



Министерство образования и науки Республики Казахстан
Павлодарский государственный университет им. С. Торайгырова
Агротехнологический факультет
Кафедра биотехнологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
к лабораторным работам
по дисциплине «Биохимия животных»
для студентов специальности 050802 «Зоотехния»

Павлодар



УТВЕРЖДАЮ

**Декан агротехнологического
факультета**

_____ **Бексеитов Т.К.**

«__» _____ 2009г.

Составитель: к.т.н., доцент _____ К.М. Омарова

Кафедра биотехнологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторным работам

по дисциплине «Биохимия животных»

для студентов специальности 050802 «Зоотехния»

Рекомендована на заседании кафедры биотехнологии. «__» _____ 20__ г.

Протокол № __.

Зав. кафедрой _____ Ж.А. Адамжанова

Одобрена учебно-методическим советом Агротехнологического факультета

«__» _____ 20__ г. Протокол № __.

Председатель УМС _____ М.Е. Жагипарова

ВВЕДЕНИЕ

Целью изучения курса «Биохимия животных» является получение студентами глубоких знаний о химическом составе организма, структуры, свойствам клеток и об обмене веществ и энергии в живом организме.

В результате изучения курса биологической химии студенты должны знать: химический состав живого организма, механизм действия витаминов, гормонов и ферментов, а также обмен веществ и закономерности выделения энергии в живом организме. Студенты должны уметь исследовать современными биохимическими методами кровь, молоко и другие биологически активные вещества, а также уметь применять приобретенные знания в деятельности будущей специальности.

Практические работы должны способствовать самостоятельному творческому подходу к решению практических задач, приобретению навыков сбора материала и изучению его с применением научно-исследовательских методов. В ходе практических занятий глубже прорабатываются основные положения предмета и приобретаются навыки работы со справочной литературой и определителями.

Программа курса рассчитана на 2 кредита (90 часов), согласно Государственному общеобязательному стандарту высшего образования 050802 Зоотехния, ГОСО РК 3.08.327-2006 «Образование высшее профессиональное. Бакалавриат» и Типовой программе (Алматы, 2006).

СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЗАНЯТИЙ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Тема: Цветные и именные качественные реакции на белки

Цель данной работы выяснить химизм качественных реакций на аминокислоты, показать роль отдельных ученых в исследовании белков, а также:

- 1) изучить и систематизировать имеющиеся литературные данные по качественным реакциям на белковые аминокислоты, составить базу данных о качественных, в том числе цветных, реакциях на белки;
- 2) научиться практически осуществлять качественные реакции;
- 3) выделить качественные реакции на белковые аминокислоты, изучаемые в курсе химии.

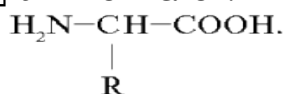
Белки – основа жизнедеятельности любого организма на Земле. Это сложные высокомолекулярные природные соединения. Мономерами белков являются аминокислоты. Умение определять аминокислоты важно и в теоретическом, и в практическом аспекте. Определение аминокислот сопровождается написанием уравнений качественных реакций, что способствует углублению знаний по органической химии. Это умение имеет большое значение при заболеваниях, связанных с ослаблением иммунной системы людей (аллергические заболевания, нарушение функционирования ферментативных систем и т. д.), при которых основную роль играют белки. В данной ситуации необходимо оперативно и грамотно определять аминокислоты (белки).

Для аминокислот, постоянно встречающихся в составе белков, разработано множество цветных (в том числе именных) реакций. Многие из них высокоспецифичны, что позволяет определять ничтожные количества той или иной аминокислоты.

Надо помнить, что все качественные реакции – это реакции не собственно на белки, а на определенные аминокислоты, входящие в их состав.

Основной структурной единицей белков служат α -аминокислоты. В состав большинства природных белков входит около 20 α -аминокислот.

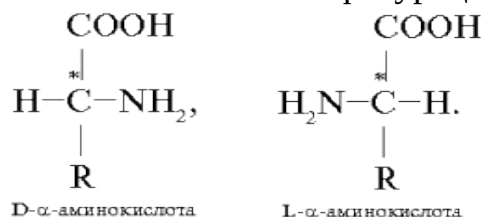
Общая формула белковых α -аминокислот:



Основным источником α -аминокислот для живого организма являются пищевые белки. Некоторые белковые аминокислоты синтезируются и самим организмом. Их называют заменимыми аминокислотами. Другие α -аминокислоты, необходимые для синтеза белков, синтезируются в

организме не могут и должны поступать только извне. Такие аминокислоты называют незаменимыми.

Все α -аминокислоты, входящие в состав белков, за исключением глицина (аминоуксусная кислота), содержат один или два асимметрических атома углерода и являются оптически активными соединениями. Они существуют в виде пар зеркальных изомеров (энантиомеры, или оптические антиподы), различающихся положением аминогруппы у асимметрического (хирального) атома углерода (он обозначен звездочкой). Расположение аминогруппы справа в проекционной формуле Фишера соответствует D-конфигурации, ее расположение слева – L-конфигурации:

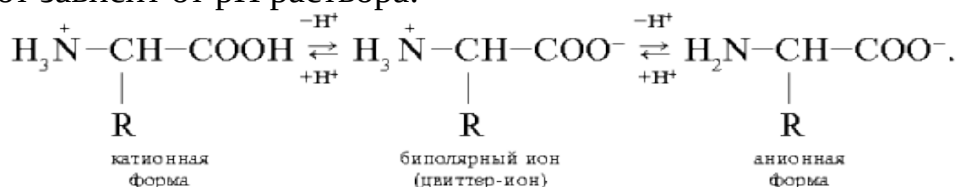


Большинство D-изомеров обладает сладким вкусом, а L-изомеры – горькие или безвкусные.

В состав природных белков входят только L-аминокислоты. α -Аминокислоты D-ряда называют иногда неприродными, т. к. они не используются для построения белков человеческого организма.

