

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б2.Б3. Биологическая химия

Направление подготовки 111900.62 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»  
Профиль образовательной программы «Ветеринарно-санитарная экспертиза»  
Форма обучения    заочная

Оренбург 201\_ г.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1</b>	<b>Конспект лекций.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Лекция № 1</b> Протеиногенные аминокислоты. Структуры белка.....	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Лекция № 2</b> Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия.....	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Лекция №3</b> Основные углеводы пищи. Переваривание углеводов. Механизм трансмембранного переноса глюкозы и других моносахаридов в клетки .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Методические указания по выполнению лабораторных работ.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	Лабораторная работа № ЛР-1 Основы функционирования белков. Сложные белки.....	9
<b>2.2</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-2 Витамины. Качественные реакции .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	Лабораторная работа № ЛР-3 .3 Тема: Особенности ферментов как белковых катализаторов. ....	13
<b>2.4</b>	Лабораторная работа № ЛР-4 Строение и функции основных липидов организма. Переваривание и всасывание жиров. Ресинтез жиров в клетках слизистой оболочки кишечника.....	14
<b>3</b>	<b>Методические указания по проведению практических занятий.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Практическое занятие № ПЗ-1</b> Белковое питание. Азотистый баланс. Переваривание белков.....	<b>18</b>

# 1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

## 1. 1 Лекция № 1 ( 2 часа).

**Тема:** «Протеиногенные аминокислоты. Структуры белка»

### 1.1.1 Вопросы лекции:

1. Строение и свойства протеиногенных аминокислот. Пептидные связи.
2. Структура белков
3. Формирование трехмерной структуры белка в клетке
4. Функционирование белков






### 1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Строение и свойства протеиногенных аминокислот. Пептидные связи.

Общая структурная особенность аминокислот - наличие amino- и карбоксильной групп, соединённых с одним и тем же углеродным атомом. R - радикал аминокислот - в простейшем случае представлен атомом водорода (глицин), но может иметь и более сложное строение.

В водных растворах при нейтральном значении pH аминокислоты существуют в виде биполярных ионов.

Таблица Классификация основных аминокислот белков по их химическому строению

Тривиальные названия аминокислот	Сокращённые названия		Строение радикалов
	русские	латинские	
I. Аминокислоты с алифатическими радикалами			
1. Глицин	Гли	Gly G	-H
2. Аланин	Ала	Ala A	-CH <sub>3</sub>
3. Валин	Вал	Val V	$-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
4. Лейцин	Лей	Leu L	$-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
5. Изолейцин	Иле	Ile I	$-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$   CH <sub>3</sub>
II. Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале дополнительную функциональную группу			
Гидроксильную группу			
6. Серин	Сер	Ser S	-CH <sub>2</sub> -OH
7. Треонин	Тре	Thr T	-CH(OH)-CH <sub>3</sub>
Карбоксильную группу			
8. Аспарагиновая кислота	Асп	Asp D	-CH <sub>2</sub> -COOH
9. Глутаминовая кислота	Глу	Glu E	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Амидную группу			
10. Аспарагин	Асп	Asn N	-CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
11. Глутамин	Гли	Gln Q	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
Аминогруппу			
12. Лизин	Лиз	Lys K	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
Гуанидиновую группу			
13. Аргинин	Арг	Arg R	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-C(=NH)-NH <sub>2</sub>
Серу			
14. Цистеин	Цис	Cys C	-CH <sub>2</sub> -SH
15. Метионин	Мет	Met M	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
III. Аминокислоты, содержащие ароматический радикал			
16. Фенилаланин	Фен	Phe F	-CH <sub>2</sub> - 
17. Тирозин	Тир	Tyr Y	-CH <sub>2</sub> - 
IV. Аминокислоты с гетероциклическими радикалами			
18. Триптофан	Три	Trp W	-CH <sub>2</sub> - 
19. Гистидин	Гис	His H	-CH <sub>2</sub> - 
V. Иминокислота			
20. Пролин	Про	Pro P	 -COOH Дана полная формула

## 2. Структура белков

Уровни структуры белков: 1 — первичная, 2 — вторичная, 3 — третичная, 4 — четвертичная

- Первичная структура — последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Важными особенностями первичной структуры являются консервативные мотивы — сочетания аминокислот, играющих ключевую роль в функциях белка.

Консервативные мотивы сохраняются в процессе эволюции видов, по ним часто удаётся предсказать функцию неизвестного белка.

- Вторичная структура — локальное упорядочивание фрагмента полипептидной цепи, стабилизированное водородными связями. Ниже приведены самые распространённые типы вторичной структуры белков:

- Третичная структура — пространственное строение полипептидной цепи (набор пространственных координат составляющих белок атомов). Структурно состоит из элементов вторичной структуры, стабилизированных различными типами взаимодействий, в которых гидрофобные взаимодействия играют важнейшую роль. Четвертичная структура (или субъединичная, доменная) — взаимное расположение нескольких полипептидных цепей в составе единого белкового комплекса. Белковые молекулы, входящие в состав белка с четвертичной структурой, образуются на рибосомах по отдельности и лишь после окончания синтеза образуют общую надмолекулярную структуру. В состав белка с четвертичной структурой могут входить как идентичные, так и различающиеся полипептидные цепочки. В стабилизации четвертичной структуры принимают участие те же типы взаимодействий, что и в стабилизации третичной. Надмолекулярные белковые комплексы могут состоять из десятков молекул.

### 3. Формирование трехмерной структуры белка в клетке

Формирование трёхмерной структуры белков - важнейший биологический процесс, так как от пространственной структуры белков зависит их биологическая функция.

Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название "**фолдинг белков**". Индивидуальные белки, продукты одного гена, имеют идентичную аминокислотную последовательность и приобретают в одинаковых условиях клетки одинаковую конформацию и функцию. Это положение подтверждается способностью некоторых белков после денатурации (при которой происходит разрыв слабых связей, но не повреждается первичная структура белков) спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию.

