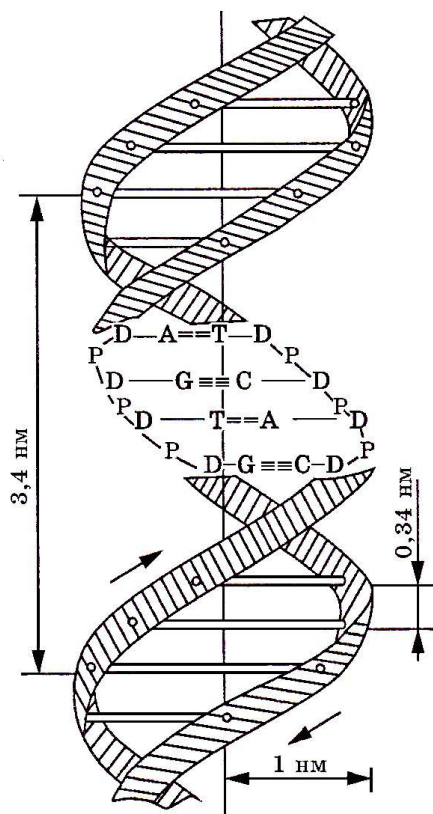


# БИОХИМИЯ



## Рабочая тетрадь

студента(ки) группы \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (фамилия, имя)

200\_\_ / 200\_\_ уч. год



УДК 557  
ББК  
Г-51

**Гирфанова Ю.Р.** Биохимия: Рабочая тетрадь / Ю.Р. Гирфанова -  
Димитровград: Технологический институт – филиал УлГАУ, 2019.- 37 с.

Рецензенты: Курьянова Надежда Хусаиновна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Технология производства, переработки и экспертизы продукции АПК» ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Биохимия: Рабочая тетрадь предназначена для подготовки бакалавров по направлению подготовки 19.03.03 Технология молока и молочных продуктов.

Рабочая тетрадь разработана в соответствии с учебной программой дисциплины «Биохимия». В ней изложены основные методики выполнения практических работ, краткие общие сведения к ним, предлагаются контрольные вопросы к выполненным практическим работам.

Утверждено  
на заседании кафедры «Технология  
производства, переработки и экспертизы  
продукции АПК»  
Технологического института – филиала  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ,  
протокол № 1 от 2 сентября 2019г.

Рекомендовано  
к изданию методическим советом  
Технологического института – филиала  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ  
Протокол № 2 от 10 октября 2019г.

© Гирфанова Ю.Р., 2019

© Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2019



*Скажи мне, и я забуду.  
Покажи мне, и я запомню.  
Дай мне сделать самому, и я научусь.*

Древняя китайская мудрость



## СОДЕРЖАНИЕ

Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории.....	
Оказание первой медицинской помощи.....	
Требования к выполнению и оформлению лабораторных работ.....	
Лабораторная работа №1 «Хроматографическое разделение аминокислот на бумаге».....	
Лабораторная работа №2 «Цветные реакции на белки».....	
Лабораторная работа №3 «Реакции осаждения белков».....	
Лабораторная работа №4 «Сложные белки – нуклеопротеиды».....	
Лабораторная работа №5 «Методы исследования нуклеиновых кислот».....	
Лабораторная работа №6 «Реакции на ферменты».....	
Лабораторная работа №7 «Витамины».....	
Лабораторная работа №8 «Углеводы» .....	
Рейтинг успеваемости по лабораторному практикуму.....	
Руководство для исследователя.....	
Литература.....	



## ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Химия (и соответственно биологическая химия) – наука экспериментальная, поэтому при изучении этого предмета, наряду с теоретическим курсом, важен лабораторный практикум.

Этот практикум позволяет ознакомиться с оборудованием химической лаборатории, научиться грамотно проводить химический эксперимент, квалифицированно пользоваться химическими реактивами, не нарушая общепринятую технику безопасности при работе в химических лабораториях.

*Во избежание несчастных случаев при работе в химической лаборатории необходимо соблюдать следующие правила техники безопасности:*

1. Работать только на указанных преподавателем или сотрудником лаборатории рабочих местах. Соблюдать в лаборатории тишину и порядок. Не загромождать рабочее место ненужными посудой и реактивами, запрещается класть на стол сумки, книги, шапки и т.п.

2. Не расходовать реактивы больше требуемого количества. Взятые в избытке реактивы обратно в склянки не сливать. Вовремя выключать электрические приборы. Не переносить приборы и реактивы общего пользования на свое рабочее место. Не путать пробки и крышки от склянок.

3. Концентрированные кислоты и щелочи выливать не в раковину, а в специальные емкости, установленные под тягой. Реактивы, использованные во время опытов, сливать не в канализацию, а в емкости с надписью «Отходы».

4. Выполнять эксперимент только после соответствующей подготовки по теоретическому разделу работы, внимательного ознакомления с описанием работы накануне занятия и уяснив технику ее выполнения. Все работы с вредными и опасными веществами выполнять только под тягой.

5. Работы с концентрированными кислотами и щелочами выполнять с осторожностью, а при попадании кислот и щелочей на кожу, лицо, глаза и одежду, тщательно смыть струей воды и обработать пораженный участок специальными растворами по указанию преподавателя или сотрудника лаборатории. При разливе концентрированных растворов кислот, щелочей или других вредных веществ доложить об этом преподавателю или лаборанту и в соответствии с их указаниями привести рабочее место в порядок.



6. Запрещается вливать в концентрированные кислоты воду, так как может произойти выброс кислоты из реакционного сосуда. При разбавлении кислот, особенно серной, нужно приливать кислоту к воде тонкой струйкой при постоянном помешивании.

7. Не наклонять низко голову над приборами и химической посудой, в которых происходит химическая реакция. Для определения запаха газа направлять к себе ток воздуха с газом движением руки.

8. Во избежание взрыва не поджигать выделяющиеся при реакции газы и пары, не убедившись, что они не содержат примеси воздуха. При нагревании реакционной смеси, а также в случае выделения газообразных продуктов реакции, держать химическую посуду или пробирки в сторону от себя и работающих рядом. Не зажигать открытый огонь, если рядом проводятся работы с огнеопасными и взрывчатыми веществами. В случае возгорания растворимых в воде жидкостей тушить огонь песком или огнетушителем.

9. Обожженную кожу смочить крепким раствором перманганата калия. О возникновении любого аварийного момента или несчастного случая немедленно докладывать преподавателю.

10. После работы в лаборатории тщательно вымыть руки с мылом, убрать рабочее место, помыть химическую посуду и пробирки.

## ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Для оказания первой медицинской помощи в лаборатории должны быть бинты, гигроскопическая вата, 3%-ный раствор йода, 2%-ный раствор борной кислоты, 3%-ный раствор двууглекислого натрия (питьевая сода), коллодий или БФ-6.

При ранениях стеклом нужно удалить из раны осколки, обработать кожу вокруг нее йодом и перевязать пораненное место.

При термических ожогах первой и второй степени обожженное место можно присыпать двууглекислым натрием (питьевой содой). Хорошо помогают примочки из свежеприготовленных растворов 2%-ной питьевой соды или 5%-ного марганцевокислого калия. Лучшим средством для примочек является абсолютный или 96%-ный этиловый спирт, он оказывает одновременно и обеззараживающее действие.

При более тяжелых или обширных ожогах пострадавшего необходимо немедленно отправить к врачу.

При ожогах кислотами и щелочами пораженный участок кожи быстро промывают большим количеством воды. Затем на обожженное место



накладывают примочку: при ожогах кислотой – из 2%-ного раствора питьевой соды, при ожогах щелочью – из слабого (0,5%) раствора уксусной кислоты.

