	<p>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»</p>	Б1.О.10 Биологи- ческая химия
		Методические указания

Кафедра физиологии, биохимии  
и кормления животных

**Б1.О.10 БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**

**Лабораторный практикум**

**Специальность 36.05.01 Ветеринария**

**Специализация**

**Ветеринарно-санитарная экспертиза**

**Квалификация выпускника ветеринарный врач**

Уфа 2023

УДК 579.22  
ББК 28.672  
М54

Рекомендованы к изданию методической комиссии факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол № 8 от 23 марта 2023 г.)

**Составители:** к.б.н., доцент Сатаева Л. В., к.б.н., доцент Андриянова Э.М.

**Ответственный за выпуск:** зав. кафедрой физиологии, биохимии и кормления животных, к.б.н., доцент Хабиров А.Ф.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Темы	Страницы
Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ по курсу «Биохимия»	4
1 Лабораторная работа № 1 Качественные реакции на углеводы	6
2 Лабораторная работа № 2 Изучение химической природы липидов	8
3 Лабораторная работа № 3 Цветные реакции на белки и отдельные аминокислоты	10
4 Лабораторная работа № 4 Осаждение белков	10
5 Лабораторная работа № 5 Определение изоэлектрической точки белка	13
6 Лабораторная работа № 6 Определение содержания витамина С	15
7 Лабораторная работа № 7 Качественные реакции на отдельные гормоны	17
8 Лабораторная работа № 8 Влияние различных факторов на ферментативный гидролиз крахмала	18
9 Лабораторная работа № 9 Качественные реакции на дегидрогеназы молока и мышечной ткани	20
10 Лабораторная работа № 10 Изучение липазы молока и каталазы крови и печени	21
11 Лабораторная работа № 11 Хроматографический метод разделения и определения веществ	
12 Лабораторная работа № 12 Изучение химического состава молока	24
Библиографический список	26

## **Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ по дисциплине «Биологическая химия»**

При проведении лабораторных занятий по биохимии применяются физические и химические методы исследований состава и свойств растворов, тканей тела, животных и др. При проведении работ используются электрические приборы, спиртовки, химические вещества (кислоты минеральные и органические, щелочи, спирты, органические растворители), легковоспламеняющиеся вещества и др., а так же лабораторное оборудование изготовленное из стекла и электрооборудование. Студенты к работе лаборанта при приготовлении рабочих растворов не привлекаются.

При выполнении лабораторных работ студентам необходимо выполнять основные правила техники безопасности.

1. В лаборатории работать только в застегнутой спецодежде (халатах), без спецодежды студенты на занятие не допускаются.
2. Выполняя лабораторную работу точно руководствоваться методикой, описанной в методических указаниях к данной лабораторной работе.
3. Не пользоваться реактивами без этикеток или неизвестными растворами.
4. Для работы использовать лабораторное оборудование и посуду из стекла не имеющих видимых повреждений.
5. Электроприборы не должны иметь оголенных проводов. Спиртовки должны быть исправны.
6. Для работы с концентрированными кислотами, щелочами и другими агрессивными веществами использовать специальную адаптированную посуду, оборудование. Избегать попадания агрессивных веществ, растворов на кожу тела, одежду, тетради и т.д.
7. На рабочем месте придерживаться чистоты и порядка. Работать внимательно, не мешать друг другу при выполнении отдельных операций.
8. В лаборатории биохимии необходимо соблюдать все правила работы в химических лабораториях.
9. Не пользоваться реактивами без этикеток.
10. Пробирками, пипетками и другими принадлежностями для работы пользоваться только на своем рабочем месте, не брать реактивов и пипеток с другого стола.
11. Осторожно обращаться с концентрированными кислотами, щелочами, а также уксусным ангидридом, перекисью водорода и др. Концентрированные кислоты и щелочи нельзя брать пипетками.
12. Нагревать и кипятить жидкости следует осторожно, чтобы избежать выбрасывания ее из пробирки. Отверстие пробирки отклонить в сторону от себя и других студентов, работающих в лаборатории.
13. При загорании водорастворимых органических веществ (например спиртов) в качестве средства тушения использовать воду. При загорании жидкостей, нерастворимых в воде (бензола, толуола и др.), очаг пожара накрыть асбестовым полотенцем, одеялом, засыпать песком или применить огнетушитель.
14. При ожогах и порезах следует немедленно оказать помощь. При термических ожогах смочить обожженный участок 5%-ным раствором танина в этиловом спирте. При ожогах кислотами – промыть обожженное место водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной 1%-ным раствором соды. При ожогах щелочами пораженный участок следует обильно промыть водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной 10%-ным раствором уксусной кислоты. При ожогах жидким фенолом кожу протирают глицерином до появления нормальной окраски, промывают водой и накладывают компресс из ваты или марли, смоченной глицерином. При попадании в глаза кислоты следует

тщательно промыть их водой, а затем 2%-ным раствором бикарбоната натрия. В случае попадания в глаза щелочи их промывают водой и 2%-ным раствором борной кислоты.

15. После окончания работы отключить аппаратуру от электросети, закрыть водопроводные краны, рабочее место оставить в полном порядке.

16. По всем неясным вопросам, касающимся работы, правил безопасности, обращаться к преподавателю или лаборанту.

17. Студенты, не соблюдающие правил безопасной работы в лаборатории, не допускаются к работе, об их поведении сообщается деканату.

## Лабораторная работа № 1 Качественные реакции на углеводы, кислотный гидролиз крахмала и клетчатки

**Цель и задачи работы.** Закрепить представления о химическом строении, некоторых свойствах, классификации и биологической роли углеводов в организме животных. Изучить некоторые экспресс методы определения сахаров, основанные на цветных реакциях и использования этих знаний в работе специалистов пищевых технологий. Определить состав крахмала и клетчатки с применением химических методов.

**Материалы и оборудование.** 1% раствор глюкозы, лактозы, сахарозы, крахмала, 10% раствор NaOH, 5% раствор CuSO<sub>4</sub>, реактив Селиванова, концентрированная HCl, раствор Люголя, дистиллированная вода, 72%-ный раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40%-ный раствор NaOH, 1%-ный раствор CuSO<sub>4</sub>, концентрированная серная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга, универсальная индикаторная бумага; мелко нарезанная фильтровальная бумага, стеклянные палочки, водяные бани, пробирки. Пробирки, пипетки на 1-5 мл., пипетки глазные, электроплитки, спиртовки, колбы на 50 мл, лакмусовая бумага, вата, колбы на 100 мл.

### Общие сведения.

Углеводы – класс органических веществ являющихся альдегидо- и кетопроизводными многоатомных спиртов, что и определяет их свойства. Основой питания сельскохозяйственных животных являются углеводы. В рационе крупного рогатого скота их доля достигает до 70%.

Углеводы не накапливаются в организме, хотя определенный их резерв обнаруживается в печени и мышцах в виде гликогена.

Для травоядных моногастричных и полигастричных сельскохозяйственных животных в питании большую роль играют углеводы: крахмал и целлюлоза, отличающиеся друг от друга строением и усвояемостью.

В органах пищеварения сельскохозяйственных животных не вырабатываются ферменты способные гидролизовать клетчатку (целлюлозу), а ткани тела не могут окислять ее моносахарид β-глюкозу, тогда как крахмал и его структурный мономер α-глюкоза усваиваются и используются в организме.

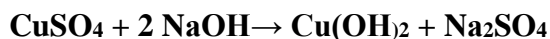
### Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### Задания

#### 1. Реакция Троммера на восстанавливающие свойства сахаров.

Реакция обоснована на способности свободных карбонильных групп сахаров легко окисляться за счет восстановления тяжелых металлов.



