восстанавливающих сахаров в исследуемой пробе (в пересчете на глюкозу) находят по формуле



$$X = \frac{T \cdot n \cdot 100}{V \cdot 1000},$$

где X – концентрация восстанавливающих сахаров в исследуемой пробе, %; T – титр меднощелочного раствора по глюкозе, мг; V – объем анализируемого раствора сахара, пошедшего на титрование, мл; n – разведение пробы; 1000 – перевод миллиграммов в граммы.

II. Анализ темных растворов и растворов, содержащих восстанавливающих сахаров менее 0,08 % (второй вариант, обратное титрование).

Из чистой глюкозы с известной влажностью готовят 100 мл приблизительно 0,1 %-ного раствора. Полученным раствором заполняют бюретку. В сосуд 1 наливают водопроводную воду и ставят на электрическую плитку. Когда вода закипит, в сосуд 2 пипетками вливают 5 мл первого раствора и 5 мл второго раствора. После перемешивания жидкости в эбулиостате к ней добавляют 5 мл анализируемого раствора, имеющего концентрацию восстанавливающих сахаров менее 0,05 %, или 1...2 мл темного анализируемого раствора, окраска которого настолько интенсивна, что затрудняет наблюдение изменения окраски метиленовой синей в конце титрования. Затем к жидкости в эбулиостате добавляют раствор глюкозы из бюретки до появления желтой окраски. Это будет предварительное титрование. По бюретке определяют объем раствора глюкозы, израсходованного на предварительное титрование.

Затем выполняют окончательное титрование, при котором в эбулиостат вносят по 5 мл первого и второго растворов. После перемешивания пипеткой добавляют 5 мл анализируемого раствора и такой объем глюкозы из бюретки, чтобы на дотитрование после 2 мин кипячения потребовалось не более 1 мл. По бюретке определяют объем раствора глюкозы, израсходованной на окончательное титрование.

При анализе по второму варианту концентрацию восстанавливающих сахаров в исследуемой пробе (в пересчете на глюкозу) вычисляют по формуле

$$X = \frac{(T - C \cdot V)100}{g \cdot 1000},$$

где X – концентрация восстанавливающих сахаров в исследуемой пробе, %; T – титр меднощелочного раствора по глюкозе, мг; C – концентрация глюкозы в растворе, которым вели титрование, мг/мл; V – объем раствора глюкозы, пошедший на титрование, мл; g – объем исследуемой пробы, взятый на анализ, мл; 1000 – перевод миллиграммов в граммы.

Внимание! 1. В начале анализа, если быстро вставить холодный эбулиостат с меднощелочным раствором в сосуд 1 и **сразу** закрыть его пробкой, то в результате охлаждения смеси в сосуде 1 давление пара



резко понизится, и раствор частично или полностью перельется по внутренней трубке эбулиостата во внешний сосуд (от одной капли меднощелочного раствора вода мутнеет и становится грязно-синего цвета). Поэтому внутренний сосуд предварительно нагревают, и только после этого, удалив остатки воды, вливают меднощелочной раствор.

2. Для получения хорошо воспроизводимых результатов анализа надо сахарный раствор в конце титрования прибавлять всегда с одинаковой скоростью, потому что реакция окисления сахара меднощелочным раствором идет не мгновенно.

Задание

1. Определить концентрацию глюкозы и восстанавливающих сахаров в исследуемом образце четырьмя методами: глюкозооксидазным на анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра», с помощью набора «Фотоглюкоза», по методу Шомоди-Нельсона и эбулиостатическим методом.

2. Выразить результаты в одинаковых единицах измерения и сделать вывод о сходимости результатов, полученных различными методами.

3. Провести сравнительную оценку методов количественного определения моносахаридов (табл. 3).

Таблица 3. Методы определения восстанавливающих сахаров

| Группа методов | Название метода | Сущность | Химизм | Характерные особенности (ограничения) | Применение |
|--------------------|------------------------|----------|--------|---------------------------------------|------------|
| Редуктометрические | Бертрана | | | | |
| | Эбулиостатический | | | | |
| Колориметрические | 3,5-динитросалициловый | | | | |
| | Шомоди-Нельсона | | | | |
| | о-толуидиновый | | | | |
| Физические | Рефрактометрический | | | | |
| | Поляриметрический | | | | |
| Ферментативные | Глюкозооксидазный | | | | |
| | Гексокиназный | | | | |



1.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

Общим признаком для всех сложных углеводов является то, что их можно расщепить до моносахаридов при использовании кислотного или ферментативного гидролиза. Концентрацию продуктов в гидролизате можно определить любым из методов определения моносахаров и пересчитать на содержание полисахаридов.

В ряде отраслей пищевой промышленности (сахарной, кондитерской, крахмалопаточной и др.) содержание углеводов в сырье, полуфабрикатах, готовых изделиях определяют поляриметрическим методом. Приборы, с помощью которых измеряют величину угла вращения плоскости поляризации света, называют поляриметрами.

1.3.1. Поляриметрическое определение сахаров на сахариметре

Поляриметрический метод основан на измерении угла поворота плоскости поляризации при прохождении поляризованного луча света через оптически активные вещества. Оптическая активность веществ обусловлена особенностями строения их молекул, наличием ассиметрического атома углерода, особенностями кристаллической решетки твердых кристаллов, особенностями строения молекул веществ в растворенном или газообразном состоянии. При прохождении луча света через раствор оптически активного вещества он будет повернут на некоторый угол, называемый углом поворота плоскости поляризации. Направление вращения плоскости поляризации для каждого вещества может быть различным (сахароза, глюкоза – правовращающие, фруктоза – левовращающая).

Каждое оптически активное вещество характеризуется удельной вращательной способностью $[\alpha]_D^{20}$. Это угол вращения плоскости поляризации, производимый раствором оптически активного вещества, в 100 мл которого содержится 100 г вещества, при толщине слоя 100 мм и температуре 20 °С. Для определения содержания углеводов поляриметрическим методом используют поляриметр-сахариметр СУ-4 (рис. 12). Шкала этих поляриметров калибрована в угловых градусах сахарной шкалы, отчего они и получили название сахариметров.



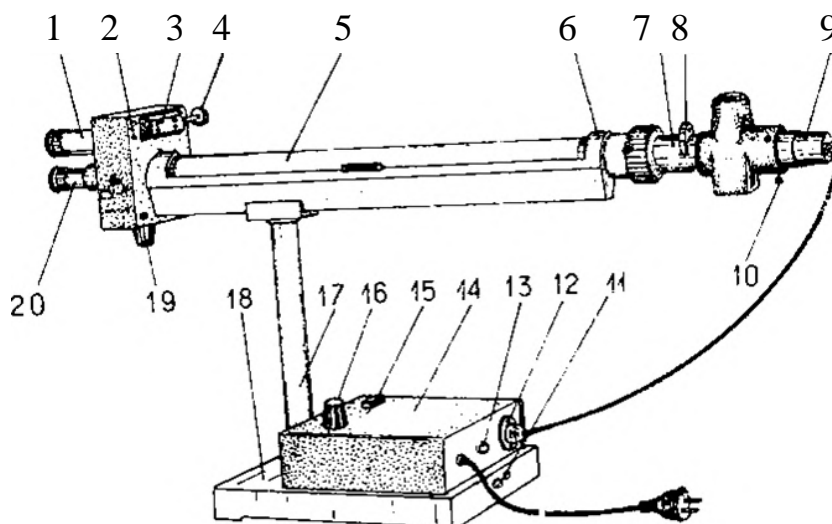


Рис. 12. Устройство поляриметра-сахариметра СУ-4: 1 – лупа; 2 – измерительная головка; 3 – механизм установки нониуса; 4 – ключ; 5 – кюветное отделение; 6 – траверса; 7 – оправа поляризатора; 8 – поворотная обойма; 9 – осветительный узел; 10 – регулировочный винт; 11 – винт заземления; 12 – вилка разъема; 13 – вставка плавкая; 14 – крышка; 15 – кнопка; 16 – ручка резистора; 17 – стойка; 18 – основание; 19 – рукоятка клинового компенсатора; 20 – зрительная труба

Ход определения

1. Подготовка сахариметра к работе.

Прибор устанавливают в темной комнате на стол, заземляют, включают в сеть и кнопкой 15 – осветитель. Устанавливают обойму 8 в положение «С», если раствор бесцветный или слабоокрашенный, или в положение «Д», если темноокрашенный.

2. Настройка прибора.

Перед началом проведения опыта необходимо проверить правильность установки прибора на нуль. Нулевое положение сахариметра проверяют без поляризметрической трубки. Уравнивают яркость двух половинок поля зрения зрительной трубы 20, как показано на рис 13.

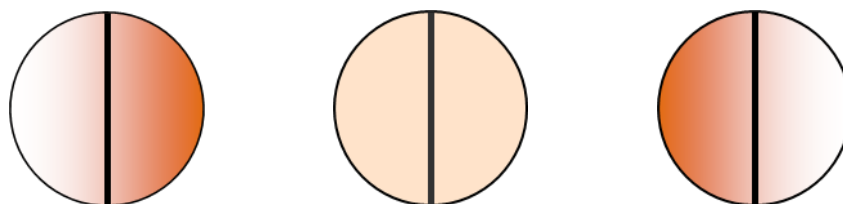


Рис. 13. Установка яркости прибора поляриметра-сахариметра СУ-4

При уравнивании яркости полей следует учесть, что требуемое положение должно находиться между двух картинок (рис. 13, среднее поле), при



выходе за эти рамки полученное значение угла вращения будет неверным. Получение требуемой картинки добиваются плавным вращением вправо и влево рукоятки клинового компенсатора 19, добиваясь однородного поля зрения по интенсивности освещенности в обоих его половинках. Совмещают нулевое деление нониуса с нулевым делением шкалы (лупа 1), перемещая нониус котировочным ключом 4. Повторяют операции установки нулевого положения 3–4 раза.

3. Подготовка кювет к работе.

Перед использованием кюветы необходимо вымыть и просушить. Перед заполнением необходимо промыть кюветы исследуемым раствором 2–3 раза. Затем в кювету, закрытую с одной стороны стеклом и гайкой, наливают столько жидкости, чтобы она выступила поверх краев трубки, как шапочка. После того как пузырьки воздуха, содержащегося в жидкости, поднимутся вверх, закрывают кювету предварительно вымытым и вытертым насухо стеклом. Для того, чтобы под стеклом не оставалось воздушного пузырька, устанавливая стекло быстро, как бы срезая выступающую жидкость. Если же воздушный пузырек останется, установку стекла повторяют. Закручивают гайку.

Для исследования используются кюветы длиной 200 мм. Если используют кювету длиной 100 мм, то полученный результат умножают на 2, следовательно, если длина кюветы 400 мм, то делят на 2.

4. Проведение измерений.

Поляризацию проводят следующим образом: после проверки нулевой точки вкладывают в желоб сахариметра кювету с испытуемым раствором и крышку закрывают. Затем, вращая винт рабочей шкалы (для сахарозы и крахмала – правого вращения), добиваются однородности поля. Измеряют угол вращения плоскости поляризации, считывая показания с точностью до 1° по основной шкале и с точностью до $0,05^\circ$ при помощи нониуса. По совпадению нулевой точки нониуса с основной шкалой определяют целые градусы. Для определения десятых долей градуса необходимо установить, какое деление нониуса совпадает с делением основной шкалы. Пример отчета по шкале сахариметра приведен на рис. 14.

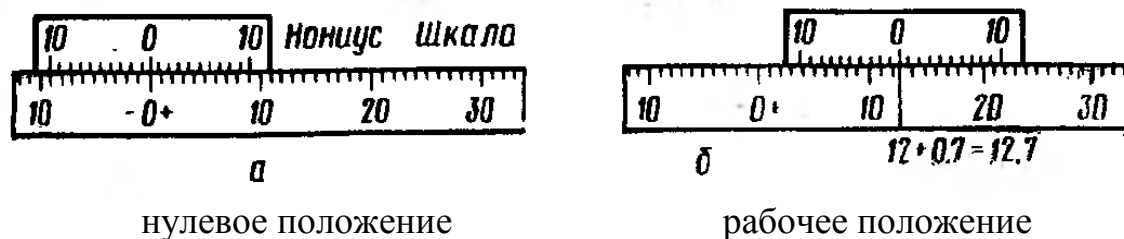


Рис. 14. Шкала сахариметра

Отсчет осуществляют не менее 3 раз, каждый раз начиная с возвращения рукоятки в нулевое положение. Рассчитывают среднеарифметическое значение и используют далее для расчета.

Задание

Определить концентрацию сахарозы в исследуемом модельном растворе, рассчитать погрешность измерения.

1.3.2. Поляриметрический метод определения содержания сахарозы в мелассе

Метод определения массовой доли сахарозы в свекловичной мелассе основан на измерении угла вращения плоскости поляризации при помощи сахариметра. В состав углеводов мелассы помимо сахарозы входят раффиноза, инвертный сахар и др. Кроме этого, меласса содержит весьма значительные количества органических и неорганических примесей, придающих ей высокую вязкость. Поэтому при использовании поляриметрического метода определения сахарозы необходимо провести осветление мелассы, осаждение несахаров и разложение красящих веществ.

Реактивы: 0,1 н раствор уксусной кислоты; раствор Герлеса I: 34 г азотнокислого свинца $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ растворяют в мерной колбе на 100 мл дистиллированной водой; раствор Герлеса II: 3,2 г NaOH растворяют в колбе на 100 мл дистиллированной водой; сухая соль дигидрофосфата натрия (NaH_2PO_4); гидросульфит или дитионит натрия (NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Ход определения

Взвешивают в стаканчике 26 г мелассы с погрешностью $\pm 0,01$ г, растворяют небольшими порциями теплой дистиллированной воды (примерно 50 мл), с помощью воронки переводят в мерную колбу на 100 мл и охлаждают до температуры 20 °С. Если меласса имеет щелочность более 10, то ее нейтрализуют 1н раствором уксусной кислоты до слабокислой реакции по лакмусу.

Далее исследуемый раствор мелассы осветляют растворами реактива Герлеса, частями в 4–6 приемов, добавляя в сумме по 14,8 мл каждого. Для этого в колбу с раствором мелассы поочередно добавляют 2...3 мл раствора Герлеса I и через 15...20 с такое же количество раствора Герлеса II. Смесь перемешивают легким вращением колбы в течение 1,5...2 мин, затем опять в указанном порядке добавляют осветлители. После осветления добавляют ди-



стиллированную воду в таком объеме, чтобы уровень раствора не достигал 2 мл до метки.

Колбу с раствором помещают в термостат на 15 мин для достижения температуры 20 °С. Пену, образующуюся на поверхности раствора, удаляют каплей этилового эфира. Раствор доливают дистиллированной водой до метки и перемешивают в течение 1...2 мин. Перед фильтрованием раствор оставляют на 5 мин для осаждения осадка.

Раствор фильтруют через сухой бумажный фильтр, а затем центрифугируют. Первые порции фильтрата выбрасывают. Если последующий фильтрат мутный, его возвращают на фильтр для получения прозрачного раствора. Далее фильтрат освобождают от избытка свинца, для этого на каждые 50 мл фильтрата прибавляют 0,45 г сухого измельченного порошка NaH_2PO_4 , для его растворения жидкость энергично взбалтывают и прибавляют на 50 мл фильтрата по 0,1 г NaHSO_3 или $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Раствор перемешивают, взбалтывая, выдерживают 20 мин, вновь взбалтывают и фильтруют, отбрасывая первые порции. Полученный раствор является исходным для определения прямой и инверсионной поляризации, а также количества инвертного сахара.

Полученный раствор анализируют по прямой поляризации в трубке длиной 200 мм. Определив угол вращения плоскости поляризации полученного раствора мелассы, вычисляют концентрацию сахарозы в мелассе по формуле, %,

$$C_n = \alpha \cdot 0,26 \cdot 3,85,$$

где C_n – концентрация сахарозы в мелассе по прямой поляризации, %; α – угол вращения плоскости поляризации, град. шкалы сахариметра; 0,26 – количество сахарозы, содержащееся в 100 мл раствора и соответствующее 1° шкалы сахариметра, г; 3,85 – коэффициент разбавления мелассы при подготовке к поляризации.

1.3.3. Определение крахмала поляриметрическим методом Эверса

Многочисленные методы, используемые в пищевой промышленности для количественного определения крахмала, можно подразделить на три группы:

1. Поляриметрические методы, основанные на способности продуктов гидролиза крахмала вращать плоскость поляризации поляризованного луча (методы Линтнера, Эверса, хлоркальциевый и др.).

2. Химические методы, в основе которых лежит гидролиз крахмала до глюкозы и определение количества последней по ее редуцирующей способности.



3. Биологические методы, основанные на превращении крахмала в сахар, сбраживании последних и определении количества получаемого при брожении спирта.

Метод Эверса является основным стандартным методом определения массовой доли крахмала в зерне, картофеле и продуктах их переработки. Сущность метода заключается в гидролизе крахмала слабым раствором соляной кислоты, поляриметрическом определении глюкозы с последующим количественным пересчетом на крахмал.

Ход определения

В мерную колбу на 100 мл вносят 25 мл 1,124 %-ного раствора соляной кислоты и добавляют через воронку при постоянном перемешивании навеску материала 5 г, взвешенного с точностью 0,01 г. Когда материал будет полностью суспендирован, воронку и горлышко колбы ополаскивают 25 мл кислоты. Колбу при перемешивании помещают в кипящую водяную баню и взбалтывают в течение 3 мин (по секундомеру). Нагрев на бане продолжают еще 12 мин. По истечении 15 мин колбу вынимают из бани, вливают 40 мл холодной дистиллированной воды и охлаждают под краном до 20 °С.

Для осаждения белков и осветления раствора в колбу приливают реактивы-осадители: по 1 мл 30 %-ного раствора сульфата цинка и 15 %-ного раствора гексацианоферрата калия. Через 5 мин содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки, взбалтывают и фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу. Первые порции фильтрата не используют.

Прозрачным фильтратом с температурой 20 °С наполняют поляризационную трубку длиной 200 мм и измеряют угол вращения плоскости поляризации на сахариметре.

Параллельно проводят контрольный опыт для внесения поправки на оптически активные водорастворимые вещества, не осаждаемые реактивами-осадителями и находящиеся в растворе (преимущественно простые сахара). Отвешивают 5 г продукта, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют цилиндром 70 мл воды и взбалтывают в течение 15 мин. Затем смывают горлышко колбы 10 мл дистиллированной водой, осветляют реактивом-осветлителем, используемым в основном опыте. Взбалтывают в течение 5 мин, доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют. Отбирают пипеткой 50 мл фильтрата, переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 2 мл 25 %-ного раствора HCl, выдерживают 15 мин на кипящей водяной бане, охлаждают до 20 °С и поляризуют на сахариметре.

Содержание крахмала рассчитывают по формуле, %,



$$X = \frac{(\alpha_{\text{оп}} - \alpha_{\text{к}})100 \cdot 100}{\alpha_D^{20} \cdot m \cdot l},$$

где X – массовая доля крахмала, %, на натуральную навеску; $\alpha_{\text{оп}}$ – величина угла поворота плоскости поляризации, полученная оптически активными веществами в основном опыте, град. шкалы сахариметра; $\alpha_{\text{к}}$ – величина угла поворота плоскости поляризации, осуществляемая водорастворимыми оптически активными веществами (не крахмалом) в контрольном опыте, град. шкалы сахариметра; m – масса продукта, взятого для анализа, г; l – длина поляризационной трубки, мм; α_D^{20} – удельная вращательная способность крахмала исследуемого продукта, град. шкалы сахариметра.

При взятой для анализа навеске 5 г и длине поляризационной трубки 200 мм формула приобретает вид

$$X = (\alpha_{\text{оп}} - \alpha_{\text{к}})F,$$

где F – коэффициент Эверса, равный $1000/\alpha_D^{20}$.

Обычно при расчете массовой доли крахмала пользуются таблицей, в которой приведены значения удельной вращательной способности α_D^{20} и коэффициента Эверса (F) для основных видов крахмала (табл. 4).

Таблица 4. Величины удельной вращательной способности и коэффициента Эверса для различного сырья

| Крахмал | α_D^{20} | F | Крахмал | α_D^{20} | F |
|--------------|-----------------|-------|----------|-----------------|-------|
| Рисовый | 185,9 | 1,886 | Ржаной | 184,0 | 1,885 |
| Пшеничный | 182,7 | 1,898 | Ячменный | 181,5 | 1,912 |
| Кукурузный | 184,6 | 1,879 | Овсяный | 181,3 | 1,914 |
| Картофельный | 194,5 | 1,775 | | | |

Например, массовую долю крахмала в картофеле X (в %) вычисляют по формуле

$$X = (P_1 - P_2)1,78,$$

где P_1 – показания поляриметра в основном опыте; P_2 – показания поляриметра при определении поправки на растворимые углеводы; 1,78 – коэффициент Эверса для картофельного крахмала при поляризации в сахариметре.

Задание

Определить поляризметрическим методом содержание сахарозы в меласе, крахмала в картофеле и солоде. Сравнить полученное значение со справочными данными.



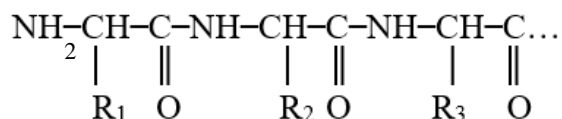
Контрольные вопросы по теме «Углеводы»

1. Приведите классификацию углеводов.
2. Охарактеризуйте строение и свойства моносахаридов, виды изомерии.
3. Напишите структурные формулы глюкозы, галактозы, маннозы, фруктозы, рибозы, ксилозы.
4. Изобразите открытую и закрытую форму α -D-глюкопиранозы, β -D-фруктофуранозы.
5. На примере глюкозы покажите образование следующих производных: глюконовой и глюкуроновой кислоты, сорбита, мальтозы, глюкозамина, глюкозо-6-фосфата.
6. Дайте характеристику строения и свойств дисахаридов, имеющих пищевое значение (названия мономеров и тип связи).
7. Изобразите фрагмент строения амилозы и амилопектина крахмала, укажите типы связей.
8. Опишите строение и свойства целлобиозы и целлюлозы.
9. Перечислите цветные реакции на углеводы.
10. Назовите методы количественного определения углеводов.
11. Расскажите о сущности химических реакций, лежащих в основе редуктометрических методов определения восстанавливающих сахаров (эбулиостатический, Шомоди-Нельсона).
12. Объясните принцип глюкозооксидазного метода определения глюкозы.
13. Какой переводной коэффициент используется для пересчета концентрации глюкозы из ммоль/л в г/л?
14. Рассчитайте теоретический выход глюкозы при гидролизе 1 грамма крахмала.
15. В чем сущность поляриметрического определения сахарозы и крахмала?



2. БЕЛКИ

Белки – это азотсодержащие биополимеры, макромолекулы которых состоят из остатков аминокислот. Аминокислоты в молекуле белка соединены пептидной ковалентной связью, образованной за счет COOH-группы, стоящей у α -углеродного атома одной аминокислоты, и NH₂-группы другой аминокислоты. В общем виде полипептидный остов белка можно представить:



где R – радикалы аминокислот.

В составе белков обнаружено 18 аминокислот и два амида – аспарагин и глутамин. Аминокислоты многократно повторяются в молекуле каждого белка, но в разной последовательности и разной пропорции, что лежит в основе огромного разнообразия белков в природе, а также придает каждому белку сугубо индивидуальные свойства.

Первичная структура представляет собой полипептидную цепь, содержащую, как правило, не менее 50 аминокислотных остатков протеиногенных аминокислот. Молекулярная масса большинства белков составляет от нескольких десятков до сотен килодальтон (кДа), среднестатистический белок состоит из 100...500 аминокислот и имеет молекулярную массу 12...60 кДа.

Протеиногенными называются 20 α -L-аминокислот, включающихся в состав белка в процессе биологического синтеза. Десять из них в достаточном количестве синтезируются в организме человека и животных. Это заменимые аминокислоты: глицин, аланин, серин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин, тирозин и пролин. Следующие 8 аминокислот – незаменимые для взрослого человека: лизин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан; еще 2 аминокислоты в некоторых литературных источниках относят к незаменимым: гистидин и аргинин (для детей). Для микроорганизмов и растений незаменимых аминокислот не существует, т.к. все необходимые аминокислоты способны синтезироваться самостоятельно.

В основе классификация аминокислот лежат:

1) химическое строение радикалов: алифатические (вал, лей), ароматические (фен, тир), гетероциклические (про, гис, три), серосодержащие (цис), содержащие гидроксильные группы (сер, тре);



2) природа заряда: нейтральные (моноаминомонокарбоновые: гли, ала, вал, лей), основные (диаминомонокарбоновые: лиз, арг, гис), кислые (моноаминодикарбоновые: асп, глу);

3) полярность радикала: неполярные (гидрофобные), полярные (гидрофильные);

4) биологическая ценность: заменимые и незаменимые.

Виды вторичной и третичной структур, биологические функции белков зависят от первичной структуры, т.е. от набора, количественного содержания и взаимного расположения остатков аминокислот, различающихся строением боковых радикалов.