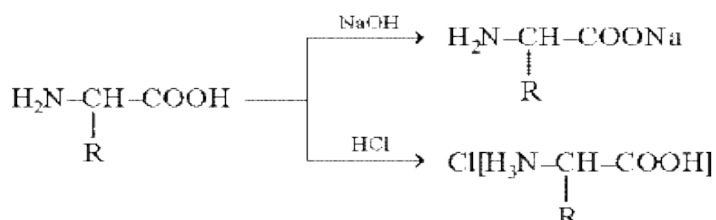
α -Аминокислоты представляют собой кристаллические вещества, растворимые в воде, имеющие сравнительно высокую температуру плавления (200–300 °C). Способность α -аминокислот растворяться в воде является важным фактором в обеспечении их биологического функционирования. С нею связана всасываемость α -аминокислот, их транспорт в организме.

Такие аминокислоты имеют две ионизируемые группы: карбоксильную (–COOH) и аминогруппу (–NH₂). В твердом состоянии и в водных растворах при определенных значениях pH среды α -аминокислоты существуют в виде биполярных ионов $\text{RCH}(\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3)\text{COO}^-$ (цвиттер-ионы), представляющих собой внутреннюю соль. В биполярном ионе карбоксильная группа диссоциирована (–COO[–]), а аминогруппа протонирована (– $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$). Ионизация молекул α -аминокислот зависит от pH раствора:



α -Аминокислоты содержат две различные функциональные группы: амино- и карбоксильную группы. Следовательно, это гетерофункциональные соединения.

Аминогруппа обуславливает основные свойства вещества, а карбоксильная – кислотные, именно поэтому α -аминокислоты являются амфотерными соединениями, т. е. образуют соли как с кислотами, так и со щелочами:



Кроме того, α-аминокислоты могут вступать в другие химические реакции, характерные для amino- и карбоксильных групп.

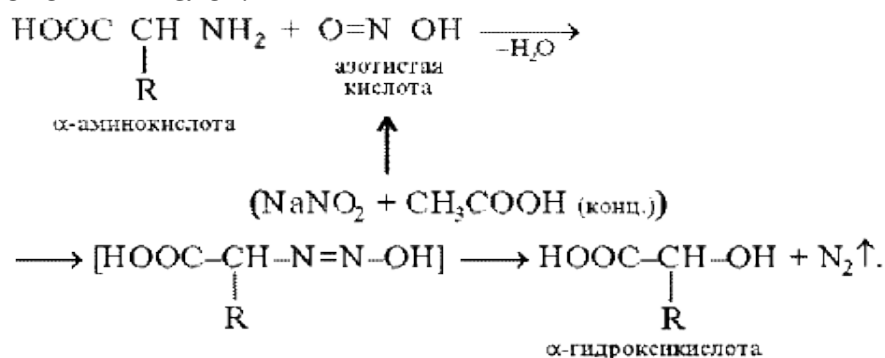
□ Реакция Адамкевича (Адамкевича–Гопкинса (1874))

Описание опыта. К 2 мл 1%-го раствора триптофана приливают ~1 мл концентрированной уксусной кислоты, встряхивают и по стенке пробирки осторожно добавляют ~2 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей наблюдают образование красно-фиолетового окрашивания. При встряхивании жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

□ Реакция Ван Слайка

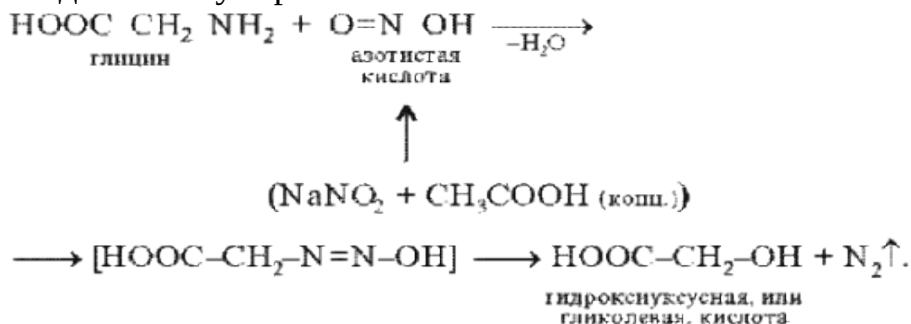
Это реакция определения первичной аминогруппы в алифатических аминах.

α-Аминокислоты, содержащие первичную аминогруппу, реагируют с азотистой кислотой. При этом образуется неустойчивое диазосоединение, разлагающееся с выделением свободного азота и образованием α-гидроксикарбоновых кислот:



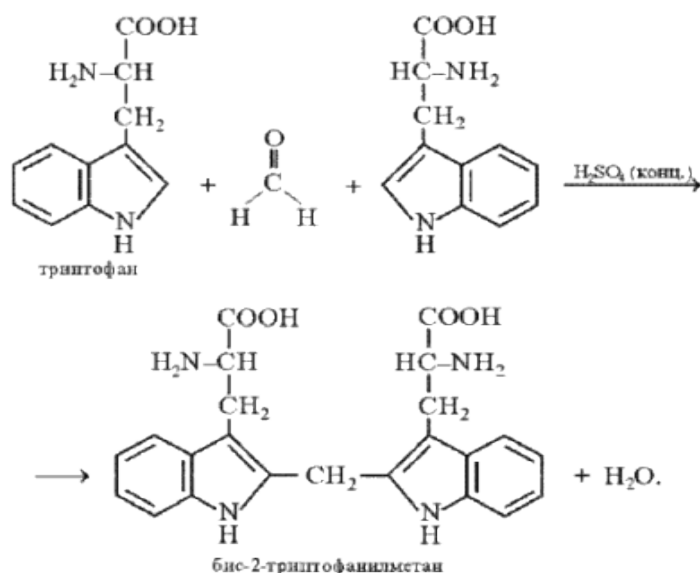
Реакция используется для количественного определения аминокислот по объему выделившегося газообразного азота.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора глицина и равный объем 5%-го раствора нитрита натрия. Добавляют 0,5 мл концентрированной уксусной кислоты и осторожно взбалтывают смесь. Наблюдается выделение пузырьков газа:

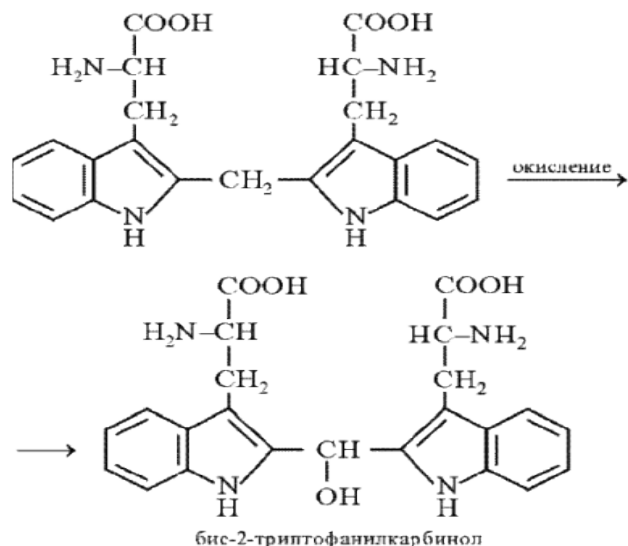


□ Реакция Вуазена

Описание опыта. Если к 1 мл 5%-го раствора белка в 30%-м растворе едкого калия прибавить одну каплю 1,25%-го раствора формальдегида, 10 мл



Продукт конденсации окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола, который в присутствии минеральных кислот образует соли, окрашенные в сине-фиолетовый цвет:



□ Реакция Маккарти и Салливана

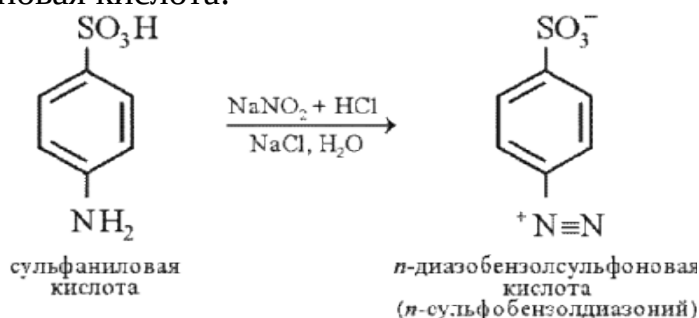
Это реакция на аминокислоту метионин.

Описание опыта. К 5 мл 0,02 н. раствора метионина прибавляют при перемешивании сначала 1 мл 14,3 н. раствора гидроксида натрия, а затем 0,3 мл свежеприготовленного 10%-го раствора нитропруссид натрия. Смесь 10 мин нагревают на водяной бане при 35–40 °С, затем в течение 2 мин охлаждают в ледяной воде. К смеси добавляют при помешивании 5 мл смеси соляной и фосфорной кислот. Полученный раствор взбалтывают 1 мин и охлаждают водой комнатной температуры в течение 10 мин. Образуется яркая красно-фиолетовая окраска.

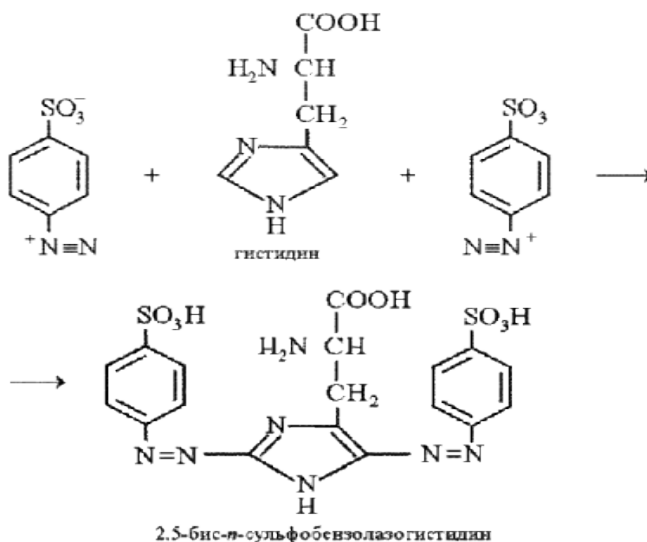
□ Реакция Паули (Диазореакция Паули)

Эта реакция на аминокислоту гистидин основана на взаимодействии гистидина с диазобензолсульфоновой кислотой с образованием соединения вишнево-красного цвета.

Реакцию диазотирования осуществляют при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия. При этом образуется диазобензолсульфовая кислота:



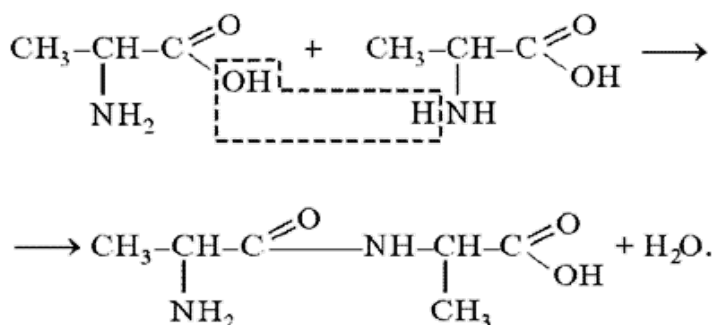
Эта кислота, взаимодействуя с гистидином, дает соединение вишнево-красного цвета:



Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5%-м растворе соляной кислоты. Затем прибавляют 2 мл 0,5%-го раствора нитрита натрия, сильно встряхивают и немедленно приливают 2 мл 0,01%-го раствора гистидина. После перемешивания содержимого пробирки сразу приливают 6 мл 10%-го раствора соды. Появляется интенсивная вишнево-красная окраска.

□ Реакция Пиотровского (биуретовая реакция)

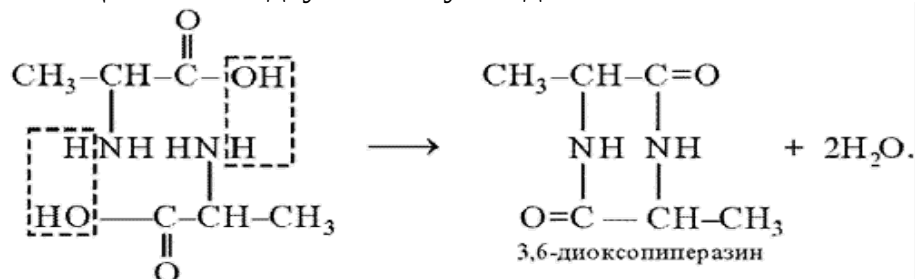
В белках аминокислоты связаны друг с другом по типу полипептидов и дикетопиперазинов. Образование полипептидов из аминокислот происходит путем отщепления молекулы воды от аминогруппы одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группы другой молекулы:



Образующаяся группа $-C(O)-NH-$ называется пептидной группой, связь $C-N$, соединяющая остатки молекул аминокислот, – пептидной связью.