Однако в клетке концентрация белков настолько высока, что существует большая вероятность взаимодействия белков с несформированной конформацией. На их поверхности располагаются гидрофобные радикалы, склонные к объединению. Поэтому для многих белков, имеющих высокую молекулярную массу и сложную пространственную структуру, фолдинг протекает при участии специальной группы белков, которые называют "шапероны" (от франц. *shaperon* - няня).

В стабилизации третичной структуры принимают участие:

- ковалентные связи (между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики);
- ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков;
- водородные связи;
- гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. При взаимодействии с окружающими молекулами воды белковая молекула «стремится» свернуться так, чтобы неполярные боковые группы аминокислот оказались изолированы от водного раствора; на поверхности молекулы оказываются полярные гидрофильные боковые группы.

### 4. Функционирование белков

Каждый индивидуальный белок, имеющий уникальную первичную структуру и конформацию, обладает и уникальной функцией, отличающей его от всех остальных белков. Набор индивидуальных белков выполняет в клетке множество разнообразных и сложных функций.

Необходимое условие для функционирования белков - присоединение к нему другого вещества, которое называют "лиганд". Лигандами могут быть как низкомолекулярные вещества, так и макромолекулы. Взаимодействие белка с лигандом

высокоспецифично, что определяется строением участка белка, называемого центром связывания белка с лигандом или активным центром.

Активный центр белков - определённый участок белковой молекулы, как правило, находящийся в её углублении ("кармане"), сформированный радикалами аминокислот, собранных на определённом пространственном участке при формировании третичной структуры и способный комплементарно связываться с лигандом. В линейной последовательности полипептидной цепи радикалы, формирующие активный центр, могут находиться на значительном расстоянии друг от друга.

Высокая специфичность связывания белка с лигандом обеспечивается комплементарностью структуры активного центра белка структуре лиганда

Под комплементарностью понимают пространственное и химическое соответствие взаимодействующих молекул. Лиганд должен обладать способностью входить и пространственно совпадать с конформацией активного центра. Это совпадение может быть неполным, но благодаря конформационной лабильности белка активный центр способен к небольшим изменениям и "подгоняется" под лиганд. Кроме того, между функциональными группами лиганда и радикалами аминокислот, образующих активный центр, должны возникать связи, удерживающие лиганд в активном центре. Связи между лигандом и активным центром белка могут быть как нековалентными (ионными, водородными, гидрофобными), так и ковалентными.

Активный центр белка - относительно изолированный от окружающей белок среды участок, сформированный аминокислотными остатками. В этом участке каждый остаток благодаря своему индивидуальному размеру и функциональным группам формирует "рельеф" активного центра.

## **1. 2 Лекция №2 ( 2 часа).**

Тема: «Ферменты. Строение. Кофакторы. Механизм действия »

### **1.2.1 Вопросы лекции:**

1. Общая характеристика ферментов как биологических катализаторов.
2. Классификация и номенклатура ферментов
3. Кофакторы и коферменты
4. Механизм действия ферментов

### **1.2.2 Краткое содержание вопросов:**

1. Общая характеристика ферментов как биологических катализаторов.

Ферменты, как было установлено ещё в 1922 г., являются белками. Их роль уникальна: они увеличивают скорость протекания химической реакции, однако при этом не расходуются. В 1926 г. был впервые очищен и выделен в виде белковых кристаллов фермент уреазы, катализирующий реакции расщепления мочевины до аммиака и диоксида углерода. К настоящему времени в кристаллическом виде получены сотни различных ферментов, расшифрованы их аминокислотные последовательности, изучается их роль в метаболических превращениях.

В роли биокатализаторов могут выступать и небелковые соединения. Например, некоторые типы РНК вызывают гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот. Такие молекулы РНК с каталитической активностью называют рибозимами, однако их значение в химическом превращении соединений намного меньше, чем у ферментов.

Поскольку ферменты - белковые молекулы, следовательно, они обладают всеми свойствами, характерными для белков. В то же время они имеют особенности строения, характеризующие их как катализаторы. Рассмотрим основные свойства ферментов как биологических катализаторов.

### **2. Классификация и номенклатура ферментов**

Каждый фермент имеет 2 названия. Первое - короткое, так называемое рабочее, удобное для повседневного использования. Второе (более полное) - систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента.

В названии большинства ферментов содержится суффикс "аза", присоединённый к названию субстрата реакции, например уреазы, сахаразы, липазы, нуклеазы или к названию химического превращения определённого субстрата, например лактатдегидрогеназы, аденилатциклазы, фосфо-глюкомутазы, пируваткарбоксилазы. Согласно российской классификации ферментов (КФ), названия ферментов пишутся слитно. Однако в употреблении сохранился ряд тривиальных, исторически закреплённых названий ферментов, которые не дают представления ни о субстрате, ни о типе химического превращения, например трипсин, пепсин, ренин, тромбин.

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961 г. разработал систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разбиты на 6 основных классов в зависимости от типа катализируемой химической реакции. Каждый класс состоит из многочисленных подклассов и подподклассов с учётом преобразуемой химической группы субстрата, донора и акцептора преобразуемых группировок, наличия дополнительных молекул и т.д. Каждый из 6 классов имеет свой порядковый номер, строго закреплённый за ним.

Класс ферментов	Тип реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление двойных связей
Изомеразы	Взаимопревращения различных изомеров
Лигаза	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений

### 3. Кофакторы и коферменты

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы (коферментах) и/или в ионах металлов (кофакторах).