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

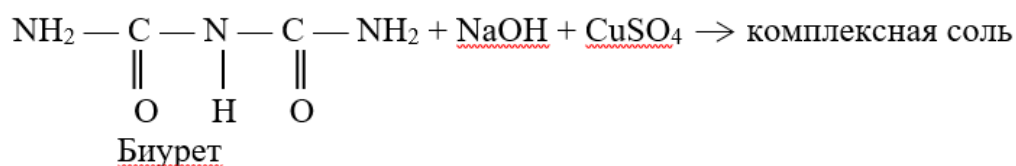
2.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ И АМИНОКИСЛОТЫ

Для обнаружения белка используют различные цветные реакции: универсальные (на пептидные связи) и специфические (на функциональные группы аминокислотных остатков, входящих в состав белка). Эти реакции применяются как для качественного, так и для количественного определения белка.

Материалы: 10 %-ный раствор белка куриного яйца; белоксодержащие экстракты и растворы; 0,1 %-ный раствор глицина.

2.1.1. Биуретовая реакция

Данная реакция указывает на наличие в макромолекуле белка пептидных связей. Известно, что при взаимодействии биурета, в молекуле которого присутствуют пептидные связи, с ионами меди (II) в щелочной среде образуется комплексная соль сине-фиолетового цвета:



Такое же сине-фиолетовое окрашивание появляется и при добавлении к белковому раствору щелочного раствора сернокислой меди. Интенсив-



ность окраски зависит от количества белка в растворе. Это позволяет использовать данную реакцию для количественного определения белка. Цвет окрашенных растворов зависит от длины полипептидной цепи: белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза (поли- и олигопептиды) – красную или розовую окраску.

Для проведения этой реакции к 1 мл раствора белка добавляют 1 мл 10 %-ного раствора NaOH и 1–2 капли 1 %-ного раствора CuSO₄.

2.1.2. Нингидриновая реакция

Данная реакция указывает на присутствие в аминокислотах α-аминогрупп. В результате взаимодействия аминокислот с нингидрином происходит их декарбоксилирование и дезаминирование. Далее восстановленный нингидрин вступает в реакцию с одной молекулой невосстановленного нингидрина и с аммиаком, образуя окрашенный в сине-фиолетовый цвет комплекс (пурпур Руэмманна). Нингидриновую реакцию широко используют для обнаружения и количественного определения аминокислот.

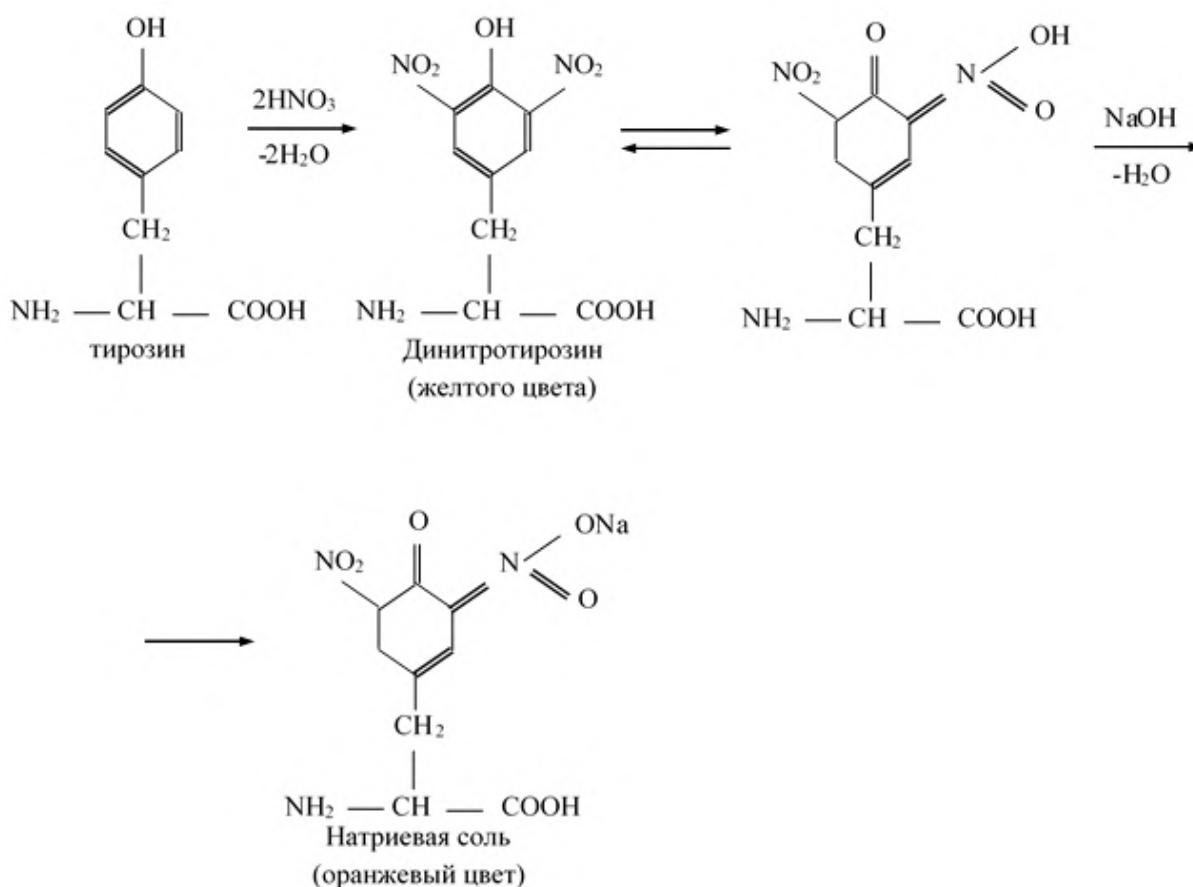
Для проведения этой реакции в первой пробирке к 0,2...0,5 мл 0,1 %-ного раствора глицина добавляют 2–3 капли 0,1 %-ного ацетонового раствора нингидрина и кипятят 2 мин. Во второй пробирке проводят реакцию с раствором белка куриного яйца. Объясните различие в интенсивности окраски реакции в разных пробирках.

2.1.3. Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция указывает на присутствие в молекуле белка ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и фенилаланина). Она основана на нитровании бензольного кольца радикалов этих аминокислот с образованием желтоокрашенных нитросоединений (греч. «ксантос» – желтый), которые при взаимодействии со щелочами переходят в соли хиноидной структуры ярко-оранжевого цвета. На примере тирозина эта реакция приведена ниже.

Для проведения реакции в пробирку к 1 мл раствора белка **осторожно** приливают 0,5 мл концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки осторожно нагревают на водяной бане до появления осадка желтого цвета. После охлаждения в пробирку добавляют 1 мл концентрированного раствора аммиака. Сделайте вывод о наличии ароматических аминокислот в исследуемом белке.



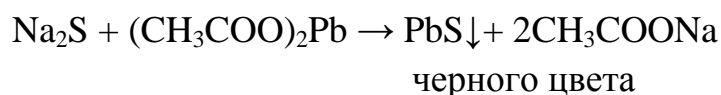
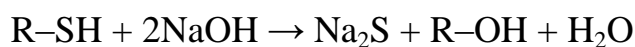


2.1.4. Реакции на серосодержащие аминокислоты

Нитропруссидная реакция – это взаимодействие серосодержащих аминокислот – цистина, цистеина и метионина – со щелочью с образованием сернистого натрия, который при взаимодействии с нитропруссидом образует соединение красного цвета. Белки, содержащие указанные выше аминокислоты в незначительном количестве, нитропруссидной реакции не дают.

Для проведения этой реакции к 1 мл раствора белка добавляют 1 мл 30 %-ного раствора щелочи и содержимое пробирки осторожно кипятят в течение 2...3 мин на спиртовке. После охлаждения добавляют 3–5 капель 5 %-ного раствора нитропруссиды натрия.

Реакция с ацетатом свинца – это взаимодействие серосодержащих аминокислот со щелочью с образованием сульфида натрия, присутствие которого обнаруживается после его взаимодействия с ацетатом свинца по выпадению осадка PbS черного цвета:



Для проведения этой реакции к 1 мл раствора белка добавляют 2 мл 10 %-ного раствора NaOH, перемешивают, осторожно кипятят в течение 2...3 мин. Затем к горячему раствору добавляют 1–2 капли 5 %-ного раствора ацетата свинца и продолжают осторожно нагревать до появления черного осадка сульфида свинца.

После проведения этих реакций делают вывод о содержании в анализируемом материале серосодержащих аминокислот и сравнивают чувствительность этих методов.

После проведения качественных реакций на аминокислоты и белки полученные результаты заносят в табл. 5 и делают вывод об аминокислотном составе исследуемого материала, сравнивают с литературными данными.

Таблица 5. Качественные реакции на белки и аминокислоты

| Название реакции | Исследуемый материал | Наблюдаемая окраска | Реагирующая группа | Вывод о наличии |
|------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | | | | |

2.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Стабильность белковых растворов обусловлена двумя основными факторами: наличием поверхностного заряда на белковой молекуле и гидратной оболочки вокруг нее. Устранение этих факторов приводит к осаждению белка из раствора.

Суммарный заряд белка определяется соотношением отрицательно и положительно заряженных аминокислотных остатков на поверхности белковых молекул, а также величиной pH раствора. Отрицательный заряд могут приобретать в нейтральной и щелочной среде глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в боковых радикалах которых содержатся свободные карбоксильные группы. Лизин, аргинин и гистидин в нейтральной и кислой среде заряжаются положительно благодаря наличию в их боковых радикалах, соответственно, аминогруппы, гуанидиновой группы и имидазольного кольца.

Значение pH, при котором суммарный заряд белка является нулевым, называется *изоэлектрической точкой* (ИЭТ, pI). В изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна (изоэлектрическое состояние), вследствие чего водный раствор белка при pH, равном pI, наименее устойчив и белок легче выпадает в осадок. Это явление применяется для определения изоэлектрической точки белка. Благодаря наличию заряда белки подвижны в электрическом поле.

Вторым стабилизирующим фактором, удерживающим молекулы белка в растворе, является водная оболочка (гидросфера) белка. При её разруше-

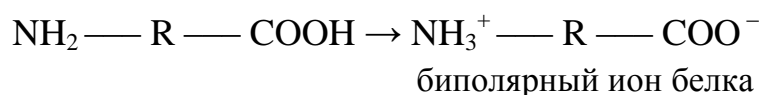


нии (например, при добавлении к белковому раствору вещества, обладающего бóльшей гидрофильностью, чем белок) дегидратированные белковые мицеллы также выпадают в осадок.

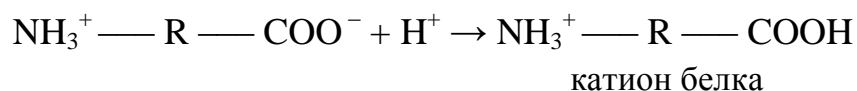
Одно из фундаментальных свойств белка – способность к денатурации. *Денатурация* – это нарушение нативной (природной) структуры, вызываемое действием физических и химических факторов и приводящее к изменению физико-химических свойств белка и утрате его биологических функций. Денатурация может носить обратимый и необратимый характер.

2.2.1. Определение изоэлектрической точки казеина

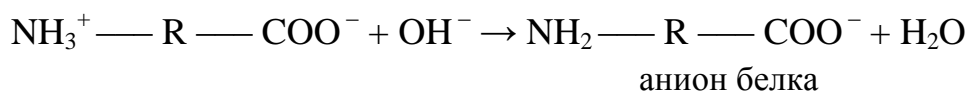
Белки являются амфотерными соединениями, т.е. они могут диссоциировать как кислоты и как основания. При этом Н-ионы (протоны), освобождающиеся в результате диссоциации кислотной группы, присоединяются к NH₂-группе, и таким образом молекула белка переходит в ионизированную форму, образуя биполярный ион белка:



При добавлении к раствору белка разбавленной кислоты его молекулы перезаряжаются в результате подавления диссоциации кислотных групп. В кислой среде молекулы белка получают положительные заряды и превращаются в катионы:



При добавлении к раствору белка щелочи его молекулы соответственно перезаряжаются, превращаются в анионы:



Изменяя кислотность среды, можно менять заряд белка. Если заряд снижается до нуля, электростатическое отталкивание уменьшается и по мере приближения к изоэлектрической точке молекулы притягиваются друг к другу с образованием крупных агрегатов. При определенном рН суммарный заряд белка становится равным нулю. Такое состояние белка называется изоэлектрической точкой (ИЭТ), которая является константой для каждого белка (рис. 15). Для казеина ИЭТ наступает при рН 4,6...4,7, для сывороточного глобулина при рН 5,4, для протаминов при рН 10,0...12,0.



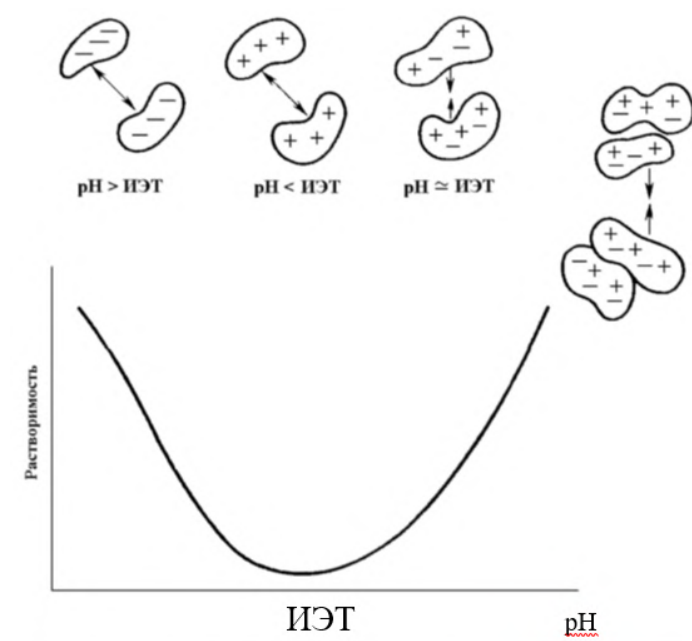
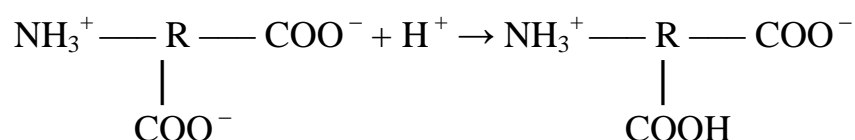


Рис. 15. Растворимость белков вблизи изоэлектрической точки

Так как большинство белков относятся к кислым белкам, т.е. в их молекулах преобладают моноаминодикарбоновые аминокислоты, то изоэлектрическая точка этих белков наступает в слабокислой среде:



Материалы: 0,2 %-ный раствор казеина.

В каждую из семи пронумерованных пробирок вносят растворы по приведенной схеме (табл. 6).

Таблица 6. Схема определения изоэлектрической точки казеина

| Растворы | Номер пробирки | | | | | | |
|---|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | Объемы растворов, мл | | | | | | |
| Вода | 0,4 | 1,2 | 1,6 | 1,8 | 1,9 | 1,94 | 1,97 |
| 0,2 М р-р CH ₃ COOH | 1,6 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,06 | 0,03 |
| 0,4 % р-р казеина в 0,2 М р-ре CH ₃ COONa | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| pH | 3,8 | 4,1 | 4,4 | 4,7 | 5,0 | 5,3 | 5,6 |



После внесения растворов содержимое пробирок хорошо перемешивают и после 5...10 мин отмечают пробирку с наибольшим количеством осадка (помутнения). Делают вывод об изоэлектрической точке казеина и о его аминокислотном составе.

Изучите физико-химические свойства белков. Определите изоэлектрическую точку казеина и сделайте вывод об аминокислотном составе казеина (какие аминокислоты преобладают?).

2.2.2. Изменение белков при нагревании

Почти все белки при нагревании коагулируют. Большинство белков свертывается при температуре 50...55 °С. При продолжительном нагревании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние. Свертывание и осаждение наиболее быстро происходит в изоэлектрической точке. В устойчивости белковых молекул важную роль играет концентрация водородных ионов.

Материалы: 10 %-ный раствор белка куриного яйца.

В пять пробирок наливают приблизительно по 2 мл раствора яичного белка. Первую пробирку нагревают до кипения и наблюдают, через какой промежуток времени образуется осадок.

Во вторую пробирку добавляют 1–2 капли 1 %-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Сравнивают время и количество осадка в этой пробирке с первой (контрольной). Поясните процесс.

В третью пробирку добавляют 0,5 мл 10 %-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Опишите наблюдения и поясните процесс.

В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл 10 %-ного раствора уксусной кислоты и несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия. Поясните наблюдения (по сравнению с третьей пробиркой).

В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10 %-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Поясните наблюдения.

Исследуйте изменения белков при нагревании, результаты и выводы оформить в виде табл. 7.

Таблица 7. Изменения белков при нагревании в присутствии различных химических агентов

| № пробирки | Реакция среды | Наблюдаемые изменения | Объяснение |
|------------|---------------|-----------------------|------------|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | | | |



2.2.3. Осаждение белков

Реакции осаждения белков можно разделить на две группы:

- 1) обратимое осаждение белков (солями аммония, нейтральных щелочных и щелочноземельных металлов, спиртов);
- 2) необратимое – солями тяжелых металлов, нагреванием, минеральными и органическими кислотами, а также другими реагентами, вызывающими ковалентную модификацию белков.

Материалы: 10 %-ный раствор белка куриного яйца.

Осаждение органическими кислотами. Для полного удаления белка из растворов используют их осаждение трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой кислотами ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$). Этой реакцией пользуются в биохимической практике для удаления белковых веществ (получения безбелковых экстрактов при анализе) и для определения их содержания в биологическом материале.

В первую пробирку наливают 1...2 мл раствора белка и добавляют несколько капель 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Во вторую пробирку к раствору белка добавляют несколько капель 20 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка в обеих пробирках. Полноту осаждения белков проверяют биуретовой реакцией. По результатам биуретовой реакции сравнивают осаждающее действие этих кислот.

Осаждение минеральными кислотами. Все концентрированные минеральные кислоты осаждают белки. Причина этого в дегидратации белковых молекул. При добавлении избытка кислот (исключение составляет азотная кислота) происходит растворение выпавшего осадка, что связано с частичным разложением белка и перезарядкой его частиц.

В три пробирки осторожно наливают по 1 мл концентрированных кислот – серной, соляной и азотной (работу проводить под тягой). Далее осторожно по стенке пробирки приливают по 1 мл раствора белка. Пробирку при этом следует держать в наклонном положении. На границе двух жидкостей появляется осадок белого цвета в виде небольшого кольца. Пробирки осторожно встряхивают и наблюдают исчезновение осадка в избытке кислоты. В азотной кислоте осадок не растворяется.

Осаждение солями. Осаждение белков из растворов солями называется высаливанием. Для этой цели используют соли различных металлов – щелочных, щелочноземельных, тяжелых. Соли щелочных и щелочноземельных металлов несут заряд, противоположный заряду белковой молекулы, и обладают большей гидрофильностью, чем белок. Поэтому при добавлении к рас-



твору белка определенного количества солей белковые молекулы теряют заряд и водную оболочку. Потеря стабилизирующих факторов приводит к выпадению в осадок дегидратированных белковых мицелл.

Соли тяжелых металлов (ртути, серебра, свинца, меди и др.) образуют с белками не растворимые в воде металлоорганические соединения. Для осаждения белков требуются небольшие концентрации этих солей (в отличие от солей щелочных и щелочноземельных металлов). Избыток солей уксуснокислого и сернокислого свинца вызывает растворение выпавшего осадка. Это объясняется тем, что избыток ионов металла перезаряжает белковый комплекс.

1. В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка. В одну добавляют порошок NaCl, а в другую $MgSO_4$ до полного насыщения. В обеих пробирках появляется осадок белков, который можно легко отделить фильтрованием или центрифугированием.

2. В три пробирки наливают по 2 мл раствора белка и по каплям прибавляют: в первую – 5 %-ный раствор сульфата меди, во вторую – 0,5 %-ный раствор ацетата свинца, в третью – 1 %-ный раствор нитрата серебра. Наблюдают за образованием осадков. В первую и во вторую пробирки добавляют избыток солей, осадки растворяются.

Осаждение белков спиртом. Механизм действия спирта и других органических растворителей (ацетона, хлороформа) объясняют дегидратацией молекул белка, что ведет к понижению устойчивости их в растворе. В результате происходит агрегация белковых частиц и их осаждение. Если в растворе белка присутствуют соли (NaCl и др.), осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда с коллоидных частиц. Реакция осаждения белков спиртом, проводимая на холоде и при непродолжительном его контакте с белком, обратима. Осаждение белков ацетоном на холоде часто используется для выделения белков из культуральной жидкости в лабораторных и промышленных условиях.

В пробирку наливают около 1 мл раствора яичного белка, добавляют несколько кристалликов NaCl, встряхивают и по каплям – 96%-ный этиловый спирт до выпадения хлопьев белка. После осаждения хлопьев надосадочную жидкость сливают, к осадку доливают воду, наблюдая растворение белка.

Исследуйте реакции осаждения белков различными осадителями, по результатам работы заполните табл. 8.

Таблица 8. Влияние осадителей на осаждение белков из раствора

| Осадители | Используемые реактивы | Характер и цвет осадка | Растворимость осадка в избытке осадителя | Чем обусловлена реакция? |
|-----------|-----------------------|------------------------|--|--------------------------|
| | | | | |



2.2.4. Методы выделения и фракционирования белков

Процесс выделения белков из биологического материала включает следующие операции:

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

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

Белки обладают высокой молекулярной массой, что обуславливает выраженный коллоидный характер их водных растворов. Основными факторами агрегативной устойчивости белковых коллоидов являются гидратация частиц и возникновение одноименного электрического заряда. Следовательно, выпадению белков из растворов способствуют уменьшение гидратации коллоидных частиц (разрушение гидратной оболочки) и значительное снижение или снятие их заряда.

Высаливание – это широко используемый способ выделения белков из различных биологических объектов, основанный на осаждении белков водотнимающими средствами. Применяется при получении ферментов, а также для фракционного разделения белков.

В зависимости от растворимости в различных средах белки классифицирует на следующие группы.

Альбумины – белки, хорошо растворимые в воде и в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4...10 %, выпадают в осадок из этих растворов при насыщении их этими же солями и сульфатом аммония (лактальбумин молока, овальбумин яичного белка, сывороточный альбумин крови и др.).

Глобулины – не растворимы в воде, хорошо растворимы в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4...10 %, выпадают в осадок при полунасыщении этих растворов. Глобулины встречаются во всех живых организмах, наиболее распространены в растениях, особенно много их в семенах бобовых и злаковых культур.

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



злаковых (глиадин пшеницы, который наравне с щелочерастворимым глютелином образует клейковину).

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природе белками, в тканях и биологических жидкостях обычно встречаются вместе. Их выделение и разделение основано на различной растворимости в воде и солевых растворах. Так, глобулины выпадают в осадок в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе. Это объясняется тем, что у глобулинов более высокая молекулярная масса и они менее гидратированы, чем альбумины.

Материалы: молочная сыворотка, неразбавленный раствор белка куриного яйца.

Фракционирование белков солями различных концентраций. В пробирку наливают 2...3 мл молочной сыворотки или неразбавленного раствора яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость по истечении 5...7 мин центрифугируют при 6 тыс. об/мин в течение 10 мин или фильтруют через сухой складчатый фильтр. Осадок глобулинов используют для очистки.

Прозрачный фугат переливают в чистую пробирку и при перемешивании добавляют избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фугуют, отбирают 1...2 мл супернатанта и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения. Осадок альбуминов переносят в диализный мешок для очистки.

Очистка белков методом диализа. Выделенные глобулины и альбумины содержат примеси минеральных солей. Для очистки белков от низкомолекулярных примесей применяют удобный и простой метод диализа. Это отделение коллоидного раствора (в данном случае белка) от низкомолекулярных соединений (солей) при помощи диффузии их через непроницаемые для коллоидов мембраны. Применяют мембраны, которые могут быть животного или растительного происхождения. В лаборатории используют целлофан, промытый в дистиллированной воде, из которого делают небольшой мешочек. В него вставляют химическую воронку, через которую наливают водный раствор белка. Затем мешочек завязывают веревкой, подвешивают к стеклянной палочке и опускают в стакан с дистиллированной водой, помещают в холодильник. Воду в стакане периодически заменяют: в слитую воду добавляют несколько капель 10 %-ного раствора хлорида бария. Появление осадка указывает на присутствие в промывной воде ионов SO_4^{2-} , а его отсутствие на окончание промывки.



Задание

Разделить альбумины и глобулины яичного белка. Результаты работы занести в табл. 9.