При взаимодействии дипептида с новой молекулой аминокислоты получается трипептид и т. д.

Дикетопиперазины образуются при взаимодействии двух молекул аминокислот с отщеплением двух молекул воды:



Дикетопиперазины были выделены из белков Н.Д.Зелинским и В.С.Садиковым в 1923 г.

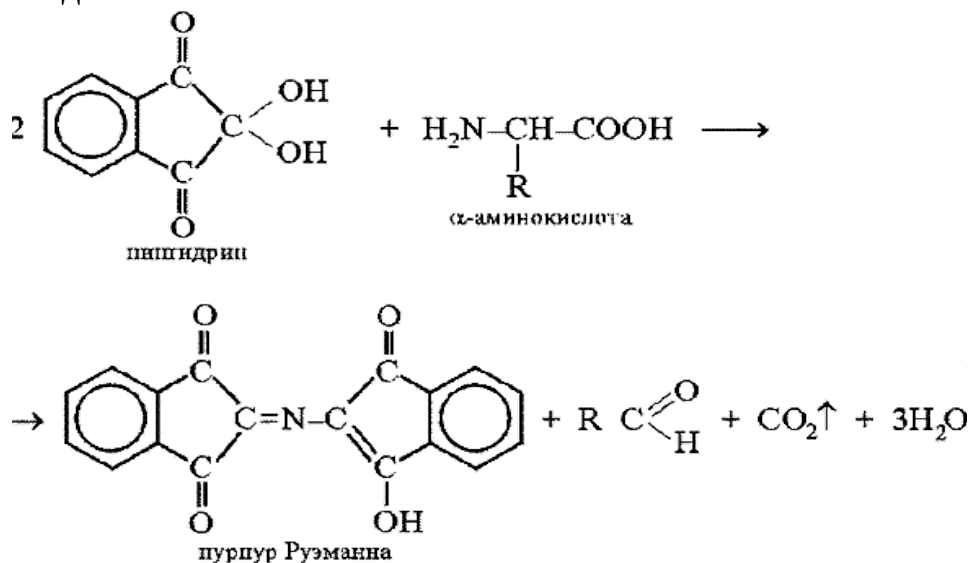
Наличие в белке повторяющихся пептидных групп подтверждается тем, что белки дают фиолетовое окрашивание при действии небольшого количества раствора медного купороса в присутствии щелочи (биуретовая реакция).

Описание опыта. 2–3 мл раствора белка нагревают с 2–3 мл 20%-го раствора едкого кали или натра и несколькими каплями раствора медного купороса. Появляется фиолетовое окрашивание вследствие образования комплексных соединений меди с белками.

□ Реакция Руэмманна (нингидриновая реакция (1911))

□-Аминокислоты реагируют с нингидрином, образуя сине-фиолетовый комплекс (пурпур Руэмманна), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

Реакция идет по схеме:

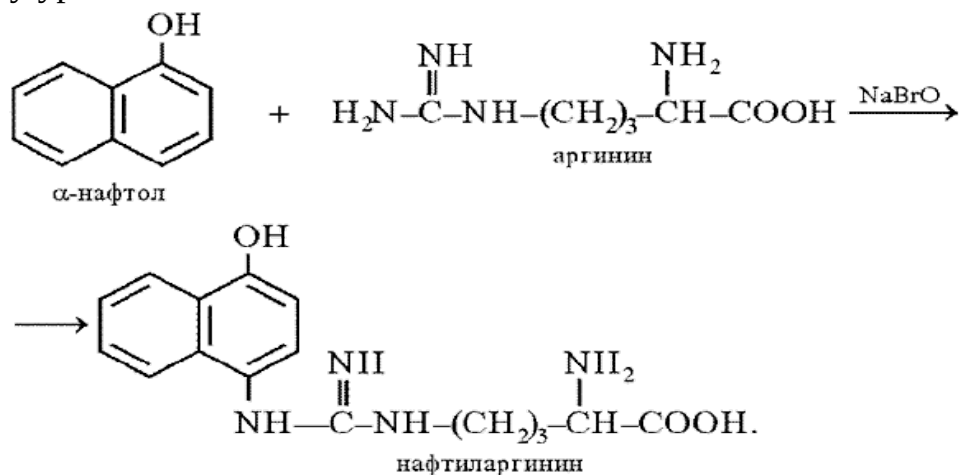


Реакция с нингидрином используется для визуального обнаружения □-аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое), а также для колориметрического определения концентрации аминокислот по интенсивности окраски продукта реакции.

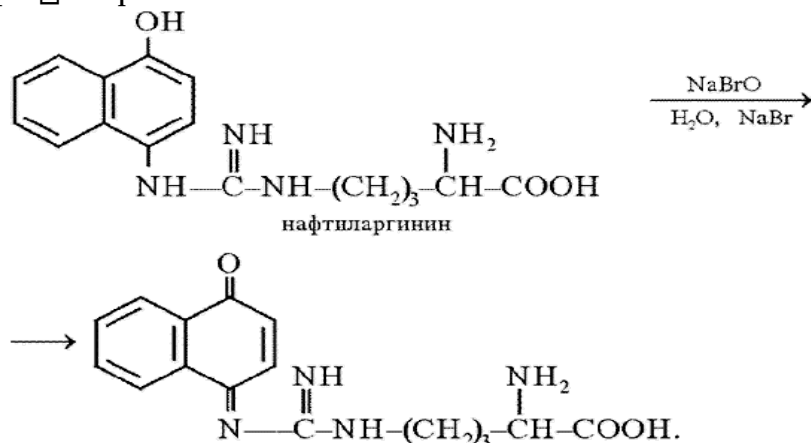
Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора глицина и 0,5 мл 1%-го раствора нингидрина. Содержимое пробирки осторожно нагревают до появления сине-фиолетового окрашивания.