Термин "кофермент" был введён в начале XX века и обозначал часть некоторых ферментов, которая легко отделялась от белковой молекулы фермента и удалялась через полупроницаемую мембрану при диализе. Несколько позже было выяснено, что большинство ферментов состоит из термолабильной белковой части и термостабильного небелкового фактора - кофермента. Белковая часть получила название "апофермент", который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью. Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу холофермента, обладающую каталитической активностью.

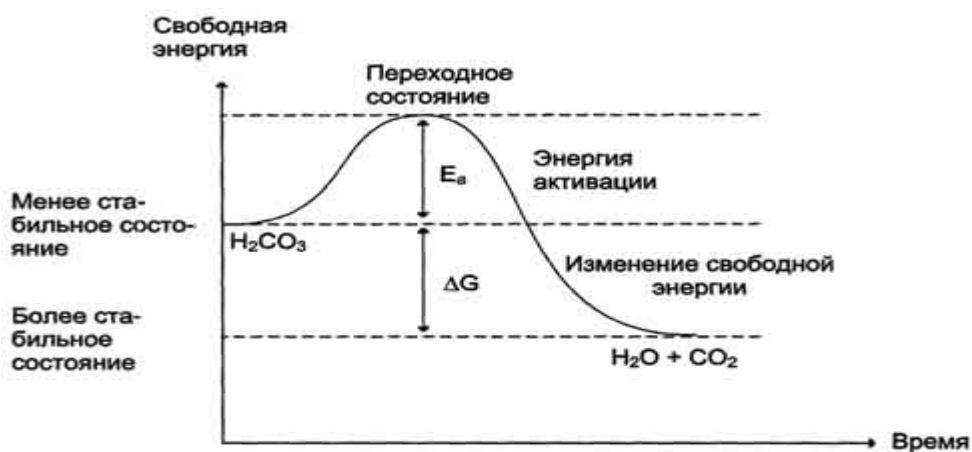
### 4. Механизм действия ферментов

Механизм действия ферментов может быть рассмотрен с двух позиций: с точки зрения изменения энергетики химических реакций и с точки зрения событий в активном центре.

#### А. Энергетические изменения при химических реакциях

Любые химические реакции протекают, подчиняясь двум основным законам термодинамики: закону сохранения энергии и закону энтропии.

Энергией активации называют дополнительное количество кинетической энергии, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.



**Рис.. Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты.**

В механизме ферментативного катализа решающее значение имеет образование нестойких промежуточных соединений - фермент-субстратный комплекс ES, подвергающийся превращению в нестабильный переходный комплекс EP, который почти мгновенно распадается на свободный фермент и продукт реакции.

Таким образом, биологические катализаторы (ферменты) не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов и поэтому не меняют равновесие реакции

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, однако имеет и отличительные свойства, связанные с особенностями строения ферментов.

Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что:

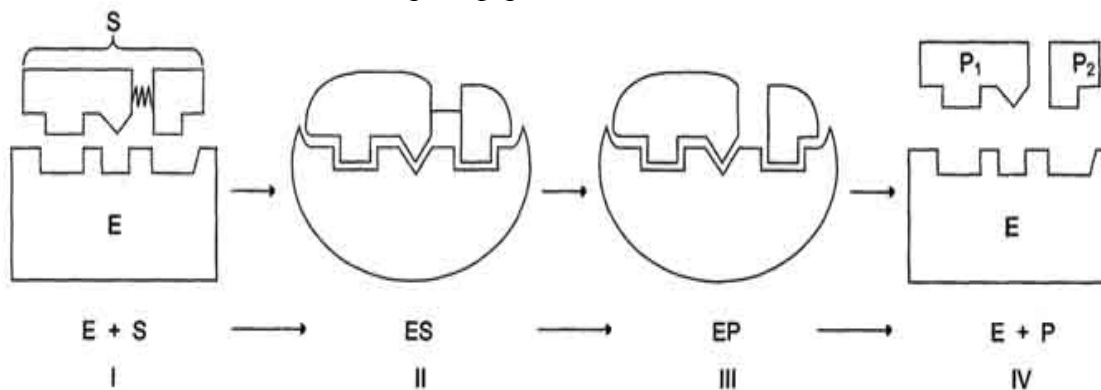
- ферменты катализируют энергетически возможные реакции;
- энергия химической системы остаётся постоянной;
- в ходе катализа направление реакции не изменяется;
- ферменты не расходуются в процессе реакции.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов заключаются в том, что:

- скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами;
- ферменты обладают высокой специфичностью;
- ферментативная реакция проходит в клетке, т.е. при температуре 37 °С, постоянном атмосферном давлении и физиологическом значении pH;
- скорость ферментативной реакции может регулироваться.

Б. Этапы ферментативного катализа

1. Формирование фермент-субстратного комплекса
2. Последовательность событий в ходе ферментативного катализа
3. Роль активного центра в ферментативном катализе



**Рис. Этапы ферментативного катализа.** I - этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента; II - образование фермент-

субстратного комплекса (ES) в результате индуцированного соответствия; III - деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP); IV - распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента.

### 1. 3 Лекция № 3 ( 2 часа).

Тема: «Основные углеводы пищи. Переваривание углеводов. Механизм трансмембранного переноса глюкозы и других моносахаридов в клетки»

#### 1.3.1 Вопросы лекции:

1. Переваривание углеводов в ротовой полости и в кишечнике
2. Механизм трансмембранного переноса глюкозы и других моносахаридов в клетки.
3. Нарушения переваривания и всасывания углеводов

#### 1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Переваривание углеводов в ротовой полости и в кишечнике

В ротовой полости пища измельчается при пережёвывании, смачиваясь при этом слюной. Слюна на 99% состоит из воды и обычно имеет pH 6,8. В слюне присутствует гидролитический фермент  **$\alpha$ -амилаза ( $\alpha$ -1,4-гликозидаза)**, расщепляющая в крахмале  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи. В ротовой полости не может происходить полное расщепление крахмала, так как действие фермента на крахмал кратковременно. Кроме того, амилаза слюны не расщепляет  $\alpha$ -1,6-гликозидные связи (связи в местах разветвлений), поэтому крахмал переваривается лишь частично с образованием крупных фрагментов - декстринов и небольшого количества мальтозы. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

Действие амилазы слюны прекращается в резко кислой среде содержимого желудка (pH 1,5-2,5). Однако внутри пищевого комка активность амилазы может некоторое время сохраняться, пока pH не изменится в кислую сторону. Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих углеводы. В желудочном содержимом возможен лишь незначительный кислотный гидролиз гликозидных связей.