Таблица 9. Результаты разделения альбуминов и глобулинов яичного белка

| Название фракции | Используемая соль | Степень насыщения | Образование белка |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Альбумины | | | |
| Глобулины | | | |

2.3. АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

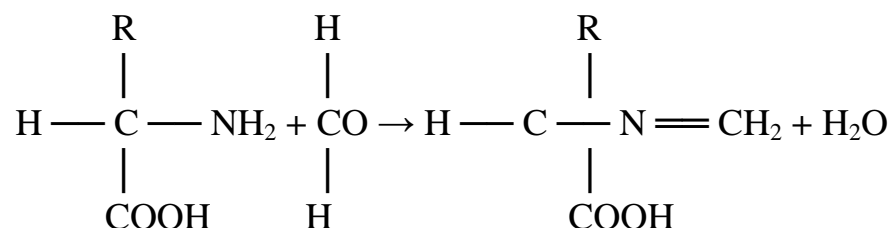
При превращении белковых веществ образуются различные промежуточные и конечные продукты. К промежуточным продуктам ферментативного распада белков относятся аминокислоты. Их качественное и количественное определение необходимо при рассмотрении продуктов внутриклеточного белкового обмена, анализе культуральных сред и биологических материалов. Степень гидролиза белка можно определить по снижению содержания общего белка и накоплению продуктов его гидролиза. Для идентификации аминокислот широко используются хроматографические методы.

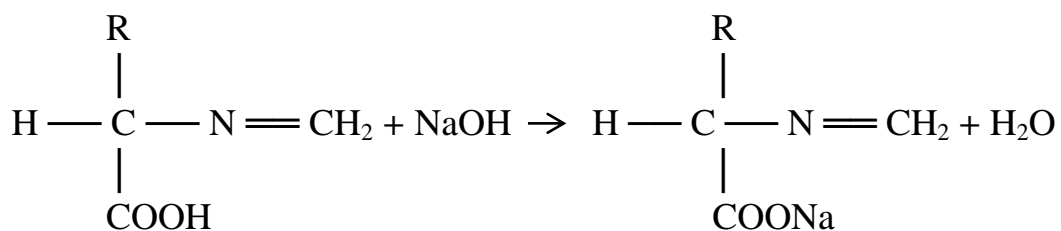
Материалы: непроросшие семена и проростки бобовых растений, гидролизаты белка, дрожжи.

2.3.1. Определение содержания аминного азота формальным титрованием

Аминным называют азот свободных аминогрупп аминокислот и пептидов. В процессе расщепления белков кислотами или ферментами образуются аминокислоты, которые содержат свободные аминогруппы и карбоксильные группы. В среднем число карбоксильных групп в аминокислотах белков равно числу аминогрупп.

Чтобы определить количество аминогрупп, их блокируют формальдегидом, а оставшиеся свободные карбоксильные группы оттитровываются щелочью. По количеству пошедшей на титрование щелочи определяют количество COOH-групп:





Ход определения

Растирают в ступке 5 г проростков или семян с 5...10 мл дистиллированной воды и песком. Содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, промывными водами доводят до метки, перемешивают. Затем содержимое колбы переносят в плоскодонную колбу, нагревают в водяной бане до 80 °С, охлаждают и фильтруют или центрифугируют. В фильтрате определяют аминный азот.

Для опыта берут 20 мл фильтрата, приливают 10 мл формальной смеси и из бюретки 0,2 н раствор щелочи до появления ярко-розового окрашивания. Такое окрашивание указывает на избыток щелочи в растворе. Значение добавленного объема щелочи обозначим a_1 . Избыток щелочи оттитровывают 0,2 н раствором НСl до бледно-розовой окраски. Объем 0,2 н раствора НСl, израсходованный на титрование, обозначим a_2 .

Одновременно проводят контрольное титрование. Для этого к 20 мл прокипяченной и охлажденной воды приливают 10 мл формальной смеси и избыточный объем 0,2 н раствора щелочи (b_1). Затем раствор титруют 0,2 н раствором НСl до бледно-розовой окраски (b_2).

Содержание аминного азота в исследуемом материале определяют по формуле

$$X = \frac{(A - B)2,8 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot g \cdot 1000},$$

где X – содержание аминного азота, %; $A = (a_1 - a_2)$ – количество 0,2 н NaOH, пошедшее на титрование фильтрата, мл; $B = (b_1 - b_2)$ – количество 0,2 н NaOH, пошедшее на титрование в контрольном опыте, мл; $(A - B)$ – количество 0,2 н раствора NaOH, пошедшего на взаимодействие с карбоксильными группами аминокислот, мл; 2,8 – количество азота, соответствующее 1 мл 0,2 н раствора NaOH, мг; 50 – общий объем вытяжки, мл; 20 – объем вытяжки, взятой на титрование, мл; g – навеска, г; $\frac{100}{1000}$ – перевод в проценты.

Примечание. Для получения формальной смеси к 50 мл 30...40 %-ного раствора формалина прибавляют 1 мл 0,1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина и смесь доводят 0,2 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания.



2.3.2. Разделение смеси аминокислот методом радиальной хроматографии на бумаге

Хроматографический метод разделения и качественного обнаружения аминокислот основан на различии адсорбционных свойств и растворимости аминокислот в системе органический растворитель–вода при их продвижении на носителе (фильтровальной бумаге). Разделенные аминокислоты выявляют раствором нингидрина. Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Чашки Петри перед использованием промывают хромовой смесью.

Ход определения

1. Разметка и маркировка хроматографической бумаги.

Из хроматографической бумаги вырезают круг (на 0,5 см больше диаметра используемой для работы нижней чашки Петри (рис. 16)), отмечают центр и делят на четыре сектора (три раствора аминокислот-свидетелей и анализируемый раствор), подписывают их карандашом по периферии. Бумагу при работе держат аккуратно, за край, чтоб не оставлять следы на ее поверхности. В центре циркулем делают круг диаметром 2 см – стартовая линия для нанесения проб. Центр фильтра прокалывают шилом, вставляют фитиль из скрученной полоски фильтровальной бумаги (высотой чуть выше высоты чашки Петри).

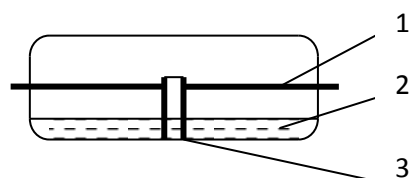


Рис. 16. Радиальная хроматография аминокислот на фильтровальной бумаге в чашке Петри:

1 – фильтровальная бумага; 2 – растворитель; 3 – фитиль из фильтровальной бумаги

2. Нанесение растворов.

На отмеченную точку стартовой линии в середину хорды первого сектора вносят микропипеткой 10 мкл раствора одной аминокислоты-свидетеля, второго сектора – второй, третьего – третьей, в четвертый сектор вносят 10 мкл анализируемой вытяжки. При этом необходимо весь объем внести точно, на бумаге должно оставаться пятно диаметром не более 3...4 мм (нужно избегать расплыва пятна). Дробное нанесение осуществляют прикосновением конца заполненного дозатора к бумаге в отмеченную точку и быстрым ее поднятии. После полного подсыхания пятна операцию повторяют. Так поступают до тех пор, пока весь раствор из дозатора не будет нанесен на бумагу.



После нанесения растворов аминокислот-свидетелей и исследуемой вытяжки фильтр 1 (рис. 16) подсушивают на воздухе, до исчезновения влажных пятен.

3. Приготовление растворителя и разгонка аминокислот.

Наливают в делительную воронку смесь: н-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода в соотношении 4:1:5, хорошо взбалтывают и после отстаивания отбрасывают нижний водяной слой, а верхний бутанольный наливают в чашку Петри (примерно на $\frac{1}{2}$ – $\frac{1}{3}$). Устанавливают фильтр, чтобы он располагался в центре и касался ее дна. Для уменьшения испарения растворителя хроматограмму накрывают второй половиной чашки, добиваясь совмещения краев чашек, и устанавливают камеру в вытяжной шкаф.

Насыщенный неподвижной фазой растворитель по фитильку непрерывно поступает к центру хроматограммы и, двигаясь к краям, растворяет нанесенные аминокислоты, и увлекает их за собой. На бумаге растворитель, перемещаясь от центра к периферии, захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами. При этом каждая из аминокислот движется по слою бумаги с определенной скоростью, что обусловлено коэффициентом распределения. Скорость движения аминокислот неодинакова, так как зависит от степени их растворения в неподвижной и подвижной фазе растворителя. Аминокислоты с полярными незаряженными, отрицательно и положительно заряженными (гидрофильными) радикалами движутся медленно, вместе с водой, некоторые чуть впереди воды. Аминокислоты с неполярными, гидрофобными радикалами перемещаются быстрее, так как вода, продвигаясь по бумаге, выталкивает их, а бутилово-уксусная фракция – увлекает за собой. Скорость перемещения аминокислот одновременно зависит от величины и объема радикала.

Разделение длится 0,5...1,5 ч, после того как растворитель дойдет почти до краев чашки, хроматограмму снимают, удаляют фитилек, простым карандашом отмечают границу фронта растворителя (проводят линию между сухой и мокрыми зонами бумаги) и высушивают в вытяжном шкафу.

5. Проявление.

Подсушенный фильтр опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора и подсушивают (лучше в сушильном шкафу при 100 °С в течение 5 мин). Во избежание загрязнения пробы поверхностными белками кожи рук держать фильтр лучше пинцетом.

6. Идентификация аминокислот.

На секторах хроматографической бумаги обнаруживаются пятна (красноватые, пурпурно-красные, в большинстве случаев сине-фиолетовые), соответствующие расположению различных аминокислот. Сравнивая положение пятен-свидетелей с пятнами в анализируемом растворе, делают вывод



об аминокислотном составе материала исследования. По интенсивности окраски и площади пятен можно судить о количестве аминокислот, присутствующих в изучаемом материале.

7. Определение коэффициента подвижности аминокислот.

Для более точной идентификации вычисляют коэффициент подвижности R_f аминокислот-свидетелей и аминокислот анализируемой смеси. Для этого измеряют расстояние, пройденное каждой аминокислотой от точки старта до середины пятна (a), и расстояние, пройденное растворителем в данном секторе (b). Рассчитывают коэффициент подвижности по формуле

$$R_f = a/b.$$

Значение R_f для аминокислот при разделении на бумаге растворителем, состоящим из бутанола, уксусной кислоты и воды (**в соотношении 12:3:5**), приведены в табл.10. Идентификация аминокислот, содержащихся в анализируемом материале, осуществляется по совпадению их позиций с позицией аминокислот-метчиков на хроматограмме, по совпадению коэффициентов подвижности и по однородности окраски пятен.

Таблица 10. Коэффициенты подвижности аминокислот (R_f)

| Аминокислоты | R_f | Аминокислоты | R_f | Аминокислоты | R_f |
|--------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|
| Цистеин | 0,08 | Оксипролин | 0,22 | Тирозин | 0,45 |
| Гистидин | 0,11 | Глицин | 0,23 | Триптофан | 0,50 |
| Лизин | 0,12 | Аспарагиновая | 0,23 | Метионин | 0,50 |
| Аспарагин | 0,12 | Треонин | 0,26 | Валин | 0,51 |
| Глутамин | 0,17 | Глутаминовая | 0,28 | Фенилаланин | 0,60 |
| Аргинин | 0,15 | Аланин | 0,30 | Изолейцин | 0,67 |
| Серин | 0,22 | Пролин | 0,34 | Лейцин | 0,70 |

Примечание. Готовят 0,1 % растворы аминокислот-свидетелей, в качестве растворителя использую кислый спиртовой раствор (в мерную колбу на 100 мл вливают 20 мл этилового спирта, 2 мл концентрированной соляной кислоты и объем доводят водой до метки).

Задание

1. Определить аминный азот методом формольного титрования.
2. Определить аминокислотный состав белка дрожжей/растительного белка/животного белка методом радиальной хроматографии. Представить хроматограмму с разделенными и идентифицированными аминокислотами.



2.4. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

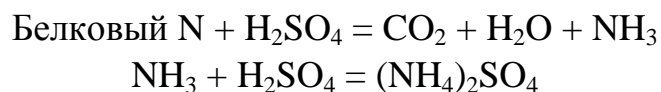
В настоящее время используют более десяти методов для определения массы белка в биологическом материале и продуктах питания, которые можно разделить на три группы:

- химические (метод формольного титрования, универсальный метод Кьельдаля, основанный на количественном определении азота в исследуемом материале);
- физические (рефрактометрический – по показателю преломления света раствором белка, спектрофотометрический – основан на способности ароматических аминокислот поглощать ультрафиолетовый свет при 280 нм);
- физико-химические (колориметрические). Из колориметрических методов наиболее распространены количественное определение белка на основе биуретовой реакции, метод Лоури (основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией), метод Бредфорда (основан на связывании белком красителя Кумасси бриллиантового синего).

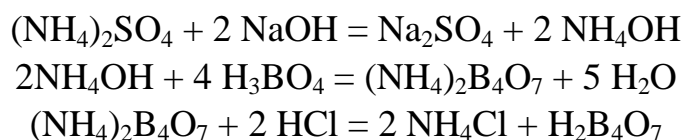
2.4.1. Определение белка методом Кьельдаля

Метод основан на минерализации органических веществ серной кислотой с последующим разложением сульфата аммония щелочью, отгонкой аммиака и его количественным определением. Метод отличается высокой точностью и воспроизводимостью, применим для анализа плохо растворимых или совсем нерастворимых в воде образцов. Для количественного исследования белков при решении спорных вопросов в качестве арбитражного принят метод Кьельдаля. Недостатками метода являются его многоэтапность и длительность выполнения.

Навеску анализируемого материала минерализуют в растворе концентрированной серной кислоты, при этом все органические вещества окисляются до углекислого газа и воды, а азот превращается в аммиак, который образует с серной кислотой сульфат аммония:



Минерализованную пробу обрабатывают щелочью. Выделяющийся аммиак связывают борной кислотой, содержание образующегося тетрабората аммония определяют титрованием раствором соляной кислоты:



Материалы: семена и растительные материалы, пищевые полуфабрикаты и продукты, дрожжи.

Ход определения

1. Минерализация (сжигание).

На аналитических весах в специальной пробирке отвешивают 50...70 мг сухих дрожжей (или анализируемого материала в расчете, что проба для анализа должна содержать 10...20 мг азота). Навеску высыпают в пакет из фильтровальной бумаги, пакет закрывают и осторожно опускают на дно жаростойкой колбы Кьельдаля. Пустую пробирку вновь взвешивают. По разности двух взвешиваний определяют массу навески. Если материал не сыпучий, то опускают навеску образца непосредственно в колбу.

Затем наливают в колбу (пипеткой по стенке) 3 мл концентрированной H_2SO_4 , добавляют пипеткой 1 мл перекиси водорода, закрывают пробирку стеклянной втулкой и нагревают в вытяжном шкафу на плитке в наклонном положении. Периодически добавляют по 0,1...0,2 мл перекиси водорода. Для этого пробирку осторожно отодвигают в сторону от нагревательного элемента плитки, ослабляя зажим держателя колбы. Охлаждают колбу со смесью 2...3 мин, вносят перекись и устанавливают обратно на кипение. Озоление считают законченным, если после 15-минутного сильного нагревания содержимое пробирки остается бесцветным.

2. Отгонка аммиака.

Содержимое колбы охлаждают и количественно переносят в перегонную колбу Кьельдаля вместимостью 200 мл, используя для этого 50 мл воды, добавляют на кончике ложечки тальк.

Далее собирают установку, которая включает плитку, колбу Кьельдаля, соединительную трубку, вертикальный холодильник и приемную колбу для конденсата. На приемной колбе предварительно ставят метку, соответствующую объему 75 мл, вливают в неё мерным цилиндром 40 мл 2 %-ной борной кислоты и устанавливают на домкрате таким образом, чтобы конец холодильника был слегка погружен в жидкость. Отсоединив соединительную трубку, вливают в колбу Кьельдаля 20 мл 30 %-ного раствора гидроксида натрия и сразу же (в противном случае анализ будет испорчен) присоединяют колбу к трубке, закрепляют её в штативе. Включают воду в холодильник, электроплитку и начинают отгонку аммиака. Отгонку ведут до тех пор, пока уровень жидкости в приемной колбе не достигнет отметки 75 мл. Чтобы конец холодильника не погружался в жидкость слишком глубоко, положение приемной колбы следует регулировать домкратом.



3. Титрование и расчет.

По окончании отгонки выключают электроплитку и воду, приемную колбу опускают, ополаскивают дистиллированной водой в приемную колбу внутреннюю трубку холодильника и снаружи его конец, погруженный в жидкость приемной колбы. В приемную колбу добавляют индикатор (смесь Андерсена) и титруют 0,05 н раствором соляной кислоты до изменения окраски индикатора от зеленого до сине-фиолетового.

Содержание общего азота в препарате вычисляют по формуле, %,

$$X = \frac{a \cdot 0,0007 \cdot K \cdot 100}{g},$$

где a – расход 0,05 н соляной кислоты на титрование, мл; 0,0007 – масса азота, эквивалентная 1 мл 0,05 н раствора соляной кислоты, г; K – поправочный коэффициент нормальности раствора соляной кислоты; 100 – перевод в проценты; g – навеска, г.

Массовую долю белка в исследуемом материале можно высчитать умножением массовой доли белкового азота на фактор пересчета азота в белок (белковый коэффициент). Например, среднее содержание азота в большинстве белков животного происхождения и микроорганизмах – 16 %, соответственно переводной белковый коэффициент $100/16 = 6,25$.

Массовые доли азота в белках некоторых биологических объектов и факторы пересчета азота в белок (белковые коэффициенты) приведены в табл. 11.

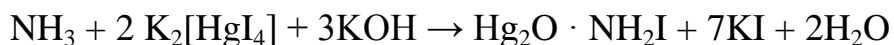
Таблица 11. Массовая доля белка в биологических объектах

| Наименование | Массовая доля азота в белке, % | Фактор пересчета (белковый коэффициент) |
|---|--------------------------------|---|
| Белки молока в целом | 15,65 | 6,38 |
| Белки животных организмов (кроме коллагена) | 16,00 | 6,25 |
| Белки зерна риса | 16,80 | 5,95 |
| Белки зерна овса и ржи | 17,15 | 5,83 |
| Белки зерна сои | 17,51 | 5,71 |
| Белки зерна пшеницы и ячменя | 17,54 | 5,70 |
| Коллаген (животный белок) | 17,79 | 5,62 |
| Белки зерна арахиса | 18,31 | 5,46 |
| Белки семян подсолнечника, льна и хлопчатника | 18,88 | 5,30 |



2.4.2. Определение общего азота методом Нesslerа

Метод также основан на сжигании навески, выделении аммиака при подщелачивании и способности аммиака образовывать со щелочным раствором тетраiodмеркурата калия (реактив Нesslerа) окрашенные в желтый цвет соединения йодида меркураммония, которые можно определять спектрофотометрически:



При большом содержании аммиака выпадает бурый осадок, в этом случае определение необходимо проводить после разбавления пробы.

Ход определения

1. Минерализация (сжигание).

Минерализацию проводят аналогично методу Кьельдаля.

2. Колориметрическое определение аммонийного азота с реактивом Нesslerа.

Озоленную смесь количественно переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Отбирают пипеткой 5 мл смеси и вносят в коническую колбу, добавляют 15 капель индикатора бромтимолового синего и титруют 0,5 н раствором NaOH до перехода зеленой окраски в синюю.

Для определения аммонийного азота в мерную колбу на 50 мл вносят 5 мл озоленной смеси, добавляют столько же NaOH, сколько пошло на титрование (без внесения индикатора). Наливают воды до 2/3 объема колбы, перемешивают, добавляют 2 мл раствора Нesslerа, доводят водой до метки и еще раз перемешивают. Через 15 мин колориметрируют в кюветах на 10 мм при 410 нм против контроля.

Содержание азота в растворе рассчитывают по калибровочной кривой, построенной с сульфатом аммония (до 5 мг/л). Содержание общего азота (%) в исследуемом препарате определяют по формуле

$$X = \frac{a \cdot n \cdot 50 \cdot 100}{g},$$

где a – содержание азота в озоленной смеси, мг/л; n – разведение; 50 – общий объем озоленной смеси, мл; g – навеска, г; 100 – перевод в проценты.

Умножая полученную массовую долю азота на фактор пересчета азота в белок (переводной коэффициент), находят содержание в исследуемом материале «сырого» белка.



2.4.3. Количественное определение белка по методу Брэдфорда

В исследовательских работах часто стоит задача определения концентрации белка в растворе (экстракт, культуральная жидкость). Среди различных методов количественного определения содержания белка широко применяются колориметрические (метод Лоури, Брэдфорда и др.).

Механизм связывания красителя Coomassie G-250 в методе М. Брэдфорда заключается во взаимодействии анионной формы красителя с белком, в результате связывания цвет красителя из красновато-коричневого становится голубым. Связывание с белком осуществляется за счет электростатического взаимодействия сульфонильных групп красителя с аминокислотными остатками белка, преимущественно с аргининовым остатком и в меньшей степени с остатками гистидина, лизина, тирозина, триптофана и фенилаланина.

Исходный кислый раствор Coomassie имеет максимум поглощения при длине волны 465 нм. После связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения смещается к 595 нм.

Внимание! Краситель очень чувствителен даже к следовым количествам белка, поэтому осторожно обращаться с основным реактивом, дополнительно промывать спиртом посуду, не касаться руками (иначе реактив посинеет)!

Ход определения

1. Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) концентрацией 200 мкл/мл готовят серию стандартных разведений в диапазоне концентраций 2,5...200 мкл/мл. Для приготовления серии разведений в эппендорфах рассчитывают объемы стандартного раствора БСА и воды (на общий объем 1 мл), заполняют табл. 12.

Таблица 12. Подготовка разведений для диапазона концентраций 2,5...200 мкл/мл

| № проб | Объем стандартного раствора БСА, мкл | Объем воды, мкл | Конечная концентрация БСА, мкл/мл | Оптическая плотность |
|--------|--------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1 | | | 150 | |
| 2 | | | 100 | |
| 3 | | | 50 | |
| ... | | | ... | |
| ... | | | 2,5 | |



Вносят в заранее подписанные пробирки по 200 мкл стандартных разведений, добавляют по 2 мл красителя, перемешивают на вортексе, инкубируют при комнатной температуре. Через 5 мин определяют оптическую плотность на спектрофотометре при 595 нм в кюветах на 10 мм. По полученным значениям строят калибровочную кривую.

2. Проведение измерений.

К пробе белка 200 мкл добавляют 2 мл красителя, перемешивают, инкубируют при комнатной температуре и через 5 мин определяют оптическую плотность при 595 нм относительно контроля (вода или тот раствор, в котором проводится измерение образцов). Содержание белка в исследуемой пробе рассчитывают по калибровочному графику.

2.4.4. Количественное определение белка по методу Лоури

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. При взаимодействии белка со щелочным раствором медного купороса образуются комплексные соединения (биуретовая реакция), которые своими тирозиновыми и цистеиновыми радикалами восстанавливают смесь фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета (реакция Фолина). Интенсивность окраски комплекса зависит от количества белка в исследуемой пробе, метод характеризуется высокой чувствительностью (10...100 мкг белка в пробе). На развитие окраски влияет присутствие многих веществ: детергентов (тритон X-100, SDS), компонентов буферных систем (трис-буфер, глицин), восстановителей (дитиотреитол), ЭДТА, сахарозы, сульфата аммония. Кроме того, для неизвестного белка со специфическим аминокислотным составом нужно быть уверенным, что полученные значения находятся внутри линейного диапазона калибровочной кривой, которую обычно строят для БСА.

Реактивы: А – 2 % раствор Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH; В – 0,5 % раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % растворе калий-натрий виннокислого; С – рабочий щелочной раствор меди, полученный сливанием 50 мл реактива А и 1 мл реактива В (в день определения); D – 1 н реактив Фолина (приготовленный разводят в 2 раза); стандартный раствор БСА, содержащий 100 мкг/мл.

Ход определения

Для построения калибровочного графика из стандартного раствора готовят растворы белка, содержащие 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг БСА в 1 мл.



К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 10...100 мкг белка, приливают 2 мл рабочего раствора С, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавляют 0,2 мл реактива Фолина, тщательно перемешивают и через 30 мин определяют оптическую плотность раствора при 750 нм в кюветах на 10 мм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

Задание

1. Определить содержание общего азота в различных биообъектах методом Кьельдаля и Несслера. По полученным данным рассчитать содержание «сырого протеина» в анализируемом материале и сравнить с теоретическим.

2. Определить концентрацию белка в растворе методами Брэдфорда и Лоури, предварительно построив калибровочный график по БСА. Сравнить полученные значения.

3. Провести сравнительную оценку методов количественного определения белка (табл. 13).

Таблица 13. Методы количественного определения белка

| Название метода | Химизм | Мешающие факторы (ограничения) | Применение |
|-----------------|--------|--------------------------------|------------|
| | | | |

Контрольные вопросы по теме «Белки»

1. Дайте определение понятию белка.
2. Охарактеризуйте первичную структуру белка.
3. На чем основана классификация протеиногенных аминокислот? Запомните сокращенные названия аминокислот (см. приложение).
4. Напишите химическую формулу фрагмента полипептидной цепи *асп-вал-лиз-гли*. Укажите суммарный электрический заряд и направление движение при электрофорезе при а) рН 7, б) рН 3, в) рН 10.
5. Перечислите универсальные и специфические цветные реакции на белки.
6. Какие связи стабилизируют третичную структуру белка?
7. Укажите боковые радикалы аминокислот, между которыми образуются: а) ионные связи; б) электростатические связи; в) водородные связи; г) гидрофобные связи.
8. Назовите основные факторы стабильности молекул белка в растворе.
9. Что лежит в основе высаливания белка сульфатом аммония, спиртом (ацетоном)?