□ Реакция Сакагучи

Эта реакция на аминокислоту аргинин основана на взаимодействии аргинина с α -нафтолом в присутствии окислителя. Ее механизм еще полностью не выяснен. По-видимому, реакция осуществляется по следующему уравнению:



Поскольку производные хинониминов (в данном случае нафтохинона), у которых водород иминогруппы —NH— замещен на алкильный или арильный радикал, всегда окрашены в желто-красные тона, то, по-видимому, оранжево-красный цвет раствора при проведении реакции Сакагучи объясняется возникновением именно производного нафтохинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH— групп аргининового остатка и бензольного ядра α -нафтола:

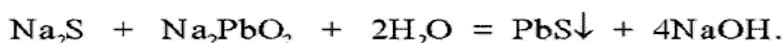
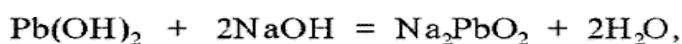
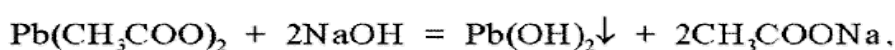
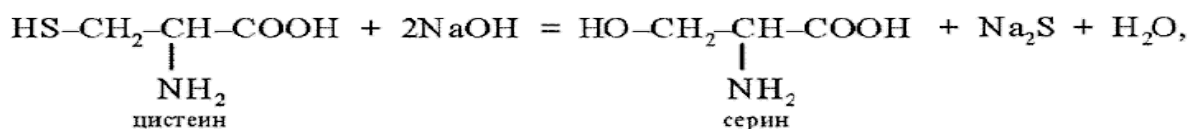


Описание опыта. В пробирку наливают 2 мл 0,01%-го раствора аргинина, затем добавляют 2 мл 10%-го раствора едкого натра и несколько капель 0,2% спиртового раствора α -нафтола. Содержимое пробирки хорошо перемешивают, приливают 0,5 мл раствора гипобромита и вновь перемешивают. Немедленно добавляют 1 мл 40%-го раствора мочевины для стабилизации быстро развивающегося оранжево-красного окрашивания.

□ Реакция Фоля

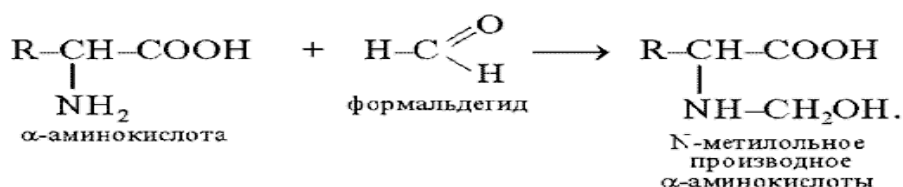
Это реакция на цистеин и цистин. При щелочном гидролизе «слабосвязанная сера» в цистеине и цистине достаточно легко отщепляется, в результате чего образуется сероводород, который, реагируя со щелочью, дает сульфиды натрия или калия. При добавлении ацетата свинца(II) образуется осадок сульфида свинца(II) серо-черного цвета.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора цистина, прибавляют 0,5 мл 20%-го раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают до кипения, а затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца(II). Наблюдается выпадение серо-черного осадка сульфида свинца(II):



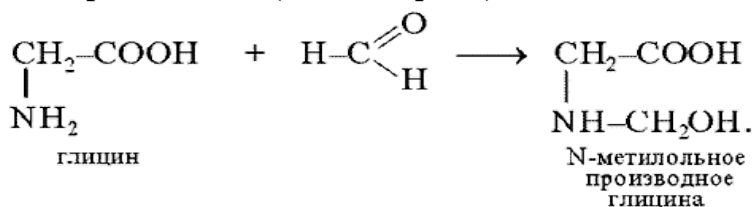
□ Реакция с формальдегидом

При взаимодействии □-аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



Эта реакция лежит в основе количественного определения □-аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

Описание опыта. В пробирку наливают 5 капель 1%-го раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-го раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание (кислая среда):



□ Реакция Циммермана

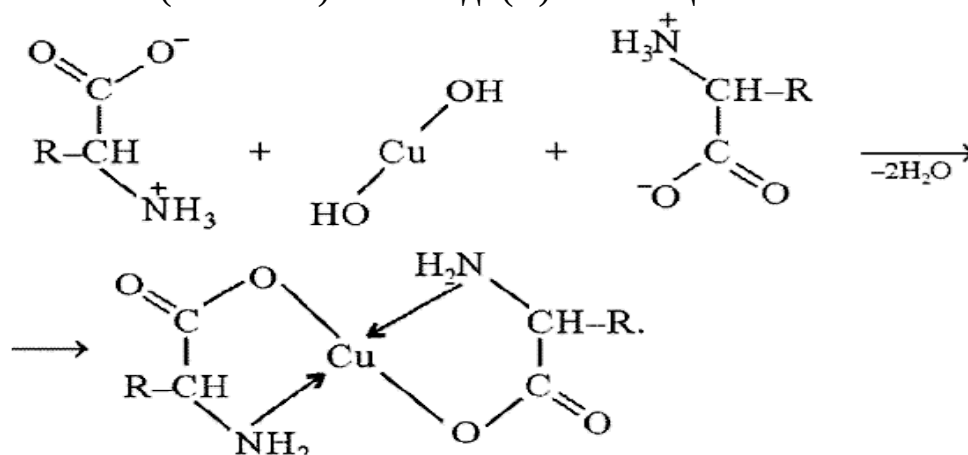
Это реакция на аминокислоту глицин.

Описание опыта. К 2 мл 0,1%-го раствора глицина, доведенного добавлением 10%-го раствора щелочи до pH = 8, приливают 0,5 мл водного раствора о-фталевого диальдегида. Реакционная смесь начинает медленно

окрашиваться в ярко-зеленый цвет. Через несколько минут выпадает зеленый осадок.

