

Титульный лист методических
рекомендаций и указаний;
методических рекомендаций;
методических указаний



Форма
Ф СО ПГУ 7.18.3/40

Министерство образования и науки Республики Казахстан

Павлодарский государственный университет им. С.Торайгырова

Кафедра биотехнологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И УКАЗАНИЯ

к лабораторным работам

по дисциплине Биохимия физической культуры и спорта

для студентов специальностей 5В010800 Физическая культура и спорт

Павлодар

Лист утверждения методических
рекомендаций и указаний; методических
рекомендаций; методических указаний



Форма
Ф СО ПГУ 7.18.3/41

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по УР

_____ Пфейфер Н.Э.

«___» _____ 20__ г.

Составитель: _____ ст.преподаватель Жагипарова М.Е.

Кафедра биотехнологии

Методические рекомендации и указания к лабораторным работам

по дисциплине Биохимия физической культуры и спорта

для студентов специальностей 5В010800 Физическая культура и спорт

Рекомендовано на заседании кафедры

«___» _____ 20__ г., протокол №___

Заведующий кафедрой _____ Омаров М.С., «___» _____ 20__ г.

Одобрено УМС Агротехнологического факультета

«___» _____ 20__ г., протокол №___

Председатель УМС _____ Жагипарова М.Е. «___» _____ 20__ г.

ОДОБРЕНО:

Начальник ОПиМОУП _____ Варакута А.А. «___» _____ 20__ г.

Одобрена учебно-методическим советом университета

«___» _____ 20__ г. Протокол №___

ВВЕДЕНИЕ

Знание биохимии полезно любому образованному человеку, независимо от рода его деятельности; оно позволяет понять, какие молекулярные взаимодействия лежат в основе жизнедеятельности.

Курс «Биохимия» начинается с материалов, посвященных структуре клеток и важнейшим принципам органической химии, относящимся к биомолекулам, затем подробно описываются структура и биологические функции белков. Далее подробно рассматриваются ферменты и способы регуляции их активности, причем постоянно подчеркивается значение трехмерной структуры белка и для иллюстрации приводится целая «галерея» структур ферментов. Подробно изложен материал по витаминам, углеводам, а также липидам и процессам биосинтеза сложных органических веществ из неорганических соединений, биохимическим процессам, происходящим при переработке сырья, производстве и хранении продуктов питания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

1. Тема лабораторной работы: Цветные реакции на белки и аминокислоты.

2. Цель работы: Установить наличие белка в исследуемых растворах с помощью цветных реакций.

3. Теоретическое обоснование работы: При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено присутствием в молекуле белка той или иной аминокислоты, имеющей в своем составе определенную химическую группировку. Цветные реакции на белки являются реакциями на функциональные группы радикалов аминокислот, входящих в состав белков. Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие некоторых аминокислот в различных природных белках. На основании цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот. Цветные реакции проводятся в пробирках одновременно с 1% раствором яичного белка и желатина, которые имеют различный аминокислотный состав.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Реактивы. 1%-ный раствор CuSO_4 ; 10%-ный и 30%-ный растворы гидроксидов натрия; концентрированная азотная кислота; концентрированный аммиак; 0,1%-ный раствор тирозина; ледяная уксусная кислота; концентрированная серная кислота; 10%-ный раствор Na_2CO_3 , 1%-ный $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 20%-ный раствор соляной кислоты, Раствор Милона.

Оборудование. Штативы с пробирками; пипетки; спиртовка; водяная баня.

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

5.1. Биуретовая реакция на пептидную связь (Пиотровского)

Биуретовая реакция открывает в белке пептидную связь (-C- N-)

II I

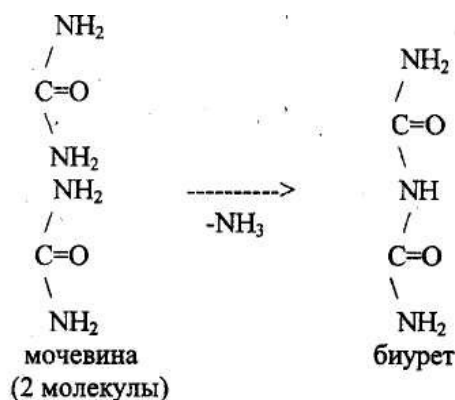
O H

Биуретовая реакция получила свое название от производного мочевины-биурета. Биурет, имеющий две группировки —CO-NH- образуется при нагревании сухой мочевины с отщеплением аммиака.

Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей —CO-NH-

При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка или полипептида образует комплексное соединение меди с пептидной группировкой, цвет которого зависит от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты неполного гидролиза (его пептоны)- розовое или красное окрашивание.

Образование биурета



Ход исследования. К 5 каплям водного раствора белка прибавляют 3 капли 10% раствора едкого натра и 1 каплю 1% раствора сернокислой меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет.

Нельзя добавлять избыток сернокислой меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

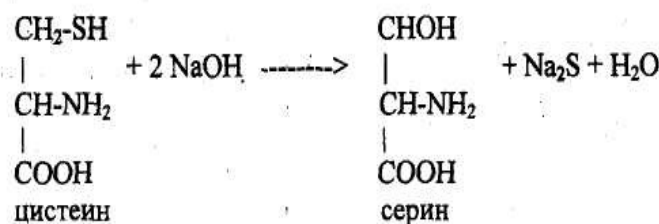
5.2. Реакция Миллона на тирозин.