10. Кратко опишите принцип метода бумажной хроматографии аминокислот. На чем основано разделение?

11. Опишите метод Кьельдаля: этапы определения, применение метода.

12. Как рассчитать массовую долю белка в материале, определив содержание общего азота?

13. Перечислите методы определения концентрации белка в растворе, их принципы, чувствительность, преимущества и ограничивающие факторы.



3. ФЕРМЕНТЫ

Необычайное многообразие биохимических реакций, которые протекают в живых организмах, обусловлено наличием у них активных биохимических катализаторов – ферментов, или энзимов. Характерной особенностью ферментов является то, что они действуют при сравнительно низких температурах (25...36 °C), обычном атмосферном давлении и с очень большой скоростью. По характеру своего действия ферменты аналогичны обычным химическим катализаторам – они ускоряют соответствующие реакции, не входя в состав образующихся продуктов, не расходуясь заметным образом и не теряя первоначальных свойств.

Общепринятыми являются названия ферментов с окончанием «-аза», прибавляемым к названию субстрата, превращение которого ускоряется данным ферментом (исключение – протеолитические ферменты, например пепсин, трипсин и др.). Рабочее название образуется из объединения названия субстрата, типа реакции и окончания «-аза» (например: лактат + дегидроген(изация) + аза = лактатдегидрогеназа). Систематическое название фермента формируется следующим образом: название субстратов (через дробь), название типа химического превращения + «-аза».

По своей природе ферменты – специфические белки, простые или сложные. Важнейшей частью фермента является *активный центр*, обычно имеющий форму кармана или впадины в глобуле фермента и представляющий собой сложную трехмерную структуру, образованную специфически расположенными аминокислотными радикалами. Ведущую роль в механизме ферментативного катализа играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется тонкой структурой активного центра и уникальной структурой всей молекулы фермента. Между аминокислотными остатками активного центра фермента и субстратом устанавливается геометрическое (по форме) и химическое (образование гидрофобных, ионных и водородных связей) соответствие. У простых ферментов функции контактных и каталитических групп активного центра определяются только радикалами аминокислотных остатков, у сложных ферментов активный центр включает также коферменты и ионы металлов. Обычно кофакторы выполняют функцию промежуточных переносчиков электронов, некоторых атомов или функциональных групп, которые в результате ферментативной реакции переносятся с одного соединения на другое. Наиболее распространены кофакторы, осуществляющие перенос восстановительных эквивалентов, фосфатных, ацильных и карбоксильных групп.



Современная классификация ферментов предполагает подразделение по типам катализируемых реакций на семь классов: оксидоредуктазы; трансферазы; гидролазы; лиазы; изомеразы; лигазы (синтетазы); транслоказы.

Цифровые коды классификации ферментов (КФ или ЕС – от англ. Enzyme Commission) состоят из 4 чисел. Например, 3.2.1.1 α -амилаза: класс 3 – гидролазы, подкласс 2 – гликозидазы, подподкласс 1 – гидролизующие соединения с О-гликозидной связью, последнее число – серийный номер данного фермента.

Активность ферментов зависит от природы и концентрации субстрата, рН среды, температуры и других условий.

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ИХ ДЕЙСТВИЯ

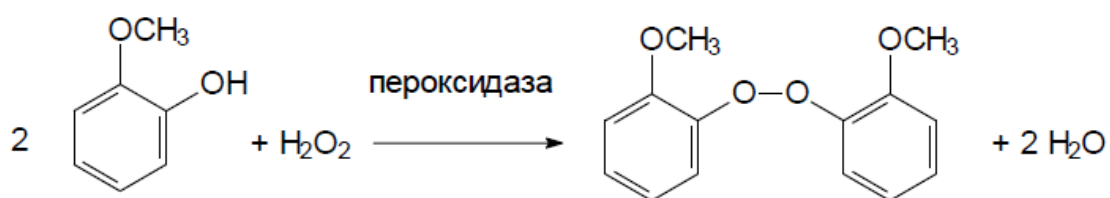
Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур. В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, работу часто проводят с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой частично очищенные ферменты или вытяжки из биологических объектов.

Вещество, превращение которого вызывает фермент, называют субстратом; выдерживание субстрата с ферментом – инкубацией. О присутствии фермента в биологическом объекте или вытяжке из него судят по превращению соответствующего субстрата. Поэтому основной задачей является выбор наиболее удобного метода детектирования убыли субстрата или накопления продуктов ферментативной реакции.

3.1.1. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле

Окислительно-восстановительный фермент *пероксидаза* широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных тканях (хрен, картофель и др.), биологических жидкостях животных (кровь, мышечная ткань, молоко). В молочной промышленности с помощью реакции на пероксидазу контролируют эффективность пастеризации молока. Пероксидаза катализирует с помощью перекиси водорода окисление многих фенолов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и др.). Так, при окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета:



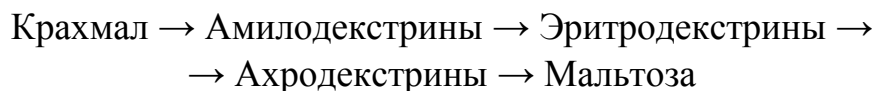


Материал: сырой и вареный картофель.

На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят по 1–2 капли 5 %-ного спиртового раствора гваякола и 1 %-ного раствора пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. Отметьте результаты и объясните различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

3.1.2. Получение амилазы слюны и обнаружение активности

Амилазы – ферменты, ускоряющие реакцию гидролиза крахмала. В слюне содержится α -амилаза – фермент, гидролизующий α -1,4-гликозидные связи крахмала с образованием декстринов и дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов гидролиза, называемых декстринами:



С раствором йода они дают различное окрашивание (табл. 14): декстрины, близкие по строению к крахмалу (амилодекстрины), дают синевато-фиолетовое окрашивание с йодом; эритродекстрины – красно-бурое; мальтодекстрины и мальтоза вообще не дают окрашивания.

Таблица 14. Продукты гидролиза крахмала

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



Хорошо прополоскать ротовую полость, набрать в рот 10...20 мл дистиллированной воды и держать 4...5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и предварительного определения её активности, из полученного препарата амилазы слюны отливают около 1 мл, приливают 2 мл 1 %-ного раствора крахмала, перемешивают и инкубируют в термостате при температуре 37...38 °С. Затем через 1...2 мин стеклянной палочкой из пробирки отбирают 1–2 капли и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость с йодом будет давать синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться йодом в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, перестанут окрашиваться совсем (останется желтый цвет йода). Пробу с раствором йода можно проводить прямо в пробирках. Для этого через 2...3 мин инкубации в пробирки вносят 1 каплю раствора йода и наблюдают за окраской на границе между йодом и раствором. По окраске, появившейся в пробирке, можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента.

Если активность амилазы слюны высокая, проводят дополнительное разбавление в 2–5 раз. Для последующих опытов желательно подобрать такое разведение слюны, чтобы за 3 мин не происходило полного обесцвечивания йод-крахмальной реакции.

3.2. СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

В отличие от большинства катализаторов неорганической природы ферменты обладают более высокой эффективностью и *специфичностью* действия. Субстратная специфичность объясняется пространственным соответствием активного центра фермента и его субстрата. Ферменты *термолабильны* – нагревание до температуры 70...80 °С приводит к инаktivации большинства ферментов за счет денатурации – разрушения вторичной и третичной структуры белка, т.е. потери пространственной конфигурации молекулы фермента, в том числе его активного центра. Ферменты *чувствительны также к изменению рН среды*, при которой они действуют. Это связано с изменением пространственной конфигурации молекулы фермента при присоединении или отщеплении протонов. Для каждого из ферментов существуют определенные *оптимальные значения температуры и рН среды*, при которых они проявляют свою максимальную активность.

Температура и рН относятся к неспецифическим факторам, так как в той или иной мере влияют на активность всех ферментов. Кроме того, существуют специфические факторы, которые в очень низких концентрациях по-



вышают активность ферментов (*активаторы*) или, напротив, снижают ее (*ингибиторы*). Регуляция активности ферментов ключевых ферментов происходит через *аллостерический центр*, который обычно удален от активного центра. Этот процесс происходит чаще всего по принципу обратной отрицательной связи, когда продукт реакции аллостерически подавляет активность фермента. Снижение активности фермента наблюдается и при конкуренции ингибитора с субстратом за активный центр фермента в случае их структурного сходства (*конкурентное ингибирование*). Это варианты обратимого ингибирования, при котором после удаления ингибитора активность фермента восстанавливается.

3.2.1. Выделение сахаразы дрожжей и определение оптимальной температуры действия

Скорость ферментативных реакций, как и неферментативных, увеличивается при повышении температуры. Но в связи с белковой природой ферментов повышение температуры может привести к их денатурации и снижению скорости реакции. Температура, при которой активность фермента наиболее высокая, является оптимальной для функционирования этого фермента. Для большинства ферментов оптимальная температура 30...36 °С, а при температуре выше 80 °С большинство ферментов теряют свою активность. Однако есть исключения – фермент папаин, ускоряющий гидролиз белка, имеет оптимальную температуру 80 °С. Температура ниже оптимальной обычно не приводит к инактивации ферментов, они лишь временно теряют свою активность, которая впоследствии восстанавливается. Но существуют ферменты, составляющие исключения, например, фермент каталаза имеет наивысшую активность при 0...10 °С.

Фермент сахараза (КФ 3.2.1.26, β -фруктофуранозидаза, инвертаза) относится к классу гидролаз, он вызывает гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу. Активность сахаразы можно определить по накоплению этих продуктов гидролиза, которые в отличие от сахарозы обладают восстанавливающими свойствами.

Материал: прессованные или сухие дрожжи.

Ход определения

1. Выделение фермента.

2 г прессованных или 0,5 г сухих дрожжей растирают в фарфоровой ступке в течение 20 мин с кварцевым песком и 5 мл фосфатного буфера, затем добавляют 20 мл буфера, нагретого до 60 °С, тщательно размешивают и



через 30 мин фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Фильтрование можно заменить центрифугированием (5 мин при 6000 об/мин).

2. Определение активности β -фруктофуранозидазы.

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 1 мл ферментной вытяжки. Пробирку № 4 кипятят на спиртовке. Добавляют во все пробирки по 5 мл 1 %-ного раствора сахарозы и перемешивают, после чего незамедлительно:

- пробирку № 1 немедленно погружают в снег или лед;
- пробирку № 2 оставляют при комнатной температуре;
- пробирки № 3 и № 4 ставят в водяную баню при 35 °С.

По истечении 15 мин инкубации во все пробирки приливают по 5 мл фелинговой жидкости и одновременно нагревают в кипящей водяной бане. В пробирках № 1, № 2 и № 3 выпадает красный осадок Cu_2O , в пробирке № 4 осадок отсутствует. Поясните, какая реакция протекает в пробирках № 1–3; почему она отсутствует в пробирке № 4.

По количеству и скорости образования осадка сделайте вывод о влиянии температуры на активность β -фруктофуранозидазы (табл. 15), укажите температурный оптимум.

Задание

Оценить влияние температурных условий на активность β -фруктофуранозидазы (табл. 15).

Таблица 15. Влияние температурных условий на активность β -фруктофуранозидазы

| № пробирки | Температура инкубации, °С | Количество осадка с реактивом Фелинга | Объяснение |
|------------|---------------------------|---------------------------------------|------------|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |

3.2.2. Специфичность действия уреазы

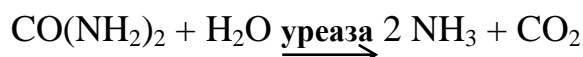
Специфичность – одно из замечательных свойств ферментов, обеспечивающее возможность координации сложнейших внутриклеточных процессов. Она проявляется в том, что каждый фермент способен каталитически ускорять только какой-либо один тип реакций или одну определенную реакцию, т.е. он может реагировать лишь с определенным соединением или с определенным классом соединений. Степень специфичности может быть:

- абсолютной (фермент действует только на одно вещество);



- абсолютной групповой (фермент действует на ряд соединений с общим типом строения);
- относительной групповой (фермент действует на определенный тип связи, не реагируя на структуру соединений, образующих эту связь);
- относительной (фермент действует только на один из оптических изомеров).

Уреаза (КФ 3.5.1.5) обладает абсолютной специфичностью, т.е. действует только на один субстрат – мочевины, разлагая её на аммиак и диоксид углерода:



Ацетамид ($\text{NH}_2\text{--CO--CH}_3$), несмотря на гомологичное с уреазой строение, не разлагается уреазой. Активная уреазы содержится в семенах сои.

Материал: соевая мука.

В одну пробирку (№ 1) наливают 5 мл 2 %-ного раствора мочевины, в другую (№ 2) – столько же 2 %-ного раствора ацетамида. В каждую из них добавляют по 1 г соевой муки, перемешивают и закрывают пробками. В пробирки под пробку подвешивают смоченную водой лакмусовую бумажку. Через несколько минут в пробирках по посинению лакмусовой бумажки определяют выделение аммиака. Если затем добавить в обе пробирки по 2–3 капли фенолфталеина, то в пробирке с действующей уреазой раствор покраснеет, указывая на подщелачивание среды аммиаком. Результаты записывают в табл. 16.

Задание

Определить специфичность действия уреазы, заполнить табл. 16.

Таблица 16. Специфичность действия уреазы

| Субстрат | Изменение цвета лакмусовой бумажки | Изменение цвета в пробирке с пробой с фенолфталеином | Объяснение |
|----------|------------------------------------|--|------------|
| Мочевина | | | |
| Ацетамид | | | |

3.2.3. Влияние pH на активность ферментов

Для большинства ферментов имеется определенное значение pH, при котором их активность максимальна. Понижение или повышение pH относительно оптимального значения для всех ферментов снижает их активность.

Активность фермента зависит от pH по двум причинам: 1) наличие в активном центре протоноакцепторных групп; 2) необходимость поддержания



общей структуры белка. Это объясняется тем, что ферменты имеют большое число полярных, положительно и отрицательно заряженных групп, участвующих в поддержании нативной конформации, образовании фермент-субстратного комплекса и проведении реакции.

Для изучения влияния pH на активность фермента используем солодовую амилазу или амилазу слюны. Определяя скорость гидролитического расщепления крахмала при различных значениях pH, можно определить то значение pH, при котором активность амилазы наиболее высокая.

Ход определения

В три пробирки вносят по 1 мл фосфатно-цитратного буфера с различным значением pH (пробирка № 1 – pH 5,6; № 2 – pH 6,8; № 3 – pH 7,8). Далее во все пробирки вносят по 1 мл раствора амилазы и после этого по 1 мл 0,5 %-ного раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают, включают секундомер, ставят в термостат с температурой 37 °С. Через 2...3 мин проводят капельную пробу с раствором йода, для чего из всех пробирок берут по одной капле инкубационной смеси, наносят на предметное стекло и добавляют по капле раствора йода. По интенсивности йод-крахмальной реакции делают вывод о глубине гидролиза крахмала. Повторяя пробы, наблюдают, как синяя окраска будет постепенно изменяться до фиолетовой, фиолетово-красной, красно-бурой и желтой, свидетельствующей о завершении гидролиза крахмала. Пробу с раствором йода можно проводить прямо в пробирках. Для этого через 5...10 мин в пробирки вносят 1 каплю раствора йода и наблюдают за окраской на границе между йодом и раствором.

Сравнивая окраску йод-крахмальной реакции в трех пробирках, отмечают, какое значение pH среды будет оптимальным для действия амилазы, результаты оформляют в табл. 17.

Задание

Определить оптимальный pH для действия амилазы (табл. 17).

Таблица 17. Оптимальный pH для действия амилазы

| № пробирки | pH | Окрашивание с йодом | Степень гидролиза крахмала |
|------------|----|------------------------|-------------------------------|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |



3.2.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Большое влияние на активность ферментов оказывают активаторы и ингибиторы – ионы металлов или органические вещества, иногда довольно сложного состава. В роли активаторов ферментов часто выступают различные микроэлементы и водорастворимые витамины – незаменимые факторы питания.

Активаторы и ингибиторы прямо или косвенно (аллостерически) влияют на активный центр фермента и изменяют его каталитическую активность. Активаторами часто служат ионы металлов I или II групп, некоторые анионы, трипептид глутатион и др. Ингибиторами могут быть соли тяжелых металлов, промежуточные или конечные продукты реакции, структурные аналоги субстратов, некоторые белки и другие вещества. Действие активаторов и ингибиторов можно наблюдать на примере активности амилазы.

Среди веществ, вызывающих торможение какого-либо фермента, большое значение имеют специфические ингибиторы, которые по характеру своего действия подразделяются на обратимые и необратимые. В свою очередь ингибиторы, вызывающие обратимое торможение, разделяют на конкурентные (конкурирующие с субстратом за активный центр фермента) и неконкурентные. Так, например, малонат является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. В качестве специфических ингибиторов выступают такие соединения, как антибиотики, гербициды, инсектициды и др.

Ход определения

В три пронумерованные пробирки вносят по 1 мл раствора амилазы соды или слюны.

Далее в каждую пробирку с амилазой добавляют по 1 мл фосфатно-цитратного буфера с pH, оптимальным для этого фермента (см. предыдущую работу):

- в пробирку № 1 добавляют 2 капли 1 %-ного раствора хлорида натрия;
- в пробирку № 2 – 2 капли 1 %-ного раствора сульфата меди;
- пробирка № 3 остается без изменений (контроль).

Затем во все три пробирки приливают по 0,5 мл 0,5 %-ного раствора крахмала, перемешивают и ставят пробирки на водяную баню с температурой 37 °С. Через 2...3 мин в каждую пробирку вносят по 1 капле раствора йода и наблюдают за окраской на границе йода и раствора. По результатам наблюдения устанавливают степень полноты гидролиза крахмала в разных вариантах опыта (относительно контроля) и делают вывод о характере влияния NaCl и CuSO₄ на активность амилазы (табл. 18).



Задание

Оценить действие активаторов и ингибиторов на активность амилазы и внести данные в табл. 18.

Таблица 18. Действие активаторов и ингибиторов на активность амилазы

| № пробирки | Окрашивание с йодом | Степень гидролиза крахмала | Характер влияния на активность амилазы |
|------------|---------------------|----------------------------|--|
| 1 | | | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |

3.3. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Особенностью ферментов как катализаторов является их чрезвычайно высокая каталитическая активность. Активность фермента обычно определяют по скорости убыли субстрата или по скорости накопления продуктов реакции.

За одну условную единицу фермента принимают то его количество, которое в стандартных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин (мкмоль/мин). На русском и немецком языках эту условную единицу обозначают *E*, на английском, французском, итальянском – *U*:

$$1E = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}}.$$

Например, при обработке 0,5 мл фермента субстрата, содержащего ксилан, разложилось 200 мкмоль ксилана за 20 мин. Это значит, что в 0,5 мл ферментного препарата содержится $\frac{200}{20} = 10E$ фермента. Это общая активность фермента, содержащегося в 0,5 мл. Общую активность фермента выражают также в расчете на единицу объема. В данном случае она будет равна $20 E/\text{мл} \left(\frac{10 E}{0,5 \text{ мл}} \right)$.

Часто бывает необходимо выражать активность фермента не в расчете на объем раствора, а на содержание белка в ферментном препарате. Так получают удельную активность, которая выражается в единицах фермента на 1 мг белка. Удельная активность – это отношение активности к массе очищенного фермента или к массе белка. Она выражается в кат/кг или E/мг. Например, если в 0,5 мл ферментного препарата содержится 5 мг белка, а общая активность 10 E, то удельная активность будет $2 E/\text{мг} \left(\frac{10 E}{5 \text{ мг}} \right)$.



Основной задачей при разработке метода определения ферментативной активности является выбор детектируемого сигнала, соответствующего либо образованию продукта, либо конверсии субстрата. При этом методы, позволяющие получить полную кинетическую кривую, точнее тех, что основаны на анализе одной конечной точки.

Скорость ферментативной реакции определяют по начальному линейному участку кривой, построенной при стандартных условиях (рН и температуре) в присутствии насыщающих концентраций субстратов.

3.3.1. Определение активности липазы

Гидролитический фермент липаза (КФ 3.1.1.3) широко распространен в тканях животных и растений. Особенно много его содержится в поджелудочной железе, семенах различных растений; также в значительных количествах его образуют плесневые грибы и некоторые бактерии.

Липаза расщепляет жиры (триацилглицериды) на глицерин и жирные кислоты по следующей схеме:



Полученные при этом жирные кислоты можно нейтрализовать щелочью. По количеству щелочи, пошедшей на титрование свободных жирных кислот, образующихся за определенный промежуток времени, судят об активности липазы.

Активность липазы оценивают по количеству щелочи, пошедшей на нейтрализацию жирных кислот, образующихся в результате расщепления субстрата (трибутирин, растительное масло). Одна из отличительных особенностей липазы заключается в действии фермента на поверхности раздела фаз, поэтому важным является эмульгирование жиров.

Материал: препарат липазы (например, Resinase A2X (Novozymes), растительное масло.



Ход определения

В две конические колбы на 100 мл наливают по 10 мл буфера с рН 6,8 и по 1 мл растительного масла, диспергируют. Ферментный препарат (например, Resinase A2X) предварительно разбавляют в мерной колбе в 100 раз. 1 мл разбавленного препарата кипятят в пробирке, охлаждают и вносят 0,1 мл инактивированного фермента в одну колбу с растительным маслом (контроль). В другую колбу (опытную) добавляют 0,1 мл активного разбавленного ферментного препарата и отмечают время начала инкубирования. Обе колбы помещают в термостат при 37 °С на 10 мин. По истечении инкубации содержимое колб титруют из микробюретки 0,1 н раствором NaOH с фенолфталеином.

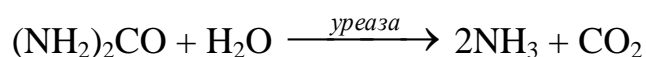
Активность липазы (Е) выражают в миллилитрах 0,1 н раствора щелочи, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за 1 мин в пересчете на 1 мл препарата по формуле

$$E = \frac{(V_1 - V_0)n}{v \cdot t},$$

где V_1 – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; V_0 – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; v – объем ферментного препарата, взятого на анализ; t – продолжительность инкубирования, мин; n – разведение ферментного препарата.

3.3.2. Определение активности уреазы

Фермент уреазы (КФ 3.5.1.5; карбамид-амидогидролаза) катализирует расщепление мочевины на аммиак и углекислоту по уравнению



Предлагаемый метод определения активности основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака.

Материал: препарат уреазы (3...5 г соевой муки растворяют в 50 мл 0,004 н HCl).

Ход определения

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения. Наливают в обе колбы по 5 мл 2 %-ного раствора мочевины и перемешивают. Ставят обе колбы на 1 ч в термостат при 37 °С, после чего добавляют по несколько капель рас-



твора метилового красного и титруют выделившийся аммиак 0,1 н раствором HCl, 1 мл которого соответствует 1,4 мг азота.

За единицу активности уреазы принимают такое количество фермента, которое за минуту при 37 °С и pH 7,0 образует из мочевины 1 мг азота аммиака. Расчет активности уреазы (А) производят по формуле

$$A = \frac{(V_1 - V_0)T \cdot 1,4 \cdot k}{v \cdot t},$$

где V_1 – количество 0,1 н раствора HCl, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; V_0 – количество 0,1 н раствора HCl, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; T – поправка к титру раствора HCl; t – продолжительность инкубации, мин; v – объем ферментного препарата, взятого на анализ, мл; k – коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г навески муки.

3.3.3. Определение активности трипсина

Трипсин относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах. Различают экзопептидазы, расщепляющие связи с С- или N-конца цепи (соответственно, карбоксипептидазы и аминопептидазы), и эндопептидазы (протеиназы), гидролизующие связи внутри пептидной цепочки (например, пепсин, химотрипсин, трипсин). Специфичность большинства протеолитических ферментов определяется в основном структурой аминокислотного остатка, расположенного рядом с расщепляемой связью. Трипсин гидролизует связи, образованные карбоксильной группой основных аминокислот (остатками лизина и аргинина).

Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в реакционной среде, где в качестве субстрата используется казеин. Активность по расщеплению казеина можно определить по количеству образовавшихся аминокислот – тирозина и триптофана, которые улавливают колориметрической реакцией с реактивом Фолина.

Материалы: 2 %-ный раствор казеина, 0,1 %-ный раствор трипсина.

Формольный метод. В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до температуры 35...37 °С и прибавляют 2 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования.

Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при температуре 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота.



Определение аминного азота методом формольного титрования. К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (не записывая объем). Затем в раствор добавляют 2 мл формольной смеси и вновь титруют 0,1 н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (записывая объем). Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – продолжительность инкубации.

Активность трипсина вычисляют по формуле, мкмоль/мин,

$$A = \frac{(V_1 - V_0)50}{10 \cdot t},$$

где V_0 и V_1 – объем раствора щелочи, пошедший на титрование 10 мл реакционной смеси в начале и в конце эксперимента, мл; 50 – объем казеина, взятый на анализ, мл; 10 – объем реакционной смеси, взятый на титрование, мл; t – продолжительность инкубации, мин.