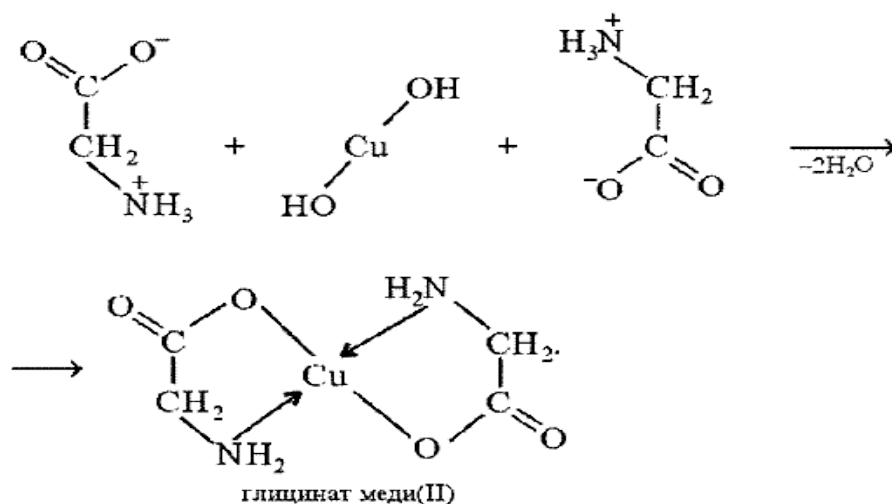
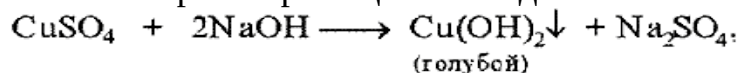
□ Образование комплексов с металлами

□-Аминокислоты образуют с катионами тяжелых металлов внутрикомплексные соли. Со свежеприготовленным гидроксидом меди(II) все □-аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди(II) синего цвета:



В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами.

Описание опыта. В пробирку наливают 3 мл 3%-го раствора сульфата меди(II), добавляют несколько капель 10%-го раствора гидроксида натрия до образования голубого осадка. К полученному осадку гидроксида меди(II) приливают 0,5 мл концентрированного раствора глицина. При этом образуется темно-синий раствор глицината меди:

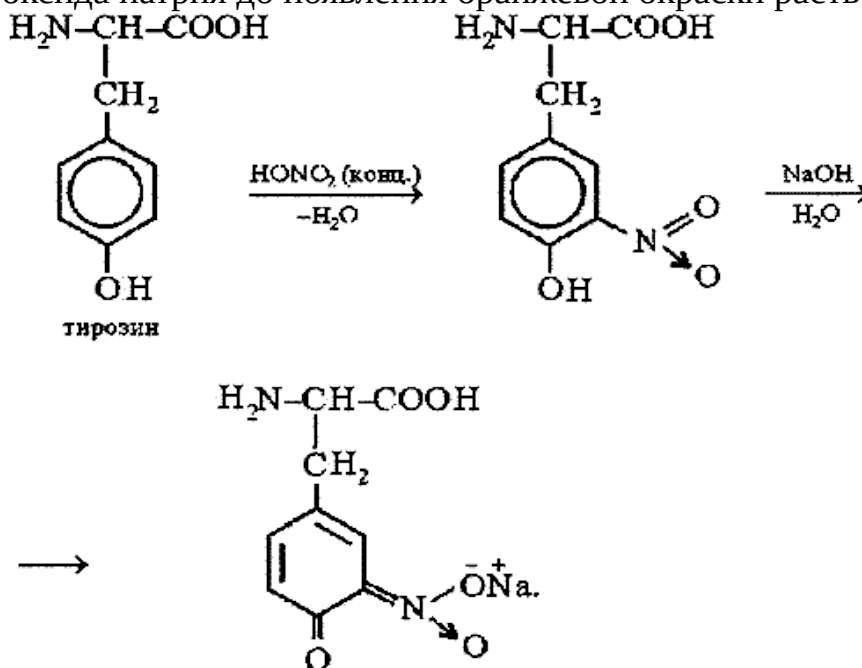


□ Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция используется для обнаружения □-аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, триптофан, фенилаланин при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, имеющие желтую окраску. В щелочной среде

нитропроизводные этих α -аминокислот дают соли, окрашенные в оранжевый цвет.

Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора тирозина и добавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты. Смесь нагревают до появления желтой окраски. После охлаждения добавляют 1–2 мл 20%-го раствора гидроксида натрия до появления оранжевой окраски раствора:



□ Осаждение белка солями тяжелых металлов

Описание опыта. В две пробирки наливают по 1–2 мл раствора белка и медленно, при встряхивании, добавляют по каплям в одну пробирку насыщенный раствор сульфата меди, а в другую – 20%-й раствор ацетата свинца. Образуются осадки труднорастворимых солеобразных соединений белка. Опыт иллюстрирует применение белка как противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

□ Открытие аминного азота в белках

Описание опыта. В сухую пробирку помещают немного сухого белка, например желатины. Прибавляют пятикратное количество натронной извести (смесь едкого натра и гидроксида кальция), перемешивают встряхиванием и подогревают. Выделяется аммиак, вызывающий посинение розовой лакмусовой бумажки, смоченной водой. Одновременно ощущается запах жженого волоса, что всегда наблюдается при сжигании белковых веществ.

□ Открытие серы в белках

Описание опыта. В пробирку наливают около ~0,5 мл раствора уксуснокислого свинца и прибавляют раствор едкого кали до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца. В другую пробирку наливают ~2–3 мл раствора белка и приливают такой же объем полученного раствора плюмбита. Нагревают смесь до кипения в течение 2–3 мин. Появление темного окрашивания указывает на образование сульфида свинца.

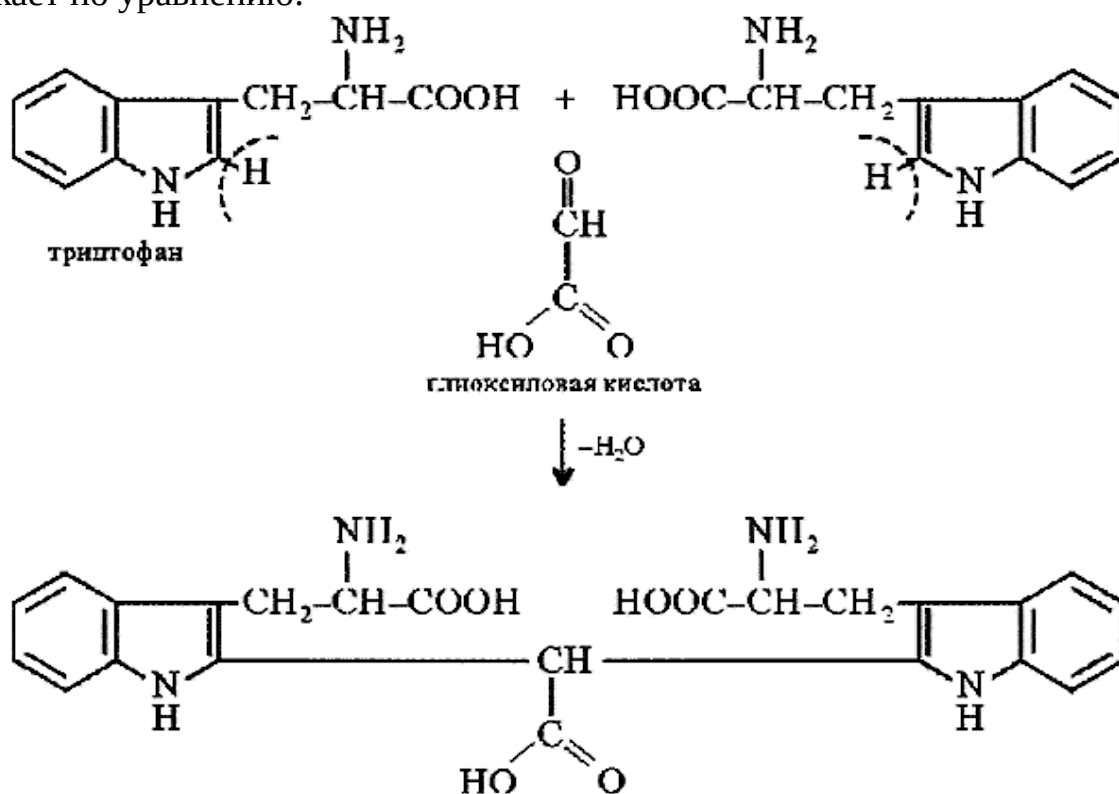
□ Реакция на присутствие серосодержащих α -аминокислот в белке