Сульфат меди в щелочной среде превращается в гидрат окиси меди Cu(OH)<sub>2</sub>, имеющий голубой цвет. При нагревании с раствором углевода он переходит в закись меди Cu<sub>2</sub>O кирпично-красного цвета. В пробирку налить 1-2 мл раствора глюкозы, добавить равный объем 10% раствора NaOH, несколько капель 5% раствора CuSO<sub>4</sub> и осторожно нагреть. В пробирке появляется желтое окрашивание, переходящее в кирпично-красный

цвет.

Сделать аналогичный опыт с раствором лактозы, крахмала, сахарозы, наблюдая за изменениями их окрашивания. Результаты занести в таблицу, сделать выводы.

Таблица 1 Реакция Троммера на углеводы

Виды углеводов	Результаты реакции + положит. – отрицат.	Выводы

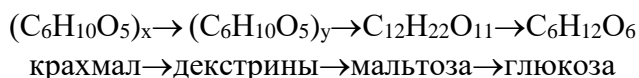
**2. Реакция Селиванова на кетоны и кетозы.** Кетогексозы и кетоновые тела при нагревании с соляной кислотой и резорцином (реактив Селиванова) дают вишнево-розовое окрашивание.

В пробирку налить 1 мл реактива Селиванова и 2-4 капли 1% раствора сахара, осторожно нагреть до красного окрашивания.

### 3. Гидролиз крахмала.

В химическом стакане растворяют 1,5 г крахмала в 25 мл дистиллированной воды и доводят до кипения при интенсивном перемешивании стеклянной палочкой.

При нагревании крахмала с разбавленными кислотами происходит его гидролиз по следующей схеме:



В мерную пробирку помещают 2 мл крахмального клейстера и 6 капель раствора серной кислоты. Содержимое пробирки встряхивают и ставят в стакан на 50 мл с кипящей водой. Каждые 2 минуты отбирают пипеткой каплю раствора и переносят в пробирку с раствором йода. Для этого предварительно в 8 пробирок помещают по одной капле раствора йода и 5 капель воды.

Последовательные пробы обнаруживают постепенное изменение окраски при реакции с йодом (синюю, сине-фиолетовую, красно-фиолетовую, красновато-оранжевую, оранжевую и желтую).

Крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины, в зависимости от величины цепочки, с йодом окрашиваются в фиолетовые, красные и оранжевые цвета. Мальтоза и глюкоза не изменяют окраски йода.

Гидролиз крахмала заканчивают, когда крахмальный клейстер не будет давать цветной реакции с йодом. Отмечают общую продолжительность гидролиза.

### 4. Гидролиз клетчатки.

В сухую пробирку помещают несколько мелко нарезанных кусочков фильтровальной бумаги и приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой до полного разрушения бумаги и образования бесцветного вязкого раствора. После этого к нему осторожно при перемешивании по каплям добавляют 1 мл дистиллированной воды. Пробирку ставят на кипящую водяную баню. Смесь нагревают 10—15 мин при регулярном перемешивании. После охлаждения жидкость нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия (контроль по универсальной индикаторной бумаге) и проводят с ней реакцию с фелинговой жидкостью (см. опыт 55.3) для обнаружения в продуктах гидролиза восстанавливающих сахаров. Напишите уравнение реакции гидролиза целлюлозы и объясните опыт.

### 6. Контрольные вопросы

1. Классификация углеводов.

2. Строение и характеристика моносахаридов в организме животных.
3. Строение и характеристика дисахаридов.
4. Характеристика гемо- и гетерополисахаридов.
5. В чем общность и различие веществ: гликоген, крахмал, целлюлоза.
6. Чем  $\alpha$ -глюкоза отличается от  $\beta$ -глюкозы.
7. Почему амилалитические ферменты организма с.-х. животных не могут гидролизовать клетчатку?
8. Биологическая роль углеводов.
9. Источники углеводов для с.-х. животных и птицы.
10. Строение и роль производных моносахаридов в организме.
11. Биологическая роль углеводов.

## **Лабораторная работа № 2. Изучение химической природы липидов**

**Цель и задачи работы.** Ознакомиться с физическими, отдельными химическими свойствами жиров и масел. Используя полученные результаты методом сравнительного анализа охарактеризовать состав жиров, масел и восков, рассмотреть их биологическую роль.

**Материалы и оборудование.** Масло растительное, жир животный, пчелиный воск, 50%- ный раствор этилового спирта, спиртово-эфирная смесь (1:1), 0,1%-ный раствор фенолфталеина, 0,1н раствор КОН, бензин, 10% раствор мыла, 0,001н раствор йода, NaHSO<sub>4</sub> кристаллический, 0,1н раствор судана, 1% раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% раствор белка яичного, 10% раствор NaOH, сыворотка крови, желчь. Штатив с пробирками, колбы на 50 мл, фарфоровые чашки (3 шт.), фильтровальная бумага для хроматографии, чашки Петри, пипетки на 5 и 10 мл., мензурка на 50 мл., электроплитка или спиртовки.

### **Общие сведения.**

Липиды – обширный класс органических веществ не растворяющихся в воде, но растворимых в органических растворителях. По строению относятся к эфирам. Липиды составляют важнейшую часть продуктивных свойств животных, они способны накапливаться в тканях тела. Биологическая роль липидов связана с химическим строением, составом липидов и количеством его в организме.

### **Порядок выполнения работы.**

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### **Задания**

**1. Растворимость жиров и масел.** В четыре пробирки налить по 2-3 капли растительного масла добавить 2-3 мл дистиллированной воды, во вторую – мыльного раствора, третью – бензин, четвертую – спирт. Все пробирки хорошо взболтать и отметить растворимость масла. Данные занести в таблицу 2.

Таблица 2 Растворимость масел

Вид жира (масла)	Полнота растворения	Полнота растворения

### **2. Обнаружение липидов в сыворотке крови.**

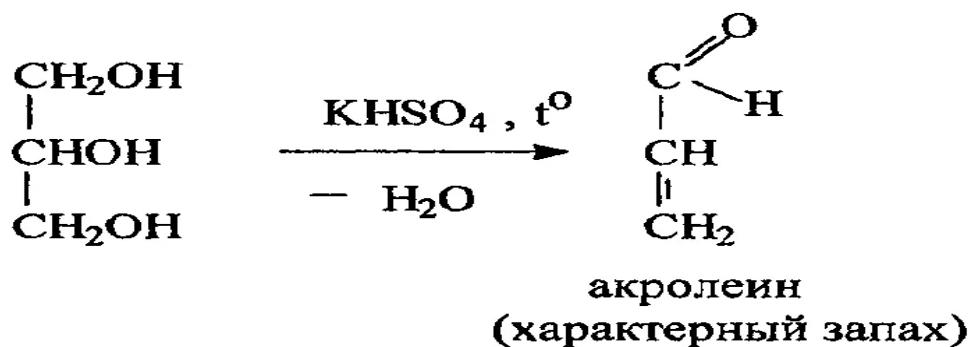
В крови содержатся триглицериды, эфиры холестерина, свободный холестерол, неэтерифицированные жирные кислоты. Липиды можно открыть по реакции с суданом.



Каплю сыворотки крови нанести на фильтровальную бумагу и высушить. Затем поместить ее в чашку Петри и залить раствором судана. Через час бумагу вынуть и промыть 50% раствором спирта. На месте нанесения сыворотки крови остается розовое пятно.

### 3. Обнаружение в липидах глицерина (акролеиновая проба).

При нагревании жира или масла с водоотнимающим веществом ( $\text{NaHSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) появляются едкие пары акролеина образующиеся из глицерина (специфический запах)



В сухую фарфоровую чашку положить 1-2 г жира животного, в другую масла растительного, в третью воск пчелиный, во все добавить водоотнимающую соль ( $\text{NaHSO}_4$ ) и поочередно греть до появления отчетливого запаха. Сравнить запах от жира и масла с запахом от воска, сделать выводы.