Метод Лоури. За единицу протеолитической активности принята способность фермента превращать за 1 мин при температуре 30 °С казеинат натрия в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина.

В опытную пробирку наливают 2 мл раствора казеина и помещают в термостат при температуре 30 °С. Примерно через 10 мин в пробирку приливают 2 мл раствора трипсина (предварительно термостатированного при 30 °С 3...4 мин), пробирку встряхивают и оставляют на гидролиз ровно на 10 мин при температуре 30 °С. Через 10 мин добавляют по 4 мл 10 %-ного раствора ТХУ, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить белок и высокомолекулярные продукты гидролиза. Быстро перемешивают смесь и для обеспечения полного осаждения выдерживают пробирки со смесью при температуре 30 °С еще в течение 20 мин. Затем смесь фильтруют в сухие пробирки. Фильтрат должен быть совершенно прозрачен. Отбирают в пробирки с предварительно налитыми туда 5 мл 0,5 М раствора углекислого натрия по 1 мл фильтрата, перемешивают и быстро приливают по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. Дают реакционной смеси постоять 20 мин. После реакции растворы приобретают голубую окраску, интенсивность которой определяют на спектрофотометре при длине волны 656...670 нм против контроля.

Контрольный опыт готовят, прибавляя реактивы в обратной последовательности: для этого в контрольную пробирку наливают 2 мл ферментного раствора того же разведения, как и в опыте, добавляют 4 мл ТХУ, выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение 10 мин, а затем вносят



2 мл субстрата. Через 20 мин нахождения в термостате раствор фильтруют, отбирают 1 мл фильтрата в сухую пробирку с предварительно налитыми туда 5 мл раствора углекислого натрия, перемешивают и добавляют 1 мл рабочего раствора реактива Фолина.

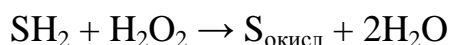
Протеолитическую активность вычисляют по формуле, ед/г,

$$\text{Активность} = \frac{D \cdot 4}{TЭ \cdot 10} k,$$

где D – оптическая плотность исследуемого раствора; 4 – отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ; ТЭ – тирозиновый эквивалент, определяемый по градуировочной прямой, мкмоль/мл (соответствует оптической плотности, которую бы дал 1 мкмоль тирозина в 1 мл стандартного раствора); 10 – продолжительность гидролиза субстрата, мин; k – коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г.

3.3.4. Определение активности пероксидазы

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) катализирует реакции окисления различных субстратов определенной химической природы (АБТС, бензидин, пирогаллол, гваякол, аскорбиновая кислота), перекись выполняет роль акцептора электронов:



В качестве субстрата используется АБТС (2.2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота), в результате окисления которого образуется соединение зеленого цвета, и оптическая плотность раствора при 414 нм увеличивается.

Ход определения

1. 0,25...2 г материала растирают в ступке с водой, доводят до 25 мл водой и настаивают 30 мин, затем фугуют. Фильтрат (вытяжку) используют для определения пероксидазной активности.

2. Для определения активности фермента берут стеклянную кювету толщиной 1 см, вносят следующие компоненты реакционной смеси: 0,70 мл 0,1 М фосфата калия, рН 6; 0,1 мл 20 мМ АБТС; 0,1 мл фермента.

Реакцию инициируют добавлением 0,1 мл 10 мМ H_2O_2 , перемешивают и одновременно включают секундомер и измеряют изменение экстинкции раствора в течение 45...60 с на спектрофотометре с помощью специальной кинетической программы. Регистрируют изменение поглощения при 414 нм, записывая значения оптической плотности через каждые 5...(20...60) секунд. Необходимо снять 5...10 точек.



3. С помощью программного обеспечения прибора или по экспериментальным данным проводится расчет начальной скорости реакции – тангенса угла наклона касательной к кинетической кривой в нулевой точке. Результаты представляют в виде графика, рассчитывают скорость нарастания оптической плотности $\Delta D_{414}/\Delta t$.

Если кинетическая кривая получается нелинейной, необходимо использовать большее разбавление ферментной вытяжки и для расчетов – начальный участок кривой.

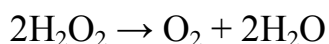
4. Расчет активности пероксидазы в относительных единицах на один грамм материала проводится по формуле

$$A = \frac{\Delta D \cdot V \cdot k}{t \cdot \varepsilon \cdot m},$$

где ΔD – изменение оптической плотности; V – общий объем полученной вытяжки, мл; k – конечное разведение фермента в кювете; t – продолжительность реакции, с; ε – коэффициент поглощения при 414 нм, равный $24,6 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; m – масса навески, г.

3.3.5. Определение активности каталазы

Каталаза (КФ 1.11.1.6) всегда присутствует в системах, где происходят процессы клеточного дыхания с участием флавиновых дегидрогеназ, в результате деятельности которых образуется токсичная для клетки перекись водорода, поэтому каталаза выполняет важную роль, разлагая токсичную для клеток перекись водорода:



О ходе реакции судят по изменению концентрации пероксида водорода в пробе спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм, максимуму поглощения H_2O_2 .

Ход определения

1. Навеску ткани 1...5 г растереть в охлажденной ступке в 5 мл экстракционного буфера. Гомогенат центрифугировать, пробы поместить в холодильник (4 °С).

2. Реакция проводится в кварцевой кювете, реакционная смесь содержит: 0,98 мл 10 мМ H_2O_2 ; 20 мкл экстракта. Активность каталазы определяют по уменьшению оптической плотности при длине волны 240 нм в течение 100 с.



3. Расчет активности каталазы в относительных единицах на один грамм сухого веса проводят по формуле

$$A = \frac{\Delta D \cdot V \cdot k}{t \cdot \varepsilon \cdot m},$$

где ΔD – изменение оптической плотности; V – общий объем полученной вытяжки, мл; k – конечное разведение фермента в кювете; t – время реакции, с; ε – коэффициент поглощения при 240 нм, равный $4 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹; m – масса навески, г.

3.3.6. Выделение α - и β -амилаз из солода и определение их активности

Солод как основное сырье для пива является источником получения экстрактивных веществ сусла и источником ферментов (амилолитических, протеолитических, цитолитических и др.), под действием которых нерастворимые вещества солода (крахмал, белки и пр.) переводятся в сусло. Пророщенные зерна ячменя пшеницы и других злаковых растений обладают высокой амилазной активностью.

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

α -амилаза (К.Ф. 3.2.1.1.) – систематическое название 1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза, старые названия – диастаза, гликогеназа, декстриногенамилаза. Этот фермент содержится в слюне, соке поджелудочной железы, плесневых грибах, проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя. α -амилаза катализирует без определенного порядка гидролиз внутренних 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, содержащих три и более остатков α -D-глюкозы. При действии α -амилазы на крахмал образуются главным образом декстрины небольшой молекулярной массы и незначительное количество мальтозы. α -амилаза чувствительна к подкислению (оптимум pH 5,6...6,3), но термостабильна (температурный оптимум 65 °C).

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



Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3.), или экзо-1,4- α -D-глюкозидаза, имеет систематическое название 1,4- α -D-глюкан-глюкогидролаза. Она гидролизует крахмал и продукты его деструкции до глюкозы. С помощью этого фермента получают из крахмала глюкозную патоку и кристаллическую глюкозу.

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

В солоде (проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя) содержатся активные α - и β -амилазы. Данный метод позволяет установить специфичность и активность совместного действия амилаз на крахмал. Наиболее эффективно гидролиз осуществляется под действием комплекса амилаз, содержащихся в вытяжке из солода.

Выделение α - и β -амилазы из солодовой водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и pH среды. При нагревании солодовой вытяжки до 70 °C β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. Оптимум действия β -амилазы проявляется при pH 4,8, однако α -амилаза при таких значениях pH теряет свою активность, а при понижении до pH 3,3 – денатурирует.

Действие амилаз на крахмал можно установить либо по убыли крахмала, либо по накоплению продуктов его распада. Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывают по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по окончании опыта нерасщепленным крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. При проведении опыта продолжительность инкубации и объем раствора ферментного препарата устанавливают такими, чтобы в опытных пробирках (содержащих фермент) не произошел полный гидролиз крахмала.

Ход определения

1. Получение солодовой вытяжки.

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

2. Выделение α -амилазы.

В пробирку вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике ножа порошок ацетата кальция и пробирку выдерживают в течение 15 мин на водяной бане, нагретой до 68 °C (в период



нагревания температура воды не должна подниматься выше 70 °С и опускаться ниже 66 °С). Затем содержимое пробирки охлаждают холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

3. Выделение β -амилазы.

В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл 0,1М раствора HCl. Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на снег или лед (можно в морозильную камеру холодильника). В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде к содержимому колбы добавляют 2 мл раствора 0,15 моль/л гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) для того, чтобы pH довести до 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

4. Определение амилалитической активности

а) Пробирки заполняют в соответствии с табл. 19. При этом можно проводить опыт по двум вариантам:

- варьировать объем солодовой вытяжки (от 0,02 до 0,5 мл) при одинаковой продолжительности инкубации (10...15 мин);
- при одинаковом объеме солодовой вытяжки (0,1 мл) снимать пробы через определенное время выдерживания.

Содержимое в пробирках перемешивают и ставят в термостат при 37 °С.

Таблица 19. Схема эксперимента

| Компоненты, мл | Пробирки | | | | | | | |
|----------------------------------|----------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Солодовая вытяжка (вариант 1) | – | 0,02 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | – | – |
| Солодовая вытяжка (вариант 2) | – | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | – | – |
| α -амилаза | – | – | – | – | – | – | 1 | – |
| β -амилаза | – | – | – | – | – | – | – | 1 |
| Вода | 1 | | | | | | – | – |
| Буфер, pH 5,5 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Крахмал, 2 % | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Продолжительность инкубации, мин | | | | | | | 10 | 10 |
| Оптическая плотность | | | | | | | | |

б) По окончании времени инкубации пробирки из термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 мл 1М HCl (для остановки реакции) и по 3 капли водного раствора йода; содержимое перемешивают.



Пробирки с содержимым, окрашенным в желтые тона, убирают. Пробирки с содержимым, окрашенным в синие, фиолетовые или красные тона, оставляют для дальнейшей работы (если после добавления раствора йода все пробирки с одним и тем же ферментным препаратом будут окрашены в желтый цвет, то опыт следует повторить, взяв этот ферментный препарат в меньшем количестве).

в) Берут мерные колбы вместимостью 50 мл, нумеруют их соответственно номерам оставленных для дальнейшей работы пробирок. В каждую колбу вносят 30...40 мл воды, 0,5 мл 1М НСl, 5–10 капель водного раствора йода и 0,5 мл смеси из пробирки в соответствии с номером колбы. Содержимое колбы доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют при 656 нм против воды.

г) Строят график изменения оптической плотности, характеризующий гидролиз крахмала, от времени инкубации или объема солодовой вытяжки (в зависимости от поставленной задачи). Для дальнейшего расчета используют данные кинетического определения расщепленного крахмала, определяя убыль только на прямолинейном участке.

д) Активность амилаз выражают в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин

$$A = \frac{(D_k - D_o)60 \cdot V}{E_k \cdot v \cdot t \cdot m},$$

где D_k и D_o – оптическая плотность контрольного и опытного растворов; 60 – масса взятого для анализа крахмала, мг (в 3 мл 2 %-ного раствора содержится 60 мг крахмала); V – общий объем солодовой вытяжки (100 мл); v – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, мл; t – продолжительность инкубации, мин; m – масса солода, взятого для приготовления солодовой вытяжки.

Рассчитывают суммарную активность амилаз солода (с использованием кинетических данных), а также активность α - и β -амилаз расчетным путем. При расчете активности β -амилазы необходимо учесть все разведения солодовой вытяжки, сделанные при выделении β -амилазы.

Делают выводы о сходимости результатов расчетного и кинетического способов определения активности.

3.3.7. Определение активности сычужного фермента

При промышленном использовании ферментных препаратов активность выражают в косвенных единицах активности, позволяющих рассчитать расход препарата. Например, сычужный фермент обладает способно-



стью свертывать молоко за счет сычужной коагуляции казеина и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при температуре 35 °С в течение 40 мин.

Материал: молоко сырое, 1 %-й раствор сычужного фермента.

Ход определения

В стакан наливают 50 мл молока и ставят в водяную баню с температурой 35 °С. Через 3...5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 %-ного раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана. Появление хлопьев и сгустка показывает начало свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, т.е. время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев.

Активность сычужного фермента вычисляют по формуле

$$A = \frac{v \cdot 40}{m \cdot n},$$

где A – активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.); v – количество взятого молока, мл; 40 – стандартное время свертывания молока, мин; m – масса сычужного фермента, взятого на анализ, г; n – продолжительность свертывания молока в эксперименте, мин.

3.3.8. Определение активности целлюлаз

Существует метод определения ферментативной активности целлюлазы с использованием субстрата хроматографической бумаги. Используемый метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся в результате гидролиза целлюлозы хроматографической бумаги «Ватман № 1» под действием ферментов целлюлолитического комплекса. За единицу целлюлолитической активности (1 FPU) принято количество ферментов, которое катализирует гидролиз целлюлозы хроматографической бумаги с образованием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 мин при температуре 50 °С и pH 4,8.

Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом Шомоди–Нельсона, и глюкозооксидазным методом на анализаторе глюкозы «Энзискан».



Ход определения

Полоски бумаги массой 50 мг помещают в эппендорфы на 2 мл и добавляют по 1 мл 0,05 М ацетатного буфера. Эппендорфы инкубируют в течение 10 мин в термостате при 50 °С, после чего добавляют по 0,5 мл прогретых до 50 °С растворов ферментного препарата различного разбавления и отмечают по секундомеру время начала реакции. Пробирки инкубируют при 50 °С в течение 1 ч, после чего определяют концентрацию восстанавливающих сахаров по Шомоди–Нельсону. Продолжительность гидролиза может быть увеличена, если предполагаемая активность фермента очень мала. При изменении продолжительности процесса необходимо учесть это в формуле расчета активности (продолжительность гидролиза). По окончании гидролиза реакцию останавливают, быстро нагревая пробирку до 100 °С.

Затем раствор в пробирке центрифугируют в течение 2 мин при 10000 об/мин, отбирают из нее 200 мкл гидролизата и перемещают в пробирку с 200 мкл реактива Шомоди. Пробирку плотно закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре 100 °С на 40 мин. После этого пробирку охлаждают до комнатной температуры, добавляют 200 мкл реактива Нельсона, встряхивают, выдерживают 10 мин, добавляют 400 мкл ацетона и 1000 мкл дистиллированной воды. Раствор в пробирке центрифугируют 2 мин при 10000 об/мин, переносят раствор из пробирки в 1-сантиметровую кювету 2-лучевого спектрофотометра и измеряют оптическую плотность раствора при 610 нм против кюветы с раствором «фона буфера».

Расчет активности (ФБ, FPU) проводится по формуле

$$\text{ФБ} = \frac{C \cdot \text{РФ} \cdot 1000}{180 \cdot 60 \cdot 0,33},$$

где C – концентрация восстанавливающих сахаров, мг/мл; РФ – разбавление фермента; 180 – молекулярная масса глюкозы; 60 – продолжительность гидролиза, мин; 0,33 – отношение количества фермента к объему раствора.

Задание

1. Определить активность липазы, трипсина, уреазы, пероксидазы, каталазы и других ферментов. Провести сравнительную характеристику методов определения ферментативной активности и способов выражения активности в виде табл. 20.



Таблица 20. Детектирование и метод определения ферментов

| Фермент | Катализируемая реакция | Метод детектирования (реакции, лежащие в основе определения) | Активность фермента, единицы измерения |
|---------|------------------------|--|--|
| | | | |

2. Определить активность амилаз солода.
3. Определить активность сычужного фермента.
4. Определить активность целлюлаз.

3.3.9. Определение амилазной (диастазной) активности мёда

Мёд является натуральным продуктом пчеловодства. Все натуральные мёды, которые хранятся с соблюдением необходимых условий, содержат ферменты. Одним из важнейших является амилаза, так как по ее количеству можно контролировать качество мёда. Диастаза (амилаза) является наиболее стойкой из всех ферментов мёда, поэтому ее присутствие даже в незначительных количествах указывает на нарушение условий переработки и хранения мёда.

Ход определения

Определение активности амилазы (диастазы) основано на способности этого фермента расщеплять крахмал, что определяют йодной реакцией. Показатель выражают амилазным (диастазным) числом (единицы Готе). Подготовка к испытанию включает приготовление раствора мёда массовой концентрации 100 г/л в пересчете на сухие вещества. Для этого предварительно проводят анализ влажности мёда.

Определение массовой доли воды в мёде можно проводить ареометром. Метод основан на свойстве водных растворов изменять плотность в зависимости от массовой доли мёда. В цилиндр на 100 мл наливают раствор мёда, приготовленный в соотношении мёд : вода как 1 : 2, и термометром определяют температуру раствора. Если температура раствора выше 25 °С или ниже 15 °С, раствор охлаждают или нагревают. Затем в цилиндр опускают ареометр (рекомендуется начать с ареометра со шкалой от 1,080 до 1,160), исключая его соприкосновение со стенками. Через 10...15 с учитывают показания ареометра и по табл. 21 находят величину массовой доли воды в мёде.

Затем готовят раствор мёда массовой концентрацией 100 г/л в пересчете на сухие вещества. Для этого рассчитывают, какой объем раствора мёда необходим для выполнения анализа.



Таблица 21. Содержание массовой доли воды в мёде

| Плотность, г/см ³ | Температура, градусы С | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1,099 | 28,92 | 28,79 | 28,66 | 28,53 | 28,40 | 28,27 | 28,14 | 28,01 | 27,88 | 27,75 | 27,62 |
| 1,100 | 28,26 | 28,13 | 28,00 | 27,87 | 27,74 | 27,61 | 27,48 | 27,35 | 27,22 | 27,09 | 26,96 |
| 1,101 | 27,63 | 27,50 | 27,37 | 27,24 | 27,11 | 26,98 | 26,85 | 26,72 | 26,59 | 26,46 | 26,33 |
| 1,102 | 26,97 | 26,84 | 26,71 | 26,58 | 26,45 | 26,32 | 26,19 | 26,06 | 25,93 | 25,80 | 25,67 |
| 1,103 | 26,31 | 26,18 | 26,05 | 25,92 | 25,79 | 25,66 | 25,53 | 25,40 | 25,27 | 25,14 | 25,01 |
| 1,104 | 25,68 | 25,55 | 25,42 | 25,29 | 25,16 | 25,03 | 24,90 | 24,77 | 24,64 | 24,51 | 24,38 |
| 1,105 | 25,02 | 24,89 | 24,76 | 24,63 | 24,50 | 24,37 | 24,24 | 24,11 | 23,98 | 23,85 | 23,72 |
| 1,106 | 24,39 | 24,26 | 24,13 | 24,00 | 23,87 | 23,74 | 23,61 | 23,48 | 23,35 | 23,22 | 23,09 |
| 1,107 | 23,73 | 23,60 | 23,47 | 23,34 | 23,21 | 23,08 | 22,95 | 22,82 | 22,69 | 22,56 | 22,43 |
| 1,108 | 23,10 | 22,97 | 22,84 | 22,71 | 22,58 | 22,45 | 22,32 | 22,19 | 22,06 | 21,93 | 21,80 |
| 1,109 | 22,44 | 22,31 | 22,18 | 22,05 | 21,92 | 21,79 | 21,66 | 21,53 | 21,40 | 21,27 | 21,14 |
| 1,110 | 21,81 | 21,68 | 21,55 | 21,42 | 21,29 | 21,16 | 21,03 | 20,90 | 20,77 | 20,64 | 20,51 |
| 1,111 | 21,15 | 21,02 | 20,89 | 20,76 | 20,63 | 20,50 | 20,37 | 20,24 | 20,11 | 19,98 | 19,85 |
| 1,112 | 20,51 | 20,39 | 20,26 | 20,13 | 20,00 | 19,87 | 19,74 | 19,61 | 19,48 | 19,35 | 19,22 |
| 1,113 | 19,89 | 19,76 | 19,63 | 19,50 | 19,37 | 19,24 | 19,11 | 18,98 | 18,85 | 18,72 | 18,59 |
| 1,114 | 19,26 | 19,13 | 19,00 | 18,87 | 18,74 | 18,61 | 18,48 | 18,35 | 18,22 | 18,09 | 17,96 |
| 1,115 | 18,60 | 18,47 | 18,34 | 18,21 | 18,08 | 17,95 | 17,82 | 17,69 | 17,56 | 17,43 | 17,30 |
| 1,119 | 16,08 | 15,95 | 15,82 | 15,69 | 15,56 | 15,43 | 15,30 | 15,17 | 15,04 | 14,91 | 14,78 |
| 1,120 | 15,45 | 15,32 | 15,19 | 15,06 | 14,93 | 14,80 | 14,67 | 14,54 | 14,41 | 14,28 | 14,15 |
| 1,121 | 14,82 | 14,69 | 14,56 | 14,43 | 14,30 | 14,17 | 14,04 | 13,91 | 13,78 | 13,65 | 13,52 |
| 1,122 | 14,19 | 14,06 | 13,93 | 13,80 | 13,67 | 13,54 | 13,41 | 13,28 | 13,15 | 13,02 | 12,89 |
| 1,123 | 13,56 | 13,43 | 13,30 | 13,17 | 13,04 | 12,91 | 12,78 | 12,65 | 12,52 | 12,39 | 12,26 |

Для проведения анализа в десять пробирок разливают раствор мёда и другие компоненты реакционной смеси согласно табл. 22.

Пробирки закрывают пробками, тщательно перемешивают содержимое, помещают в водяную баню на 1 ч при $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$. По истечении 1 ч пробирки вынимают из водяной бани, охлаждают под струей воды до комнатной температуры, после чего в каждую пробирку вносят по одной капле раствора йода.

Оценка результатов: первая пробирка слева, в которой образуется желтоватая окраска, соответствует амилазной (диастазной) активности в исследуемом мёде.

Определение предельного амилазного (диастазного) числа: предельным амилазным (диастазным) числом называется минимальная установленная амилазная (диастазная) активность. При исследовании белоакациевого, липового, подсолнечникового, хлопчатникового мёдов определение ведут по пробирке № 10 таблицы, остальных видов – по пробирке № 7.



Таблица 22. Схема определения амилазной (диастазной) активности мёда

| Компонент реакционной смеси | Номер пробирки | | | | | | | | | |
|---|----------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Раствор мёда (массовая концентрация 100 г/л), мл | 1,0 | 1,3 | 1,7 | 2,1 | 2,8 | 3,6 | 5,0 | 6,0 | 7,1 | 10 |
| Дистиллированная вода, мл | 9,0 | 8,7 | 8,3 | 7,9 | 7,2 | 6,4 | 5,0 | 4,0 | 2,9 | – |
| Раствор NaCl (массовая концентрация 5,8 г/л), мл | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Раствор крахмала (массовая концентрация 10 г/л), мл | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Ед. Готе | 50,0 | 38,0 | 29,4 | 23,8 | 17,9 | 13,9 | 10,0 | 8,0 | 7,0 | 5,0 |

Задание

1. Определить массовую долю воды в мёде при помощи ареометра.
2. Определить амилазную (диастазную) активность мёда.

Контрольные вопросы по теме «Ферменты»

1. На чем основана биохимическая классификация ферментов?
2. Кратко опишите строение молекулы и механизм действия ферментов.
3. Перечислите основные свойства ферментов.
4. Назовите и охарактеризуйте ферменты класса гидролаз.
5. Назовите и охарактеризуйте ферменты класса оксидоредуктаз.
6. Охарактеризуйте аллостерические (ключевые) ферменты и их роль в регуляции процессов метаболизма.
7. Назовите типы ингибирования и их примеры.
8. В каких единицах выражается активность ферментов? Дайте определение международной единице активности ферментов.
9. Укажите принципы и методы определения активности ферментов, использованных в работе.
10. Назовите условия проведения ферментативного анализа.
11. Назовите принцип колориметрического метода определения активности амилаз. Что положено в основу?



4. Липиды

Липиды представляют собой обширную группу соединений, существенно различающихся по своей химической структуре и функциям. Липиды характеризуются следующими признаками: нерастворимостью в воде; растворимостью в неполярных растворителях (эфир, хлороформ, бензол); содержанием высших алкильных радикалов; распространенностью в живых организмах. К липидам относятся жиры (триглицериды), воски, фосфолипиды, гликолипиды, стеролы и стериды, терпены.

Обязательным компонентом липидов являются **высшие жирные кислоты (ВЖК)** (рис. 17). Среди них преобладают монокарбоновые, содержащие чаще четное число атомов углерода – от 8 до 24, большей частью они представлены кислотами, имеющими C_{16} и C_{18} (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая). Нумерацию углеродных атомов в жирно-кислотной цепи начинают с атома углерода карбоксильной группы. Входящие в состав триглицеридов жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными (с двойными связями). Количество и положение двойных связей в ненасыщенных ВЖК часто обозначают с помощью цифровых символов, например: олеиновую кислоту 18 : 1(9), линолевую кислоту 18 : 2 (9, 12), где первая цифра – число углеродных атомов, вторая – число двойных связей, в скобках – номера ближайших к карбоксилу С-атомов, вовлеченных в образование двойной связи.