## **ТРЕБОВАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ РАБОТ**

Работа в химической лаборатории требует соблюдения правил техники безопасности, приступать к выполнению лабораторной работы можно только с разрешения преподавателя. Кроме знания методики выполнения работы студент должен ответить на ряд контрольных вопросов, охватывающих основные теоретические положения изучаемого раздела данного курса.

При выполнении лабораторной работы студент обязан вести рабочую (лабораторную) тетрадь. Записи проводят или в процессе выполнения работы, или сразу же после ее окончания.

Вести записи следует аккуратно, разборчиво, пользоваться только черными или синими чернилами.

Оформление работы следует проводить четко и аккуратно. **Отчет по каждой лабораторной работе должен быть сдан преподавателю и защищен непосредственно на занятии, посвященном данной теме. (!)**

Сдавая экзамен по изучаемому курсу, студент должен представить преподавателю, наряду с конспектами лекций, рабочую тетрадь для лабораторных работ, в которой фиксируются после каждой лабораторной работы замечания преподавателя по ее оформлению, указывается, зачтена она или нет, ставится подпись преподавателя.

В конце тетради может быть проставлен рейтинг успеваемости по лабораторному практикуму.

Преподаватель ставит пометку, допускается ли студент к экзамену.



## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 1

### ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА БУМАГЕ

**Цель работы:** познакомиться с бумажной хроматографией как одним из методов изучения аминокислотного состава белков

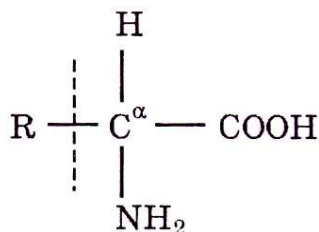
#### Общие сведения по лабораторной работе

➤ Структурными компонентами (мономерами) белков являются аминокислоты. Об этом свидетельствует тот факт, что при кислотном, щелочном, ферментативном гидролизе белков в качестве его конечного продукта образуются аминокислоты.

Всего в природе найдено около 300 аминокислот, однако в состав белков входит лишь 20, получивших название *белковых*, или *протеиногенных*, аминокислот.

В виде очищенных препаратов белковые аминокислоты представляют собой белые кристаллические вещества: сладкие, горькие или не имеющие вкуса.

Белковые аминокислоты являются  $\alpha$ -аминокислотами с характерной общей структурной особенностью: наличием карбоксильной и аминной групп, связанных с атомом углерода в  $\alpha$ -положении:



Часть этой структурной формулы (вправо от штриховой линии) одинакова у всех аминокислот,  $\alpha$ -остаток (радикал R) аминокислоты, ее *функциональная группа*, которая у разных аминокислот неодинакова по структуре, электрическому заряду и растворимости. Благодаря специфическим особенностям радикалов каждая аминокислота наделена индивидуальностью. Соответствующая последовательность и сочетание этих групп в молекуле белка определяют ее биологические функции.

В растворе возможно существование четырех электрохимических форм аминокислот (рис. 1)

В водных растворах аминокислоты находятся в виде *амфотерных ионов*, о чем свидетельствуют следующие факты:

- 1) они лучше растворимы в воде, чем в менее полярных растворителях;
- 2) в водных растворах аминокислоты обладают высокими диэлектрическими постоянными и большими дипольными моментами;



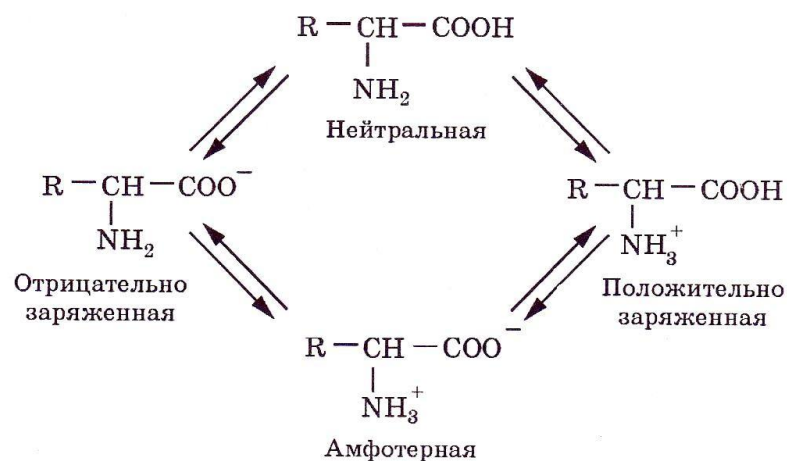


Рис.1. Электрохимические формы аминокислот

3) при кристаллизации из нейтральных водных растворов аминокислоты образуют прочные кристаллические решетки: кристаллы аминокислот плавятся при достаточно высоких температурах (200 – 300 °С), обычно с разложением. Объяснить это можно тем, что прочность кристаллической решетки аминокислот обусловлена электростатическими силами притяжения между противоположно заряженными химическими группами расположенных рядом молекул.

На ионизацию аминокислот в водных растворах большое влияние оказывает значение pH среды. В растворе с pH 4 – 9 аминокислоты существуют в виде амфотерных ионов.

➤ Основоположником хроматографического метода по праву считают русского ботаника Михаила Семеновича Цвета, открывшего этот метод в 1903 г. Однако широкое практическое приложение хроматографии относится к значительно более позднему периоду и связано с именами Арчера Мартина и Ричарда Синга. Эти молодые английские химики разработали в 1944 г. простую процедуру разделения смеси белковых гидролизатов (аминокислот) с помощью распределительной хроматографии на листах фильтровальной бумаги. Достоинства метода были столь быстро оценены в научном мире, что уже в 1952 г. авторы получили Нобелевскую премию. Несмотря на послевоенную разруху, в Советском Союзе метод бумажной хроматографии также быстро получил признание ученых.

### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** растворы аминокислот (из имеющихся в наличии в лаборатории), бутанол, уксусная кислота, раствор нингидрина (1%) в 95% ацетоне, фильтровальная бумага, хроматографическая камера, пульверизатор, электрическая плитка

### Ход работы:

Готовим полоску фильтровальной бумаги размером 5x10 см (можно вырезать из круглых обеззоленных фильтров диаметром 11 см). У одного края пробиваем дыроколом дырку, у противоположного края прочерчиваем простым карандашом линию старта. Наносим на эту линию растворы аминокислот (примерно 0,02 моль/л) – 5 мкл (пятнышко диаметром 2-3 мм). На линии старта можно поместить до 4-5 образцов аминокислот. Фиксируем эту полоску с помощью стеклянной палочки с резиновыми пробками в хроматографической камере в подвешенном состоянии так, чтобы ее нижний конец был погружен в растворитель (бутиловый спирт – уксусная кислота – вода 4:1:1) ниже линии старта.

Растворитель быстро поднимается по волокнам листа фильтровальной бумаги: за 20-25 мин на высоту 5-6 см. После этого вынимаем полученную хроматограмму, высушиваем и смачиваем 0,2-0,5%-ным ацетоновым раствором нингидрина (для повышения чувствительности реакции в раствор добавляют несколько капель уксусной кислоты).

Затем хорошо прогреваем хроматограмму над электроплиткой до появления красно-фиолетовых пятен (так называемый пурпур Руэмана – продукт взаимодействия аминокислот с нингидрином).

Процедура в целом занимает не более 30 мин.

Поскольку аминокислоты имеют разную растворимость в воде и органической фазе (бутиловый спирт), каждая из них имеет на хроматограмме определенную высоту.