### 4. Определение кислотного числа жира, масла.

Природные жиры и масла представляют собой смешанные триглицериды с небольшим количеством свободных жирных кислот. При хранении на свету, доступе воздуха они прогоркают, то есть увеличивается число свободных жирных кислот, это можно определить титрованием щелочью.

1 мл свежего масла растворить в 10 мл спиртово-эфирной смеси и в присутствии фенолфталеина оттитровать 0.1н KOH. Количество KOH, идущее на нейтрализацию жирных кислот в 1 г жира называется кислотным числом. Повторить опыт со старым маслом. Сравнить результат, сделать выводы, данные занести в таблицу.

### 5. Эмульгирование жиров (масел)

При активном взбалтывании жиры и масла с водой образуют нестойкую эмульсию. Некоторые вещества снижают поверхностное натяжение водных растворов и этим препятствуют слиянию мелких раздробленных частиц жира (масла). Образуется стойкая эмульсия. К таким веществам относятся растворы щелочей, солей угольной кислоты, белков. В кишечнике эту функцию выполняют желчные кислоты и бикарбонаты.

В пять пробирок налить по 1 мл воды. Добавить по две капли растительного масла, затем добавить эмульгаторы по 5 капель:

во вторую – желчь;

третью – KOH;

четвертую – раствор карбоната натрия;

пятую – раствор белка.

Все пробирки энергично встряхнуть, рассмотреть полученный результат, занести в таблицу 3.

Таблица 3 Действие разных эмульгаторов на водные растворы жира (масла)

№ п/п	Вид водного раствора жира (масла)	Эмульгаторы	Характер эмульсии
1...			

## 6. Контрольные вопросы.

1. Липиды и их классификация.
2. Строение нейтральных жиров животного организма.
3. Жирно-кислотный состав жиров и масел.
4. Стероиды, стериды, химическая природа, биологическая роль.
5. Видовая специфичность жиров, содержание их в организме сельскохозяйственных животных.
6. Биологическая роль жиров.

## Лабораторная работа № 3. Цветные реакции на белки и отдельные аминокислоты

**Цель и задачи работы.** Ознакомиться с методами выявления белков и отдельных аминокислот в растворах, изучить аминокислотный состав белка, структуру белковой молекулы.

**Материалы и оборудование.** 10% раствор едкого натрия, 1% раствор сернистой меди, раствор белка, сыворотка крови, концентрированная азотная кислота, 5% раствор ацетата свинца. Штатив с пробирками, электроплитки, спиртовки.

**Общие сведения.** Цветные реакции дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие некоторых аминокислот в различных природных белках. На основе цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

### Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### Задания

**1. Биуретовая реакция.** Обусловлена пептидными связями в молекуле белка, который в щелочной среде с солями меди образует цветную комплексную соль. К 1-2 мл раствора яичного белка добавить равное количество гидроксида натрия и 1-2 капли 1% раствора сульфата меди. Появление фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии в растворе белка. Провести аналогичный опыт с сывороткой крови, сделать выводы.

**2. Ксантопротеиновая реакция.** Основана на способности ароматических аминокислот при нагревании (фенилаланин, тирозин, триптофан) образовывать с концентрированной азотной кислотой желтоокрашенные нитросоединения. К 2-3 мл яичного белка прилить 1 мл концентрированной азотной кислоты. Выпадет осадок, который при нагревании приобретает желтую окраску.

**3. Реакция Фояля.** Серосодержащие аминокислоты со свинцом образуют соединения сернистого свинца темно-бурого цвета, которые выпадают в осадок. В пробирку

налить 1-2 мл уксуснокислого свинца и добавлять по каплям 10% раствор гидроокиси натрия до растворения образующегося осадка гидрата окиси свинца. Добавить в пробирку 3-5 капель неразбавленного белка куриного яйца и нагреть до появления темно-бурого цвета. По результатам опытов заполнить таблицу 4.

Таблица 4 Характеристика химической природы белков по цветным реакциям.

Название реакции	Употребляемые реактивы	Наблюдаемое окрашивание	Группы, открываемые в белке

## 6. Контрольные вопросы

1. Классификация аминокислот.
2. Аминокислоты заменимые и незаменимые.
3. Понятие о структуре белковой молекулы, соотношение структуры и функции.
4. Содержание белков в организме сельскохозяйственных животных и их биологическая роль.

## Лабораторная работа № 4. Реакции осаждения белков

**Цель и задачи работы.** Изучить методы выделения белков из растворов, механизм обратимого и необратимого осаждения, разобрать вопрос об использовании этих методов при биохимических исследованиях, в процессах переработки продукции животноводства и др.

**Материалы и оборудование.** Раствор яичного белка, сыворотка крови, мышечная ткань, 10% раствор NaCl, насыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , кристаллический  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1% раствор уксусной кислоты, 10% раствор NaOH, 1% раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5% раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрированная серная кислота, концентрированная азотная кислота, 10% раствор ТХУ, 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 1% раствор пикриновой кислоты, этиловый спирт, насыщенный раствор NaCl. Штатив с пробирками, воронки, фильтры, ступки, марля, пипетки глазные, спиртовки.

### Общие сведения.

#### 4.4 Обратимое осаждение белков.

Осаждение белков без денатурации молекулы наблюдается под действием нейтральных солей щелочных металлов  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . При этом происходит снятие электрического заряда молекулы и белковая частица становится электронеutralной, одновременно она лишается гидратационной оболочки, в результате белки выпадают в осадок не изменяя структуры. Они могут быть вновь растворены при нормализации осмотических факторов. Этот способ осаждения называется **высаливанием**.

#### Необратимое осаждение.

Осаждение белков с нарушением структуры белковой молекулы и утратой ею всех функциональных свойств происходит под действием различных факторов. Соли тяжелых металлов (свинца, меди, ртути и т.д.) адсорбируются на поверхности белковой молекулы, образуя нерастворимый комплекс. Это свойство используется в клинике, при отравлениях солями тяжелых металлов применяют внутрь молоко или сырое яйцо. Белки адсорбируют металлы, уменьшая их всасывание и снижая степень действия на организм.

Действие высокой температуры вызывает свертывание. Для разных белков она различна, что следует учитывать в работе. например для полной стерилизации необходимо кипятить 30 минут. Механизм температурной коагуляции связан с перестройкой макромолекул. Частицы белка утрачивают гидрофильность, нарушается вторичная и третичная структуры, особенно быстро это происходит в изоэлектрической точке.

Быстрое разрушение белка вызывают концентрированные минеральные кислоты ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  и др.). Кислоты вызывают гидролиз белков до аминокислот. Несколько отличается действие азотной кислоты, не приводящая к растворению белков.

В различных исследованиях, аналитических работах, клинической практике большое применение получили органические кислоты: ТХУ, сульфосалициловая, пикриновая. Так сульфосалициловая используется в клинике для обнаружения очень малых количеств белка в биологических жидкостях (например в моче). Она способна осаждать и продукты распада белков – пептиды и полипептиды. ТХУ осаждает только белки.

Многие органические растворители осаждают белок путем отнятия у него молекулы воды. Необратимые изменения наступают при длительном действии спирта, ацетона и других веществ на белки.