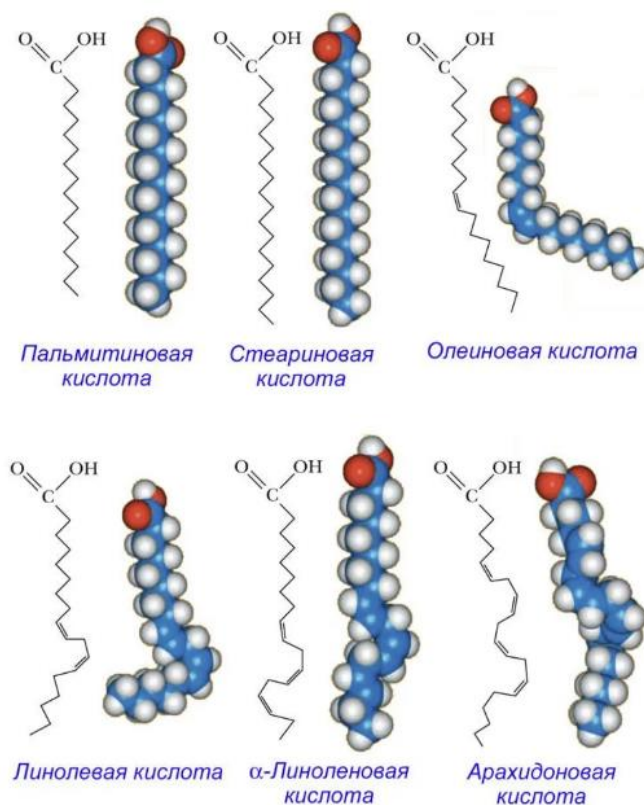
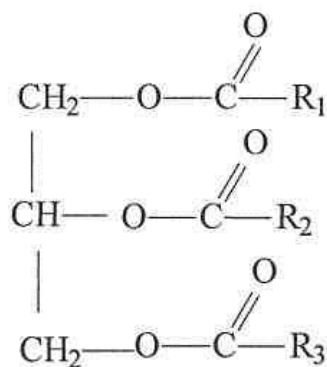


Рис. 17. Строение высших жирных кислот

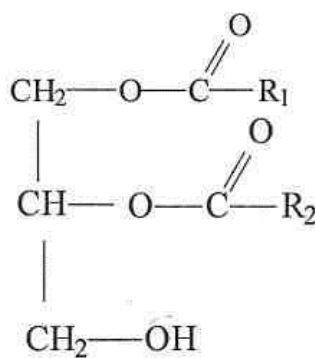


В зависимости от состава и строения липиды разделяются на простые и сложные. Простые липиды – двухкомпонентные вещества, представляют собой сложные эфиры высших жирных кислот с различными спиртами: глицериды и воски. Глицериды (ацилглицеролы, или *жиры*) – сложные эфиры высших жирных кислот и трехатомного спирта глицерина; *воски* – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов; *стериды* – сложные эфиры высших жирных кислот и полициклических спиртов – стеролов.

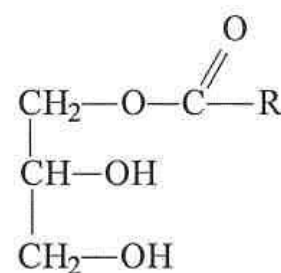
Нейтральные жиры – наиболее распространенная группа липидов в природе, играет запасующую и энергетическую роль в растениях и животных:



триглицерид



диглицерид



моноглицерид

($\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ – радикалы жирных кислот)

Если все три кислотных радикала принадлежат одной и той же кислоте, то такие триглицериды называют простыми (например, трипальмитин, триолеин и т.д.), если разным – смешанными (например, 1-олео-2-пальмитостеарин).

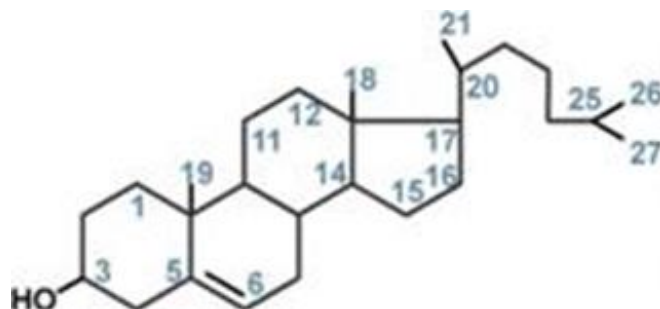
Жирнокислотный состав триглицеридов различен. Так, для жиров, имеющих высокую температуру плавления и твёрдую консистенцию, характерно преобладание остатков насыщенных ВЖК (животные жиры, масло какао). Растительные масла содержат в основном ненасыщенные кислоты, при этом их ценность зависит от содержания полиненасыщенных ВЖК.

Химические свойства жиров проявляются в их способности к омылению, прогорканию, высыханию и гидрогенизации.

Сложные липиды – это многокомпонентные молекулы, содержащие остатки ВЖК, спирта и дополнительного компонента (фосфолипиды, гликолипиды). **Фосфолипиды** – липиды, содержащие, помимо жирных кислот и спирта, остаток фосфорной кислоты. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты. Общий структурный фрагмент фосфолипидов – фосфатидная кислота. **Гликолипиды** в составе молекулы содержат углеводные остатки, фосфорная кислота в них отсутствует.



Стероиды – группа биологически важных природных соединений, в структуру которых входит полициклический углеводород, образованный гидрированным фенантреном (кольца А, В и С) и циклопентаном (кольцо D):



4.1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЖИРОВ

Материалы: растительное масло, семена льна или подсолнечника.

Растворение жира. В четыре пробирки наливают по 2 мл воды, спирта, ацетона или бензина, добавляют по 0,5 мл масла и перемешивают. Что происходит при встряхивании пробирок? В какой жидкости жиры лучше растворяются?

Затем несколько капель раствора жира в спирте и бензине наносят на фильтровальную бумагу. Что наблюдается после испарения растворителя?

На основании этих качественных реакций сделайте вывод, какой реагент является лучшим растворителем для вашего материала исследования.

Получение эмульсии жира. В пробирку вносят 2...3 мл воды, приливают 0,5 мл масла, 3–5 капель 1 %-ного раствора Na_2CO_3 , содержимое пробирки взбалтывают. Образуется стойкая эмульсия за счет частичного образования мыла, являющегося хорошим эмульгатором.

Определение непереносимости жира. В свободных и связанных с глицерином жирных кислотах некоторых жиров, в особенности растительных масел, имеются ненасыщенные связи, благодаря которым жиры способны присоединять галоиды.

В пробирку вносят 0,5...1 г масла, приливают 0,5...1 мл бромной воды и тщательно взбалтывают. Объясните наблюдения.

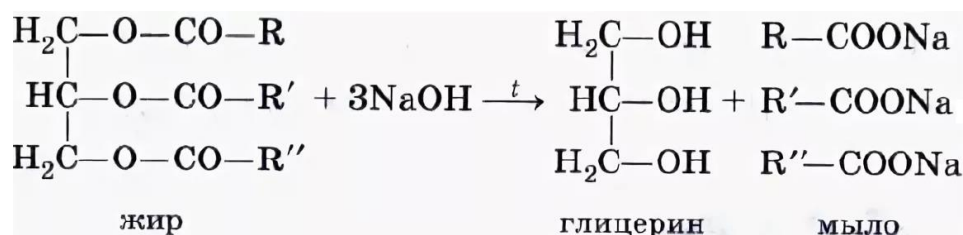
Экстрагирование жиров. Растворимостью жиров в органических растворителях пользуются для извлечения масел из семян. В фарфоровой ступке измельчают около 1 г сухих семян льна или подсолнечника, помещают их в широкую пробирку, добавляют 3...4 мл бензина, дихлорэтана или четы-



рехлористого углерода и закрывают пробкой с длинной прямой стеклянной трубкой в качестве воздушного холодильника.

Пробирку помещают в кипящую водяную баню и время от времени встряхивают смесь. Через 7...8 мин разбирают прибор, небольшое количество раствора переносят на часовое стекло и ждут испарения растворителя. Объясните наблюдения

Получение мыла. В пробирку помещают 1 мл касторового масла, 1 мл этанола и 1 мл 30 %-ного раствора гидроксида натрия. Содержимое энергично перемешивают стеклянной палочкой. Через 1...2 мин появляется твердое мыло:



Очищающие (моющие) свойства мыла связаны с определенными особенностями строения молекул щелочных солей высших карбоновых кислот. Каждая такая молекула имеет два фрагмента: небольшую полярную (гидрофильную) головку и крупный неполярный (гидрофобный) углеродный хвост. Например, в процессе стирки молекулы мыла гидрофобными концами проникают в частицы жирового загрязнения на поверхности ткани (рис. 18), в то время как гидрофильные головки остаются в водной фазе (а), что приводит к изменению этих частиц и превращению их в более мелкие мицеллы (б), растворимые в воде. Мицеллы не могут сливаться друг с другом, т.к. благодаря гидрофильным головкам, обращенным к воде, имеют одноименные заряды. Удаление мицелл с загрязненной поверхности достигается ее промыванием водой.

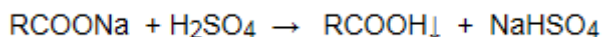


Рис. 18. Механизм удаления жирового загрязнения с помощью мыла

Гидролиз мыла. В пробирку вносят немного мыла, полученного в предыдущем опыте, и добавляют 1 каплю спиртового раствора фенолфталеина. Покраснение раствора не происходит, т.к. сваренное мыло является смесью солей высших жирных кислот и не содержит свободной щелочи. Затем в ту же пробирку вносят 5...10 капель воды. Раствор окрашивается в малиновый цвет:



Выделение жирных кислот из мыла. В пробирку вносят немного мыла, полученного в предыдущем опыте, 2 мл воды и добавляют 1 каплю 2 н раствора серной кислоты. Сразу же выпадает хлопьевидный осадок свободных жирных кислот, главным образом пальмитиновой и стеариновой:



4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕХНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЖИРОВ

4.2.1. Определение кислотного числа жира

Кислотным числом называется количество мг КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла. Это очень важный показатель качества природного жира, так как увеличение кислотного числа при хранении свидетельствует о происходящем в нем гидролизе. Так, при кислотном числе более 1,5 мг КОН/г растительное масло считается прогоркшим, несвежим.

Материал: растительное масло.

В колбу помещают 3...5 г масла, растворяют его в 10...15 мл смеси спирт-эфир (1:1), добавляют 2–3 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором КОН до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5 мин. Кислотное число (к.ч.) рассчитывают по формуле

$$\text{К.ч.} = \frac{AK \cdot 5,6}{B},$$

где A – количество 0,1 н спиртового раствора КОН, пошедшее на титрование взятой навески, мл; K – поправка к титру КОН; B – навеска масла, г; 5,6 – количество мг КОН, содержащееся в 1 мл 0,1 н раствора.

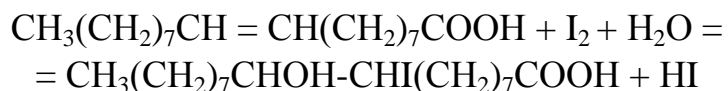
Проведите анализ, сделайте вывод о качестве исследованного масла.

4.2.2. Определение йодного числа жира

Йодным числом называется количество граммов йода, связываемое 100 г жира. Йодное число характеризует ненасыщенность жиров, так как присо-



единение йода происходит по месту двойных связей ненасыщенных жирных кислот. Например, олеиновая кислота вступает в реакцию с йодом по следующему уравнению:



В коническую колбу вместимостью 500 мл отвешивают 0,1...0,2 г жира. Затем в колбу приливают 40 мл 96 %-ного этилового спирта и на водяной бане с температурой 40...50 °С (колбу пробкой не закрывать!) при перемешивании растворяют жир. После растворения жира колбу вынимают из бани, охлаждают, к раствору жира приливают пипеткой 25 мл 0,2 н спиртового раствора йода, хорошо взбалтывают и затем добавляют 200 мл дистиллированной воды. Колбу плотно закрывают пробкой. Раствор сильно взбалтывают и оставляют в покое ровно на 5 мин, после чего избыток йода оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия. Для связывания избытка йода титрование необходимо вести быстро, для чего сначала раствор тиосульфата натрия вливают струей до появления желтого окрашивания. Затем, прибавив 0,5 мл раствора крахмала, титруют по каплям до обесцвечивания раствора.

Наряду с этим проводят контрольное титрование пробы без жира, т.е. в коническую колбу отмеривают 25 мл спиртового раствора йода, 40 мл спирта, 200 мл воды и через 5 мин титруют раствором тиосульфата натрия. По разности между контрольным и опытным титрованием рассчитывают йодное число (й.ч.) по формуле

$$\text{Й.ч.} = \frac{(V_1 - V_2)0,0127 \cdot 100}{n},$$

где V_1 – количество тиосульфата натрия, пошедшее на титрование контрольного варианта, мл; V_2 – количество тиосульфата натрия, пошедшее на титрование опытного варианта, мл; 0,0127 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата натрия, г; n – навеска масла, г.

4.2.3. Определение числа омыления и эфирного числа

Омылением называется гидролиз нейтральных жиров щелочами. *Числом омыления* называется количество мг КОН, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира, как свободных, так и входящих в состав триглицеридов. *Эфирным числом* называется количество мг КОН, необходимое для нейтрализации жирных кислот, которые отщепляются при омылении триглицеридов, содержащихся в 1 г жира.

Определение числа омыления. В колбу помещают около 1 г масла (с точностью до 0,0002 г; опыт), вливают 20 мл 0,5 н спиртового раствора



КОН. Колбу соединяют с обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 40...50 мин. Затем колбу отделяют от холодильника, охлаждают, добавляют в нее 2 капли раствора фенолфталеина, 10 мл воды, перемешивают и титруют из бюретки 0,5 н раствором HCl до исчезновения окраски. То же самое проделывают с контрольной колбой, в которой масло заменено 1 мл воды. По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления (Ч.о.):

$$\text{Ч.о.} = \frac{(V_1 - V_2)28}{n},$$

где V_1 – количество 0,5 н раствора HCl, пошедшее на контрольное титрование, мл;
 V_2 – количество 0,5 н раствора HCl, пошедшее на опытное титрование, мл;
 n – навеска масла, г; 28 – количество мг КОН, содержащееся в 1 мл 0,5 н раствора.

Определение эфирного числа. Эфирное число жира рассчитывают путем вычитания из числа омыления величины кислотного числа.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ СЫРОГО ЖИРА В АППАРАТЕ Э-8

Сущность метода заключается в многократном экстрагировании материала экстрагентом, выпаривании экстракта, сушке и взвешивании остатка извлеченного жира. При экстракции извлекаются не только собственно жиры, но и фосфолипиды, пигменты, воски и др. липиды. Поэтому остаток после удаления растворителя называется сырым жиром.

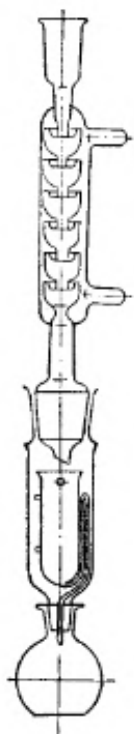
В качестве растворителя чаще всего применяют серный (этиловый) эфир, имеющий самую низкую температуру кипения (около 35 °С), тетрахлоруглерод, этиловый спирт, ацетон или их смеси. Выбор растворителя определяется характеристикой липидного комплекса анализируемого материала: для зерна и продуктов его переработки, а также мясосодержащих продуктов – эфир или гексан. Полнота извлечения зависит от тонкости помола, предварительного высушивания перед экстракцией.

Материалы: измельченное зерно, органические растворители (диэтиловый эфир, этанол, ацетон).

Ход определения

Сырой жир извлекают в аппарате Э-8 (рис. 19), состоящем из экстрактора, приемной колбы и обратного холодильника. Все части прибора плотно с помощью шлифа присоединяются один к другому.





Колбу аппарата, предварительно доведенную до постоянной массы при температуре 105°C , присоединяют к холодильнику и во внутренний стакан наливают растворитель (в количестве в 2–2,5 раза превышающем объем, т.е. примерно двойного-тройного слива).

Навеску тонко размолотого материала (8...10 г) пересыпают в полотняный мешочек. Мешочек неплотно вкладывают во внутренний сосуд экстрактора (диаметр заполненного мешочка должен быть несколько меньше внутреннего диаметра экстрактора, а по высоте он должен размещаться чуть ниже верхнего нагиба сифонной трубки). Присоединяют холодильник и перегонную колбочку, закрепляют в держателе, погрузив её неглубоко в электрическую водяную или песчаную баню.

Рис. 19. Конструкция аппарата Э-8 для экстракции жира

Пустив охлаждающую воду в холодильник, колбочку с растворителем нагревают до кипения. Пары растворителя, пройдя по широкой трубке экстрактора, конденсируются в холодильнике и в виде капель стекают во внутренний стакан экстрактора. Когда уровень эфира поднимется выше верхнего колена сифонной трубки, экстракт с растворенными в нем жирами через сифон стечет в колбу. Вновь нагреваясь в колбе, эфир превращается в пар и поднимается в холодильник, а жир остается в колбе. Таким образом, одним и тем же небольшим количеством растворителя путем многократной экстракции можно перевести в приемную колбу весь жир, содержащийся в навеске.

Чтобы избежать улетучивания паров растворителя через холодильник, растворитель не должен сильно кипеть. Работу прибора следует регулировать таким образом, чтобы сливание растворителя по сифонной трубке происходило 7–10 раз в течение часа. При нормальном действии аппарата экстрагирование достаточно вести в течение 2...3 ч или продолжать до 4...6 ч (в зависимости от содержания жира в материале). По окончании экстрагирования растворителю дают последний раз стечь из экстрактора, прекращают нагревание и разъединяют прибор.

Вынув и отжав мешочек с обезжиренным образцом, в этом же аппарате проводят отгонку растворителя, периодически разбирая прибор и аккуратно сливая растворитель через боковую сифонную трубку. Колбочку с остатком жира на дне доводят до постоянной массы в сушильном шкафу и рассчитывают содержание жира в материале по формуле, %,



$$X = \frac{(m_2 - m_1)100}{m(100 - W)} \cdot 100,$$

где m_1 – масса пустой колбы до экстракции, г; m_2 – масса колбы с жиром после экстракции, г; m – масса навески, взятой на анализ, г; W – влажность продукта, %.

Задание

1. Изучить физико-химические свойства растительных масел, наблюдения и выводы оформить в виде табл. 23.

Таблица 23. Сводные результаты исследования растительных масел и животных жиров

| Название реакции | Исследуемый материал | Реагент | Наблюдения в пробирке / На фильтровальной бумаге | Вывод |
|----------------------------------|----------------------|--------------|--|-------|
| Растворение жира | | Вода | | |
| | | Спирт | | |
| | | Ацетон | | |
| | | Бензин | | |
| Определение непереносимости жира | | Бромная вода | | |
| Экстрагирование жиров | | | | |

2. Определить технические числа растительных масел: кислотное, йодное, число омыления, эфирное число. Сравнить различные виды и образцы растительных масел, сделать вывод о свежести и биологической ценности.

3. Определить содержание сырого жира в исследуемом материале, сравнить со справочными данными.

Контрольные вопросы по теме «Липиды»

1. Напишите реакцию омыления.
2. Почему реакция водных растворов мыла всегда щелочная?
3. На чем основано выделение свободных жирных кислот из мыла?
4. На чем основано удаление жировых загрязнений с поверхности материала с помощью мыла?
5. Назовите общие свойства, присущие всем липидам.
6. На какие классы и по какому принципу классифицируются липиды?
7. Какие спирты встречаются в составе различных липидов?
8. Каковы различия между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами? Приведите примеры предельных и непредельных жирных кислот, входящих в состав липидов, и их формулы.



9. Напишите структурные формулы трипальмитина и пальмитостеароолеина. Какие триацилглицеролы входят в группу простых, а какие – в группу смешанных триацилглицеролов?

10. Какими свойствами будет обладать жир, содержащий преимущественно предельные (насыщенные) и непредельные (ненасыщенные) жирные кислоты соответственно?

11. Рассчитайте энергетический выход при полном β -окислении стеариновой кислоты.

12. Объясните принцип определения йодного и кислотного числа жира.

13. На чем основано количественное определение жира в продуктах питания?



5. НУКЛЕОПРОТЕИНЫ. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеопротеины – сложные комплексные соединения, состоящие из нуклеиновой кислоты и белкового компонента. Апопротеинами нуклеопротеинов служат основные белки гистоны и протамины, иногда негистоновые белки.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные биополимеры, мономерами которых являются нуклеотиды. Нуклеиновые кислоты выполняют важнейшие функции в молекулярных механизмах хранения и передачи генетической информации в живых организмах.

В состав нуклеотида входят пуриновое (аденин или гуанин) или пиримидиновое (тимин, цитозин или урацил) основание, присоединенное N-гликозидной связью к углеводу, пентоза и фосфорная кислота, соединенная сложноэфирной связью с C₅ пентозного остатка. В зависимости от углеводного компонента (β-D-рибоза или β-D-2-дезоксирибоза) различают рибонуклеиновую и дезоксирибонуклеиновую кислоты (РНК и ДНК). В свою очередь, в зависимости от функционального значения, молекулярной массы и локализации в клетке РНК делят на несколько видов (транспортные РНК, рибосомальные РНК, информационные РНК).

Для изучения химического состава нуклеиновых кислот проводят кислотный гидролиз дрожжей, богатых нуклеопротеинами, и в полученном гидролизате выявляют компоненты этих кислот при помощи качественных реакций.

Материал: дрожжи сухие.

Ход определения

1. Кислотный гидролиз.

В коническую колбу на 100 мл вносят 1 г сухих дрожжей, добавляют 20 мл 10 %-ного раствора H₂SO₄ и 20 мл дистиллированной воды. Колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают до кипения и кипятят в течение 40...60 мин. После чего содержимое колбы охлаждают, отфильтровывают или центрифугируют 5 мин при 6000 об/мин. С фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

2. Качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

2.1. Качественная реакция на белки.

Для проведения биуретовой реакции на белки в пробирку вносят 5 капель гидролизата дрожжей, нейтрализуют по лакмусу 10 %-ным раствором NaOH, прибавляют 1 каплю 1 %-ного раствора CuSO₄. Жидкость окрашивается в розовый цвет.



2.2. Качественная реакция на пентозы.

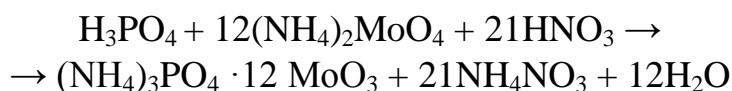
В пробирку вносят 0,5 мл нейтрализованного щелочью гидролизата, добавляют 2 капли 1 %-ного спиртового раствора тимола, перемешивают и осторожно подслаивают равный объем концентрированной серной кислоты. На дне пробирки образуется красное окрашивание в результате конденсации тимола с фурфуролом, получившимся из пентозы.

2.3. Серебряная проба на пуриновые основания.

К 1 мл гидролизата дрожжей приливают 2 капли концентрированного раствора аммиака и 5 капель 1 %-ного раствора нитрата серебра. Через 3...5 мин выпадает бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

2.4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

В пробирку вносят 1 мл гидролизата дрожжей, прибавляют 5 капель молибденового реактива. Содержимое пробирки осторожно кипятят несколько минут. Развивается лимонно-желтая окраска жидкости вследствие образования фосфорномолибденовокислого аммония по реакции:



Задание

Провести гидролиз нуклеопротеинов и качественные реакции на их составные части в гидролизате. По результатам работы заполнить табл. 24.

Таблица 24. Результаты гидролиза нуклеопротеинов дрожжей и качественных реакций на составные части нуклеиновых кислот

| Название реакции | Исследуемый материал | Реакция | Наблюдения | Вывод |
|------------------|----------------------|---------|------------|-------|
| | | | | |

Контрольные вопросы по теме «Нуклеиновые кислоты»

1. Дайте определение нуклеотиду. Укажите составные части и участвующие связи на примере АМФ.
2. Перечислите отличия ДНК и РНК.
3. Охарактеризуйте структурную организацию ДНК.
4. Как соединяются между собой моноклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот? Изобразите структурную формулу участка фрагмент ДНК ...А-Т-Г-Ц...
5. Что тяжелее: белок или ген? Во сколько раз?
6. Фрагмент молекулы белка содержит N-A-M-V. Определите:
 - а) структуру участка молекулы ДНК, кодирующего эту последовательность;
 - б) количество (в %) различных видов нуклеотидов в этом участке гена (в 2 цепях)
 - в) длину этого участка гена.



6. ВИТАМИНЫ

Витамины – низкомолекулярные органические соединения разнообразного строения, необходимые для поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Многие водорастворимые витамины входят в состав коферментных групп различных ферментов, обеспечивая таким образом нормальное течение биохимических процессов в организме. В большинстве случаев витамины не синтезируются гетеротрофными организмами, поэтому недостаток или отсутствие витаминов в пище приводит к различным заболеваниям. Несмотря на точное установление химического строения молекул, витамины сохранили названия в виде букв латинского алфавита, отражающие хронологическую последовательность их выделения.