Реакция обусловлена наличием в молекуле белка циклической аминокислоты тирозина, имеющего в своем составе фенольную группу. При нагревании или продолжительном стоянии раствора белка с реактивом Миллона (раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO_3 с примесью HNO_2) образуется осадок, окрашенный сначала в розовый, а затем в кроваво-красный цвет.

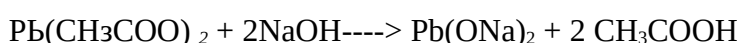
Ход исследования. К 5 каплям исследуемого раствора добавляют по 2-3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают до кипения. Образуется осадок розового или красного цвета. Не следует прибавлять избыток реактива. Наблюдают и записывают изменение окраски раствора в таблицу.

5.3. Реакция Фоля на цистеин.

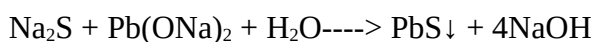
При добавлении к раствору белка раствора гидроксида натрия, ацетата свинца с последующим кипячением, раствор начинает темнеть. Реакция обусловлена присутствием в белке цистеиновых и полуцистеиновых остатков, которые при нагревании в присутствии крепкой щелочи разрушаются с образованием сульфида натрия:



Ацетат свинца реагирует со щелочами с образованием п्लомбита натрия:



Сульфид натрия при взаимодействии с п्लомбитом дает черный осадок сульфида свинца:



Черный

осадок

Ход исследования. В первую пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, во вторую - 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30%-ного раствора едкого натра и 1 каплю 5% раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость в пробирках с яичным белком темнеет, так как образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирке с желатином черный осадок не образуется, так как желатин почти не содержит серосодержащих аминокислот.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. Результаты работ оформляются в виде таблицы 1:

Таблица 1 - Результаты лабораторной работы № 1

Объект исследования	Название реакции		
	Биуретовая (на пептидные связи)	Миллона (на тирозин)	Фоля (на цистеин)

Условные обозначения: (-) – реакция отрицательная; (+) – реакция слабо выражена; (+ +) – реакция выражена хорошо.

7. Контрольные вопросы:

1. Чем обусловлены цветные реакции на белки?
2. Если с раствором одного белка реакции Миллона и Фоля положительны, а с раствором другого отрицательны, что можно сказать о различиях аминокислотного состава этих белков?
3. Как с помощью цветных реакций обнаружить в белке пептидные связи?
4. Как обнаружить в белке цистеин?
5. Как обнаружить в белке тирозин?
6. Что такое гидролиз белка и какие условия необходимы для его протекания?

1. Тема лабораторной работы: Изучение состава нуклеопротеидов, содержащихся в дрожжах.

2. Цель работы: Изучить состав нуклеопротеидов, содержащихся в дрожжах.

3. Теоретическое обоснование работы:

Для изучения химического состава нуклеопротеидов проводят кислотный гидролиз дрожжей и открывают продукты гидролиза - полипротеиды, пуриновые основания, углеводы (пентозы) и фосфорную кислоту. С помощью специальных реакций можно открыть в гидролизате составные части нуклеопротеидов. Биуретовой реакцией устанавливают наличие полипептидов. Пуриновые основания открывают по образованию осадка серебряных солей, фосфорную кислоту - по реакции с молибденовокислым аммонием, а пентозы - реакцией Молиша (по образованию продукта тимола и фурфурола красного цвета).

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Материал исследования: дрожжи.

Реактивы: 10%-ный раствор H_2SO_4 ; 10%-ный раствор $NaOH$; 1%-ный, 7%-ный раствор $CuSO_4$; концентрированный раствор аммиака; 1%-ный раствор $AgNO_3$; $Vi[(NH_4)_2MoO_4 + HNO_3]$

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

В большую широкую пробирку помещают около 0,5 г растертых в ступке сухих дрожжей и добавляют 5 мл. 10% раствора серной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают. Пробирку закрывают пробкой с обратным холодильником и укрепляют в штативе над электроплиткой. Жидкость осторожно кипятят в течение 1 часа, подливая по мере ее выкипания небольшими порциями дистиллированную воду. После гидролиза жидкость охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и в гидролизате открывают продукты распада нуклеопротеидов.

1. Открытие продуктов гидролиза простых белков.

В пробирку наливают 5 капель гидролизата, нейтрализуют его по лакмусу 10% раствором едкого натра и прodelьвают биуретовую реакцию. Отмечают в какой цвет окрашивается жидкость.

2. Открытие продуктов гидролиза нуклеиновых кислот.

Реакция Фединга. В пробирку наливают 5 капель гидролизата, нейтрализуют его по лакмусу 10% раствором едкого натра и прodelьвают реакцию Фелинга (см стр 82)

3. Серебряная проба на пуриновые основания.

В пробирку наливают 10 капель гидролизата, прибавляют 2 капли концентрированного аммиака и 5 капель 1% раствора азотнокислого серебра. При стоянии выпадает бурый осадок.

В щелочной среде происходит образование серебряных соединений пуриновых оснований, имеющих бурый цвет.

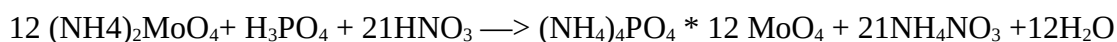
4. Качественная реакция Молишана на пентозную группу.

К 10 каплям профильтрованного гидролизата дрожжей добавляют 2-3 капли 1% алкогольного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки **осторожно** приливают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

5. Открытие фосфорной кислоты.

а) Реакция с молибденовым реактивом.

В пробирку наливают 10 капель молибденового реактива (3,75% раствор молибденовокислого аммония в 16% азотной кислоте), добавляют 5 капель гидролизата и кипятят до появления лимонно-желтого окрашивания. При охлаждении выпадает желтый осадок.