Последующие этапы переваривания нерасщеплённого или частично расщеплённого крахмала, а также других углеводов пищи происходит в тонком кишечнике в разных его отделах под действием гидролитических ферментов - гликозидаз.

2. Механизм трансмембранного переноса глюкозы и других моносахаридов в клетки.

Транспорт моносахаридов в клетки слизистой оболочки кишечника может осуществляться разными способами: путём облегчённой диффузии и активного транспорта. В случае активного транспорта глюкоза и  $\text{Na}^+$  проходят через мембраны с люминальной стороны, связываясь с разными участками белка-переносчика. При этом  $\text{Na}^+$  поступает в клетку по градиенту концентрации, и одновременно глюкоза транспортируется против градиента концентрации (вторично-активный транспорт, см. раздел 5). Следовательно, чем больше градиент  $\text{Na}^+$ , тем больше поступление глюкозы в энтероциты. Если концентрация  $\text{Na}^+$  во внеклеточной жидкости уменьшается, транспорт глюкозы снижается. Градиент концентрации  $\text{Na}^+$ , являющийся движущей силой активного сим-порта, создаётся работой  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. Перенос в клетки слизистой оболочки кишечника по механизму вторично-активного транспорта характерен также для галактозы.

3. Нарушения переваривания и всасывания углеводов

В основе патологии переваривания и всасывания углеводов могут быть причины двух типов:



- дефекты ферментов, участвующих в гидролизе углеводов в кишечнике;
- нарушение всасывания продуктов переваривания углеводов в клетки слизистой оболочки кишечника.

В обоих случаях возникает осмотическая диарея, которую вызывают нерасщеплённые дисахариды или невсосавшиеся моносахариды. Эти невостребованные углеводы поступают в дистальные отделы кишечника, изменяя осмотическое давление содержимого кишечника. Кроме того, оставшиеся в просвете кишечника углеводы частично подвергаются ферментативному расщеплению микроорганизмами с образованием органических кислот и газов. Всё вместе приводит к притоку воды в кишечник, увеличению объёма кишечного содержимого, усилению перистальтики, спазмам и болям, а также метеоризму.

## **2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

### **2.1 Лабораторная работа №1 ( 2 часа).**

**Тема: Основы функционирования белков. Сложные белки**

#### **2.1.1 Цель работы: изучить основы функционирования белков.**

#### **2.1.2 Задачи работы:**

1. Изучить основы функционирования белков.
2. Закрепить представления о структурах белковых молекул.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

#### **2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

10%-ный раствор серной кислоты, дистиллированная вода, концентрированный раствор аммиака, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный спиртовой раствор тимола, концентрированная серная кислота, молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония, вода, 32%-ная азотная кислота ( $\rho = 1,2$  г/мл), слюна, 2 мл молока, ледяная уксусная кислота, стеклянная палочка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор азотной кислоты, 0,5%-ный раствора фенолфталеина, 1%-ный раствор яичного белка, круглодонная колба на 100 мл, фильтры, пробка с обратным холодильником длиной 25-30 см, стеклянные палочки, спиртовка, спички, пробирки, штативы, асбестовая сетка.

#### **2.2.4 Описание (ход) работы:**

##### **Опыт 1. Реакции на фосфопротеиды**

##### **Выделение казеиногена из молока**

##### **Ход работы:**

К 2 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды и затем 2 капли ледяной уксусной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают на фильтре 2 раза дистиллированной водой, а затем собирают стеклянной палочкой в пробирки и используют для следующих работ.

##### **Доказательство белковой природы казеиногена**

##### **Ход работы:**

С частью осадка казеиногена проделывают цветные реакции на белки и аминокислоты – биуретовую, Фоля, Миллона.

Оставшуюся часть осадка подвергают гидролизу, для чего помещают его в пробирку, куда добавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой и кипятят 10-15 мин на асбестовой сетке. Охлаждают. В гидролизате открывают фосфорную кислоту.

Гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты, в присутствии 1-2 капель 0,5%-ного раствора фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 мл фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Раствор окрашивается в лимонно-желтый цвет, а при стоянии выпадает осадок такого же цвета фосфомолибденовокислого аммония.

## **Опыт 2. Реакции на гликопротеиды**

### **Открытие углеводного компонента в яичном белке**

#### **Ход работы:**

В сухую пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и проводят реакцию Молиша. К 10 каплям раствора яичного белка прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

### **Выделение муцина из слюны**

#### **Ход работы:**

В пробирку собирают 2-3 мл слюны и добавляют 4-5 капель ледяной уксусной кислоты. Выпадает осадок муцина. Жидкость из пробирки осторожно сливают, а с осадком муцина проводят реакцию Молиша для доказательства присутствия углевода в этом белке.