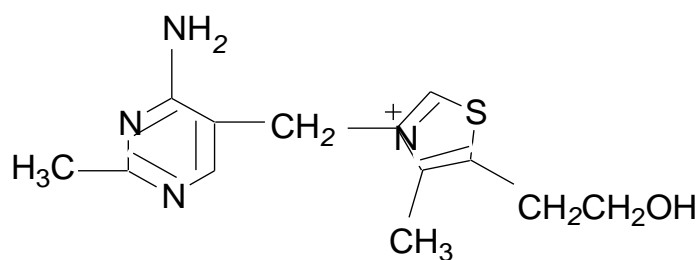
Среди витаминов выделены две большие группы: водорастворимые и жирорастворимые. К жирорастворимым относятся витамины группы А, D, Е, К, а к водорастворимым – витамины группы В, а также витамины С и Р.

6.1. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Материалы: 0,01 %-ный раствор тиамина; 0,025 %-ный раствор витамина В₂; витамин В₆; никотиновая кислота (в порошке); витамин В₁₂ (в ампулах); клубни картофеля, капуста.

Качественная реакция на витамин В₁. Витамин В₁ является предшественником тиаминпирофосфата, выполняющего функцию кофермента ферментов, катализирующих декарбоксилирование кетокислот.

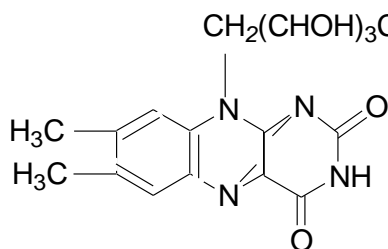
В молекуле витамина наряду с аминогруппой содержится атом серы, поэтому ему дано химическое название **тиамин** (от греч. *тион* – сера):



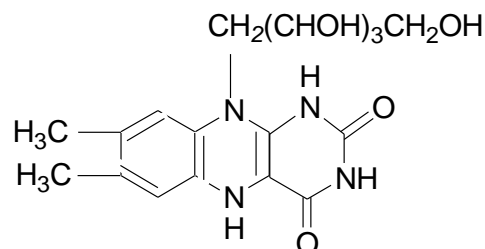
В пробирку вносят 1,5 мл раствора 10 %-ного раствора Na₂CO₃ и 1 мл диазореактива, затем добавляют 3–5 капель раствора тиамина. Появляется желтая окраска, переходящая в розовую, т.к. образуется сложное соединение этого витамина с диазо-бензолсульфокислотой, окрашенное в оранжевый или красный цвет.



Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин). Рибофлавин (витамин В₂) состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола. Рибофлавин входит в состав флавиновых нуклеотидов – ФМН и ФАД, являющихся коферментами многих дегидрогеназ. В окисленной форме рибофлавин окрашен в желтый цвет, а в восстановленной – бесцветный:



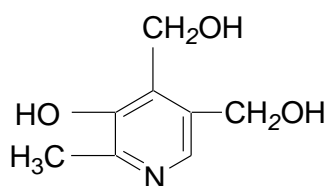
окисленная форма



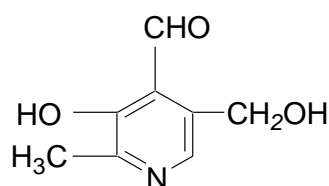
восстановленная форма

В пробирку вносят 1 мл раствора витамина В₂, добавляют (под тягой) 5 капель концентрированной соляной кислоты и несколько кусочков металлического цинка. Выделяющийся в ходе реакции водород взаимодействует с рибофлавином: наблюдается постепенное окрашивание жидкости в розовый цвет, а затем обесцвечивание, что обусловлено восстановлением рибофлавина. При взбалтывании бесцветного раствора лейкофлавина последний вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

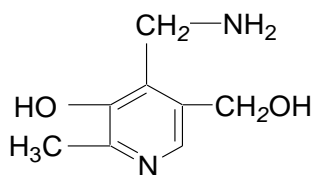
Качественная реакция на витамин В₆. В настоящее время витамин В₆ представляет собой сочетание трех индивидуальных веществ, обладающих свойствами витамина (пиридоксол, пиридоксамин, пиридоксаль). В организме каждое из этих веществ способно перейти в пиридоксальфосфат, который непосредственно участвует в химических реакциях, связанных с деятельностью витамина В₆. Витамин В₆ в форме фосфопиридоксала выполняет коферментную функцию у ферментов обмена аминокислот – декарбоксилаз и аминотрансфераз.



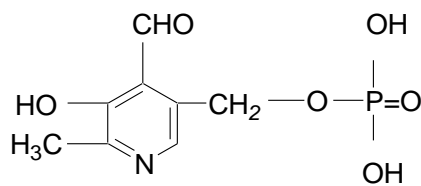
пиридоксол



пиридоксаль



пиридоксамин

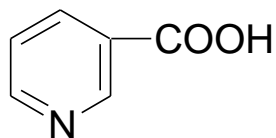


пиридоксальфосфат

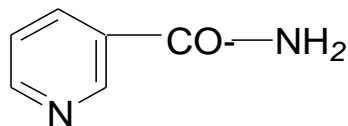


В пробирку наливают 0,5 мл раствора витамина В₆, добавляют 1 каплю 5 %-ного раствора хлорида железа (III), перемешивают. Жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция основана на образовании комплексного соединения типа фенолята железа.

Качественная реакция на витамин РР (никотиновая кислота, амид никотиновой кислоты). В природе витамин РР встречается в виде двух форм: никотиновой кислоты и ее амида (никотинамид):



никотиновая кислота



никотинамид

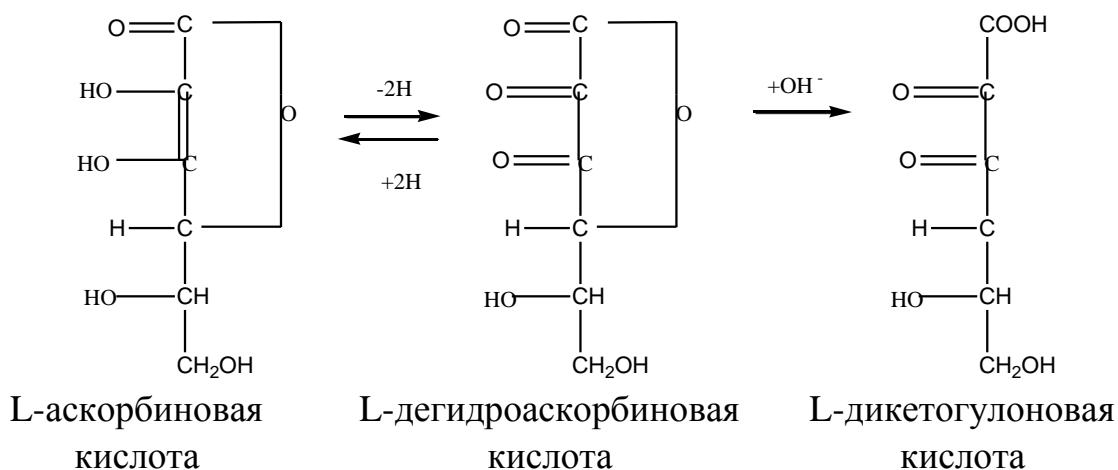
Из витамина РР образуются два кофермента – никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺). Эти коферменты входят в состав ферментов класса оксидоредуктаз (дегидрогеназ) и участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях, имеющих энергетическое значение. Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, мало растворимой в воде.

В пробирку вносят 5...10 мг никотиновой кислоты, приливают 1...2 мл 10 %-ного раствора уксусной кислоты, нагревают до кипения и добавляют 1...2 мл 5 %-ного раствора ацетата меди. Жидкость окрашивается в голубой цвет. При стоянии раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Качественные реакции на витамин С (аскорбиновая кислота). Наиболее характерными свойствами аскорбиновой кислоты являются ее кислотность, обусловленная енольным водородом при С₃, и легкое окисление до дегидроаскорбиновой кислоты, катализируемое ионами металлов и ферментом аскорбиноксидазой. Данный процесс обратим, и это важное свойство лежит в основе механизма действия аскорбиновой кислоты в живом организме: она является участником окислительно-восстановительных систем и тем самым обеспечивает нормальное протекание жизненно важных процессов.

Дегидроаскорбиновая кислота нестабильна в щелочной среде, в которой происходит гидролиз лактонного кольца с образованием дикетогулоновой кислоты. Восстанавливающая способность аскорбиновой кислоты является основой большинства количественных методов ее определения.





Для проведения качественных реакций на витамин С необходимо приготовить фильтрат растительных тканей (сок). Для этого измельченные клубни картофеля или капустные листья (5...10 г) растирают в фарфоровой ступке с толченым стеклом, приливают 10 мл воды, перемешивают и фильтруют.

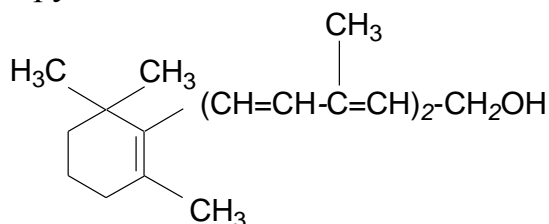
1. В две пробирки вносят по 1 мл дистиллированной воды и по 2 капли 0,1%-ного раствора йода в йодиде калия. В одну пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды (контроль), в другую – 1 мл фильтрата растительных тканей (опыт). Во второй пробирке раствор йода обесцвечивается вследствие окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и восстановления молекулярного йода до йодоводородной кислоты.

2. К 1...2 мл сока добавляют 1 каплю свежеприготовленного насыщенного раствора красной кровяной соли $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 каплю 2 %-ного раствора FeCl_3 и 5 капель 10 %-ного раствора HCl . В присутствии аскорбиновой кислоты происходит восстановление $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, который с трехвалентным железом образует окрашенный в голубой цвет $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. В контроле вместо сока берут дистиллированную воду (появляется буроватое окрашивание).

6.2. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Материалы: рыбий жир или масляный раствор витамина А; 0,1 %-ный раствор α -токоферола в спирте.

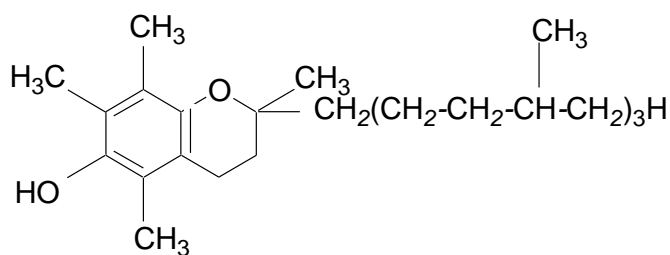
Качественная реакция на витамин А (ретинол). Витамин А (ретинол) содержит кольцо β -иона и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и спиртовой группы:



Провитамином А является желтый пигмент растений – каротин ($C_{40}H_{56}$), при распаде которого образуется две молекулы витамина А.

Серная кислота отнимает от витамина А воду с образованием цветных продуктов реакции. В сухую пробирку вносят 5 капель раствора витамина А и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется бурое окрашивание.

Качественные реакции на витамин Е (токоферол). Обнаружено несколько близких друг к другу по химической структуре токоферолов – α , β , γ . В последнее время выделено еще несколько форм токоферола, различающихся по числу и расположению метильных групп в бензольном кольце:

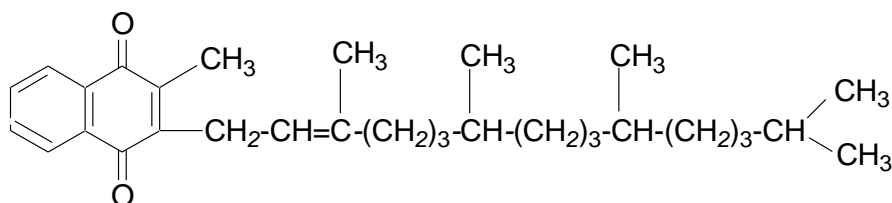


α -токоферол

1. В сухую пробирку вносят 3 капли витамина Е и аккуратно прибавляют под тягой (по стенке пробирки) 6 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки слегка встряхивают. Образующаяся эмульсия после встряхивания расслаивается, пробирку нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин, верхний масляный слой окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена окислением α -токоферола до окрашенного продукта α -токоферилхинона.

2. В пробирку вносят несколько капель витамина Е и равное количество 0,2%-ного спиртового раствора хлорида железа (III). Содержимое пробирки перемешивают и нагревают. Раствор окрашивается в красный цвет.

Качественная реакция на витамин К (филлохинон). По своей химической структуре витамин относится к группе нафтохинонов. Витамин K_1 , выделенный из листьев капусты, крапивы и других растений, является 2-метил-3-фитил-1,4-нафтохиноном:



витамин K_1

В пробирку вносят 0,5 мл 0,1 %-ного спиртового раствора викасола, добавляют 2–3 капли 0,025 %-ного раствора цистеина и 1 каплю 10 %-ного гидроксида натрия. В результате жидкость окрашивается в желтый цвет.

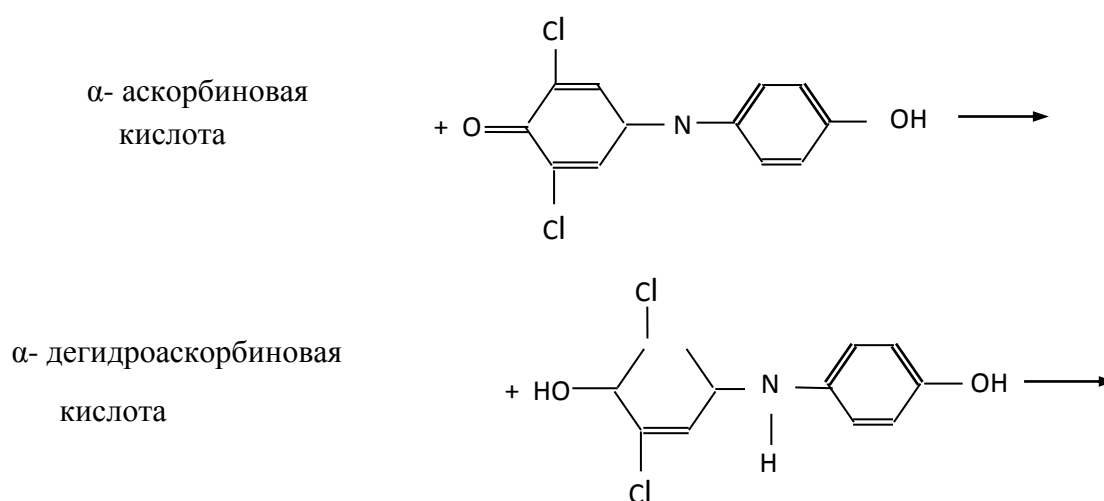


6.3. Количественное определение витамина С

6.3.1. Определение витамина С титриметрическим методом

Наиболее богатыми естественными источниками витамина С являются овощи и фрукты, прежде всего ягоды шиповника (1200 мг%), черная смородина (400 мг%), цитрусовые (40...60 мг%), красный сладкий перец (250 мг%), петрушка (150 мг%), капуста (50...100 мг%), картофель (20 мг%) и др.

Метод количественного определения основан на легкой окисляемости аскорбиновой кислоты. В кислой среде аскорбиновая кислота способна восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (краска Тильманса) до лейкоформы, сама при этом окисляясь до дегидроаскорбиновой кислоты:



В результате реакции аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту, а индикатор восстанавливается до бесцветной формы. В тот момент, когда вся аскорбиновая кислота прореагировала, избыток красителя в кислой среде дает розовое окрашивание. По количеству израсходованной на окислительно-восстановительную реакцию краски Тильманса и находят количество аскорбиновой кислоты.

Ход определения

Навеску растительного материала (1...5 г), измельченного ножом из нержавеющей стали, тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1...3 г толченого стекла и 5 мл 1 %-ного раствора HCl до получения жидкой кашицы. По мере растирания прибавляют еще 15 мл соляной кислоты и всю смесь переносят в мерную колбу на 50 мл. Остаток в ступке смывают в ту же колбу раствором щавелевой кислоты, доводя объем смеси до метки. Содержимое колбы перемешивают и фильтруют или центрифугируют. Далее 5...10 мл фильтрата переносят в конические колбочки и титруют из микробюретки



0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Одновременно проводят контрольное титрование смеси реактивов. Число миллилитров раствора краски, пошедших на контрольное титрование, вычитают из числа миллилитров, пошедших на титрование вытяжки.

Расчет содержания аскорбиновой кислоты (мг на 100 г материала) производят по формуле

$$X = \frac{(A - B)T \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot n} \cdot 100,$$

где A – количество краски, пошедшей на титрование вытяжки, мл; B – то же на контрольное титрование, мл; T – титр краски по аскорбиновой кислоте, мг; V_1 – общий объем экстракта, мл; V_2 – количество экстракта, взятого для титрования, мл; n – навеска исследуемого материала, г.

Отдельно определяют титр краски по аскорбиновой кислоте. Для этого растворяют несколько кристалликов (1...1,5 мг) аскорбиновой кислоты в 50 мл 2 %-ного раствора серной кислоты. Берут в две конические колбочки по 5 мл этого раствора и титруют из микробюреток: в одной колбочке – 0,001н раствором 2,6-дихлорфенол-индофенола до появления розовой окраски, в другой точно 0,001н раствором иодата калия, предварительно добавив в колбочку несколько кристалликов иодида калия и 5 капель 1 %-ного раствора крахмала (до обесцвечивания).

Определив объем краски и объем иодата калия, рассчитывают титр краски. Титр краски по аскорбиновой кислоте (T) – это количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл раствора краски:

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b},$$

где a – количество 0,001 н раствора иодата калия, мл; b – количество раствора краски, мл; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты соответствующее 1 мл 0,001 н раствора иодата калия.

Определение витамина С в окрашенных объектах. Титрование раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола вытяжек из окрашенных плодов и овощей (например, свёклы, клюквы, черной смородины и т.д.) связано со значительными трудностями, так как зачастую невозможно проследить за изменением окраски экстракта и определить конец титрования. Вытяжки из окрашенных плодов и овощей рекомендуется титровать в присутствии хлороформа или дихлорэтана.

Экстрагирование витамина С из растительного материала производят так же, как в предыдущей работе. В 2–3 большие пробирки пипеткой вносят



по 5...10 мл окрашенной вытяжки, добавляют по 5...6 мл чистого хлороформа, после чего титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Титрование заканчивают при появлении розового окрашивания слоя органического растворителя.

6.3.2. Колориметрическое определение витамина С

Принцип титриметрического определения аскорбиновой кислоты с краской Тильманса может быть использован для спектрофотометрического определения.

Берут навеску свежего растительного материала – около 2 г. Навеску измельчают на терке из нержавеющей стали, измельченный материал заливают 10 мл 2 %-ной метафосфорной кислоты и быстро растирают. Гомогенат количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, объем доводится до метки раствором 2 %-ной метафосфорной кислоты, которая является одним из лучших стабилизаторов аскорбиновой кислоты в растворе, к тому же она осаждает белки. Содержание колбы встряхивают, фильтруют или центрифугируют.

Из фильтрата берется три пробы по 10 мл. К каждой пробе добавляют по 1 мл свежеприготовленного 0,025 %-ного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Как только к пробе прилита краска, включается секундомер. Растительная вытяжка с краской хорошо перемешивается, раствор заливается в кювету толщиной 10 мм, фотометрирование ведется при 530 нм. Кювету вставляют в держатель кювет колориметра, нулевая точка которого предварительно устанавливается по 2 %-ной метафосфорной кислоте. При колориметрировании вытяжки с краской необходимо стрелку гальванометра постоянно подводить к нулю, пока не пройдет 35 секунд, так как интенсивность окраски раствора все время уменьшается.

Параллельно колориметрируется 10 мл 2 %-ной метафосфорной кислоты с 1 мл краски (контроль). Изменение в интенсивности окрашивания контрольного и опытного образцов пропорционально количеству аскорбиновой кислоты, находящемуся в растительной вытяжке. Расчет производится по калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой 100 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 1 л 2 %-ной метафосфорной кислоты. Из данного раствора разведением готовят растворы, содержащие 1, 2, 3 мкг и т. д. аскорбиновой кислоты в 1 мл. По разнице в колориметрировании раствора 2 %-ной метафосфорной кислоты и стандартных растворов строится калибровочная кривая. Когда вытяжка растений содержит значительное количество аскорбиновой кислоты (около 700 мкг на 1 г), при добавлении 1 мл краски к 10 мл вытяжки



краска полностью обесцвечивается аскорбиновой кислотой. В этом случае вытяжку необходимо разбавить вдвое 2 %-ной метафосфорной кислотой и учесть это при расчете содержания аскорбиновой кислоты.

Содержание аскорбиновой кислоты на 1 г исследуемого материала вычисляется по формуле

$$X = \frac{a \cdot V}{g},$$

где a – содержание аскорбиновой кислоты в 1 мл вытяжки, найденное по калибровочной кривой, мкг; V – объем экстракта, полученного из данной навески, мл; g – навеска исследуемого материала, г.

Задание

1. Провести качественные реакции на водорастворимые и жирорастворимые витамины. По результатам работы заполнить табл. 25.

Таблица 25. Результаты проведения качественных реакций на водорастворимые и жирорастворимые витамины

| Витамин | Исследуемый материал | Реакция | Наблюдения | Объяснение |
|---------|----------------------|---------|------------|------------|
| | | | | |

2. Определить содержание аскорбиновой кислоты в растительном материале.

Контрольные вопросы по теме «Витамины»

1. Охарактеризуйте роль витаминов в жизнедеятельности организма.
2. Приведите классификацию витаминов.
3. Приведите общую характеристику водорастворимых витаминов, их коферментную функцию. Коферментом каких ферментов является витамин B_1 ? B_2 ? B_6 ? B_{12} ? PP? H? C?
4. Укажите названия пяти витаминов, которые входят в состав кофакторов ферментов, ускоряющих реакции окислительного декарбоксилирования пирувата.
5. На чем основано определение витамина C в сырье и продукции?

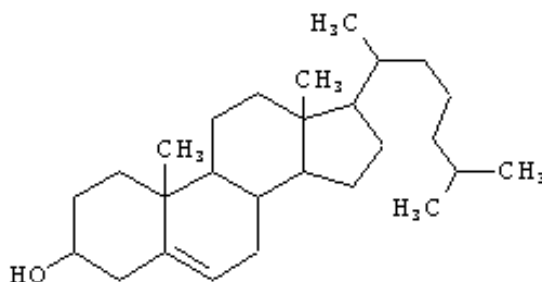


7. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Биологически активные вещества – химические вещества, обладающие при небольших концентрациях высокой физиологической активностью по отношению к определённым группам живых организмов или отдельным группам их клеток. Физиологическая активность веществ может рассматриваться как с точки зрения возможности их медицинского применения, так и с точки зрения поддержания нормальной жизнедеятельности организма либо придания группе организмов особых свойств.

7.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И СТЕРИНОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ

Стерины – высокомолекулярные циклические спирты, в основе строения которых лежит ядро циклопентанпергидрофенантрена. Стериды – сложные эфиры стеринов с высокомолекулярными жирными кислотами (чаще всего – пальмитиновой, стеариновой и олеиновой). Одним из наиболее распространенных стеринов является холестерин, вторичный высокомолекулярный циклический спирт. Холестерин – типичный представитель стеринов животного организма (зоостеринов):



При дегидрировании молекулы холестерина образуется провитамин D₃ (7-дегидрохолестерин). Из холестерина образуются желчные кислоты, стероидные гормоны.

Стерины, встречающиеся в растениях, называют фитостеринами. В дрожжах содержится эргостерин, который при облучении ультрафиолетовыми лучами превращается в витамин D₂. В растительных маслах содержатся стигмастерин и β-ситостерин, в бурых водорослях – фукостерин; β-ситостерин найден в плодах малины, ежевики, грейпфрута.

К производным циклопентанпергидрофенантрена относятся также некоторые алкалоиды, гликозиды и сапонины – вещества, содержащиеся в растениях и обладающие активным физиологическим действием. Так, агликонами гликозидов наперстянки, горицвета, ландыша и некоторых других растений, употребляющихся для лечения заболеваний сердца, являются стерои-



ды. Имеются также данные, что гормон цветения растений относится к производным циклопентанпергидрофенантрена.

7.1.1. Реакция Сальковского на холестерин

Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация молекулы холестерина с образованием холестерилена – соединения, окрашенного в красный цвет.

Реактивы: холестерин, 1 %-ный хлороформный раствор или растительное масло, концентрированная серная кислота.

К 2...3 мл хлороформного раствора холестерина (или растительного масла) в пробирке осторожно, наклоняя по стенке, добавляют 1...2 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку легко встряхивают. Вначале верхний слой, а затем и вся жидкость в пробирке принимает красную, оранжевую или красно-фиолетовую окраску.

7.1.2. Реакция Витби на наличие стероидов в растительных маслах

Реактивы: подсолнечное или другое растительное масло; хлороформ; смесь концентрированной серной кислоты с формалином (50 : 1).