фосфорномолибденовокислый аммоний

б) Реакция образования молибденовой сини.

В пробирку наливают 10 капель гидролизата, нейтраллизуют по лакмусу 10% раствором едкого натра до нейтральной реакции, добавляют 5 капель молибденового реактива (2,5% раствор молибденовокислого аммония в 5 н. серной кислоте) и 5 капель смеси равных количеств 1% раствора гидрохинона и 20% раствора сернистокислого натрия. Постепенно появляется синее окрашивание. При добавлении молибденового реактива к гидролизату содержащаяся в последнем фосфорная кислота вступает в реакцию с молибденовокислым аммонием. В результате образуется фосфорномолибденовая кислота, которая, восстанавливаясь гидрохиноном и сернистокислым натрием, превращается в молибденовую синь.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. Полученные данные заносятся в таблицу 2

Таблица 2 – Результаты лабораторной работы № 2

Наименование сложного белка	Наименование простетической группы	Химическая структура компонентов простетических групп	Реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция
-----------------------------	------------------------------------	---	----------	------------------	-------------------------

7. Контрольные вопросы:

1. Что проводят для изучения состава нуклеопротеидов?
2. Как устанавливают в дрожжах наличие полипептидов?
3. Как устанавливают в дрожжах наличие пуриновых оснований?
4. Как устанавливают в дрожжах наличие пентоз?
5. Как устанавливают в дрожжах наличие фосфорной кислоты?
6. В чем состоит сущность реакции Молишана?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

1. **Тема лабораторной работы:** Влияние температуры и рН на активность ферментов.

2. Цель работы: Изучить влияние внешних и внутренних факторов на ферментативные реакции.

3. Теоретическое обоснование работы:

Температура - один из важных факторов, влияющих на скорость ферментативных реакций. Являясь веществами белкового происхождения, ферменты термолabileны, т.е. неустойчивы к воздействию высокой температуры и в большинстве случаев теряют свою активность в водных растворах уже при нагревании выше 70°.

Для всех ферментов существует определенная оптимальная температура, при которой они наиболее активны.

Для проявления максимальной каталитической активности ферментов требуются определенные условия, в том числе оптимальная концентрация водородных ионов. Это значение получило название оптимума рН или оптимальной реакции среды.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Материал исследования: слюна.

Реактивы: Разбавленная слюна (предварительно опаласкивают рот дистиллированной водой, затем набрав в рот приблизительно 20-25 мл дистиллированной воды и продержав ее там в течение нескольких минут, собирают и фильтруют ее); 1%-ный раствор крахмала; 0,3%-ный раствор хлористого натрия; реактив Люголя. 0,2 М раствор фосфата натрия двухзамещенный; 0,1 М раствор лимонной кислоты; 0,5%-ный раствор крахмала.

Оборудование: Штатив с пробирками; пипетки; стакан со льдом; спиртовка; водяная баня с термометром.

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

5. 1. Влияние температуры на активность ферментов.

Температурный оптимум для большинства ферментов животного происхождения находится в пределах 40-50°С. *Особая чувствительность ферментов к температуре является одним из свойств, качественно отличающих эти биокатализаторы от неорганических катализаторов.* При более низкой температуре ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается и действие ферментов замедляется

Ход исследования. В четыре пробирки наливают по 10 капель разведенной в 10 раз слюны и ставят первую пробирку в лед, вторую- в штатив при комнатной температуре, третью- в водяную баню при температуре 40° и четвертую- в кипящую водяную баню. Через 10 минут во все пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. После этого во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя и отмечают, в каких пробирках и насколько глубоко произошел гидролиз крахмала.

Различная окраска при реакции с йодом, а следовательно, и различная степень гидролиза крахмала обусловлены неодинаковой скоростью ферментативного катализа при разных температурных условиях опыта.

5.2. Влияние рН среды на активность ферментов.

Активность ферментов во многом зависит от реакции среды, в которой они находятся. Для каждого фермента имеется определенное значение рН среды, при котором он наиболее активен. Для большинства ферментов животного происхождения оптимум рН находится в пределах 4-7. Отклонение рН от оптимума может нарушить связь между белковой частью ферментов и их простетическими группами, может влиять на связывание субстрата с ферментом. Активность амилазы слюны является наиболее высокой при рН=6,8 и понижается в кислой и щелочной средах. *Изменение пространственного расположения активных участков молекулы фермента под влиянием рН и приводит к изменению скорости ферментативного действия.*

Ход исследования. В трех пробирках готовят буферные растворы с различным значением рН. Для этого точно отмеривают 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия и 0,1 М раствор лимонной кислоты в количествах, указанных в приведенной ниже таблице 3.

Таблица 3 – Приготовление буферных растворов

№ пробирки	0,2 м раствор Na_2HPO_4	0,1 м раствор лимонной кислоты	рН среды	Окрашивание с йодом
1	0,58	0,42	5,6	
2	0,77	0,23	6,8	
3	0,97	0,03	8,0	

После встряхивания во все пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и по: 10 капель слюны, разведенной в 10 раз. Перемешав жидкости, пробирки ставят в штатив и оставляют при комнатной температуре. Через 2-3 минуты из второй пробирки берут капельную пробу для реакции с йодом. Если получают синее окрашивание, пробу повторяют через следующие 2-3 минуты. Когда в капельной пробе получается желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя и заносят в таблицу полученные окраски с йодом. Оптимум рН для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (желтое окрашивание).

6. Требования к отчету по лабораторной работе. Результаты работы 5.1. записывают в таблицу 4, делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы.