На хроматограмме (рис.2) можно видеть, что: глицин, гистидин, лизин и глутаминовая кислота имеют низкую подвижность (гидрофильные аминокислоты) в данном растворителе и обнаруживаются на 1-2 см выше линии старта; метионин и особенно лейцин поднимаются в процессе хроматографии довольно высоко (гидрофобные аминокислоты); смесь глицина и лейцина достаточно хорошо разделяется (1-я дорожка); поднимающиеся высоко гидрофобные аминокислоты заметно размываются (наличие «хвостов»).



**Внимание!** Не следует слишком прогревать хроматограмму после обработки нингидрином, так как фон из-за этого становится кремовым, а пятна аминокислот менее заметными.

Рис. 2. Хроматограмма



С помощью линейки измеряют расстояние:

1. От места нанесения капли раствора до середины каждого пятна (а);
2. От места нанесения капли раствора до линии фронта растворителя (b).

Вычисляют коэффициенты распределения (R) для каждой аминокислоты по формуле:

$$R = \frac{a}{b}$$

Результаты измерений запишите в виде таблицы, а полученную хроматограмму вклейте в тетрадь.

Аминокислота	a	b	R

### Контрольные вопросы

1. *Какие органические соединения называются аминокислотами?*
2. *Перечислите основные химические свойства аминокислот.*
3. *Почему аминокислоты обладают амфотерными свойствами?*
4. *Чем объясняются основные свойства лизина и кислотные свойства аспарагиновой кислоты?*

Ответы:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 2

### ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

**Цель работы:** познакомиться с цветными реакциями на белки как одним из методов обнаружения белков и изучения их аминокислотного состава.

#### Общие сведения по лабораторной работе

**Белки** – высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых лежит в широком диапазоне и может достигать до нескольких миллионов а.е.м.

Белковые соединения с меньшей молекулярной массой называются пептидами. Граница между пептидами и белками весьма условна: соединения, включающие 50-100 остатков  $\alpha$ -аминокислот, иногда относят к полипептидам, а иногда – к белкам.

Цветные реакции дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях и получить представление о его аминокислотном составе.

После того как было выяснено, что аминокислоты являются строительными блоками белков (мономерами), встал вопрос о том, каким образом они связаны в молекуле белка.

Представление о наличии в молекуле белка определенных типов связей между аминокислотами дало изучение биуретовой реакции. При добавлении слабых растворов сернокислой меди к биурету  $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{NH}_2$  появляется фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание, обусловленное образованием комплексных соединений меди с биуретом. Биуретовую реакцию дают все без исключения белки.


На основании изучения этой реакции в 1888 г. А.Я. Данилевским высказано предположение, что пептидная (кислотно-амидная) группа  $-\text{CO} - \text{NH}-$  является основной связью в полипептидном каркасе белковой молекулы.

Полипептидную теорию строения белка разработал и экспериментально обосновал Э.Фишер, проведенными им в 1902 – 1919 гг. (Нобелевская премия 1921 г.), доказано, что основным типом связи в молекуле белка является пептидная связь.

Полипептидная теория удачно объясняла многие физико-химические и биологические свойства белков.

#### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** яичный белок одного куриного яйца, дистиллированная вода, щелочь (10%), раствор сульфата меди (10%), раствор нингидрина (1%) в 95% ацетоне, азотная кислота (конц.), раствор аммиака



(конц.), уксусная кислота (конц.), серная кислота (конц.), раствор ацетата свинца (II), раствор щелочи (20%), раствор формальдегида (2,5%), соляная кислота (конц.), нитрит натрия (0,5%), сульфаниловая кислота (1%), раствор карбоната натрия (10%), химический стакан, фильтровальная воронка, марля, спиртовка, спички, держатель для пробирок.

### ***Ход работы:***

#### **Опыт 1 *Приготовление раствора белка.***

Яичный белок одного куриного яйца смешивают при встряхивании с 10-12-кратным объемом дистиллированной воды и фильтруют через двойной слой марли.

#### **Опыт 2 *Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)***

К 2 мл раствора белка добавляют 4 мл щелочи (10%) и несколько капель раствора сульфата меди (II). Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

#### **Опыт 3 *Нингидриновая реакция***

Реакция является характерной на свободные аминокетильные группы и поэтому универсальна для всех белков. В ходе нее нингидрин образует с аминокетильными группами краситель фиолетово-синего цвета.

К 1 мл раствора белка добавляют 0,5 мл свежеприготовленного раствора нингидрина. Смесь нагревают до кипения и охлаждают. Наблюдают фиолетово-синее окрашивание.

#### **Опыт 4 *Ксантопротеиновая реакция***

Эта реакция происходит только при наличии в белках остатков ароматических аминокетильных кислот (фенилаланин, тирозин и триптофан).

К 1 мл раствора белка добавляют 5-6 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают до кипения. Наблюдают желтое окрашивание. После охлаждения в реакционную смесь добавляют 0,5 мл концентрированного гидроксида аммония. Окраска углубляется до красновато-оранжевой.

#### **Опыт 5 *Реакция Милона***

Реакция специфична для всех белков, содержащих тирозин.

К 1 мл неразбавленного белка добавляют 1 мл реактива Милона. Белок свертывается под действием соли ртути и азотной кислоты, входящих в реактив, образуя сгусток белого цвета. При нагревании наблюдают окрашивание осадка в розово-красный цвет.

#### **Опыт 6 *Реакция на триптофан (реакция Адамкевича-Гопкина).***

К 1 мл раствора белка добавляют 2 мл концентрированной уксусной кислоты, встряхивают и, наклонив пробирку, по стенке добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не перемешивались. При стоянии на границе обеих жидкостей развивается фиолетовое кольцо.

#### **Опыт 7 *Реакция Паули***

Реакция характерна для белков, имеющих в своем составе остатки гистидина.



К 0,5 мл раствора сульфаниловой кислоты (1%) добавляют 1 мл нитрита натрия (0,5%), встряхивают и сразу же приливают сначала 1 мл раствора белка, затем, после перемешивания содержимого пробирки, 3 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После смешивания растворов развивается вишнево-красное окрашивание.

### **Опыт 8 Реакция Фоля**

Многие белки имеют в своем составе серусодержащие аминокислоты – метионин и цистеин. При нагревании таких растворов белка со щелочью и плюмбитом натрия образуется черный осадок.

К 0,5 мл ацетата свинца (II) добавляют 20%-ный раствор гидроксида натрия до растворения образующегося белого осадка гидроксида свинца (II). Затем добавляют 0,5 мл неразбавленного белка и смесь нагревают до образования черного осадка.

### **Опыт 9 Реакция Вуазене**

Реакция основана на взаимодействии формальдегида с триптофаном.

К 2 мл разбавленного раствора белка прибавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. После перемешивания прибавляют 6 мл концентрированной соляной кислоты и снова перемешивают. Через 10 минут прибавляют при перемешивании 10 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

## **Контрольные вопросы**

1. *Дайте определение белкам.*
2. *Что понимают под первичной структурой белка?*
3. *За счет каких связей образуется вторичная структура белка? Какие формы вторичной структуры белка различают?*
4. *Что понимают под третичной структурой белка? Какие виды взаимодействий поддерживают третичную структуру белковой молекулы?*
5. *Что понимают под четвертичной структурой белка?*

*Ответы:*

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....





## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 3

### РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

*Цель работы:* познакомиться со свойствами белков на примере реакций осаждения и высаливания.