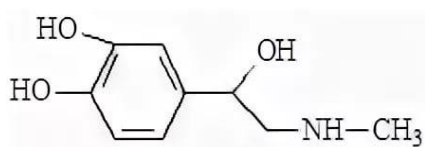
В сухую пробирку наливают 1 мл хлороформа, добавляют 2–3 капли растительного масла и легко встряхивают для растворения масла. К хлороформному раствору масла прибавляют 20 капель смеси концентрированной серной кислоты с формалином (50 : 1) и встряхивают. Хлороформный слой окрашивается в яркий вишнево-красный цвет, кислотный – в тусклый красно-коричневый с зеленой флуоресценцией. Из хлороформного слоя можно отобрать пипеткой несколько капель, перенести в другую пробирку (сухую!) и добавить 2–3 капли уксусного ангидрида – появляется сине-зеленое окрашивание.

7.2. Гормоны

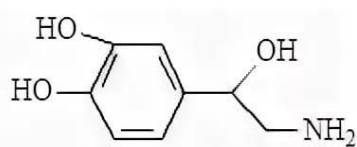
7.2.1. Гормоны мозгового слоя надпочечников

В хромоаффинных клетках мозгового слоя надпочечников образуются два гормона – адреналин и норадреналин. Они являются производными ортодиоксибензола (пирокатехина) и синтезируются в организме в результате ферментативных превращений аминокислоты тирозина (фенилаланина) при участии метионина:





Адреналин



Норадреналин

Адреналин и норадреналин образуются также в хромоаффинных клетках ганглиозной ткани. Адреналин – весьма неустойчивое вещество. Он легко окисляется и сам является хорошим восстановителем. Так, он способен восстанавливать маталлическое серебро из раствора азотнокислого серебра, медь – из закиси меди и т.д. Особенно легко проходит окисление адреналина в нейтральной и щелочной среде. Продукты окисления адреналина (дигидроадреналин, адренохром и др.) принимают участие в окислительных процессах организма. Растворы адреналина дают с хлорным железом изумрудно-зеленое окрашивание, характерное для гидроксильных групп, расположенных в ортоположении.

1. Реакция с хлорным железом.

Реактивы: адреналин (1:1000), хлорное железо, 3 %-ный раствор; аммиак, 10 %-ный раствор.

0,5 мл раствора адреналина смешивают с 2 мл воды и прибавляют 1 каплю раствора хлорного железа. Содержимое пробирки окрашивается в изумрудно-зеленый цвет. От прибавления 1 капли раствора аммиака окраска переходит в вишнево-красную, а затем принимает коричневый оттенок.

2. Реакция с йодноватокислым калием.

Реактивы: адреналин (1:1000); йодноватокислый калий, 1 %-ный раствор; уксусная или ортофосфорная кислота, 10 %-ный раствор.

К 0,5 мл раствора адреналина прибавляют 1 мл 1 %-ного раствора йодата калия, 10 капель 10 %-ного раствора уксусной или ортофосфорной кислоты и подогревают до температуры 60...65 °С. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

7.2.2. Гормоны поджелудочной железы

В поджелудочной железе вырабатывается несколько веществ, обладающих гормональным действием. β -клетки островков Лангерганса синтезируют инсулин, являющийся одним из важнейших регуляторов обмена углеводов в организме. Роль островковых клеток в выработке инсулина была доказана Л.В. Соболевым. В α -клетках островков Лангерганса образуются гормон глюкагон (полипептид, состоит из 29 аминокислотных остатков). Он также влияет на углеводный обмен, но его действие оказывается противоположным инсулину. Клетки эпителия мелких протоков железы вырабатывают



гормон липокаин, участвующий в обмене жиров. Гормон ваготонин повышает тонус парасимпатической нервной системы, а центропнеин влияет на дыхательный центр. Эти гормоны изучены еще недостаточно.

Инсулин – белковое вещество. Макромолекула инсулина состоит из мономеров, каждый из которых построен из двух полипептидных цепей: цепи А, состоящей из 21 аминокислотных остатков, и цепи В, в состав которой входят 20 аминокислотных остатков. Полипептидные цепи соединены между собой дисульфидными мостиками (рис. 20).

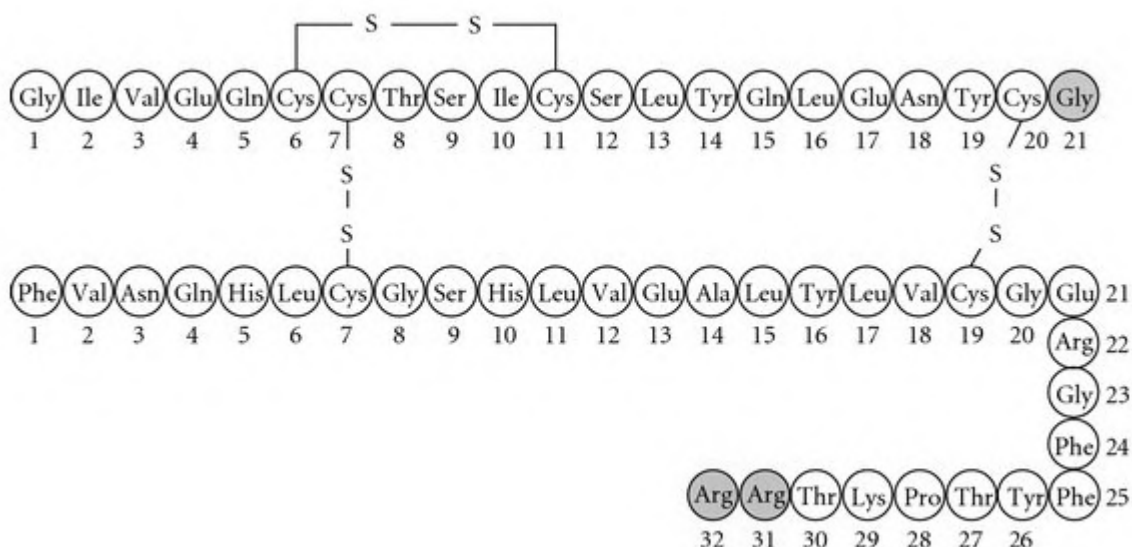


Рис. 20. Макромолекула инсулина

Мономеры инсулина связываются в димеры посредством цинка (содержание 0,3 %). Димеры соединяются друг с другом с помощью сил Ван-дер-Вальса и электростатических связей. Макромолекула инсулина состоит из 4 димеров. Физиологической активностью обладают не только макромолекулы, но и монодимеры, димеры и соединения, состоящие из двух-четырех димеров.

1. Реакция с разбавленным раствором едкой щелочи.

Реактивы: раствор инсулина; едкий натрий или калий, 0,1 %-ный раствор; уксусная кислота, 0,5 %-ный раствор.

К 10...15 каплям инсулина добавляют по каплям едкий натрий или калий до выпадения хлопьевидного осадка (рН 5,0...5,2), который растворяется при подкислении до рН 2,5...3,5.

2. Реакции, свидетельствующие о белковой природе инсулина.

С раствором инсулина проводят реакцию, доказывающую его белковую природу – биуретовую.



7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

К полифенольным полимерным соединениям относятся дубильные вещества, лигнин и меланины. Дубильные вещества распространены в растительном мире. Как и эфирные масла, они относятся к растительным веществам вторичного происхождения, играющим весьма важную роль промежуточных продуктов обмена веществ. Источником образования дубильных веществ являются углеводы. Дубильные вещества обладают физиологической активностью, в процессе роста и развития растений они подвергаются глубоким изменениям. Такой важный представитель дубильных веществ, как хлорогеновая кислота, является дыхательным хромогеном и играет большую роль в дыхании растений. Установлено, что дубильные вещества чайных листьев и других растений обладают Р-витаминной активностью. При каталитическом воздействии окислительных ферментов дубильные вещества окисляются и превращаются в окрашенные соединения, которые изменяют цвет пищевых продуктов. Дубильные вещества обладают вяжущим вкусом. Значительное количество дубильных веществ содержится в различных плодах, в хмеле, в оболочках зерна и др.

Дубильные вещества делят на две группы. К первой относят вещества эфирного характера. Под действием кислот или ферментов они гидролизуются. Дубильные вещества второй группы гидролитически не расщепляются. Это обычно конденсированные соединения, связанные между собой через углеродные атомы.

В первую группу дубильных веществ входят в основном производные ароматических оксикарбоновых кислот (галловой, пирокатехиновой, кофейной и др.) и глюкозиды. Оксикарбоновые кислоты обладают спиртовыми и кислотными группами, которые реагируют одна с другой и образуют соединения типа сложных эфиров, называемые депсидами. К группе гидролизующих дубильных веществ принадлежит танин – глюкозид дигалловой кислоты.

Основной структурной единицей второй группы дубильных веществ являются производные антоцианов и флавонолов, которые называются катехинами. К ним относятся катехин и галлокатехин. Катехины содержатся в растениях как в свободном, так и в связанном виде (сложные эфиры галловой кислоты).

7.3.1. Качественные реакции на дубильные вещества в растительном сырье

1. 5 капель 1 %-ного раствора FeCl_2 добавляют к нейтрализованному (по лакмусу) испытуемому раствору. Появление синего или зеленого окрашивания указывает на наличие дубильных веществ. Эту реакцию нельзя считать вполне специфичной, ибо она характерна для других веществ.



2. Осаждение дубильных веществ солями тяжелых металлов. К испытуемому раствору добавляют несколько капель 10 %-ного раствора $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, образование осадка указывает на наличие дубильных веществ. То же наблюдается при добавлении растворов солей меди, висмута и ртути.

7.3.2. Количественное определение дубильных веществ объемным методом

В основу этого метода положен принцип окисления дубильных веществ перманганатом калия в присутствии индигокармина. Метод широко применяют в лабораторной практике как наиболее простой.

Приготовление раствора индигокармина: 1 г препарата индигокармина переносят в мерную колбу емкостью 1 л и растворяют в 50 мл концентрированной H_2SO_4 ; доводят до метки и фильтруют.

Ход определения

Навеску 2...10 г (в зависимости от содержания дубильных веществ) хорошо измельченного растительного материала переносят в стакан, прибавляют 75 мл дистиллированной воды и нагревают до 80 °С.

Охлажденную смесь количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, стакан ополаскивают 2–3 раза дистиллированной водой и содержимое колбы доводят водой до метки. Полученную смесь оставляют настаиваться 30 мин, в течение этого времени несколько раз хорошо встряхивают, затем фильтруют через складчатый фильтр. В большую фарфоровую чашку вместимостью 1 л отмеривают 10 мл фильтрата, добавляют 750 мл дистиллированной воды и 25 мл раствора индигокармина и 10 мл разбавленной H_2SO_4 (1: 4). Смесь титруют 0,05 н раствором KMnO_4 , энергично перемешивая стеклянной палочкой. Титрование ведут со скоростью одной капли в секунду до появления слабо-розовой окраски, хорошо заметной по краям чашки. Цвет смеси в фарфоровой чашке постепенно изменяется: из синего он становится темно-зеленым, светло-зеленым, зеленовато-желтым, а затем золотисто-желтым. Титрование следует вести при хорошем освещении и повторить два раза. Чтобы получить достаточно точные, хорошо сходящиеся результаты, титруют при строго одинаковых условиях опыта.

Для внесения поправки на остальные окисляющие составные части исследуемой вытяжки проводят контрольный опыт, в котором удаляют дубильные вещества, адсорбируя их из вытяжки активированным углем. Для контроля берут также 10 мл исследуемого фильтрата и прибавляют к нему 3 г активированного угля в порошке, нагревают до 80 °С, помешивая 40 мин



на водяной бане, и фильтруют в ту же большую фарфоровую чашку. Уголь промывают теплой дистиллированной водой.

Промывные воды присоединяют к основному фильтрату и в чашку приливают дистиллированную воду до общего объема 750 мл. Добавляют 25 мл индигокармина, 10 мл разбавленной H_2SO_4 (1 : 4) и титруют 0,05 н раствором $KMnO_4$. При этом $KMnO_4$ окисляет все вещества, которые могут окисляться, кроме дубильных и красящих, предварительно поглощенных углем. Содержание дубильных веществ (в %) вычисляют по формуле

$$X = \frac{(a - b)0,004157v \cdot 100}{g \cdot 2 \cdot v_1},$$

где $(a - b)$ – разность между объемами 0,05 н раствора $KMnO_4$, израсходованными на титрование в первом и втором опытах, мл; 0,004157 – коэффициент пересчета результата титрования в дубильных веществах (1 мл 0,1 н раствора $KMnO_4$ соответствует 0,004157 г дубильных веществ, например танина); v – общий объем вытяжки, мл; v_1 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл; g – навеска исследуемого продукта, г.

7.4. АЛКАЛОИДЫ

Алкалоиды – гетероциклические соединения, оказывающие сильное физиологическое действие на животный организм и человека. Они оказывают специфическое действие на определенные части нервной системы. Одни действуют на центральную и периферическую нервные системы, другие – на иннервацию глаза, гладкую мускулатуру, желудочно-кишечный тракт и т.д. В малых дозах они могут действовать успокаивающе, в больших – как анестезирующие вещества, в критических – как яды. Из сельскохозяйственных растений широко известен люпин, обладающий способностью усваивать молекулярный азот из воздуха благодаря симбиозу с клубеньковыми бактериями. В его семенах до 60 % белка, что превышает содержание белка даже в сое. Люпин многолетний содержит около 20 алкалоидов (более 2 %). Среди них наиболее распространены лупанин, лупинин, оксилупанин. Алкалоиды находятся в семенах и листьях.

Материалы: набухшие семена кормового люпина; махорка; листья табака; чай листовой; кофе в зернах; раствор иодида калия (10 г иодида калия растворяют в 25 мл воды).

Ход определения

Метод основан на том, что соединения алкалоидов в иодиде калия дают красный осадок. Берут кусочек исследуемого материала и растирают в ступке. Кашицу заливают несколькими каплями иодида калия. Осадок берут ка-



пельницей и помещают на фильтр рядом с раствором иодида калия. Сравнивают две одинаковые капли осадка и иодида калия, убеждаясь, что окраска появилась в результате реакции. Результаты записывают в табл. 26.

Таблица 26. Сравнение результатов качественного анализа алкалоидов

| Название растения | Часть растения | Количество осадка | | |
|-------------------|----------------|-------------------|------------------|----------------|
| | | Мало (3 балла) | Средне (2 балла) | Много (1 балл) |
| | | | | |

7.5. РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Для извлечения пигментов из растительных тканей и их разделения обычно используют полярные растворители или смесь полярных и неполярных растворителей. Так как пигменты быстро выцветают на свету, их экстракцию проводят в затемненном помещении с предварительно охлажденными растворителями. Чтобы предотвратить изомеризацию пигментов, экстракцию ведут как можно быстрее. Пигменты извлекают последовательно несколькими порциями растворителя, фильтруя каждый раз раствор через стеклянный фильтр. При растирании листьев добавляют небольшое количество $MgCO_3$ и $CaCO_3$ для нейтрализации кислот клеточного сока и предотвращения феофитинизации пигментов. Основными представителями растительных пигментов являются каротиноиды и хлорофилл.

Каротиноиды являются изопреноидами, подразделяются на каротины и ксантофиллы. Ксантофиллы содержат гидроксильные или эпоксидные группы. Основные представители каротиноидов неоксантин, виолоксантин, зеоксантин, β -каротин.

Хлорофиллы представляют собой порфириновые соединения, содержащие центральный ион магния, радикалы-заместители в кольце и фитольный хвост. Хлорофилл *a* содержит в качестве заместителя только метильные группы. В хлорофилле *b* метильная группа у третьего атома кольца замещена на альдегидную (рис. 21).

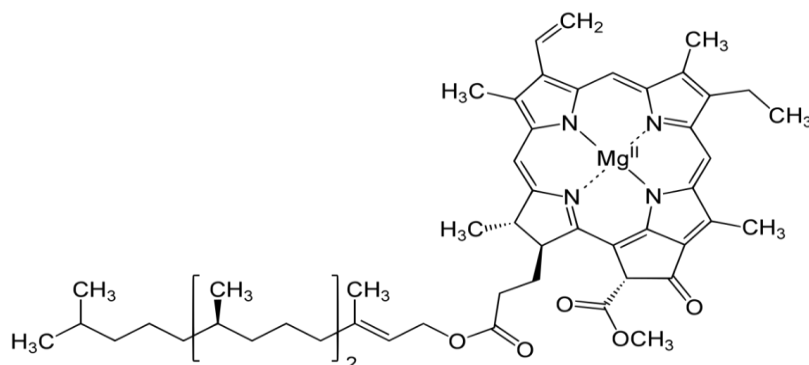


Рис. 21. Структура хлорофилла



Количественное определение пигментов основано на их способности поглощать лучи определенной длины волны. Регистрацию оптической плотности раствора пигментов проводят на спектрофотометре. Определение концентрации хлорофиллов *a* и *b* в растворе без их разделения затруднено, так как спектры обоих хлорофиллов сильно перекрываются, и невозможно найти две длины волны, в которых поглощение одного пигмента заметно превышает поглощение другого. Это обстоятельство и используют при проведении количественного определения обоих хлорофиллов без их разделения.

Ход определения

Навеску растительного материала (100...200 мг) измельчают и помещают в маленькую ступку, добавляют на кончике скальпеля немного $MgCO_3$, приливают 4...5 мл ацетона и тщательно растирают. Полученную вытяжку сливают по палочке на стеклянный фильтр (№ 2/ПОР100), вставленный в колбу Бунзена. После этого в ступку приливают еще немного ацетона, растирают, снова вливают на фильтр. Эту операцию повторяют несколько раз, пока раствор, стекающий из фильтра, не будет абсолютно бесцветным.

Вытяжку переливают в мерную колбу, колбу Бунзена ополаскивают несколько раз небольшими порциями ацетона и доводят чистым ацетоном объём вытяжки в мерной колбе до метки (25 мл). Полученная ацетоновая вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяют на спектрофотометре. Для этого часть полученного экстракта наливают в кювету спектрофотометра. Вторую кювету, заполненную чистым растворителем, используют как контрольную. Оптическую плотность определяют при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов *a* и *b* в 100 %-ном ацетона, 662 и 644 нм. Для определения содержания каротиноидов определяют оптическую плотность вытяжки при длине волны 440...470 нм.

В зависимости от природы растворителя, используемого для извлечения пигментов, их концентрации (мг/г) рассчитывают по следующим формулам для трех вариантов растворителей (*C* – концентрация; *D* – оптическая плотность)

1. В 80 %-ном растворе ацетона

$$C_{хла} = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649},$$

$$C_{хлb} = 20,11 \cdot D_{649} - 2,39 \cdot D_{665},$$

$$C_{хла+хлb} = 6,45 \cdot D_{665} - 17,72 \cdot D_{649};$$

2. В 100 %-ном ацетоне

$$C_{хла} = 9,784 \cdot D_{662} - 0,990 \cdot D_{644},$$

$$C_{хлb} = 21,426 \cdot D_{644} - 4,650 \cdot D_{662},$$

$$C_{хла+хлb} = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644},$$

$$C_{кар} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 \cdot D_{хла+хлb};$$



3. В 96 % -ном растворе спирта

$$C_{\text{хла}} = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{646},$$

$$C_{\text{хлб}} = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665},$$

$$C_{\text{хла+хлб}} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649}.$$

Затем вычисляют содержание пигментов А в растительном материале, мг/г сырой массы:

$$A = \frac{VC}{1000P},$$

где C – концентрация пигментов, мг/л; V – объем вытяжки, мл (25 мл); P – навеска растительного материала, г.

Результаты измерений заносят в табл. 27.

Таблица 27. Результаты измерений оптической плотности

| Объект исследования | Масса навески, мг | Оптическая плотность (D) при длине волны (для 100% ацетона) | | |
|---------------------|-------------------|---|-----|-----|
| | | 662 | 644 | 440 |
| | | | | |

На основании полученных инструментальных данных рассчитывают количество пигментов в растительном материале (табл. 28).

Таблица 28. Количество пигментов в исследуемом растительном материале

| Объект исследования | Количество пигментов, мг/л раствора | | | Количество пигментов в сыром листе, мг/л | | | Соотношение пигмента | |
|---------------------|-------------------------------------|-----|-------------|--|-----|-------------|----------------------|---|
| | Хла | Хлб | Каротиноиды | Хла | Хлб | Каротиноиды | Хла/Хлб | $\Sigma(\text{хла+хлб})/\text{Каротиноиды}$ |
| | | | | | | | | |

Задание

Проанализировать результаты и сделать выводы о соотношении пигментов в изучаемых объектах. Сравнить результаты, полученные для разных видов растений, для одного растения в различных фазах роста.



Контрольные вопросы по теме «Биологически активные вещества»

1. Опишите общие свойства и функции гормонов.
2. В чем заключается химическая природа и биологическая роль гормонов гипоталамуса?
3. В чем заключается химическая природа и биологическая роль гормонов поджелудочной железы?
4. На чем основаны качественные реакции на адреналин?
5. Где в природе распространены дубильные вещества? Приведите примеры.
6. Какую роль играет хлорогеновая кислота в растительной клетке?
7. На какие группы делят дубильные вещества?
8. На чем основано количественное определение дубильных веществ?
9. Какой алкалоид содержится в кофе? Нарисуйте его структуру.
10. На чем основана качественная реакция по определению алкалоидов?
11. Почему в молодых листьях люпина больше алкалоидов?
12. Какие свойства относят к общегрупповым свойствам класса алкалоидов?
13. Что такое растительные пигменты? Какую роль они играют в жизнедеятельности растительной клетки?
14. Что такое каротиноиды? Какой максимум поглощения они имеют?
15. В какой части ЭТЦ фотосинтетической системы встречаются каротиноиды?
16. Что такое хлорофиллы? Какие основные представители хлорофиллов есть у высших растений? Какой максимум поглощения имеют хлорофиллы *a*?
17. На чем основано количественное определение пигментов в растительных материалах?



Библиографический список

Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.

Землянухин А.А. Малый практикум по биохимии. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1985. – 128 с.

Биссвангер Х. Практическая энзимология. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 328 с.

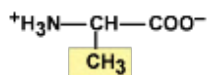
Хибхенов Л.Б., Сперанский В.В. Практикум по анатомии пищевого сырья: учеб. пособие. – Удан-Удэ.: ВСГТУ, 2007, 72 с

Блохин Ю.И., Падалкина В.С., Канидьева В.И. Органическая химия в пищевых биотехнологиях: лабораторный практикум. – М.: МГУТУ, 2007.

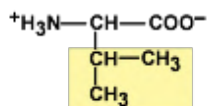


Аминокислоты

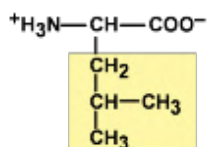
Неполярные Алифатические



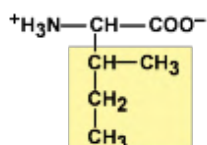
Аланин, Ала, А



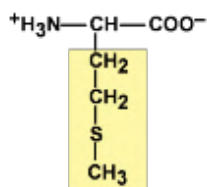
Валин, Вал, V



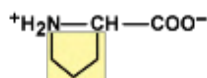
Лейцин, Лей, L



Изолейцин, Иле, J

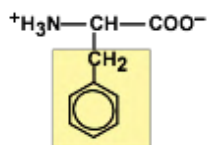


Метионин, Мет, M



Пролин, Про, P

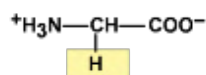
Ароматические



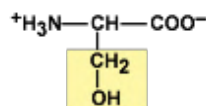
Фенилаланин, Фен, F

Полярные

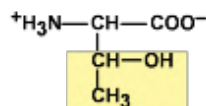
Незаряженные



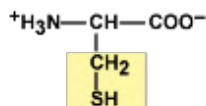
Глицин, Гли, G



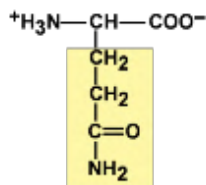
Серин, Сер, S



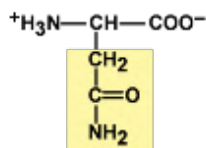
Треонин, Тре, T



Цистеин, Цис, C

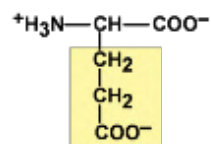


Глутамин, Глн, Q

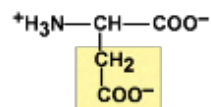


Аспарагин, Асн, N

Отрицательно заряженные

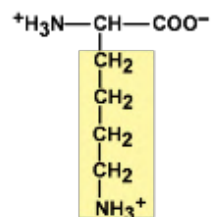


Глутаминовая кислота, Глу, E

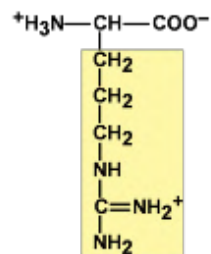


Аспарагиновая кислота, Асп, D

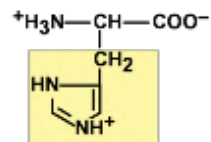
Положительно заряженные



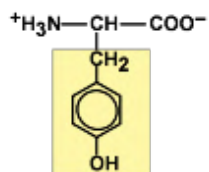
Лизин, Лиз, K



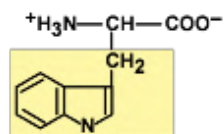
Аргинин, Арг, R



Гистидин, Гис, H



Тирозин, Тир, Y



Триптофан, Три, W