Таблица 4 – Результаты лабораторной работы № 4

№ пробирки	Инкубация, °С	Реакция с йодом
1	0	

2	20
3	45
4	100

Результата работы 5.2. вносят в таблицу 3 и делают выводы о характере влияния рН на активность амилазы.

7. Контрольные вопросы:

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

1. Тема лабораторной работы: Количественное определение активности амилазы слюны по методу Вольгемута.

2. Цель работы: научиться определять активность амилазы в биологических жидкостях.

3. Теоретическое обоснование работы:

В основу количественного определения в большинстве случаев положены изменения, происходящие с субстратом соответствующей ферментативной реакции. Об этих изменениях и об их скорости можно судить по количеству вещества, расщепленного при определенных условиях под влиянием данного фермента или по количеству продуктов распада, образовавшихся в результате действия фермента.

Активность амилазы слюны определяется количеством (мл) 0,1% раствора крахмала, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны в течение 30 минут при 38°.

Определение активности амилазы в биологических жидкостях основано на нахождении максимального разведения слюны, мочи или сыворотки крови, при котором происходит полное расщепление крахмала.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Материал исследования: слюна.

Реактивы: 0,1% раствор крахмала; реактив Люголя;

Оборудование: водяная баня с термометром; штатив с пробирками; пипетки

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

Находят максимальное разведение слюны, при котором происходит полное расщепление определенного количества крахмала под влиянием фермента амилазы (появление красно-бурого окрашивания с йодом).

Ход исследования.

В десять пронумерованных пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды; затем в первую пробирку отмеривают 1 мл слюны, предварительно разведенной в 10 раз дистиллированной водой. Содержимое пробирки перемешивают и 1 мл полученной смеси с помощью пипетки переносят во вторую пробирку, где жидкости также перемешивают. Из второй пробирки 1 мл смеси переносят в третью пробирку, из третьей - в четвертую и т.д. Из десятой пробирки (после перемешивания жидкости) 1 мл смеси выливают. Таким образом, в каждой пробирке будет находиться по 1 мл жидкости с различным содержанием в ней слюны, а следовательно, и амилазы. В каждую пробирку, начиная с десятой, отмеривают из бюретки по 1 мл 0,1% раствора крахмала и все пробирки помещают в водяную баню при температуре 38° на 30 минут. Вынув пробирки из бани, быстро охлаждают их содержимое, добавляя в каждую пробирку приблизительно по 7-8 мл водопроводной воды. Во все пробирки вносят по 2 капли реактива Люголя и после перемешивания отмечают, в какой цвет окрасится жидкость в каждой пробирке. Полученные данные вносят в таблицу 5

Таблица 5 – Приготовление разведений слюны

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

пробирки

Разведе 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280 1:2560 1:5120 1:10240

ние

слюны

Окраска

после

добавле

ния

реактива

Люголя

Примечание. Окраска жидкости обозначается буквами: Ж- желтая, К-красная, Ф-фиолетовая, С-синяя.

Фермент амилаза катализирует реакцию гидролиза крахмала до образования дисахарида мальтозы через ряд промежуточных продуктов распада (декстринов).

Если нерасщепленный крахмал с йодом образует синее окрашивание, то декстрины в зависимости от величины своих частиц могут давать с йодом фиолетовую, красно-бурюю, интенсивно- желтую окраску, или же образуются соединения, которые совсем не окрашиваются в присутствии йода.

Таким образом, появления в пробирках синего окрашивания добавлении реактива Люголя показывает, что гидролиз крахмала в них еще не наступил. Фиолетовое окрашивание с йодом свидетельствует о том, что гидролиз крахмала уже начался, а красно-бурое и желтое окрашивание жидкости в некоторых пробирках указывает на то, что в них вместо крахмала имеются уже промежуточные, более простые продукты его гидролиза. Поэтому последняя по счету пробирка (от первой к десятой), в которой после добавления реактива Люголя получится красно-бурое окрашивание, укажет на минимальное количество амилазы (максимальное разведение слюны), необходимое для расщепления 1 мл крахмала.

Пример расчета. Допустим, что после добавления реактива Люголя в первых четырёх пробирках появилась желтая окраска, в пятой- красно-бурая, в шестой - фиолетовая, а в остальных - синяя.

Следовательно, минимальное количество амилазы, достаточное для расщепления крахмала, содержащегося в 1 мл 0,1% раствора, который находится в жидкости пятой пробирки, где слюна была разведена в 320 раз. Поскольку одним миллилитром слюны, разведенной в 320 раз, в течение 30 минут при температуре 38° расщепляется 1 мл 0,1% раствора крахмала, то это же количество неразведенной слюны расщепит крахмала в 320 раз больше, т.е. 320 мл. Эта цифра и будет показывать активность амилазы слюны: A^{38}

=320 мл. Данной методикой можно пользоваться и для определения активности амилазы мочи, сыворотки крови и других биологических жидкостей.

Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской. Если слюна в ней, например, была разведена в 320 раз, составляют следующую пропорцию и находят амилопластическую силу слюны.

1/320 мл слюны расщепила 2 мл 0,1% раствора крахмала,

1мл слюны расщепила X мл 0,1% раствора крахмала

Тогда $X = 2 \cdot 320 / 1 = 640$ мл 0,1% раствора крахмала.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. По результатам расчетов сделать выводы.