#### Общие сведения по лабораторной работе

**Реакции осаждения** белков могут быть обратимыми и необратимыми. В первом случае белки не подвергаются глубоким изменениям, поэтому получаемые осадки могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе с сохранением своих нативных свойств. При необратимых реакциях осажденные белки подвергаются глубоким изменениям - денатурации.

Реакции осаждения дают возможность: 1) изучить свойства белков; 2) освободить жидкость от присутствия белка; 3) установить наличие белка в биологических жидкостях; 4) высаливанием с помощью различных концентраций нейтральных солей или спиртом выделить отдельные белковые фракции.

Белки осаждаются, если убрать оба фактора устойчивости белковой молекулы - заряд и гидратную оболочку. Это обеспечивается нагреванием при достижении изоэлектрической точки. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН около 5,0). Протамины и гистоны имеют изоэлектрическую точку в щелочной среде (рН около 8,0). Кроме рН среды важную роль в осаждении белков при нагревании играет концентрация солей.

**Денатурация** – это изменения в структуре белков под действием экстремальных факторов (изменение температуры, действие солей тяжелых металлов и т.д.), приводящих, как правило, к потере биологической активности молекул. В денатурированном состоянии полипептидные цепи образуют случайные и беспорядочные петли и клубки, причем конформация данной полипептидной цепи с течением времени может изменяться. Но первичная структура сохраняется.

**Ренатурация** – самопроизвольное возвращение белковой цепи к нативной форме и восстановление исходной биологической активности.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка. Выпадение белка в виде осадка связано с денатурацией белковых частиц и образованием комплексных солей белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший в осадок белок растворяется.

Органические кислоты вызывают необратимое осаждение белков, чаще используют растворы трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот.



Осаждение белков солями тяжелых металлов (в отличие от высаливания) происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя с ними солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ), но нерастворимые в воде. Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка.

**Реакции высаливания** – осаждение белков с помощью высоких концентраций нейтральных солей. Реакция обусловлена дегидратацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда. Для высаливания различных белков требуется неодинаковая концентрация одних и тех же солей.

### **Экспериментальная часть лабораторной работы**

**Реактивы и оборудование:** свежеприготовленный раствор куриного белка, уксусная кислота (конц.), раствор сульфата аммония (насыщ.), дистиллированная вода, сульфат аммония (тв.), соляная кислота (конц.), азотная кислота (конц.), серная кислота (конц.), трихлоруксусная кислота (3%), раствор ацетата свинца (1%), раствор нитрата серебра (5%), раствор сульфата меди (10%), спиртовка, спички, держатель для пробирок, фильтровальная бумага, фильтровальная воронка, ложечка для сыпучих веществ.

#### ***Ход работы:***

##### **Опыт 1 Осаждение белков нагреванием**

В пробирку приливают 4 мл раствора белка и кипятят его в течение 1 минуты. Белок выпадает в осадок в виде мути. Содержимое пробирки охлаждают и делят на две части. К одной из них приливают 1-2 капли концентрированной уксусной кислоты, а к другой – 1-2 капли раствора сульфата аммония и снова кипятят. В обеих пробирках количество выпавшего осадка увеличивается.

##### **Опыт 2 Осаждение белков минеральными кислотами.**

В одну из трех пробирок берут 1 мл концентрированной соляной кислоты, во вторую - столько же концентрированной азотной кислоты, в третью - концентрированной серной кислоты. Во все пробирки очень осторожно по стенке приливают по 1 мл белкового раствора. На границе кислоты и белкового раствора образуется белое кольцо - осадок белка.

##### **Опыт 3 Осаждение белков органическими кислотами.**

В пробирку приливают 2 мл белкового раствора. Затем прибавляют несколько капель 3% раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирке образуется осадок белка в виде мути или мелких хлопьев.





#### **Опыт 4 Осаждение белков солями тяжелых металлов**

В 3 пробирки приливают по 1 мл белкового раствора и добавляют в первую пробирку 5 капель 1% раствора ацетата свинца, во вторую - 5 капель 5% нитрата серебра и в третью - несколько капель 10% раствора сульфата меди. Во всех трех пробирках образуется осадок.

#### **Опыт 5 Реакции высаливания**

В пробирке смешивают по 3 мл раствора белка и насыщенного раствора сульфата аммония. Появляется осадок глобулинов в виде мути или даже хлопьев. Отливают в другую пробирку около 1 мл мутной жидкости и добавляют к ней 3-4 мл воды. При разбавлении водой осадок снова растворяется. Оставшуюся в первой пробирке жидкость фильтруют. К 2-3 мл фильтрата прибавляют при встряхивании порошок сульфата аммония до прекращения растворения, появляется муть или хлопья выпавшего в осадок альбумина, который при добавлении 3-5 мл воды растворяется.

#### **Контрольные вопросы**

1. *Чем обусловлены реакции осаждения белков?*
2. *Какими реактивами вызывается обратимое осаждение белков?*
3. *Какими реактивами вызывается необратимое осаждение белков?*

*Ответы:*

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 4

### СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ – НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

**Цель работы:** *опытным путем определить состав сложных белков – нуклеопротеидов.*

#### Общие сведения по лабораторной работе

В связи с огромным разнообразием белков, различием их физических и химических свойств и биологических функций вопрос о классификации и номенклатуре белков разработан далеко не полностью.

В настоящее время наиболее удачной следует считать классификацию по структурным признакам с определенным сочетанием характерных физико-химических свойств белков. На основании такого подхода класс белковых веществ подразделяется на две большие группы: протеины (простые белки), в состав которых входят только остатки аминокислот, и сложные белки – соединение простого белка с каким – либо веществом небелковой природы – *простетической группой* (например, гемом, углеводом, нуклеиновой кислотой и т.д.). В зависимости от природы простетической группы сложные белки делятся на гликопротеины, липопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины, нуклеопротеины.

Протеины и сложные белки в свою очередь делятся на ряд подгрупп.

#### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** сухие или свежие дрожжи, серная кислота (20%), щелочь (10%, 20%), сульфат меди (II) (1%), раствор аммиака (конц.), нитрат серебра (1%), реактив Фелинга, раствор молибдата аммония; коническая плоскодонная колба, «кипятильник», холодильник Либиха, электрическая плитка с асбестовой сеткой, фильтровальная воронка, фильтровальная бумага, химический стакан, спиртовка, держатель для пробирок, спички.

**Ход работы:**

**Опыт 1.** *Приготовление гидролизата, содержащего нуклеопротеиды.*

В коническую плоскодонную колбу помещают 1 г свежих (или 0,2 г сухих) дрожжей, добавляют 20 мл серной кислоты (10% раствор), бросают «кипятильник» и ставят восходящий холодильник Либиха. Кипятят 1 час на слабом огне, охлаждают и фильтруют. Получили гидролизат, с которым продельывают последующие опыты.

**Опыт 2.** *Проба на белок.*



К 1 мл гидролизата добавляют 2 мл 10% р-ра щелочи и 1-2 капли 1% раствора сульфата меди (II). Появляется красно-фиолетовое окрашивание (биуретовая реакция)

**Опыт 3. Проба на пуриновые основания.**

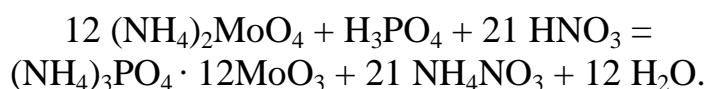
К 2 мл гидролизата добавляют 1 каплю гидроксида аммония (конц.0) и 1 мл 1% раствора нитрата серебра. Через 3-5 минут выпадают серо-белые хлопья серебряных солей пуриновых оснований.