### **Порядок выполнения работы.**

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### **Задания**

#### **1. Высаливание белков (обратимое осаждение).**

**а)** Осаждение белков сернокислым аммонием. В пробирку налить 3-4 мл разбавленного яичного белка, прибавить равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и взболтать. В осадок выпадают белки глобулины. Через 5-7 минут содержимое отфильтровать. В фильтрате остаются альбумины. Для того, чтобы убедиться в наличии этих белков, взять несколько капель фильтрата и проделать с ней биуретовую реакцию, положительная реакция (фиолетовое окрашивание) указывает на присутствие в растворе альбуминов.

Для осаждения альбуминов к остывшему фильтрату добавить кристаллический сульфат аммония до полного насыщения. Осадок альбуминов отфильтровать. Со вторым фильтратом провести биуретовую реакцию.

**б)** Осаждение хлоридом натрия. В пробирку налить 2-3 мл сыворотки крови и прибавить до полного насыщения кристаллический хлористый натрий. Через 2-3 минуты появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирки отфильтровать. В фильтрате остаются альбумины. Для их осаждения к фильтрату добавить несколько капель уксусной кислоты – появляется муть.

Через 5 минут альбумины отфильтровать. Проверить второй фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

**в)** Высаливание мышечных белков. Измельченную мышечную ткань растереть в ступке с 25-30 мл 10% хлорида натрия. Образовавшуюся полужидкую массу отфильтровать через двойной слой марли. Первые мутные капли фильтрата слить снова на фильтр и повторно отфильтровать для получения розовато-красного раствора без взвешенных в нем частиц. В полученной солевой вытяжке содержатся глобулины и альбумины. Их разделить сульфатом аммония или хлоридом аммония. Полноту осаждения в конце опытов проверить биуретовой реакцией. Результаты опытов занести в таблицу 7.

Таблица 5 Осаждение белков высаливанием

№ п/п	Опытные жидкости	Что осаждается насыщенным раствором $\text{NaCl}$	Что осаждается в слабокислой среде после высаливания $\text{NaCl}$	Что осаждается в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Что осаждается в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

## 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

В 2 пробирки взять по 1-2 мл раствора яичного белка. В одну добавить по каплям раствор уксуснокислого свинца, в другую - сернокислой меди. Отметить характер изменений в пробирках, результаты занести в таблицу.

## 3. Осаждение белков кипячением.

Взять 2 пробирки, налить 1-2 мл раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагреть до кипения. Во вторую пробирку добавить 1 каплю 1% раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и также нагреть. Отметить в какой пробирке осаждение наступает быстрее. Результаты занести в таблицу.

## 4. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами.

Взять 2 пробирки, осторожно налить в них по 1 мл кислот, в первую – серной, во вторую – азотной. В обе пробирки осторожно по стенке прилить по 1 мл раствора яичного белка. На границе жидкостей появляется осадок в виде белого кольца. При встряхивании осадок в пробирке с серной кислотой растворяется, с азотной - сохраняется. Результаты занести в таблицу.

## 5. Осаждение белка органическими кислотами.

В 3 пробирки взять по 1-2 мл раствора яичного белка и добавить несколько капель: в одну – ТХУ, другую – сульфосалициловой кислот, в третью – пикриновую кислоту. Пробирки встряхнуть, отметить характер осаждения белков, результаты занести в таблицу.

## 6. Осаждение белка органическими растворителями.

К 1 мл раствора белка в пробирке прилить 15-20 капель этилового спирта.

Таблица 6 Реакция необратимого осаждения белков

Факторы Осаждения белка	Реактивы	Цвет и вид осадка	Механизм осаждения

## 7. Контрольные вопросы.

1. Классификация белков.
2. Обратимое и необратимое осаждение белков.
3. Изменения в белковых структурах при денатурации.
4. Использование реакций осаждения белков в зоотехнии, медицине, ветеринарии, переработке молока и мяса.

## Лабораторная работа № 5 Определение изоэлектрической точки белка

**Цель работы:** ознакомиться с методом определения изоэлектрической точки (ИЭТ) белка.

### Вводные пояснения

Общую формулу молекулы белка можно записать следующим образом:



где:

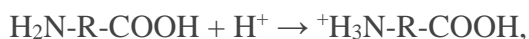
R- углеводородный радикал,

$\text{NH}_2$  - аминогруппа, которая обладает основными свойствами, т.к. в кислой среде присоединяет протон с образованием иона  $\text{NH}_3^+$ ,

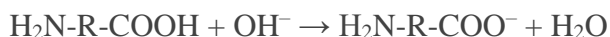
$\text{HOOC}$ -кислотная группа, которая диссоциирует на ион водорода  $\text{H}^+$  и кислотный остаток –  $\text{COO}^-$ .

Таким образом, белки, как и аминокислоты, обладают амфотерностью.

В кислой среде коллоидная частица белка имеет положительный заряд:



а в щелочной среде – отрицательный заряд:



Состояние макромолекул белка, при котором число ионизированных кислотных и основных групп равны, и средний суммарный заряд макромолекул равен нулю, называется *изоэлектрическим состоянием*. Значение **pH** раствора, при котором молекулы белка находятся в изоэлектрическом состоянии, называется *изоэлектрической точкой (ИЭТ)*. Изоэлектрическая точка является важнейшей характеристикой белка, определяющей его свойства в той или иной среде.

Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы, нейтральные молекулы белка легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению pH раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами. Выпадение белка в осадок можно ускорить добавлением водоотнимающих веществ, например, этилового спирта.

Тщательно растирают белок (казеин или желатин) в ступке до состояния пудры. В мерную колбу на 100 мл помещают 0,4 г белка, прибавляют 10 мл 1н раствора ацетата натрия и 70 мл воды. Колбу подогревают до 70°C и при энергичном встряхивании растворяют белок. Затем добавляют до метки воду. Раствор может быть слегка мутным, но не должен содержать хлопьев и осадка.

**Реактивы:** 0,5 %-й раствор желатины; 0,1 М раствор уксусной кислоты; 0,1 М раствор ацетата натрия; 96 %-й этиловый спирт.

**Оборудование:** пробирки; мерные пипетки.

#### Ход работы

1. В пять пронумерованных пробирок прилейте растворы уксусной кислоты и ацетата натрия в количествах, указанных в таблице.
2. После чего в каждую пробирку добавьте по 1 см<sup>3</sup> раствора желатины и хорошо перемешайте.
3. В каждую пробирку прибавьте по 4 см<sup>3</sup> этилового спирта и снова перемешайте.
4. Через 5–10 мин. просмотрите все пробирки и оцените степень мутности полученных смесей. pH наиболее мутной смеси соответствует изоэлектрической точке желатины.
5. Результаты оформить в виде таблицы, отмечая степень мутности раствора до и после добавления этилового спирта по пятибалльной шкале: 1 – отсутствие помутнения, 2 – слабое, 3 – умеренное, 4 – сильное, 5 – очень сильное.

Таблица 7 Определение изоэлектрической точки белка

№ пробирки	Состав буферной смеси, мл		pH смеси	0,5 %-й раствор желатины, мл	Этиловый спирт, мл	Степень мутности (по 5-балльной шкале)
	0,1 М CH <sub>3</sub> COOH	0,1 М CH <sub>3</sub> COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	0,2	1,8	5,7	1	4	

## 6. Контрольные вопросы.

1. Механизм формирования белковой молекулы
2. Значение ИЭТ белков в зависимости от их аминокислотного состава
3. Электрокинетические свойства белков в зависимости от их заряда
4. Заряд белковых коллоидов в разных условиях среды.
5. Заряд белковых молекул и их функциональная активность.

## Лабораторная работа № 6 Определение содержания витамина «С»

**1. Цель и задачи работы.** Ознакомиться с физическими, отдельными химическими свойствами витамина С. Научиться определять витамин С методом титрования.