7. Контрольные вопросы:

1. Что такое активность амилазы?
2. Что показывает появление синего окрашивания в пробирке?
3. О чем свидетельствует появление фиолетового окрашивания в пробирке?
4. Как рассчитать активность амилазы?
5. Какую реакцию катализирует фермент амилаза?
6. На чем основано определение активности амилазы в биологических жидкостях?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

1. Тема лабораторной работы: Строение гормонов.

2. Цель работы: Изучить строение гормонов с помощью качественных реакций.

3. Теоретическое обоснование работы:

Гормоны – это биологически активные вещества, оказывающие регуляторное влияние на обмен веществ. Влияние проявляется разными путями: гормоны могут изменять

скорость ферментативных реакций, скорость синтеза белков, влияют на проницаемость клеточных мембран.

Гормоны способствуют поддержанию постоянства внутренней среды (гомеостаза), например сахара крови, минеральных веществ и т.д. Гормоны участвуют в размножении и росте, в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т.д. Одной из систем, регулирующих обмен веществ в организме, является гормональная система, которая включает действие всех эндокринных желез внутренней секреции. Клетки эндокринных желез продуцируют особые вещества, называемые гормонами. По химической природе гормоны условно делят на белковые и стероидные. Белковые образуются из белков, пептидов или отдельных аминокислот. К ним относятся гормоны гипофиза, щитовидной железы, поджелудочной железы, мозгового слоя надпочечников. Стероидные гормоны образуются из стероидного ядра так называемого циклопентанпергидрофенантрена, к ним относятся гормоны коры надпочечников и половых желез.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Материал исследования: препарат инсулина в ампулах (можно использовать в разведении 1:100), препарат щитовидной железы (таблетки тиреоидина).

Реактивы: 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный CuSO_4 ; реактив Миллона; 5%-ный раствор ацетат свинца; 10%-ный раствор K_2CO_3 ; 10%-ный раствор серной кислоты; 1%-ный раствор крахмала; 1%-ный раствор KIO_3 ; лакмусовая бумага.

Оборудование: ступки; песочная баня; пробирки с обратным холодильником; штатив с пробирками; пипетки.

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

5. 1. Качественные реакции, подтверждающие белковую природу инсулина.

Гормон поджелудочной железы - инсулин. Инсулин является простым белком. Он играет важную роль в метаболизме углеводов, снижая содержание сахара в крови. Он способствует биосинтезу гликогена в печени и мышцах, а также липогенезу, т.е. образованию жиров из углеводов. Инсулин является антагонистом адреналина по отношению к гликогену. Влияние инсулина на следующие обменные процессы:

Углеводный обмен. 1) Увеличивает проницаемость клеточных мембран (переход из крови в ткани). 2) Инсулин активирует глюкокиназу, функцией которой является фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат. 3) Увеличивает синтез гликогена и окисление глюкозы (способствует гипогликемии). 4) Стимулирует цикл трикарбоновых кислот, усиливая конденсацию ацетил-КоА со щавелево-уксусной кислотой 5) Стимулирует пентозный цикл, активируя дегидрогеназы, таким образом влияет на процесс синтеза кислот.

Белковый обмен. Стимулирует синтез белков, увеличивает проницаемость клеточных мембран для аминокислот. Уменьшает раЙПад белков (аминокислот, угнетая активность аминотрансфераз).

Липидный обмен. Усиливает липогенез (синтез жира из углеводов).

Минеральный обмен. Снижает содержание в крови фосфата и калия и обогащает клетку кальцием.

Инсулин дает характерные реакции на белок (Геллера, биуретовую, Фоля, Миллона и др.)

Ход исследования. 1) Биуретовая реакция. К 1 мл раствора инсулина добавляют 5-6 капель раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди (II), перемешивают. Жидкость окрашивается в розовато-фиолетовый цвет. 2) Реакция Миллона. К 5-6 каплям раствора инсулина добавляют 2-3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Образуется осадок в виде сгустка красного цвета.

3) Реакция Фоля. К 5-6 каплям раствора инсулина, (использовать неразбавленный препарат) добавляют 2-3 мл раствора NaOH и кипятят 10 мин на маленьком пламени горелки. После охлаждения добавляют 1-2 капли раствора $Pb(OH)_2$ - появляется бурое окрашивание.

Примечание. Раствор $Pb(OH)_2$ приготовить в отдельной пробирке. Для этого к одной капле раствора ацетата свинца добавляем по каплям раствор 10%-ного гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца.

При стоянии или нагревании бурое окрашивание может усилиться до черного и может выпасть черный осадок.

5.2. Обнаружение иода в препарате щитовидной железы.

Гормоны щитовидной железы представляют собой йодированные производные аминокислоты тирозина. Йод поступает в организм с водой. В тканях железы он окисляется, принимает форму молекулярного йода и присоединяется к тирозиновому кольцу, образуя моноидтирозин. Затем в результате полимеризации иодтирозина образуются гормоны щитовидной железы - трийодтиронин и тироксин. Происходят эти процессы в молекулах тиреоглобулина, содержащегося в дольках железы в составе коллоида. Более 90% органически связанного иода организма выделяется в виде тироксина. Гормоны щитовидной железы, как и многие другие, применяют с лечебной целью. Характерными признаками повышенного обмена веществ в случае например, избытка гормона будут усиление газообмена, т.е. увеличение поглощения кислорода и выделения углекислоты, повышение сахара в крови и увеличенное выделение азота с мочой. В случае недостатка йода в почве и в воде у животных развивается увеличение щитовидной железы. В щитовидной железе содержится также другой гормон белковой природы-тиреокальцитонин, снижающий содержание кальция в крови.

Качественная реакция на тироксин связана с открытием в нем йода.