**Опыт 4. Проба на углевод.**

К 1 мл гидролизата добавляют 0,5 мл 20% раствора щелочи, встряхивают, приливают равный объем реактива Фелинга и нагревают до кипения. Образуется осадок оксида меди (I) красного цвета, что указывает на присутствие восстанавливающих углеводов.

**Опыт 5. Проба на фосфорную кислоту.**

К 1 мл гидролизата добавляют 1 мл молибдата аммония и нагревают. Образуется желтый осадок фосфомолибдата аммония:



**Контрольные вопросы**

- 1. Белки нуклеопротеиды состоят из нуклеиновых кислот и белка. Напишите схему реакции гидролиза нуклеопротеида до конечных структурных элементов.*
- 2. Белки фосфопротеиды служат главным питательным материалом для развития эмбриона, обеспечивая нормальное развитие его костного скелета. Напишите схему реакции гидролиза фосфопротеида, принимая во внимание образование в нем эфирной связи за счет фосфорной кислоты и карбоксильных групп серина и треонина.*

Ответы:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 5

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

**Цель работы:** *практически познакомиться с методами исследования нуклеиновых кислот.*

#### **Общие сведения по лабораторной работе**

Термин нуклеиновые кислоты был предложен немецким химиком Р.Альтманом в 1889 г. после того, как эти соединения были открыты в 1868 г. швейцарским врачом Ф.Мишером. Он экстрактировал клетки гнойного пневмококка разбавленной соляной кислотой в течение нескольких недель и получил в остатке почти чистый ядерный материал, назвав его нуклеином (от лат. *nucleus* – ядро). По своим свойствам нуклеин резко отличался от белков: он был кислым, не содержал серы, было много фосфора. Нуклеин хорошо растворялся в щелочах, но не растворялся в разбавленных кислотах.

Впоследствии из животных, растительных объектов и микроорганизмов были выделены разные нуклеиновые кислоты. Их наилучшим источником оказались клетки, имеющие большие ядра.

Гидролиз нуклеиновых кислот, выделенных из ядер клеток, показал, что они состоят из *пуриновых (аденина, гуанина) и пиримидиновых (цитозина, тимина) оснований, 2-дезоксирибозы и фосфорной кислоты*. Эта нуклеиновая кислота была названа *дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК)*. Из дрожжей была получена другая по химическому составу нуклеиновая кислота, содержащая вместо тимина *урацил* и вместо дезоксирибозы *рибозу*. Ее называли *рибонуклеиновой кислотой (РНК)*.

Общее содержание ДНК и РНК в клетках зависит от специфических функций клеток.

#### **Экспериментальная часть лабораторной работы**

**Реактивы и оборудование:** NaOH (1M); NaCl (1M в 20% -ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), этиловый спирт (96%); трихлоруксусная кислота (5%), дифениламинный реактив, серная кислота (5%), раствор аммиака (конц.); нитрат серебра (аммиачный раствор); центрифуга, водяная баня, колбы мерные на 100 мл – 4 шт., пробирки на 5 мл – 3 шт., пипетки на 1 мл – 2 шт., колба на 25 мл, цилиндр на 25 мл, пробирки.

**Ход работы:**

#### **Опыт 1. Выделение ДНК**

Метод выделения ДНК основан на том, что при добавлении к обработанной щелочью ткани насыщенного раствора NaCl в уксусной кислоте белки выпадают в осадок, а ДНК и другие соединения остаются в



растворе. ДНК отделяют от других соединений путем осаждения ее спиртом с последующим промыванием осадка трихлоруксусной кислотой.

Навеска ткани 500 мг печени предварительно измельчается ножницами и затем растирается в ступке с добавлением 2 мл 1 М NaOH. После этого раствор сливают в пробирку, которую ставят на кипящую водяную баню на 15 мин, периодически перемешивая ее содержимое. После охлаждения пробы для осаждения белков приливают 1 мл 1 М NaCl в 20%-ной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и через 5–10 мин центрифугируют в течение 5 мин при 5000 г. После отделения супернатанта к нему приливают 10 мл этилового спирта и оставляют на 1 ч в холодильнике при температуре при  $-20^\circ\text{C}$ . При этом ДНК должна выпасть в осадок, а РНК находится в растворе. Пробирку еще раз центрифугируют 5 мин при 5000 г. Осадок ДНК промывают 5%-ной трихлоруксусной кислотой.

### **Опыт 2. Определение содержания ДНК с помощью дифениламина**

В составе ДНК присутствует моносахарид дезоксирибоза, которая при реакции с дифениламином ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH-C}_6\text{H}_5$ ) окрашивает ДНК в синий цвет, тогда как при реакции с рибозой РНК раствор приобретает зеленую окраску.

Перед началом исследований небольшое количество полученной в предыдущем опыте ДНК растворяют в 1 мл 1 М NaOH, а затем добавляют равный объем дифениламинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 15–20 мин. По появлению синего окрашивания оценивают присутствие ДНК.

### **Опыт 3. Гидролиз ДНК**

Под действием серной кислоты при высокой температуре белок и дезоксирибонуклеиновая кислота подвергаются гидролитическому распаду на первичные составные части. ДНК расщепляется до азотистых оснований, дезоксирибозы и фосфорной кислоты, а белок – до пептидов и аминокислот.

Осадок, содержащий ДНК, переносят в колбу для гидролиза и добавляют 15 мл 5%-ной серной кислоты. После закрытия колбы пробкой ее помещают в кипящую водяную баню на 1 ч. После охлаждения полученный гидролизат можно использовать для изучения качественного и количественного состава основных компонентов.

### **Опыт 4. Определение содержания пуриновых оснований**

Серебро образует с пуриновыми основаниями ДНК в гидролизате комплексы, которые выпадают на дно пробирки в виде осадка.

В пробирку наливают 2 мл гидролизата ДНК, добавляют 5–6 капель концентрированного аммиака до щелочной реакции на лакмус. Затем приливают 0,5 мл аммиачного раствора серебра. После перемешивания образуется хлопьевидный осадок пуриновых оснований с солями серебра, который оседает на дно пробирки.

## **Контрольные вопросы**





## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 6

### РЕАКЦИИ НА ФЕРМЕНТЫ

*Цель работы:* познакомиться со свойствами ферментов

#### Общие сведения по лабораторной работе

**Ферменты** – это специфические белковые катализаторы, синтезируемые живыми клетками и обладающие высокой активностью.

Ферменты регулируют скорость и специфичность практически всех химических реакций, протекающих в живых организмах, и обычно работают согласованно: продукт одной ферментативной реакции служит субстратом для последующей.

Известно более тысячи различных ферментов, каждый из которых катализирует определенный тип химической реакции. Гомологичные ферменты из разных видов организмов в химическом отношении различны, даже если они катализируют одну и ту же реакцию и на первый взгляд представляются идентичными. Так, например, трипсин свиньи и трипсин коровы – это различные соединения.

Молекулы ферментов имеют обычно конформацию, характерную для глобулярных белков. Некоторые из них состоят из одной полипептидной цепи, другие – из нескольких или даже многих.

Основными факторами, влияющими на ферментативную активность, являются:

- 1) температура,
- 2) pH,
- 3) регуляция равновесия реакций,
- 4) ингибирование и активация.

#### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** слюна, раствор крахмального клейстера (1%), сырой крахмал, дистиллированная вода, реактив Фелинга, раствор сахарозы (2%), смесь льда с солью, раствор йода (1%), , раствор хлорида натрия (25%), уксусная кислота (25%, конц.), соляная кислота (0,5 М), щелочь (0,5 М), азотная кислота (конц.), раствор аммиака (конц.), спиртовой раствор резорцина  
Водяная баня, термометр, предметное стекло, спиртовка, спички, держатель для пробирок, фильтровальная воронка, фильтровальная бумага.