## **2.2 Лабораторная работа №2 ( 2 часа).**

### **Тема: Витамины. Качественные реакции.**

**2.2.1 Цель работы:** изучить витамины и ознакомиться с качественными реакциями на них

#### **2.2.2 Задачи работы:**

1. Научиться определять витамины.
2. Изучить их качественные реакции.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

#### **2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

штатив с пробирками, 1% раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрата натрия, порошок тиамин, 10% раствор бикарбоната натрия, 0,025% раствор рибофлавина, концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,01 г никотиновой кислоты, 10 % раствор уксусной кислоты, 5% раствор ацетата меди, 10% раствор тиомочевины, витамин В<sub>12</sub> беззольный фильтр, концентрированная серная кислота, пробка с обратным холодильником, штатив, дистиллированная вода, 5% раствор пиридоксина, 5% раствор хлорного железа, 1%-ная вытяжка шиповника, аскорбиновая кислота, 5% раствор феррицианида калия, концентрированная уксусная кислота, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,1 г чая, 10мл экстракта чая, индигокармин, 0,05 N. раствор перманганата калия, сок картофеля, сок капусты (клубни картофеля или часть кочана капусты натрите на терке из нержавеющей стали или пластика, растертую массу отожмите через марлю, сложенную в два слоя), 5 %-ый раствор гексацианоферрата (III) калия, 5%-ый раствор гидроксида калия, 10 %-ый раствор соляной кислот, 1,5 %-ый раствор хлорида железа (III), 5 %-ый раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте), 10 % -ый раствор аммиака, дистиллированная вода, терка из нержавеющей стали или пластика, пробирки, рыбий жир, хлороформ, анилиновый реактив, 0,1%-ный спиртовой раствор витамина Е, концентрированная азотная кислота.

#### **2.7.4 Описание (ход) работы:**

### **Опыт 1. Водорастворимые витамины**

**а) Качественная реакция на тиамин (витамин В<sub>1</sub>)**

**Ход работы:**

В пробирку приливают по 5-10 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5% раствора нитрата натрия (состав диазореактива). Сюда же вносят на кончике ножа или стеклянной палочки небольшое количество порошка тиамина и по стенке пробирки осторожно добавляют 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

**Диазореакция**

В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

**Ход работы:**

К диазореактиву, содержащему 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрата натрия, добавляют 1-2 капли 5%-ного раствора тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

**б) Открытие рибофлавина (витамин В<sub>2</sub>)**

**Ход работы:**

В пробирку приливают 10 капель 0,025% раствора рибофлавина, 5 капель концентрированной соляной кислоты и зернышко металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с витамином, восстанавливая его, и раствор меняет окраску (из желтого на красную и розовую), а затем обесцвечивается.

**в) Открытие никотиновой кислоты (витамина РР)**

**Ход работы:**

В пробирку вносят 0,01 г никотиновой кислоты и 20 капель 10 % раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения и добавляют равный объем 5% раствора ацетата меди. При постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок меди комплексной соли и никотиновой кислоты.

**г) Открытие цианкобаламина (витамина В<sub>12</sub>)**

**Ход работы:**

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10% раствора тиомочевины и высушивают над сеткой газовой горелки. Затем на фильтр добавляют 1-2 капли минерализата витамина. Приготовление минерализата: в пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В<sub>12</sub> и 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрывают ее пробкой с обратным холодильником, закрепляют на штативе в несколько наклоненном положении и производят сжигание в вытяжном шкафу до обесцвечивания раствора. По окончании минерализации добавляют 1 мл дистиллированной воды небольшими порциями при постоянном перемешивании и вновь подсушивают. На фильтре (чаще по краям пятна) появляется зеленое окрашивание.

**д) Открытие пиридоксина (витаминов В<sub>6</sub>)**

**Ход работы:**

В пробирке смешивают 5 капель 5% раствора пиридоксина и 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

**е) Открытие аскорбиновой кислоты в шиповнике**

**Ход работы:**

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

**ж) Обнаружение аскорбиновой кислоты в соке картофеля или капусты**

**Ход работы:**

**Восстановление ионов железа (III)**

В две пробирки налейте по 1 см<sup>3</sup> сока картофеля и капусты, прибавьте по 2 капли раствора гидроксида калия и столько же раствора гексацианоферрата (III) калия.

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

#### **Восстановление ионов серебра**

В пробирку налейте 1 см<sup>3</sup> раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака.

Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 см<sup>3</sup> сока картофеля, а во вторую - 1 см<sup>3</sup> сока капусты.

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

#### **з) Количественное определение рутина (витамина Р)**

##### **Ход работы:**

К 0,1 г чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и кипятят 5 мин. Отбирают 10 мл экстракта чая в коническую колбу, куда добавляют 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина в качестве индикатора. Титруют 0,05 N раствором перманганата калия до устойчивости желтой окраски. Расчет производят по формуле:

$$X = 3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100 / 10 \cdot 0,1 \cdot 1000$$

где: X – количество рутина (мг%); 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент титрования (1 мл 0,05 N раствора перманганата калия окисляет 3,2 мг рутина); A – количество миллилитра перманганата калия, прошедшего на титрование; 50 – количество миллилитров воды, добавленное к чаю для экстракции; 100 – коэффициент для пересчета; 10 – количество миллилитров экстракта, взятое для титрования; 0,1 – количество сухого вещества в граммах, взятое для анализа; 1000 – коэффициент пересчета (1 мг = 1000 мкг).

После приведения формула имеет следующий вид :

$$X = A \cdot 16 \text{ мг\%}$$

Для определения рутина в граммах на 1 кг массы тела следует воспользоваться формулой:

$$X = *0,16 \text{ г/кг} A$$

#### **Опыт 2. Жирорастворимые витамины**

##### **а) Открытие ретинола (витамина А) в рыбьем жире**

###### **Ход работы:**

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей концентрированной серной кислоты. Развивается фиолетово-красное окрашивание, быстро переходящее в бурое.

При отсутствии ретинола в пище у взрослых наблюдается потеря зрения в сумерках, у детей поражается роговая оболочка глаза и главным образом понижается сопротивляемость организма инфекционным заболеваниям.