Ход исследования. В фарфоровой ступке растирают 1 таблетку тиреоидина. Полученный порошок высыпают в пробирку для гидролиза и заливают 3 мл раствора K_2CO_3 . Перемешивают, закрывают пробкой с обратным холодильником и ставят на песчаную баню. Содержимое пробирок кипятят 10-15 мин.

Полученный гидролизат охлаждают и нейтрализуют раствором серной кислоты, добавляя его по каплям до слабокислой реакции на лакмус. Затем добавляют 1 каплю раствора крахмала и 1-2 капли раствора КЮ₃. Выделившийся иод окрашивает жидкость в синий цвет.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. Результаты изучения строения гормонов с помощью качественных реакций сводят в одну таблицу 6 :

Таблица 6 – Результаты изучения строения гормонов

Гормон	Место синтеза	Химическое строение	Качественная реакция	Механизм реакции	Наблюдаемое окрашивание
Инсулин					
Тироксин					

7. Контрольные вопросы:

1. Что представляют собой гормоны?
2. Какое влияние оказывают гормоны на обмен веществ в организме?
3. На какие виды делятся гормоны по химической природе?
4. На какие обменные процессы оказывает влияние инсулин?
5. Что представляет собой гормон щитовидной железы?
6. К чему приводит недостаток йода в почве и воде?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

1. Тема лабораторной работы: Качественные реакции на углеводы.

2. Цель работы: Изучить методы качественного определения моносахаридов и полисахаридов.

3. Теоретическое обоснование работы:

Свойства моносахаридов восстанавливать металлы обусловлено наличием в их структуре карбонильной группы, которая очень легко вступает в окислительно-восстановительные процессы. Особенно легко восстанавливаются такие металлы как серебро, медь, железо, висмут. Поэтому эти свойства были взяты в основу методов качественного определения моносахаридов.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Материал исследования: 1%-ный раствор глюкозы, 1%-ный раствор фруктозы, 1%-ный раствор крахмала.

Реактивы: 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор CuSO₄; реактив Фелинга; реактив Люголя; концентрированная соляная кислота, резорцин кристаллический; дистиллированная вода.

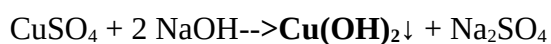
Оборудование: штатив с пробирками.

5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

5.1. Реакция Троммера.

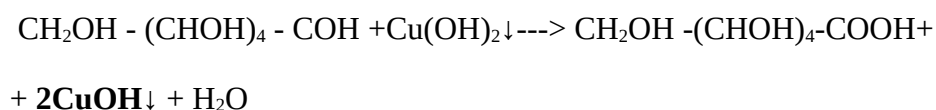
При реакции Троммера могут образоваться следующие соединения меди:

1) Гидроксид меди (Cu(OH)₂) - голубого цвета



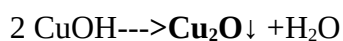
голубого цвета

2) Гидроксид меди (CuOH) - желтого цвета



желтого цвета

3) Закись меди (Cu₂O) - красного цвета



красного цвета

4) Оксид меди (CuO) - черного цвета

Ход исследования. К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1/3 часть объема едкого натрия и по каплям 1%-ный раствор CuSO₄. В присутствии глюкозы образующийся осадок гидроксида меди (I) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого, затем красного осадка указывает на окисление глюкозы и на восстановление меди (Cu₂O).

Примечание: Реакция между сахаром и гидроксидом меди идет количественно и избыток сульфата меди при нагревании, теряя воду, переходит в черный оксид меди (II), что затемняет основную реакцию. Поэтому при реакции Троммера следует **избегать излишка сульфата меди!**

5.2. Реакция Фелинга.

Проба с жидкостью Фелинга основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Отличие заключается в том, что в реакции Фелинга прибавляют сегнетовую соль для связывания избытка гидроксида меди (II), из которого при нагревании образуется CuO т.е. осадок черного цвета, затемняющий реакцию при малых количествах глюкозы в исследуемом растворе. Жидкость Фелинга представляет собой медный алкоголь сегнетовой соли.

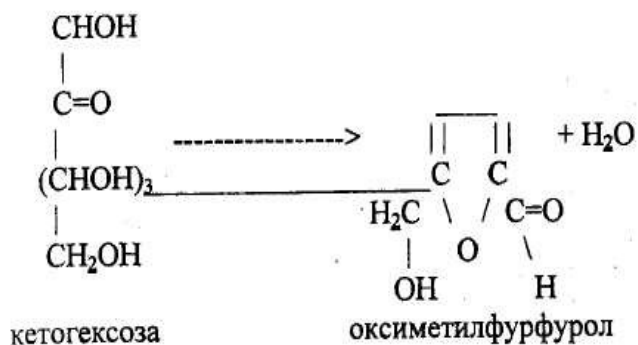


Ход исследования. К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1 мл жидкости Фелинга. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появляется, как и в пробе Троммера, желтый осадок гидроксида меди (I) и красный осадок оксида меди (I). Кислород идет на окисление углевода.

5.3. Реакция Селиванова для распознавания кетоз.

Реакция Селиванова применяется специально для распознавания кетоз. Особенно хорошо получается с фруктозой и теми сложными сахарами, которые при гидролизе дают фруктозу (сахароза, инулин). Реакция основана на образовании из фруктозы при нагревании с кислотой нестойкого вещества – оксиметилфурфуrolа, который с резорцином (мета-диоксибензолом) дает красное окрашивание.

Ход исследования. К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1 мл жидкости Фелинга. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появляется, как и в пробе Троммера, желтый осадок гидроксида меди (I) или же красный осадок оксида меди (I). Кислород идет на окисление углевода.