**Ход работы:**

##### **Опыт 1. Действие амилазы слюны на сырой и вареный крахмал.**

В пробирку берут 2 мл 1-процентного раствора крахмала (клейстера). В другой пробирке смешивают 0,5 г растертого в порошок сырого крахмала и 2





мл дистиллированной воды. В обе пробирки вносят по 5 капель отфильтрованной слюны и ставят в водяную баню при температуре 40°.

Через 10 минут ставят пробу Фелинга с раствором в первой пробирке; реакция положительная.

Через 1 час с жидкостью во второй пробирке реакция отрицательная. Амилаза слюны на сырой крахмал не действует.

### **Опыт 2. Специфичность действия ферментов.**

В одну пробирку берут 1мл 1-процентного раствора крахмала, в другую – 1 мл 2-процентного раствора сахарозы. В обе пробирки прибавляют по 7– 10 капель отфильтрованной слюны и ставят их в водяную баню при температуре 40°.

Через 15—20 минут с содержимым обеих пробирок проделывают реакцию Фелинга. Амилаза слюны расщепляет крахмал и не действует на сахарозу. Поэтому реакция Фелинга будет положительной только в первой пробирке.

### **Опыт 3. Влияние температуры на активность фермента.**

В четыре пробирки помещают по 2 мл 1-процентного раствора крахмала. Одну пробирку ставят в кипящую воду, вторую – в смесь льда с солью, третью– в водяную баню при температуре 40°, а четвертую – оставляют при комнатной температуре.

Затем во все пробирки вносят по 5– 7 капель отфильтрованной слюны. Через 10 минут после этого во все пробирки прибавляют по 2 капли 1-процентного раствора йода. Отмечают, где за это время произошел гидролиз крахмала, о чем судят по отсутствию синего окрашивания.

### **Опыт 4. Активаторы и парализаторы ферментов.**

В четыре пробирки берут по 2 мл 1-процентного раствора крахмала. Добавляют в одну пробирку 1 мл 25-процентного раствора хлорида натрия, во вторую – 1 мл 25-процентного раствора соляной кислоты, в третью – 1 мл 25-процентного раствора уксусной кислоты и в четвертую – 1 мл дистиллированной воды.

Во все пробирки вносят по 7– 10 капель отфильтрованной слюны и ставят на водяную баню при температуре 40°. Через каждые две минуты из всех пробирок берут по одной капле жидкости и смешивают на предметном стекле, под которое подложен лист белой бумаги, с одной каплей 1-процентного раствора йода. Устанавливают, в какой из пробирок скорее и в какой медленнее наступает полный гидролиз крахмала.

### **Опыт 5. Отношение ферментов к высокой температуре.**

В две пробирки берут по 1 мл отфильтрованной слюны. Содержимое одной пробирки кипятят на пламени горелки и дают остыть.

Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл 1-процентного раствора крахмала и ставят в водяную баню при температуре 40°.

Через 15 – 20 минут в обе пробирки вносят по 1 – 2 капли 1-процентного раствора йода. По появлению синего окрашивания в пробирке с





прокипяченной слюной судят об отсутствии гидролиза крахмала, так как фермент разрушился при кипячении.

**Опыт 6. Влияние кислот и щелочей на активность амилазы слюны.**

В три пробирки наливают по 1 мл 1-процентного раствора крахмала. В одну пробирку добавляют 1 мл 0,5-нормального раствора соляной кислоты, во вторую – 1 мл 0,5-нормального раствора бикарбоната натрия или едкой щелочи, а в третью – 1 мл дистиллированной воды.

Все пробирки ставят в водяную баню при температуре 40°.

Через 10 минут во все пробирки прибавляют по 5 – 10 капель отфильтрованной слюны. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и прибавляют по одной капле 1-процентного раствора йода. Наблюдают, в какой из пробирок отсутствует синее окрашивание, т. е. где наступает гидролиз крахмала.

**Опыт 7. Получение муцина и исследование его химической природы**

Муцин – вещество, входящее в состав слюны, которое увеличивает ее вязкость, загущает и способствует образованию пены.

В пробирку налейте 5 мл отфильтрованной слюны и при перемешивании стеклянной палочкой добавьте несколько капель концентрированной уксусной кислоты. На палочку будет налипать белый комочек, похожий на сваренный яичный белок. Это – муцин.

Часть полученного вещества поместите в отдельную пробирку, добавьте 2-3 капли концентрированной азотной кислоты. Муцин пожелтеет. Теперь добавьте 2-3 капли концентрированного раствора аммиака – цвет станет оранжевым. Это ксантопротеиновая реакция на белки.

Другую часть полученного вещества подвергните пробе на углеводы, проведя цветную реакцию Молиша. (см. лаб. раб. №7 «Изучение химических свойств углеводов»). Наблюдайте появление розового или фиолетового кольца.

Сделайте вывод о химическом составе муцина.

**Контрольные вопросы**

1. *Какие центры выделяют в составе ферментов?*
2. *Что понимают под фермент-субстратным комплексом? Какими связями связаны фермент и субстрат в фермент субстратном комплексе?*
3. *Какой принцип положен в основу классификации ферментов?*

*Ответы:*

.....

.....

.....

## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 7

### ВИТАМИНЫ

*Цель работы:* познакомиться со свойствами витаминов

#### Общие сведения по лабораторной работе

**Витаминами** называют пищевые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена целостного организма.

Витамины были открыты русским врачом Н.И.Луниным. Это низкомолекулярные соединения различной химической природы. Они как незаменимые компоненты входят в состав активных центров многих ферментов и участвуют в реакциях биокатализа, в регуляции многих биохимических и физиологических процессов. Витамины способствуют укреплению здоровья, увеличивают сопротивляемость организма к простудным и инфекционным заболеваниям, повышают работоспособность.

Витамины классифицируют на две группы: растворимые в жирах и растворимые в воде.

Одним из витаминов является витамин С – аскорбиновая кислота. Структурная формула аскорбиновой кислоты представлена на рис.4.

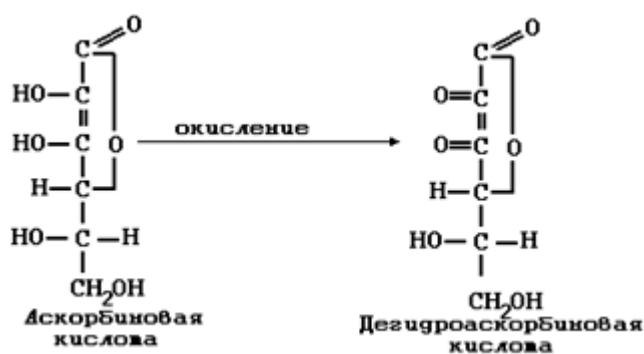


Рис. 4. Схема окисления аскорбиновой кислоты

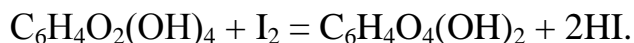
Из рисунка видно, что в молекуле витамина С нет карбоксильной группы - носителя кислотных свойств в органической химии. Кислотные свойства этого вещества обусловлены лёгкой подвижностью водорода у третьего углеродного атома. Однако в природных продуктах

содержится огромное количество органических кислот, поэтому определять витамин С методом нейтрализации нельзя. При определении витамина С резонно воспользоваться легкой окисляемостью этого вещества. Аскорбиновая кислота крайне легко окисляется, даже кислородом воздуха. Именно поэтому витамин С так быстро разрушается, особенно при контакте с металлами, которые катализируют процесс окисления. При



окислении аскорбиновая кислота переходит в дегидроаскорбиновую, которая уже не проявляет витаминных свойств. В качестве окислителя в данном методе используется элементарный  $I_2$  который количественно переводит аскорбиновую кислоту в дегидроаскорбиновую, при этом образуется йодоводородная кислота.