##### **б) Открытие холекальциферола (витамина D) в рыбьем жире**

###### **Ход работы:**

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей анилинового реактива (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты). Эмульсия окрашивается в желтый цвет, который при нагревании приобретает красную окраску.

### **в) Открытие токоферола (витамин Е)**

#### **Ход работы:**

В сухой пробирке смешивают при энергичном встряхивании 5 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Верхний масляный слой расслоившейся эмульсии окрашивается в красный цвет.

### **2.3 Лабораторная работа №3 ( 2 часа).**

#### **Тема: Особенности ферментов как белковых катализаторов.**

##### **2.3.1 Цель работы: изучить особенность ферментов как белковых катализаторов**

##### **2.3.2 Задачи работы:**

1. Ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы.
2. Исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции.
3. Изучить процесс ингибирования холинэстеразы фосфорорганическими соединениями.
4. Закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов.
5. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами.
6. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
7. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

##### **2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

штатив с пробирками, держатель для пробирок, 1% раствора крахмала, вода, слюна, термостат или водяная баня, 1% раствор йодида калия, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия, образцы молока и кисломолочных продуктов, 1%-ный раствор  $H_2O_2$ , 1%-ный раствор йодисто-калиевого крахмала.

##### **2.3.4 Описание (ход) работы:**

##### **Опыт 1. Гидролиз крахмала амилазой слюны**

##### **Ход работы:**

В две пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В одну из них (пробирка №1) вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую (№2) – 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят термостат или водяную баню на 15 мин при 37 С. Затем из пробирки №1 отбирают по 4 капли исследуемого вещества, которые вносят в две различные пробирки.

а) **реакция на крахмал.** В одну из пробирок добавляет 1 каплю 1% раствора йодида калия (реакция с йодом). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

б) **Реакция Троммера.** В другую – 3 капли 5 % раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают до кипения (реакция Троммера). Появление красного окрашивания указывает на присутствие в растворе конечных продуктов гидролиза крахмала – глюкозы и мальтозы. Аналогичную процедуру сделать с содержимым пробирки №2. Результаты опыта записать в виде таблицы.

Таблица. Гидролиз крахмала амилазой слюны

№ Пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция	
			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Вода (контроль)		
2	Крахмал	Амилаза		

Результат должен показать, что в присутствии воды гидролиза крахмала не происходит, и реакция с йодом должна быть положительной, а реакция Троммера –

отрицательной, тогда как в присутствии амилазы слюны результаты должны быть противоположными, так как произошел гидролиз крахмала.

## **Опыт 2. Реакция на пероксидазу с йодисто-калиевым крахмалом**

### **Ход работы:**

В 3 пробирки вносят образцы молока и кисломолочных продуктов по 2-3 мл., добавляют 3-5 мл. воды, 5 капель 1% раствора  $H_2O_2$  и 5 капель 1% раствора йодисто-калиевого крахмала. Появление синего окрашивания указывает на то, что кисломолочный продукт получен из не пастеризованного молока (сливок)

Появление окраски более чем через 2 мин не служит показателем наличия пероксидазы.

## **2.4 Лабораторная работа №4 ( 2 часа).**

**Тема: Строение и функции основных липидов организма. Переваривание и всасывание жиров. Синтез жиров в клетках слизистой оболочки кишечника**

### **2.4.1 Цель работы:** изучить строение и функции основных липидов организма

животного

### **2.4.2 Задачи работы:**

1. Ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды.
2. Закрепить представления о структурах липидов.
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами; ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов.
4. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

### **2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

штатив с пробирками, бюретка, спиртовка, спички, чаша для выпаривания, фильтровальная бумага, чашка Петри, стеклянная палочка, фарфоровая чашечка, жир (свиной, говяжий и т.п.), вода, этанол, толуол, петролейный эфир, ацетон, водяная баня, растительное масло, раствор щелочи (NaOH разб.), соляная кислота, цельное молоко, 10%-ный раствор  $Na_2CO_3$ , диэтиловый эфир, безводный  $KHSO_4$ , аммиачный раствор нитрата серебра, фуксинсернистая кислота, бромная вода, кусочек сала, спирт, 0,2н спиртового раствора йода, 0,1н раствор тиосульфата натрия, раствор крахмала, сливочное масло, 0,1н раствора KOH, касторовое масло, 35%-ный раствор гидроксида натрия, дистиллированная вода, фенолфталеин, раствор соляной кислоты, 5%-ная эмульсия сухих сливок, 5%-ный раствор панкреатина, 1%-ный раствор карбоната натрия, желчь, 20%-ный раствор сахарозы, концентрированная серная кислота, суспензия яичного желтка, панкреатин, молибденовый реактив, белок.

### **2.4.4 Описание (ход) работы:**

#### **Опыт 1. Растворимость жиров и масел**

##### **Ход работы:**

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

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в

водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

### **Опыт 2. Гидролиз жиров и масел**

#### **Ход работы:**

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

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

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

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

### **Опыт 3. Выделение жира из молока**

#### **Ход работы:**

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

### **Опыт 4. Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)**

#### **Ход работы:**

В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира), 0,1-0,2 г безводного  $\text{KHSO}_4$  и нагревают на спиртовке (под тягой) до появления белых густых паров. В пары вносят фильтровальную бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

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

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании в присутствии водоотнимающих средств ( $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , борная кислота) из глицерина образуется непредельный альдегид – акролеин (пропеналь).

### **Опыт 5. Определение ненасыщенности кислот в составе жира**

#### **Ход работы:**

В пробирки поместите образцы жиров: 2–3 капли растительного масла, 2-3 капли рыбьего жира, 2-3 капли топленого жира (масла), кусочек животного жира (свиного, бараньего) и добавьте по 8 – 10 капель бромной воды. Пробирку встряхните.

Аналитический эффект: Обесцвечивание бромной воды

### **Опыт 6. Определение йодного числа**

#### **Ход работы:**

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3-4 капли растительного масла, в другую – кусочек сала.