**2. Материалы и оборудование.** 10% раствор HCl, 2% раствор HCl, 0,001н 2,6 – дихлорфенолиндофенол, уксусная кислота концентрированная, капуста, картофель, плоды шиповника, молоко. Ступки фарфоровые, мерные цилиндры, бюретки, пипетки мерные на 2 и 5 мл., воронки, весы лабораторные, фильтры бумажные.

### 3. Общие сведения.

Цинга – неинфекционное заболевание, вызванное недостаточностью витамина «С», имело широкое распространение среди людей питающихся консервированными продуктами при отсутствии овощей и фруктов.

В животноводстве, сегодня, в зимний стойловый период имеют место проявления отдельных симптомов гиповитаминоза «С».

### 4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### 5. Задания

#### 1. Определение содержания витамина «С» в капусте.

Отвесить 1 гр. капусты, растереть в ступки с 2 мл. 10% раствора HCl, прилить 8 мл. дистиллированной воды, хорошо перемешать. Гомогенат отфильтровать. В колбочку для титрования внести 2 мл. фильтрата, добавить 10 капель 10% раствора HCl, и титровать 0,001н раствора 2,6 дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания, сохраняющегося в течение 30 секунд.

Расчет содержания витамина «С» в 100 гр. продукта производится по формуле:

$$X = \frac{0.088 \cdot A \cdot 10 \cdot 100}{B \cdot C},$$

где А – расход 2,6 – дихлорфенолиндофенола, мл.;

В – количество фильтрата взятого для титрования, мл.;

С – количество продукта взятого для анализа, гр.;

10 – общее количество экстракта, мл.;

0,088 – коэффициент перерасчета для витамина «С».

#### 2. Определение содержания витамина «С» в картофеле.

Отвесить 5 гр картофеля (без кожуры), растереть в ступке с 20 каплями 10% раствора HCl, постепенно прилить 15 мл. дистиллированной воды, перемешать до однородной массы. Полученную массу слить в колбочку для титрования, ступку ополоснуть водой и добавить смыв в ту же колбочку для титрования. Титровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до слабо розового окрашивания. Расчет содержания витамина «С» произвести по формуле приведенной выше.

### **3. Определение содержания витамина «С» в плодах шиповника.**

Растереть в ступке 1 плод шиповника, добавляя постепенно 9 мл. 2% раствора HCl. Раствор отфильтровать в сухую пробирку. 3 мл. фильтрата перенести в колбу и оттитровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания не исчезающего 30секунд. Расчет содержания витаминов «С» произвести по формуле приведенной выше.

### **4. Количественное определение витамина «С» в молоке.**

10 мл. молока развести дистиллированной водой в три раза. В коническую колбу внести 1 мл. 2% раствора HCl, 5 мл. разбавленного молока и 9 мл. дистиллированной воды (общий объем 15 мл. ). Полученную смесь оттитровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до появления слабо розового окрашивания.

**5. Слепой опыт.** В колбу внести 1 мл. 2% раствора HCl, 14 мл. дистиллированной воды и оттитровать 2,6 – дихлорфенолиндофенолом до слабо розового окрашивания.

Расчет содержания витамина «С» в молоке произвести по формуле:

$$X = \frac{B * C * 0,088 * 100}{5},$$

где В – количество индикатора

2,6 – дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование молока, за вычетом его расхода в слепом опыте, мл.;

С - разведение молока (в опыте оно равно числу 3);

5 – количество молока взятого для титрования, мл.;

100 – перерасчет в мг./%.

### **Содержание витамина «С» в различных источниках.**

В 100 г: капусты 25 – 60 мг.

картофеля 1 – 5 мг.

шиповника 500 – 1500 мг.

хвой 200 – 400 мг.

молоко коровье 1 – 2 мг.

молоко кобылье до 33 мг.

### **6. Контрольные вопросы.**

1. Написать окисленную и восстановленные формы витамина «С».
2. Биологическая роль витамина «С» в организме.
3. Источники витамина «С» для с. х. животных и птицы.
4. Проявления авитаминоза и гиповитаминоза «С» в животноводстве и птицеводстве.



## Лабораторная работа № 7 Качественные реакции на гормоны

*Реактивы и оборудование:* 1. 10% раствор NaOH; 2. 1% раствор CuSO<sub>4</sub>; 3. HNO<sub>3</sub> - (конц.); 4. (NH<sub>4</sub>)OH - (конц.); 5. 1 % раствор Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; 6. 1 % раствор FeCl<sub>3</sub>; 7. 1 % раствор йодата калия (KIO<sub>3</sub>); 8. 10% раствор CH<sub>3</sub>COOH; 9. 1% раствор сульфаниловой кислоты; 10. 5% раствор NaNO<sub>2</sub>; 11. 10% раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 12. 10% раствор сахарозы; 13. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - (конц.); 14. Хлороформ; 15. Инсулин; 16. Раствор адреналина, 0,1% разведение (1:10); 17. Тиреоидин; 18. Спиртовой раствор фолликулина или кортизона-ацетата; 19. Пробирки; 20. Водяная баня; 21. Штативы для пробирок.

### I. Качественные реакции на инсулин.

Цветные реакции на инсулин, которые доказывают его белковую природу: а) биуретовая реакция; б) ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан);

в) реакция на слабосвязанную серу (цистеин, цистин). См. занятие «Цветные реакции на белки».

#### 1. Биуретовая реакция

*Ход работы:* к 5 каплям инсулина добавить 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 каплю (избыток мешает чтению результатов реакции!!!) 1% раствора сернокислой меди. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

#### 2. Ксантопротеиновая реакция

*Ход работы:* к 5 каплям инсулина добавить 3 капли концентрированной азотной кислоты; образуется осадок белка, который при осторожном нагревании на водяной бане окрашивается в желтый цвет. **К охлажденной пробе (!!!)** добавляют избыток аммиака - появляется оранжевое окрашивание вследствие образования хиноидного производного тирозина.

#### 3. Реакция Фоль на слабосвязанную серу

*Ход работы:* вначале денатурируют белок, добавляя к 5 каплям раствора инсулина 1% раствор уксуснокислого свинца по каплям до выпадения осадка. Затем также по каплям добавляют 10% раствор NaOH до полного просветления жидкости (растворение осадка денатурированного белка). Пробирку нагревают в кипящей водяной бане, пока раствор не окрасится в темный (черный) цвет за счет образования осадка сульфида свинца.

### II. Качественные реакции на адреналин.

Обусловленные наличием кольца пирокатехина в его молекуле.

1. Реакция с хлорным железом: адреналин, в молекулу которого входит фенольное кольцо, образует с хлорным железом соединение типа фенолята.

*Ход работы:* в пробирку внести 2 - 3 капли раствора адреналина (1:10) и 1 каплю 1% раствора хлорного железа. Жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет, переходящий при стоянии в желтый.

2. Реакция с йодатом калия (KIO<sub>3</sub>): продукты хиноидного окисления адреналина окрашивают раствор адреналина в цвета от розового до бурого. В условиях опыта адреналин окисляется а пигмент - галохром, имеющий красно-фиолетовую окраску.

*Ход работы:* в пробирку внести 2 - 3 капли раствора адреналина (1:10), 2 капли 1% раствора йодата калия и 2 капли 10% раствора уксусной кислоты. При легком нагревании появляется красно-фиолетовое окрашивание.

### III Качественные реакции на стероидные гормоны.

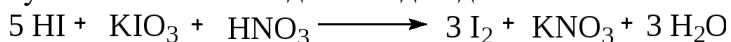
Основаны на присутствии в молекуле гормона кольца цикlopentanпергидрофенантрена при взаимодействии сахарозы с серной кислотой появляется оксиметилфурфурол, образующий со стероидным гормоном соединение, окрашенное в пурпурно-красный цвет.