Качественной реакцией на серосодержащие α -аминокислоты является реакция Фоля. Белки, содержащие остатки цистеина или цистина, также дают эту реакцию.

Описание опыта. В пробирку наливают 10 капель раствора яичного белка и вдвое больший объем 20%-го раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки нагревают до кипения (1–2 мин). К полученному щелочному раствору добавляют 5 капель раствора ацетата свинца(II) и вновь кипятят реакционную смесь. Наблюдается появление серо-черного осадка.

□ Реакция на триптофан

Триптофан, реагируя в кислой среде с альдегидами, образует окрашенные продукты конденсации. Например, с глиоксиловой кислотой (являющейся примесью к концентрированной уксусной кислоте) реакция протекает по уравнению:



По аналогичной схеме протекает и реакция триптофана с формальдегидом.

Контрольные вопросы:

1. Дайте определение белкам и аминокислотам.
2. Что такое качественные реакции?
3. Дайте общую формулу аминокислот.
4. Какие аминокислоты называют заменимыми и незаменимыми?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Тема: Изучение свойств ферментов

Определение амилазной активности слюны

Цель работы: определить амилазную активность слюны.

Оборудование и реактивы: р-р I+KI, 0.1%-ный р-р крахмала, пробирки, штативы, пипетки, стаканчики на 50 мл, фарфоровые чашечки, водяные бани, стаканы, электроплитки, термометры.

Принцип работы. Амилазную активность слюны выражают в количестве субстрата (крахмала), расщепляемого 1 мл слюны за определенный промежуток времени (30 мин). Определение основано на нахождении максимального разведения, при котором слюна еще расщепляет крахмал полностью за взятый промежуток времени. О наличии или отсутствии крахмала в растворе судят по йодной реакции.

Ход работы.

1. Наливают в 8 пронумерованных пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

2. В первую пробирку отливают 1 мл слюны, разведенной водой в 10 раз. Для получения слюны, разведенной в 10 раз, необходимо 20 мл воды подержать во рту 2 минуты.

3. Перемешивают содержимое первой пробирки путем втягивания пипеткой жидкости из пробирки и последующего выпуска из пипетки.

4. Переносят 1 мл из первой пробирки во вторую.

5. Перемешивают содержимое второй пробирки, переносят 1 мл из второй пробирки в третью и т.д. до восьмой пробирки. Из восьмой пробирки 1 мл жидкости выливают. Таким образом получают ряд разведений.

6. Наливают во все 8 пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

7. Наливают во все пробирки, начиная с восьмой, по 2 мл 0,1% - ного раствора крахмала и перемешивают содержимое каждой пробирки.

8. Одновременно помещают все 8 пробирок в нагретую до 37 градусов С водяную баню.

9. Через 30 мин пробирки вынимают и охлаждают током холодной воды. В штатив ставят по порядку номеров.

10. Приливают в каждую пробирку по 2 капли йода. Желтый цвет в пробирках свидетельствует об отсутствии крахмала, красно-бурый – о присутствии промежуточных продуктов расщепления, синий – о наличии крахмала.

11. Вычисляют амилазную активность исследуемой слюны; достаточное расщепление крахмала имеет место в той пробирке, где нет синего оттенка. Для примера, пусть это будет 5-я пробирка. В 5-й пробирке неразведенной слюны было 1/320 мл, т.е. можно записать: 1/320 мл слюны расщепляет 2 мл 0.1%-ного раствора крахмала. 1 мл слюны расщепляет x мл 0.1%-ного раствора крахмала. $X = 2 / (1/320) = 640$. Следовательно, 1 мл неразбавленной

слюны за 30 минут при 37 градусах С расщепляет 640 мл 0,1%-ного раствора крахмала.

Влияние рН на действие ферментов.

Цель работы: определить рН оптимума действия амилазы.

Оборудование и реактивы: 0.1 М р-р лимонной кислоты, 0.2 М р-р $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30% р-р H_2SO_4 , р-р $\text{I}+\text{KI}$, 0,1% и 1%-ный р-р крахмала, индикаторная бумага универсальная, пробирки, штативы, пипетки на 2 и 5 мл, стаканчики на 50 мл, цилиндры на 25 и 50 мл, фарфоровые чашечки, водяные бани, стаканы, электроплитки, термометры.

Принцип работы. Ферменты очень чувствительны к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Можно считать, что для каждого фермента имеется определенная концентрация протонов, при которой он наиболее активен. Изменение кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности фермента.

Ход работы.

1. В стаканчиках на 50 мл готовят буферные растворы в соответствии с данными таблицы. Определяют рН растворов с помощью индикаторной бумаги.

2. Берут 5 пробирок, в каждую приливают по 2 мл буферных растворов, 2 мл 1%-ного раствора крахмала, 2 мл слюны, разведенной в 20 раз.