Схема реакции:



### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** раствор сульфаниловой кислоты, раствор нитрита натрия, раствор тиамин (витамин  $B_1$ ), бикарбонат натрия (20%), металлический цинк, раствор рибофлавина (витамин  $B_2$ ), витамин PP, уксусная кислота (10%), ацетат меди (5%), раствор пиридоксина (витамин  $B_6$ ), хлорид железа (III) (5%), подсолнечное масло, бромная вода.; химические стаканы, коническая колба, штатив, бюретка, ступка с пестиком, весы.

**Ход работы:**

#### Опыт 1. Реакция с диазореактивом на тиамин (витамин $B_1$ )

В основе реакции лежит способность витамина  $B_1$  в щелочной среде с диазореактивом (смесь солянокислого или сернокислого раствора сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия) образовывать сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

В пробирку приливают 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и 1 мл раствора нитрита натрия. Образуется диазореактив. Сюда же вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка или 0,5 мл раствора тиамин и по стенке пробирки осторожно добавляют 1 мл 20%-го раствора бикарбоната натрия.

На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого или красного цвета.

#### Опыт 2. Реакция восстановления рибофлавина (витамина $B_2$ )

Образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте водород восстанавливает желтый рибофлавин сначала в родофлавин (промежуточное соединение) красного цвета, а затем в бесцветный лейкофлавин.

В пробирку приливают 1 мл раствора витамина  $B_2$ , 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

#### Опыт 3. Реакция на витамин PP (антипеллагрический)

При нагревании витамина PP с раствором ацетата меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли витамина PP.



В пробирку помещают 5-10 мг витамина РР и растворяют при нагревании в 1-2 мл 10% -го раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору прибавляют такой же объем 5%-го раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

**Опыт 4. Реакция на пиридоксин (витамин В<sub>6</sub>)**

При взаимодействии пиридоксина с раствором хлорида железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексной соли типа фенолята железа.

В пробирке смешивают 1 мл водного раствора пиридоксина и 2 капли 5%-го раствора хлорида железа (III). Смесь встряхивают. Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.

**Опыт 5. Количественное определение витамина С методом йодиметрического титрования**

На весах взвешивают яблоко в целом. Результат записывают. Затем острым ножом вырезают ломтик от самой сердцевины (витамины распределены в толще яблока неравномерно, а нам необходимо провести анализ яблока в целом). Ломтик помещают в ступку, заливают 20-30 мл соляной кислоты и тщательно растирают. Остаток яблока взвешивают и по разности находят массу ломтика (результат также записывают). Полученную смесь количественно переносят в коническую колбу и титруют раствором йода, тщательно перемешивая. Как только капля йода окрасит раствор в синий цвет и окраска не исчезнет в течение 2-3 минут, записывают показания бюретки.

*Расчет результатов:*

Количество витамина С в пробе (мг) находят по формуле:

$$m_{\text{vit C}} = V \cdot 0,875$$

Затем результат переводят в граммы (делением на 1000), затем делят на массу ломтика и умножают на 100. Окончательная формула:

$$w(\%) = V \cdot 0,875 \cdot 100 / m \cdot 1000 = V \cdot 0,875 / 10m, \text{ где}$$

V - объем раствора потраченного на титрование, m - масса ломтика.

**Опыт 6. Определение витамина А в подсолнечном масле.**

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

**Опыт 7. Определение витамина D в рыбьем жире или курином желтке**

В пробирку с 1 мл рыбьего жира прилейте 1 мл раствора брома. При наличии витамина D появляется зеленовато-голубое окрашивание.





## ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 8

### УГЛЕВОДЫ

**Цель работы:** познакомиться со свойствами углеводов.

#### Общие сведения по лабораторной работе

**Углеводами** называют большую группу органических соединений, обладающих различной химической структурой и биологическими свойствами, объединяемых общей формулой  $C_x(H_2O)_y$ , где  $x$  и  $y$  могут быть не равны друг другу.

Углеводы классифицируют на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Сахара – оптически активные вещества: луч поляризованного света, проходя через их раствор, изменяет направление поляризации (рис.3).



Рис. 3. Поляризация света раствором сахара.

Т.е. сахара вращают плоскость поляризации, причем в ту или иную сторону, и на вполне определенный угол. Сахароза вращает плоскость поляризации вправо, а глюкоза и фруктоза, продукты ее гидролиза, – влево. Отсюда и слово "инверсия" (по-латыни "переворачивание").

**Углеводы** – один из "трех китов" нашего питания (два других – белки и жиры). Глюкоза и фруктоза, крахмал и клетчатка, десятки других углеводов образуются непрерывно и "сгорают" (окисляются) в растительных и животных клетках, служат важнейшим энергетическим материалом организма. При всей несхожести отдельных представителей углеводов есть у них, конечно, общие, обязательные для всех свойства. Это и позволяет обнаружить углеводы даже в очень малых количествах.

#### Экспериментальная часть лабораторной работы

**Реактивы и оборудование:** сахароза (тв., 5%), глюкоза (тв.), фильтровальная бумага, спиртовой раствор резорцина, серная кислота (конц., 10%), крахмальный клейстер, спиртовой раствор йода (1%), слюна, раствор сульфата меди (II), щелочь, фруктовый сок, соляная кислота (разб.), карбонат



магния, синий лакмус; электроплитка, предметное стекло, спиртовка, спички, держатель для пробирок, водяная баня.

### ***Ход работы:***

#### **Опыт 1. Цветная реакция Молиша.**

Налейте в 3 пробирки примерно по 1 мл воды и бросьте в одну из них несколько крупинок сахарного песка (сахарозы), столько же глюкозы во вторую и клочок фильтровальной бумаги (клетчатки) – в третью. Теперь добавьте 2-3 капли спиртового раствора резорцина. Наклоните пробирку и осторожно налейте по стенке 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Закрепите пробирку в вертикальном положении. Тяжелая кислота опустится на дно, а на границе ее с водой появится яркое красивое кольцо - красное, розовое или фиолетовое.

Это качественная реакция на углеводы.

**Внимание!** Реакция настолько чувствительна, что ее может вызвать даже пылинки и волокна на стенках пробирки. Поэтому посуду, в которой проводят реакцию, надо очень тщательно мыть, а ополаскивать лучше дистиллированной водой.

#### **Опыт 2. Приготовление крахмального клейстера**

Крахмальный клейстер - коллоидный раствор крахмала в воде.

Налейте в стакан 40 мл холодной воды и 0,5 чайной ложки крахмала. Смесь хорошо размешайте - получится так называемое крахмальное молоко. При перемешивании добавьте к нему кипятка (40 мл) и, продолжая размешивать, нагревайте на огне до тех пор, пока раствор не станет прозрачным. Остудите его. Вы получили крахмальный клейстер.

#### **Опыт 3. Качественная реакция на крахмал.**

Поместите на предметное стекло 2 капли раствора крахмального клейстера и добавьте 1 каплю слабого спиртового раствора йода. Наблюдайте появление сине-фиолетовой окраски раствора.