*Ход работы:* к 5 каплям стероидного гормона добавить 1 каплю 10% раствора сахарозы. После тщательного перемешивания осторожно по стенке пробирки добавить концентри-

рованную серную кислоту. На границе двух жидкостей появляется пурпурно-красное кольцо.

#### IV. Качественные реакции на йод в тиреоидине

*Принцип метода:* тиреоидин (препарат, полученный из щитовидной железы животных) подвергается кислотному гидролизу: отщепившуюся йодисто-водородную кислоту окисляют в свободный йод йодноватисто-кислым калием:



Свободный йод экстрагируют хлороформом. Раствор йода в хлороформе окрашен в фиолетовый цвет.

*Ход работы:* в пробирку вносят половину таблетки тиреоидина и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Для проведения гидролиза пробирку нагревают 1-2 мин на водяной бане (если жидкость вспенивается, нагревание прекращают). Затем добавляют в пробирку 20 капель раствора йодноватисто-кислого калия, раствор осторожно перемешивают и охлаждают. Добавляют в пробирку 10-15 капель хлороформа, встряхивают и отмечают, что хлороформ (нижний слой) окрасился йодом в фиолетовый цвет.

Полученные результаты оформить в виде следующей таблицы.

Таблица Качественные реакции на гормоны

Название железы внутренней секреции	Название гормона	Название реакции	Окрашивание	Вывод (химическая природа гормона)
1				
2				
3				
4				

#### Контрольные вопросы

1. Перечислите основные железы внутренней секреции.
2. Дайте определение гормонов и их классификация по химической природе.
3. Охарактеризуйте роль гормонов, обнаруженных проведенными качественными реакциями, в обмене веществ животного организма.
4. Каково влияние йодтиронинов на метаболизм в организме животных?
5. Принципы методов обнаружения адреналина и тироксина.
6. Каков механизм действия гормонов на клетки-мишени?

#### Лабораторная работа № 8 Влияние различных факторов на ферментативный гидролиз крахмала

**Цель и задачи работы.** Выяснить химическую природу, отдельные свойства ферментов. Изучить основные факторы определяющие ферментативную активность.

**Материалы и оборудование.** 0,85% раствор NaCl, 1% раствор CuSO<sub>4</sub>., 2% раствор HCl, 1% раствор Люголя, 10% раствор NaOH. 1% раствор крахмала, 1% раствор сахарозы, 1% раствор соды, слюна. Штатив с пробирками, водяная баня, термометр, электроплитка.

#### Общие сведения.

«История биохимии - это в значительной мере история исследования ферментов» – так образно определил А Ленинджер, один из ведущих биохимиков, значение этого класса

веществ. По сути в организме нет биохимических процессов протекающих без участия ферментов. К настоящему времени идентифицировано около 2000 различных ферментов, каждый из которых катализирует какую – то одну определенную реакцию.

Спектр использования ферментов чрезвычайно широк и разнообразен. Это промышленные технологии, пищевые производства, медицина, сельское хозяйство.

### Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### 5. Задания

1. В пробирку собрать 2 – 3 мл слюны, разбавить ее водой в 5 –6 раз. Взять 7 пробирок, пронумеровать и налить в каждую примерно 1 мл раствора слюны. Раствор слюны в первой пробирке прокипятить, во вторую пробирку добавить 1 мл физиологического раствора, в третью 1 мл раствора  $\text{CuSO}_4$ , в четвертую 1мл раствора  $\text{HCl}$ , в пятую 1 мл раствора соды. В первые шесть пробирок прилить по 5 мл раствора крахмала, а в седьмую раствора сахарозы. Поставить все семь пробирок в водяную баню ( $39 - 41^\circ\text{C}$ ) на 15 минут затем достать, охладить до комнатной температуры, добавить в первые шесть пробирок по одной капле раствора Люголя. В тех пробирках, где нет синего (сине – фиолетового) окрашивания и с раствором седьмой пробирки проделать реакцию Троммера. Полученные результаты занести в таблицу 9.

Таблица 1. Особенности действия ферментов слюны.

№ п/п	Субстрат	Ферменты	Дополнительный фактор	Результаты опыта		Выводы
				Реакция с йодом	Реакция Троммера	
1	крахмал	амилаза, мальтаза	кипячение			
2			физ. раствор			
3			$\text{CuSO}_4$			
4			$\text{HCl}$			
5			$\text{Na}_2\text{CO}_3$			
6			-			
7	сахароза		-			

Полученные результаты объяснить. Написать схему гидролиза крахмала.

### 6. Контрольные вопросы

1. Природа ферментов.
2. Свойства ферментов.
3. Особенности ферментативных реакции.
4. Механизм действия ферментов.
5. Применение ферментных препаратов в практике.
6. Написать перечень ферментов органов пищеварения с. х. животных, указать оптимум их pH, на что они действуют и продукты гидролиза.

## Лабораторная работа № 9 Качественные реакции на дегидрогеназы молока и мышечной ткани

**1. Цель и задачи работы.** На примере действия дегидрогеназы молока и мышечной ткани закрепить представления об особенностях строения и механизме действия сложных ферментов и окислительно – восстановительных процессах биологического окисления.

**2. Материалы и оборудование.** Молоко или кефир, мышечная кашица (0,5 г мышц, растертых в ступке с 3 – 4 мл физраствора), 0,4% раствор формальдегида, метиленовая синь 0,01% раствор, янтарная кислота (3% раствор, нейтрализованный едким натром до слабо щелочной реакции на лакмус). Штатив с пробирками, водяная баня, термометры, электроплитки или спиртовки.

### 3. Общие сведения.

По строению (составу) ферменты делятся на простые и сложные. Сложные состоят из белковой (апофермент) и небелковой (кофермент) частей. К таким относятся ферменты биологического окисления – оксидоредуктазы.

В молоке содержится фермент, ускоряющий дегидрирование различных альдегидов (формальдегида, ацетальдегида и др.). Если реакция дегидрирования протекает в присутствии газообразного кислорода, то водород переносится на кислород с образованием перекиси водорода. В присутствии метиленовой сини она служит акцептором, на которой альдегидоксидаза переносит водород с окисляемого субстрата.

Сукцинатдегидрогеназа окисляет янтарную кислоту (сукцинат) в фумаровую (фумарат). При наличии метиленовой сини последняя восстанавливается в бесцветное лейкосоединение.

### 4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

### 5. Задания

#### 1. Действие альдегидоксидазы молока.

Налить в две пробирки по 4 – 5 мл. молока или кефира, содержимое одной пробирки прокипятить и охладить. Добавить в обе пробирки по 8 – 10 капель раствора формальдегида и по 1 – 2 капли метиленовой сини, перемешать и поставить в водяную баню при 37 – 40°C. Через некоторое время наблюдается обесцвечивание метиленовой сини в одной пробирке и отсутствие обесцвечивания в другой (кипяченной).

Записать схему опыта, результаты и выводы занести в таблицу.

**2. Действие сукцинатдегидрогеназы мышц.** В две пробирки внести по 3 – 4 мл мышечной кашицы и в одну из них добавить 6 – 8 капель нейтрализованного раствора янтарной кислоты. Затем в обе пробирки прилить по 2 капли раствора метиленовой сини, встряхнуть и поставить в баню температурой 37 – 40°C. Через некоторое время происходит обесцвечивание метиленовой сини в пробирке с янтарной кислотой. Во второй пробирке окраска сохраняется. Написать схему опыта и объяснить его результаты. Данные занести в таблицу 10.

Таблица 10. Результаты действия дегидрогеназ

№ пробирки	Условие опыта	Результат опыта	Выводы

## 6. Контрольные вопросы.

1. Характеристика двухкомпонентных ферментов.
2. Строение НАД и НАДФ.
3. Биологическая роль дегидрогеназ.
4. Аэробные и анаэробные дегидрогеназы.