3. Содержимое каждой пробирки перемешивают и оставляют стоять на 10-15 мин. Время ориентировочное. Необходимо контролировать ход гидролиза через каждые 5 мин. Для этого из пробирки с рН 6.8 берут на фарфоровую чашечку 1 каплю жидкости и проводят реакцию с йодом. Опыт лучше прекращать при неполном расщеплении крахмала (красноватая окраска продуктов реакции). Для прекращения опыта во все пробирки добавляют по 2 капли йода. На основании полученной в пробирках окраски судят о степени расщепления крахмала в зависимости от рН. Там, где крахмал расщепляется наиболее полно, было оптимальное значение рН для действия амилазы.

Фосфатно-цитратная буферная система

	Объем, мл				
0,1 М лимонная кислота	12,29	7,91	4,55	1,83	0,55
0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,71	12,09	15,45	18,17	19,45
рН	4,0	5,8	6,8	7,4	8,0

Влияние температуры на активность амилазы слюны

Цель работы: определить влияние температуры на активность фермента слюны.

Оборудование и реактивы: 30% р-р H_2SO_4 , р-р $I+KI$, 1%-ный р-р крахмала, пробирки, штативы, пипетки на 2 и 5 мл, стаканчики на 50 мл, цилиндры на 25 и 50 мл, фарфоровые чашечки, водяные бани, стаканы, электроплитки, термометры.

Принцип работы. При низкой температуре ферментативные реакции идут медленно. По мере повышения температуры скорость ферментативных реакций обычно повышается. По достижении некоторого оптимума повышение температуры уже ведет к падению активности фермента и вследствие этого к снижению скорости ферментативных реакций. Так уже при температуре раствора 50-60 градусов С часто происходит температурная инактивация ферментов. Для огромного большинства ферментов температурный оптимум лежит в пределах 30-40 градусов С. В зависимости от состояния, в котором находится фермент, температурная устойчивость его не одинакова. Сухие препараты некоторых ферментов выдерживают нагревание даже до 100С без заметной потери своей активности. В растворе же эти ферменты при 100 градусах С целиком теряют свою каталитическую активность. Низкая температура не инактивирует ферменты. Как правило, она лишь замедляет или останавливает их действие. В отличие от ферментных, реакции с неорганическими катализаторами ускоряются с повышением температуры.

Ход работы.

1. Наливают в 5 пробирок по 2 мл 1%-ного раствора крахмала и помещают в различные температурные условия: - в холодную воду, - оставляют при комнатной температуре, - в водяную баню при 37 градусах С - в водяную баню при 70 градусах С - в водяную баню при 100 градусах С.

2. После того, как температура в пробирках уравнивается с температурой окружающей среды (примерно через 3 минуты) добавляют в каждую пробирку по 1 мл разбавленной в 20 раз слюны. Перемешивают содержимое пробирок и оставляют их на 20 минут (время ориентировочное). Необходимо контролировать ход гидролиза через каждые 5 минут. Для этого, из пробирки, находящейся при температуре 37 градусов С, берут на фарфоровую чашечку одну каплю жидкости и проводят реакцию на крахмал с йодом. Опыт лучше прекращать при неполном гидролизе крахмала в этой пробирке (бурая или красноватая окраска продуктов реакции). Для прекращения опыта во все пробирки добавляют 2 капли йода.

3. Одновременно проводят опыт с кислотным гидролизом крахмала. Берут 5 пробирок, вносят 2 мл 1%-ного раствора крахмала и помещают в те же температурные условия, что и в первом случае. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл 30%-ного раствора серной кислоты, перемешивают и оставляют на 20 минут. По прошествии 20 минут в пробирки добавляют по 2

капли раствора йода. Отмечают визуально особенности гидролиза крахмала под действием амилазы слюны и сравнивают с кислотным гидролизом.

Контрольные вопросы:

1. Каков характер зависимости скорости ферментативной реакции от температуры, рН, концентрации фермента?
2. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении рН среды?
3. Как определить оптимум рН для действия фермента?
4. Почему для сравнения ферментативной активности разных препаратов нужно проводить реакцию в одинаковых условиях?
5. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции?

Рекомендуемая литература

Обязательная:

1. Жеребцов Н.А., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. Биохимия: Учебник. - Воронеж, Гос. Ун-т, 2002. – 693 с.
2. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 2002. – 479 с.
3. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
4. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия: Учебник для вузов– М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
5. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. – М.: Высшая школа, 1986. – 551 с.
6. Практикум по биохимии: Учебное пособие/ Пустовалова Л.М. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1999. – 544 с.
7. Практикум по биохимии: Учебное пособие/ Чиркин А.А. – Мн.: Новое знание, 2002. – 512 с.
8. Современные методы в биохимии./ под ред. Ореховича В.Н. - М.: Медицина, 1977. – 392 с.
9. Фердман Д.Л. Биохимия.– М.: Высшая школа, 1966. – 644 с.
10. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Агар, 1999. – 512 с.
11. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Высшая школа, 1993. – 496 с.
12. Щербаков В.Г., Иваницкий С.Б., Лобанов В.Г. Лабораторный практикум по биохимии и товароведению маслиничного сырья: Учеб. пособие. - М.: Колос, 1999. – 128 с.

Дополнительная:

1. Гринштейн Дж., Винниц М. Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. – М.: Мир, 1965. – 822 с.
2. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: В 3-х т. / Пер. с англ. – М.: Мир, 1982.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах. Т.1. – М.: Мир, 1985. – 367 с.
4. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах. Т.2. - М.: Мир, 1985. – 368 с.
5. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах. Т.2. - М.: Мир, 1985. – 320 с.
6. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / Под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1990. – 216 с.
8. Петров А.А., Бальян Х.В., Троценко А.Т. Органическая химия: Учебник для вузов. – СПб: «Иван Фёдоров», 2002. – с. 528-597.

9. Слесарев В.И. Химия: Основы химии живого. - СПб.: Химиздат, 2001. – 784 с.
10. Спирина А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. – М.: Высшая школа, 1986. – 303 с.
11. Справочник биохимика: Пер. с англ./ Досон Р., Эллиот Д., Элиот У., Джонс К. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
12. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. Т.1. – М.: Мир, 1984. – 232 с.
13. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. Т.2. – М.: Мир, 1984. – 312 с.
14. Страйер Л. Биохимия. В 3-х томах. Т.3. – М.: Мир, 1984. – 400 с.