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

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

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

**Расчет йодного числа проводят по формуле:**

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

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

Сравните йодное число растительного масла и сала. Объясните разницу.

#### **Опыт 7. Определение кислотного числа**

##### **Ход работы:**

В первую предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 г. свежего сливочного масла, во вторую - примерно 2 г. прогорклого сливочного масла. Колбы повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира)  $\approx 2$ -3 г. В каждую колбочку добавляют по 10-15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5-1 мин.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К.ч.} = V T / m,$$

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

Сравните кислотное число свежего и прогорклого масла.

#### **Опыт 8. Омыление жиров**

##### **Ход работы:**

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

#### **Опыт 9. Определение числа омыления**

##### **Ход работы:**

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

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

Расчет числа омыления проводят по формуле:

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

где Ч.о. – число омыления;  $V_2$  – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля;  $V_1$  – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла;  $m$  – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

#### **Опыт 10. Определение перекисного числа**

##### **Ход определения:**

На аналитических весах взвешивают около 1 г жира и помещают его в коническую колбу 10-200 мл. В другую колбу (контроль) наливают 2-3 мл. воды. В обе колбы наливают по 10 мл. хлороформа и растворяют жир. Затем в колбы добавляют по 20 мл ледяной уксусной кислоты и по 1 мл. раствора йодистого калия. Смесь тщательно перемешивают и оставляют на 3 минуты. Затем проводят титрование выделившегося йода



0,01 н раствором тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Титруют до исчезновения желтой окраски, после чего в колбы приливают 1 мл 1% раствора крахмала и титруют до исчезновения голубой окраски.

Вычисление результатов проводят по формуле:

$$X = (a - b) \cdot T \cdot 0,001269 \cdot 100 / H,$$

где X – перекисное число; а- количество 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование йода, выделившегося в результате реакции жира с йодистым калием (мл); б – количество 0,01 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное в контрольном определении (мл); Т- поправка к титру раствора тиосульфата натрия; 0,00127 — количество граммов йода, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, Н – навеска жира. .

Степень окисления порчи жира в зависимости от перекисного числа определяется по таблице 18:

Таблица 18. Оценка состояния жира в зависимости от величины перекисного числа

Перекисное число % йода	Степень окислительной порчи
до 0,03	свежий
От 0,03 до 0,06	свежий, не подлежит хранению
От 0,06 до 0,10	сомнительной свежести
Более 0,10	испорченный

### Опыт 11. Открытие липазы

#### Ход работы:

В две пробирки наливают по 10 капель 5% эмульсии сухих сливок. В пробирку №1 добавляют 5 капель 5% раствора панкреатина, содержащего липазу, а в пробирку №2 – такое же количество воды. В обе пробирки вносят по 1 капле 1% раствора фенолфталеина и добавляют по каплям 1% раствор карбоната натрия до появления слабо-розовой окраски (нельзя добавлять избыток карбоната натрия). Пробирки помещают на 30 мин в термостат при 37° С, по окончании инкубации замечают изменение окраски.

### Опыт 12. Качественная реакция на желчные кислоты

#### Ход работы:

На сухую чашку Петри (под которую подложить лист белой бумаги) нанести 2 капли желчи, 2 капли 20%-ного раствора сахарозы и тщательно перемешать. Стеклопалочкой. Затем прилить 7 капель концентрированной серной кислоты и перемешать той же палочкой. Через 2-3 минуты наблюдается красное окрашивание, которое при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

### Опыт 13. Действие фосфолипаз поджелудочной железы

#### Ход работы:

В две пробирки наливают по 5 капель суспензии яичного желтка. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли панкреатина, а во вторую – 2 капли воды. Обе пробирки помещают в термостат при 38°С на 30 мин. После инкубации в обе пробирки наливают по 5 капель молибденового реактива, нагревают их на пламени спиртовки и охлаждают водой под краном.

### Опыт 14. Эмульгирование жира

#### Ход работы:

В 5 пробирок помещают по 2 капли растительного масла, по 1 мл дистиллированной воды и по 5 капель соответственно в каждую пробирку, начиная с первой: желчи, гидроксида натрия, карбоната натрия, белка и воды. Пробирки встряхивают и наблюдают

образование устойчивых эмульсий во всех пробирках, кроме 5-й, где происходит расслаивание на жир и воду.

#### **Опыт 15. Проба на понижение поверхностного натяжения**

##### **Ход работы:**

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

### **3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

#### **ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ**

##### **3.1 Практическое занятие №1 (2 часа).**

**Тема: «Белковое питание. Азотистый баланс. Переваривание белков»**

##### **3.1.1 Задание для работы:**

1. Основной источник аминокислот
2. Протеиногенные аминокислоты
3. Полноценность белкового питания
4. Источники и пути использования аминокислот
5. Характеристика протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта

##### **3.1.2 Краткое описание проводимого занятия:**

1. Рассмотреть основные источники аминокислот для человека и животных
2. Изучить методы определения полноценности белкового питания, а также процессы происходящие при переваривании белков.

##### **1. Переваривание белка пепсином**

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл 0,2% соляной кислоты; во вторую пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте; в третью пробирку - 3-4 мл желудочного сока или раствора пепсина в соляной кислоте, предварительно нейтрализованного на лакмус содой; в четвертую пробирку - 3-4 мл предварительно прокипяченного и охлажденного желудочного сока или прокипяченного и охлажденного раствора пепсина и соляной кислоты.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины и все пробирки ставят одновременно, а водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно произойти лишь набухание фибрина под действием кислоты; во второй переваривание (растворение) фибрина; в третьей – фибрин остается без изменения, так как пепсин в нейтральной среде не активен; в четвертой – происходит набухание фибрина под действием соляной кислоты, но переваривание не имеет места, так как пепсин разрушен кипячением.