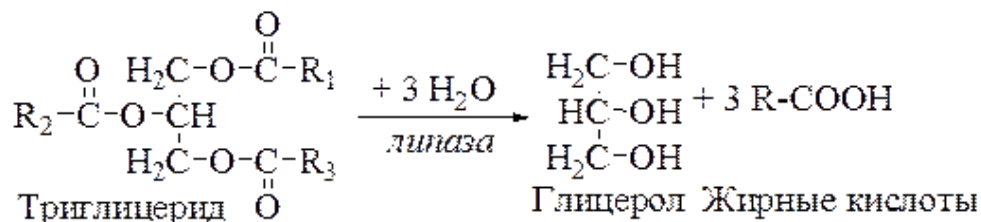
## 10 Лабораторная работа № 10 Изучение липазы молока и каталазы крови и печени

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

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

### 1. Действие липазы

Липаза входит в состав сока поджелудочной железы. В желудочном соке она содержится в небольшом количестве и действует только на предварительно эмульгированные жиры. В кишечнике желчные кислоты и белки способствуют эмульгированию липидов. Действие липазы можно обнаружить, добавив ее раствор к молоку, предварительно слабо подщелоченному раствором карбоната натрия в присутствии фенолфталеина, дающего бледно-розовую окраску.



**Принцип метода.** Липаза ускоряет гидролиз нейтрального жира на глицерин и жирные кислоты, что приводит к снижению pH и исчезновению розовой окраски индикатора – фенолфталеина.

**Материалы:** молоко,

**Реактивы и оборудование:** свежеприготовленный раствор панкреатина (растолочь 1 таблетку панкреатина, добавить 5 мл дистиллированной воды), вода; штатив с пробирками; пипетки

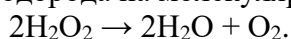
**Ход работы.** В две пробирки налить по 1 мл молока. В 1-ю пробирку добавляют 5 капель панкреатина, содержащего липазу, во 2-ю – 5 капель воды. В обе пробирки налить по 1 капле 0,5 %-го раствора фенолфталеина и по каплям 1%-го раствора карбоната натрия до появления бледно-розовой окраски при pH 8,0 (нельзя приливать избыток раствора карбоната натрия). Пробирки поместить в термостат при температуре 38 °C на 30 мин. Наблюдать обесцвечивание раствора в пробирке, содержащей липазу.

Сделать выводы по результатам работы.

## 2. Действие каталазы (пероксидазы)

Оксидоредуктазы (1-й класс) катализируют окислительно-восстановительные реакции, осуществляя перенос водорода или электронов. К оксидоредуктазам относятся дегидрогеназы, оксидазы, каталаза, лактопероксидаза, оксигеназы и др. – всего около 30 ферментов.

Фермент каталаза (пероксидаза) содержится во всех тканях и жидкостях организма, но особенно активен в строме эритроцитов и печени, а также зеленых листьях растений, где участвует в процессе фотодыхания. В процессе окисления некоторых веществ образуется перекись водорода  $H_2O_2$ , ядовитая для организма, которая может в нём накапливаться. Биологическая роль каталазы заключается в разложении вредной для организма перекиси водорода на молекулярный кислород и воду:



Фермент содержится почти исключительно в эритроцитах и притом не в гемоглобине, а в строме. Содержание каталазы в крови снижается при ряде заболеваний, таких, как рак, анемия, туберкулез и др.

**Материалы исследования:** кровь; печень, мышечная масса.

**Реактивы и оборудование:** 3%-й раствор  $H_2O_2$ ; вода; штатив с пробирками; пипетки; стакан; ступка с пестиком; спички или лучинка; скальпель.

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

б) Действие каталазы печени. В пробирку поместить 0,5 г растёртой печени, прилить 10 мл воды и перемешать. Добавить 3% раствор перекиси водорода до верха пробирки и сразу, закрыв её пальцем, опрокинуть в стакан с водой, не выливая жидкости. Происходит выделение пузырьков кислорода в пробирке и вытеснение ими жидкости в стакан. Для доказательства того, что собранный газ – кислород, пробирку закрыть пальцем, осторожно вынуть из воды, перевернуть и быстро внести в пробирку тлеющую лучинку или спичку. Появление пламени указывает на усиление горения за счёт выделившегося кислорода. Сделать выводы по проделанной работе.

### Вопросы

1. Какие вещества называются ферментами?
2. Каковы их химическая природа и свойства?
3. Что такое специфичность действия ферментов и как она определяется?
4. Как зависит активность ферментов от температуры?
5. Как влияет величина pH среды на ферментативную активность?
6. Какие вещества называются активаторами и ингибиторами ферментов?
7. Как определяют активность каталазы крови?

## Лабораторная работа № 11 Хроматографический метод разделения и определения веществ

**Цель работы:** ознакомиться с принципом хроматографического разделения веществ.

**Оборудование и материалы**

Лабораторные пробирки, фломастеры на водной основе, хроматографическая (фильтровальная) бумага, дистиллированная вода

#### 4.3 Пояснения к теме

**Хроматография** – это метод, применяемый для разделения различных смесей на составляющие их компоненты. Метод основан на том, что в неподвижной среде, через которую протекает растворитель, каждый из компонентов, увлекаемых растворителем, движется со своей собственной скоростью независимо от других. Если, например, смесь пигментов, обуславливающих зеленую окраску растений, растворить в соответствующем растворителе и пропустить через какую-либо неподвижную среду, такую, как хроматографическая бумага, молотый мел или силикагель, то эта смесь разделится на несколько различным способом окрашенных пигментов.

В зависимости от природы используемой неподвижной среды различают три главных типа хроматографии: бумажную, колоночную и тонкослойную. Одной из модификаций хроматографии, применяемой для разделения молекул, несущих заряды, является электрофорез. В хроматографической среде под влиянием приложенного электрического поля одна сторона оказывается заряженной положительно, а другая – отрицательно. Отдельные молекулы в разделяемой смеси движутся к той или другой стороне в зависимости от их относительных масс и зарядов. Электрофорез широко применяется для выделения и идентификации аминокислот, белков и других веществ.

При хроматографии подвижность растворенного вещества относительно фронта растворителя постоянно для данного вещества. Это может быть выражено величиной  $R_f$ :

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным веществом}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}}$$

Если фронт растворителя выходит за пределы бумаги, то подвижность данного растворенного вещества можно выразить в сравнении с подвижностью другого стандартного вещества. Тогда

$$R_x = \frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным веществом}}{\text{Расстояние, пройденное стандартным веществом } x}$$

#### *Двухмерная бумажная хроматография*

Хроматографией, идущей только в одном направлении, не всегда можно эффективно разделить сложную смесь веществ. В этом случае для лучшего разрешения пятен должно быть проведено дополнительное разделение в перпендикулярном направлении с использованием второго растворителя. Для этого используют квадратный лист бумаги. Образец наносят на базовую линию около одного из углов и проводят разделение в первом направлении. Бумагу вынимают из камеры, сушат, поворачивают на  $90^\circ$  и проводят повторное хроматографическое разделение, используя другой растворитель. В результате вещества, частично разделенные после первого пробега, окончательно разделяются во втором растворителе, имеющем отличные от первого характеристики. Бумагу вынимают, сушат и выявляют разделенные вещества соответствующим реактивом. Идентифицировать данное вещество можно, сравнив его местоположение с положением стандартных веществ.

Опыт показывает, что чем концентрированнее стартовое пятно, тем лучше пройдет разделение. Разделение проходит лучше при более длинном хроматографическом пробеге.