#### **Опыт 4. Кислотный гидролиз крахмала.**

Огромные молекулы крахмала под действием воды гидролизуются, расщепляются на более мелкие молекулы. Сначала образуется растворимый крахмал, потом "обрубки" помельче - декстрины, затем дисахарид мальтоза, или солодовый сахар. Наконец, при распаде мальтозы образуется глюкоза, виноградный сахар. Готовый продукт гидролиза часто содержит все переходные вещества; в таком виде он известен под названием патоки.

К 30 мл крахмального клейстера добавьте 5-10 мл разбавленной 10%-ной серной кислоты. Смесь клейстера с кислотой поставьте кипятиться на электроплитку, понемногу доливая воду по мере ее испарения. Время от времени берите пробы жидкости и, слегка охладив, капайте на них разбавленным йодным раствором.

Крахмал, как вы помните, дает синее окрашивание, а вот декстрины - красно-бурое. Что касается мальтозы и глюкозы, то они не окрашиваются. По мере гидролиза цвет проб будет меняться, а когда окрашивание йодом





исчезнет, нагревание можно прекратить. Впрочем, для более полного разложения мальтозы имеет смысл прокипятить смесь еще несколько минут.

**Опыт 5. Ферментативный гидролиз крахмала.**

Содержащийся в слюне фермент амилаза может превращать полисахарид крахмал в дисахарид мальтозу.

Дистиллированной водой с минуту прополощите рот - получится раствор слюны. Раствор профильтруйте и смешайте с равным количеством крахмального клейстера. Пробирку со смесью поставьте в стакан с теплой, около 40 °С, водой. Время от времени берите пробы с йодом - изменение окраски будет точно таким же, как при гидролизе с серной кислотой, но реакция пойдет быстрее. Не позже чем через четверть часа крахмал гидролизуется до мальтозы, и цветная реакция с йодом исчезнет.

**Опыт 6 Обнаружение глюкозы во фруктовом соке.**

Приготовьте в пробирке гидроксид меди  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Для этого добавьте 2-3 капли раствора медного купороса к 0,5-1 мл раствора гидроксида натрия.. К полученному осадку прибавьте равный объем фруктового сока (например, яблочного) и встряхните пробирку. Осадок растворится, получится синий раствор.

Такая реакция характерна для многоатомных спиртов, т. е. для спиртов, которые содержат несколько гидроксильных групп.

Теперь нагрейте до кипения (или поставьте в кипящую воду) пробирку с полученным синим раствором. Он сначала пожелтеет, затем станет оранжевым, а после охлаждения выпадет красный осадок оксида меди  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Эта реакция характерна для альдегидов. Значит, во фруктовом соке есть вещество, представляющее собой альдегид и спирт одновременно. Это вещество и есть глюкоза, которая по строению представляет собой альдегидоспирт. Благодаря ей у сока сладкий вкус.

**Опыт 7. Кислотный гидролиз целлюлозы и крахмала (полумикрометод).**

Поместите в одну пробирку 1 каплю 0,5%раствора крахмального клейстера, во вторую – маленький кусочек фильтровальной бумаги. Прибавьте в обе пробирки 2-3 капли концентрированной серной кислоты и поставьте пробирки в кипящую водяную баню. Через 20 минут обратите внимание на то, что мутный раствор клейстера стал прозрачным, а кусочек фильтровальной бумаги растворяется. Добавьте в обе пробирки по 8 капель раствора щелочи для нейтрализации кислоты и создания щелочной среды, затем – 1 каплю раствора сульфата меди (II). Нагрейте верхнюю часть растворов до кипения.

**Опыт 8. Гидролиз сахарозы и обнаружение продуктов гидролиза.**

Налейте в пробирку или в стакан 10-20 мл раствора сахарозы и добавьте несколько капель разбавленной соляной кислоты. После этого нагревайте раствор на кипящей водяной бане минут десять-пятнадцать, а затем нейтрализуйте кислоту, лучше всего карбонатом магния  $\text{MgCO}_3$  (или  $\text{NaHCO}_3$ )







## Рейтинг успеваемости по практикуму

Номер лабораторной работы	Дата проведения	Оценка	Примечания	Подпись преподавателя
№1				
№2				
№3				
№4				
№5				
№6				
№7				
№8				

Наличие тетради со всеми (!) лекциями	Допуск по ЛПЗ*	Примечания	Подпись преподавателя

ОТМЕТКА О ДОПУСКЕ К ЭКЗАМЕНУ \_\_\_\_\_



## РУКОВОДСТВО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЯ (и в шутку, и всерьёз)

1. Если вы не знаете, что именно вы делаете, делайте это аккуратно.
2. Накопленный опыт прямо связан с количеством угробленного и порушенного материала.
3. Прошлый опыт всегда правилен и не должен искажаться фактами настоящего.
4. Если есть сомнение, замените его прочным убеждением.
5. Не верьте в чудеса – прямо полагайтесь на них.
6. Работа группой жизненно важна – она позволяет вам упрекать кого-нибудь другого.
7. Записывание полученных данных весьма существенно, оно показывает, что вы все-таки что-то делали.
8. Что бы не произошло, всегда найдется кто-то, кто посчитает, что это имело место в соответствии с его любимой теорией.
9. Величина, к которой, по экспериментальным результатам, что-то добавляют, что-то из нее вычитают, которую умножают и делят, чтобы получить правильный ответ, называется константой.
10. Вероятность того, что событие происходит, обратно пропорционально его желательности.
11. Эксперименты должны быть воспроизводимы: они должны не получаться всегда в одних и тех же условиях.
12. Если эксперимент получается, следует провести заведомо неправильный опыт.
13. Эксперимент можно считать удачным, если пришлось отбросить не более половины полученных данных.
14. Стремясь к аккуратности, сначала проведите кривую, потом наносите экспериментальные данные.
15. Если эксперимент совсем уж не удался, его всегда можно использовать как отрицательный пример.
16. Помните, что выполнение любого научного задания включает шесть стадий: 1) энтузиазм; 2) разочарование; 3) паника; 4) поиск виноватого; 5) наказание невиновного и 6) похвала и почести тем, кто в работе не участвовал.

### Цитата

*Удачный эксперимент – результат прямизны рук и кривизны извилин, а не наоборот.*



## ЛИТЕРАТУРА

### а) Основная литература

1. Ауэрман, Т. Л.. Основы биохимии: Учебное пособие для бакалавров/ Т.Л. Ауэрман, Т.Г. Генералова, Г.М. Сусянок. - М.: ИНФРА-М, 2013. - 400 с.

### б) Дополнительная литература

1. Биохимия: задачи и упражнения (для самостоятельной работы студентов) / А.С. Коничев, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова и др.; под ред. проф. А.С. Коничева. – М.: Колосс, 2007. – 140с.
2. Горбатова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов: Рекомендовано в качестве учебника для студентов СПО/ К.К. Горбатова, П.И. Гунькова. - 4-е изд., перераб. и доп. - СПб.: ГИОРД, 2010. - 336 с
3. Хентов, В.Я. Химия окружающей среды для технических вузов: Рекомендовано в качестве учебного пособия/ В.Я. Хентов. - Ростов н/Д: Феникс, 2005. - 144 с.
4. Рогожин, В.В. Практикум по биологической химии: Рекомендовано Умо для студентов вузов в качестве учебно-методического пособия по спец. "Ветеринария", "Зоотехния"/ В.В. Рогожин. - СПб.: "Лань", 2006. - 256 с.
5. Пинчук Л.Г. Биохимия [Электронный ресурс]: учебное пособие/ Пинчук Л.Г., Зинкевич Е.П., Гридина С.Б.— Электрон. текстовые данные.— Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011.— 364 с.— Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/14362.html>.— ЭБС «IPRbooks»



**ДЛЯ ЗАМЕТОК**