5.4. Реакция Люголя.

Цветная реакция на обнаружения крахмала, которая основана на появлении синего цвета раствора при взаимодействии крахмала с йодидом калия.

Ход исследования. К 2-3 мл раствора крахмала прибавляют 1-2 капли раствора Люголя; жидкость окрашивается в синий цвет, исчезающий при нагревании и появляющийся снова при охлаждении. Поэтому пробу с иодом необходимо проводить только с холодным раствором крахмала.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. По результатам анализа сделать выводы.

7. Контрольные вопросы:

1. Основные свойства моносахаридов?
2. Какие металлы легко восстанавливаются моносахаридами?
3. С помощью какой реакции можно распознать кетозы?
4. С помощью какой реакции можно распознать гексозы?
5. С помощью какой реакции можно распознать крахмал?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

1. Тема лабораторной работы: Основные качественные показатели жиров.

2. Цель работы: научиться определять основные качественные показатели жиров.

3. Теоретическое обоснование работы:

Растительные жиры или масла – главный запасной продукт семян большинства растений; до 905 общего числа видов высших растений земного шара содержат в семенах запасные жиры. Жиры в семенах растений могут накапливаться в большом количестве – до 30 - 40 % веса и до 50 – 60 % веса ядра. Чистые растительные масла – бесцветные вещества; окраска природных масел обуславливается наличием в них продуктов распада хлорофилла и каротиноидов.

Жиры представляют собой смесь триглицеридов сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот и построены по следующей схеме:



где R, R₁, R₂ - остатки жирных кислот



Всего в состав растительных жиров может входить до 50 различных жирных кислот, но в наибольшем количестве в составе жиров, получаемых из растений умеренных широт, содержатся пальмитиновая $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}]$, стеариновая $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}]$, олеиновая $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$, линолевая $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$ и линоленовая $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}]$ кислоты. Пальмитиновая и стеариновая кислоты – твердые при комнатной температуре, а олеиновая, линолевая и линоленовая – жидкие.

Растительные масла очень разнообразны по своим свойствам. Для общей их характеристики, а также для характеристики входящих в их состав жирных кислот принят ряд констант, которые характеризуют свойства жиров. Основными константами жиров являются кислотное число, число омыления, эфирное число и перекисное число.

4. Реактивы и оборудование лабораторной работы.

Оборудование и реактивы: водяные бани; колбы конические V = 50-100 мл; круглодонные колбы емкостью на 100 мл с обратным холодильником; спирт; эфир; 0,1н KOH; фенолфталеин; тимолфталеин; 0,5 н спиртовой раствор KOH; 0,5 н. HCl.

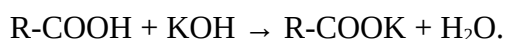
5. Содержание и порядок выполнения лабораторной работы.

5.1. Определение кислотного числа жира.

Кислотное число или кислотность жира – количество миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1г жира.

В жирах почти всегда имеются свободные жирные кислоты, причем в растительных жирах их концентрация обычно более высокая, чем в животных. Особенно много свободных кислот в масле из незрелых семян. В процессе созревания содержание свободных жирных кислот уменьшается и соответственно понижается кислотное число. Количество свободных кислот может увеличиваться и при длительном хранении семян масличных культур или полученного из них масла. Содержание кислот резко повышается при прорастании семян вследствие гидролиза жиров. Таким образом, величина кислотного числа масла может подвергаться заметным изменениям.

Принцип метода. Масло нейтрализуют титрованием раствором едкого кали, в результате чего между едким кали и находящимися в масле свободными жирными кислотами происходит следующая реакция:



По количеству раствора KOH, затраченного на нейтрализацию кислот, судят о величине кислотного числа.

Ход определения. В чистую сухую колбу на аналитических весах отвешивают 3 – 5 г масла, прибавляют 30 мл предварительно нейтрализованной смеси эфира с 96%-нвм спиртом и растворяют масло. Если масло растворяется плохо, смесь в колбе тщательно перемешивают и слабо нагревают на водяной бане при встряхивании.

После растворения жира в колбу добавляют несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1н водным раствором KOH до появления ярко-розовой окраски. Если для исследования был взят темноокрашенный жир, в котором трудно наблюдать появление розовой окраски, то вместо фенолфталеина берут 1%-ный раствор тимолфталеина и титруют до появления синей окраски.

Вычисление результатов. Для вычисления величины кислотного числа можно пользоваться следующей формулой:

$$x = \frac{a * 5,61 * T}{H}$$

Где, а – количество 0,1 н раствора KOH, затраченное на титрование,

T - поправка к титру KOH,

H – навеска масла, взятая для анализа.

Содержание кислот в масле можно выражать также не кислотным числом, а количеством свободных кислот в процентах от веса масла. При обычном титровании масла для определения кислотного числа нельзя получить никаких данных о молекулярной массе кислот, входящих в его состав и, следовательно, нельзя прямо вычислить процентное содержание кислот в масле. Поэтому условно расчеты ведут на свободную олеиновую кислоту, которая является одной из наиболее распространенных кислот, входящих в большинство растительных масел в нашей стране. Для этого кислотное число умножают на коэффициент 0,503. Этот коэффициент получают из следующего уравнения:

$$\% \text{ _ свободных _ кислот } = \frac{\text{кислотное _ число} * 282,3 * 100}{56,11 * 1000}$$