#### 4.4 Задания

1) Взять полоску из хроматографической или фильтровальной бумаги 20 см длиной, 1 см шириной. С 1 стороны полоски на расстоянии 1 см от края провести простым карандашом линию (стартовую).

- 2) Фломастером с водорастворимыми чернилами разных цветов нанести на стартовую линию пятно, примерно 2 мм в диаметре. Высушить пятно.
- 3) В пробирку налить немного воды, установить ее вертикально.
- 4) Подвесить бумагу в пробирке таким образом, чтобы конец бумаги был погружен в растворитель (воду), а стартовая линия находилась выше уровня воды.
- 5) Растворитель будет подниматься по бумажной полоске, увлекая за собой чернила. Более растворимая часть чернил будет быстрее передвигаться вместе с фронтом растворителя, менее растворимые – медленнее. Через некоторое время исходный цвет чернил разделится на несколько составляющих его компонентов.
- 5) Продолжать хроматографию до тех пор, пока фронт растворителя не окажется на расстоянии 1 см от верхнего края бумаги. Вынуть хроматограмму и высушить ее, предварительно отметив карандашом положение фронта растворителя.
- 6) Обвести пятно каждого цвета простым карандашом, рассчитать величины  $R_f$  для каждого составляющего компонента.

#### **4.5. Контрольные вопросы**

- 1) На чем основан хроматографический метод, какое значение в биологии он имеет?
- 2) Какие модификации хроматографического метода вы знаете?
- 3) Что представляет собой двухмерная хроматография?

### **Лабораторная работа 13. Изучение химического состава молока**

**1. Цель и задачи работы.** Ознакомиться с некоторыми лабораторными методами, позволяющими оценить качественный состав молока и определить количественное содержание его основных компонентов.

**2. Материалы и оборудование.** Молоко, 1%ный раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор едкого натрия, нейтральный формалин, 5% ный раствор щавелевокислого аммония, 5%ный раствор гидрата аммония, 10%ный раствор уксусной кислоты, 4% ный раствор хлористого кальция. Колбы конические, бюретки, мерные пипетки, стекла предметные и покровные, пробирки, воронки, фильтры, микроскоп, рефрактометр, водяная баня, спиртовка, электрическая плита.

#### **3. Общие сведения.**

Молоко – многокомпонентная система, в состав которой входят белки, липиды, углеводы, минеральные вещества, витамины, гормоны и ряд других компонентов.

#### **4. Порядок выполнения работы.**

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

#### **5. Задания**

##### **1. Изучение липидной фракции молока.**

Шарики молочного жира можно увидеть при увеличении в 280-400 раз.

На предметное стекло наносят маленькую каплю молока (можно предварительно разбавить его водой в 5 раз) и покрывают покровным стеклом. Затем предметное стекло помещают на столик микроскопа и рассматривают каплю молока при окуляре 7 и объективе 40, что соответствует увеличению в 280 раз.

##### **2. Определение содержания белков в молоке.**



В колбу отмеряют 10 мл молока, 10-12 капель 1%-ного раствора фенолфталеина и по каплям добавляют 0,1н раствор едкого натрия до появления бледно-розовой окраски молока, не исчезающей при взбалтывании. Затем вносят 2 мл нейтрального по фенолфталеину формалина и титруют 0,1 н раствором едкого натрия до появления стойкой белорозовой окраски, не исчезающей в течение 1 минуты.

Количество щелочи, израсходованной на титрование после добавления формалина, умножают на коэффициент 1,92 и получают общее содержание белков в молоке.

Умножение количества щелочи на коэффициент 1,51 дает в результате содержание казеина.

### **3. Открытие кальция в молоке.**

1-2 мл молока разбавить 3-4 мл воды и прибавить по каплям при встряхивании 0,5 мл 10% -ного раствора уксусной кислоты до полного осаждения казеина. После этого содержимое пробирки отфильтровать и фильтрат использовать для открытия минеральных веществ.

В пробирку наливают 5 мл фильтрата и добавляют 2-3 мл 5%-ного раствора щавелевокислого аммония, встряхивают и наблюдают за образованием белого осадка щавелевокислого кальция.

Открытие кальция основано на нерастворимости щавелевокислого кальция, образующегося при воздействии на растворимые соли кальция щавелевокислым аммонием. В молоке кальция частично находится в виде хлористого кальция.

### **4. Открытие магния в молоке.**

Молочную сыворотку (фильтрат) с образовавшимся в предыдущем опыте с осадком щавелевокислого кальция, еще раз отфильтровывают. К 3-4 мл фильтрата приливают 2 мл 5%-ного раствора гидрата аммония и наблюдают за образованием белого осадка фосфорно-аммонийной магниевой соли.

### **5. Определение казеина и альбумина (качественная проба).**

В пробирку отмеривают пипеткой 5 мл молока, нагревают его примерно до 40-50<sup>0</sup>С и второй пипеткой вносят несколько капель уксусной кислоты, слегка взбалтывая молоко до прекращения выпадения хлопьев. Выпавшие хлопья представляют собой казеин молока. После этого жидкость фильтруют в другую пробирку. Отфильтрованную сыворотку в пробирке нагревают до кипения. В жидкости появляются мелкие хлопья - молочный альбумин.

Казеин в молоке находится в виде коллоидной кальциевой соли. уксусная кислота отнимает кальций от казеина, и освобожденный казеин выпадает в осадок в виде хлопьев. В свободном состоянии альбумин растворим, но он легко освобождается при нагревании свыше 75<sup>0</sup>С (при кипячении). Свойство альбумина образовывать хлопья при нагревании используют для доказательства пастеризации молока свыше 75<sup>0</sup>С.

Оформить результаты и сделать выводы.

### **6. Контрольные вопросы.**

1. Классификация и биологические функции белков молока.
2. Молочный жир – природная эмульсия
3. Минеральный состав молока.
4. Состав и свойства казеина.
5. Сывороточные белки, их биологическая роль.
6. Молочный сахар, лактоза.

## Библиографический список

1. Ганиев, С. Б. Методические указания для выполнения лабораторных работ. Режим доступа: [http://biblio.bsau.ru/jrbis20/index.php?option=com\\_irbis&view=irbis&Itemid=115](http://biblio.bsau.ru/jrbis20/index.php?option=com_irbis&view=irbis&Itemid=115).
2. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных: фундаментальные и клинические аспекты [Текст] : учебник для студ. вузов, обуч. по спец. 310800-Ветеринария / С. Ю. Зайцев, Ю. В. Конопатов. – СПб. [и др.]: Лань, 2004. - 383 с.
3. Горбатова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов [Текст] : учебное изд. / К. К. Горбатова. - 3-е изд., перераб. и доп. – СПб. : ГИОРД, 2001. - 320 с.
4. Нурмухаметова, Н. Л. Практикум по биохимии молока и мяса [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. Л. Нурмухаметова - Уфа : БашГАУ, 2010. - 88 с. – Режим доступа: <http://biblio.bsau.ru/metodic/16802.pdf>.
5. Рогожин, В. В. Биохимия животных [Текст]: учебник для студ., обуч. по спец. 110305 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции / В. В. Рогожин. – СПб.: Гиорд, 2009. - 552 с.
6. Румянцева, Э. Р. Биохимия молока и мяса [Текст] : учеб. пособие для студ. вузов по спец. 271100 «Технология перераб. молока и молочных продуктов» и 270900 «Технология перераб. мяса и мясопродуктов» / Э. Р. Румянцева, И. Ю. Долматова. - Уфа : БГАУ. -2002. - 162 с.
7. Щербаков, В. Г. Биохимия [Текст] / [В. Г. Щербаков и др.]; под ред. В. Г. Щербакова. - 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: Гиорд, 2009. - 465 с.