##### **Переваривание белка трипсином**

##### **а)Переваривание фибрина**

##### **Ход работы:**

1. В одну пробирку наливают 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда); во вторую пробирку - 3-4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус; в третью пробирку - 3-4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

2. Помещают в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно

равной величины и одновременно ставят все пробирки в водяную баню при 37-40°C.

3. Через полчаса или час вынимают пробирки из бани и наблюдают результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место переваривания (растворение) фибрина; во второй пробирке может быть лишь очень небольшое переваривание, так как в нейтральной среде трипсин слабо активен; в третьей пробирке наблюдается только набухание фибрина.

4. Отфильтровывают часть жидкости из каждой пробирки и проделывают с фильтратом биуретовую реакцию. Положительная реакция указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка.

#### **б) Переваривание казеина**

##### **Ход работы:**

1. В колбочку наливают 25-30 мл вытяжки трипсина или раствора панкреатита и помещают туда 3-5 г казеина
2. Перемешивают содержимое, добавляют около 5 мл хлороформа (для предотвращения гниения), закрывают колбочку ватой и ставят в термостат при 37-40°C на 4-5 суток (до следующего занятия).
3. На следующем занятии нагревают колбочку до кипения и добавляют по каплям уксусную кислоту до слабокислой реакции. При этом осаждаются не переваренные белки.
4. Охлаждают смесь, погрузив колбочку в холодную воду, и фильтруют для освобождения от белков.
5. Отливают порцию фильтрата (3-4 мл) в пробирку и добавляют по каплям бромную воду. Появление розово-фиолетового окрашивания, исчезающего от избытка реактива, указывает на присутствие свободного триптофана.
6. К другой порции фильтрата (около 2 мл) добавляют 8-10 капель концентрированной серной кислоты и 5-6 мл раствора сернокислой ртути в серной кислоте, перемешивают содержимое и оставляют стоять на 10-15 минут.
7. Образовавшийся желтый осадок ртутного соединения триптофана отфильтровывают, сохраняя фильтрат, и промывают на фильтре 4-5 маленькими порциями (по 1-2 мл) дистиллированной воды.
8. Небольшим количеством (около 0,5 мл) воды переносят осадок в пробирку. Делят осадок и фильтрат на три части и проделывают как с осадком, так и с фильтратом реакции Адамкевича, Милона и ксантопротеиновую (см. Цветные реакции на белки).
9. Отмечают положительные реакции Адамкевича в ксантопротеиновую и отрицательную реакцию Милона с осадком, что указывает на присутствие триптофана и отсутствие тирозина.

Положительная ксантопротеиновая и милонова реакции и отрицательная реакция Адамкевича с фильтратом указывают на наличие в фильтрате тирозина и отсутствие триптофана.

Окрашивание при проведении ксантопротеиновой реакции (в особенности с осадком) появляется медленно (обычно через 15-20 минут).

#### **Обнаружение аммонийных солей**

В пробирку наливают 2-3 мл мочи и 1-2 мл насыщенного раствора  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , перемешивают и подносят к отверстию пробирки, не прикасаясь к её стенкам, лакмусовую бумагу, смоченную водой. Через некоторое время бумага приобретает синий цвет, за счет поглощения выделяющегося аммиака.





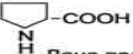
##### **3.1.3 Результаты и выводы:**

В результате занятия студенты узнали строение и свойства протеиногенных аминокислот, а также каким образом образуются пептидные связи.

Общая структурная особенность аминокислот - наличие amino- и карбоксильной групп, соединённых с одним и тем же углеродным атомом. R - радикал аминокислот - в простейшем случае представлен атомом водорода (глицин), но может иметь и более сложное строение.

В водных растворах при нейтральном значении pH аминокислоты существуют в виде биполярных ионов.

Таблица Классификация основных аминокислот белков по их химическому строению

Тривиальные названия аминокислот	Сокращённые названия		Строение радикалов
	русские	латинские	
I. Аминокислоты с алифатическими радикалами			
1. Глицин	Гли	Gly G	-H
2. Аланин	Ала	Ala A	-CH <sub>3</sub>
3. Валин	Вал	Val V	$-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
4. Лейцин	Лей	Leu L	$-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
5. Изолейцин	Иле	Ile I	$-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$   CH <sub>3</sub>
II. Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале дополнительную функциональную группу			
Гидроксильную группу			
6. Серин	Сер	Ser S	-CH <sub>2</sub> -OH
7. Треонин	Тре	Thr T	-CHOH-CH <sub>3</sub>
Карбоксильную группу			
8. Аспарагиновая кислота	Асп	Asp D	-CH <sub>2</sub> -COOH
9. Глутаминовая кислота	Глу	Glu E	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Амидную группу			
10. Аспарагин	Асп	Asn N	-CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
11. Глутамин	Глн	Gln Q	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
Аминогруппу			
12. Лизин	Лиз	Lys K	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
Гуанидиновую группу			
13. Аргинин	Арг	Arg R	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-C(=NH)-NH <sub>2</sub>
Серу			
14. Цистеин	Цис	Cys C	-CH <sub>2</sub> -SH
15. Метионин	Мет	Met M	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
III. Аминокислоты, содержащие ароматический радикал			
16. Фенилаланин	Фен	Phe F	-CH <sub>2</sub> - 
17. Тирозин	Тир	Tyr Y	-CH <sub>2</sub> - 
IV. Аминокислоты с гетероциклическими радикалами			
18. Триптофан	Три	Trp W	-CH <sub>2</sub> - 
19. Гистидин	Гис	His H	-CH <sub>2</sub> - 
V. Иминокислота			
20. Пролин	Про	Pro P	 Дана полная формула

Кроме этого, студенты ознакомились с процессами, происходящими при переваривании белков.