где, 282,3 – молекулярная масса олеиновой кислоты

56,11 – молекулярная масса KOH

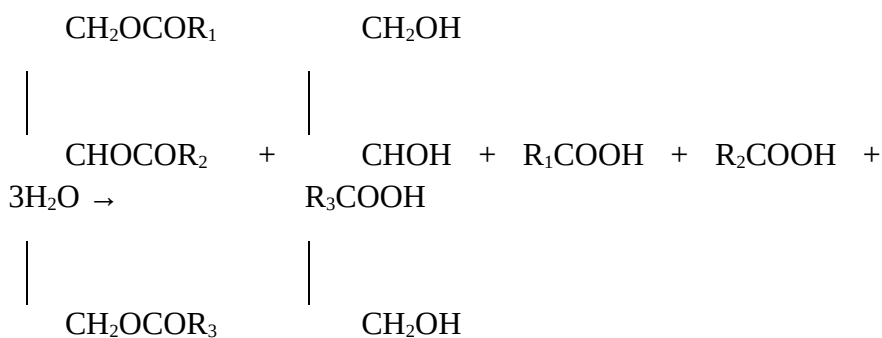
100 – пересчет на процентное содержание

1000 – пересчет миллиграммов в граммы

5.2. Определение числа омыления жиров.

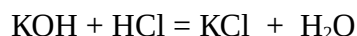
Числом омыления называется количество граммов едкого кали, необходимое для нейтрализации всех свободных и связанных кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует среднюю величину молекулярной массы кислот, входящих в состав жира. Число омыления растительных масел может заметно изменяться. Как правило, кокосовое, пальмовое и некоторые другие масла имеют высокое число омыления, а масла крестоцветных и касторовое масло – низкое.

Принцип метода: жир кипятят с избытком титрованного раствора едкого кали, в результате чего происходит его гидролиз:



Освободившиеся кислоты реагируют с едким кали, по этой же схеме реагируют и свободные кислоты, содержащиеся в масле.

Избыток щелочи, которая не прореагировала с жирными кислотами, оттитровывают соляной кислотой:



И по количеству щелочи, затраченной на связывание всех кислот жира, рассчитывают величину числа омыления.

Ход определения. В чистую сухую круглодонную колбу отвешивают на аналитических весах около 2 г жира и приливают в нее из бюретки точно 25 мл 0,5 н спиртового раствора едкого кали.

Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят на сильно кипящей водяной бане в течение 1 часа. Одновременно проводят контрольное определение. Для этого в другую колбу вместо жира вносят 2 мл воды, приливают 25 мл 0,5 н KOH и кипятят на бане. Омыление считается законченным, когда жидкость в колбе станет прозрачной. При омылении трудно растворяющихся веществ в колбу рекомендуется добавить примерно равный объем какого-либо высококипящего растворителя – толуола, пропилового, бутилового или амилового спиртов.

По окончании омыления в колбу добавляют несколько капель индикатора фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до изменения окраски. Одновременно титруют содержимое контрольной колбы.

Вычисление результатов. Количество миллиграммов КОН, которое было затрачено на нейтрализацию свободных и связанных кислот 1 г жира, равняется:

$$x = \frac{(a - b) * T_1 * 28,055 * T_2}{H}$$

где: x – число омыления;

a – количество миллилитров 0,5 н HCl, израсходованное на титрование контроля;

b – количество миллилитров 0,5 н HCl, затраченное на титрование пробы;

T₁ - поправка к титру HCl;

28,055 – ½ молекулярной массы КОН;

T₂ - поправка к титру КОН;

H – навеска жира.

На основании определения числа омыления и кислотного числа можно вычислить и так называемое число эфирности. Число эфирности – количество миллиграммов едкого кали, которое необходимо для нейтрализации освобождающихся при омылении жирных кислот в 1 г жира. Таким образом, число эфирности вычисляется по разности между числом омыления и кислотным числом. На основании этих определений можно рассчитать и содержание глицерина, имея в виду, что на омыление одной молекулы триглицерида расходуется 3 молекулы КОН и выделяется одна молекула глицерина.

6. Требования к отчету по лабораторной работе. По результатам анализа сделать выводы.

7. Контрольные вопросы:

1. Какие жирные кислоты входят в состав жиров?
2. Какие основные константы жиров вы знаете?
3. Как определяется кислотное число жира?
4. Что называется кислотным числом?
5. Что называется числом омыления?
6. Как определяется число омыления?

ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. Биологическая химия. - М.: Высшая школа 2002г. (библ. ИнЕУ)
2. А. Ленинджер. Биохимия. М. Мир 1974 г. (библ. ИнЕУ)
3. Ю.Б.Филиппович. Основы биохимии. М.: Высшая школа, 1985
4. К.А. Арыстанова, З.А. Мустафина и Э.Ж. Алимкулова. Практикум по биохимии. Астана: Казахский аграрный университет им. С. Сейфуллина, 2003.

Дополнительная:

1. В.Л. Кретович. Биохимия растений. -М.: Высшая школа,1986
2. Вальтер О.А., Пиневиц Л.М., Варасова Н.Н. Практикум по физиологии растений с основами биохимии. М.Л.: Сельхозгиз, 1957 г.
3. А. Паттон Энергетика и кинетика биохимических процессов. М. Мир. 1968 г.
4. М.П. Шерстнев, О.С. Комаров Химия и биология нуклеиновых кислот М. Просвещение 1990 г. (библ. ИнЕУ)
5. Некрасов В.В. Руководство к малому практикуму по органической химии. -М.Л.: Химия, 1964 г.
6. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. -М.: Колос,1968 г.
7. В.И. Добрынина. Учебник биологической химии. -М.: Госиздатметлит, 1963 г.