

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. Р. Е. АЛЕКСЕЕВА»

Кафедра «Производственная безопасность, экология и химия»

БИОХИМИЯ

*Учебно-методическое пособие
к лабораторным и практическим занятиям по курсу биохимии
для студентов специальности 12.03.04
всех форм обучения*

Нижний Новгород 2022

Составители: Т.Н. Соколова, Ю.М. Лукьянова

УДК 514

Биохимия: учебно-метод. пособие к лабораторным и практическим занятиям по курсу биохимии для студентов специальности 12.03.04 всех форм обучения / НГТУ им.Р.Е.Алексеева; сост.: Т.Н. Соколова, Ю.М. Лукьянова – Н.Новгород, 2022. – 35 с.

Пособие предназначено для проведения практических и лабораторных занятий по дисциплине «Биохимия».

Редактор Э.Б. Абросимова

Подп. к печ.03.10.2022. Формат 60x84^{1/16}. Печать трафаретная. Бумага газетная. Усл.печ.л.3,25. Уч.-изд.л.2,8.Тираж 50 экз. Заказ .

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е.Алексеева.
Типография НГТУ. 603950, Н.Новгород, ул. Минина, 24.

© Нижегородский государственный
технический университет им.Р.Е.Алексеева, 2022

АМИНОКИСЛОТЫ. ПЕПТИДЫ. БЕЛКИ.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Аминокислоты

Аминокислоты – это соединения, молекулы которых содержат аминогруппу и карбоксильную группу.

Таблица 1

Наименование аминокислот

Сокращенное название	Аминокислота	Сокращенное название	Аминокислота
Ала	Аланин	Лей	Лейцин
Арг	Аргинин	Лиз	Лизин
Асн	Аспарагин	Мет	Метионин
Асп	Аспарагиновая кислота	Про	Пролин
Вал	Валин	Сер	Серин
Гис	Гистидин	Тир	Тирозин
Гли	Глицин	Тре	Треонин
Глн	Глутамин	Три	Триптофан
Глу	Глутаминовая кислота	Фен	Фенилаланин
Иле	Изолейцин	Цис	Цистеин

Классификация аминокислот

По строению бокового радикала

Алифатические аминокислоты

- Моноаминомонокарбоновые кислоты: глицин, аланин, валин, изолейцин, лейцин.
 - Оксимоноаминокарбоновые кислоты (содержат ОН– группу): серин, треонин.
 - Моноаминодикарбоновые кислоты (содержат COOH– группу): аспарат, глутамат (за счёт второй карбоксильной группы несут в растворе отрицательный заряд).
 - Амиды моноаминодикарбоновых кислот (содержат NH₂CO– группу): аспарагин, глутамин.
 - Диаминомонокарбоновые кислоты (содержат NH₂– группу): лизин, аргинин (за счёт второй аминогруппы несут в растворе положительный заряд).
 - Серосодержащие кислоты: цистеин, метионин.
- Ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин, триптофан.
Гетероциклические аминокислоты: триптофан, гистидин, пролин.
Иминокислоты: пролин.

По полярности бокового радикала

Неполярные (гидрофобные)

- Аليفатические: аланин, валин, лейцин, изолейцин
- Ароматические: фенилаланин, триптофан.
- Серосодержащие: метионин
- Иминокислота: пролин.

Полярные незаряженные

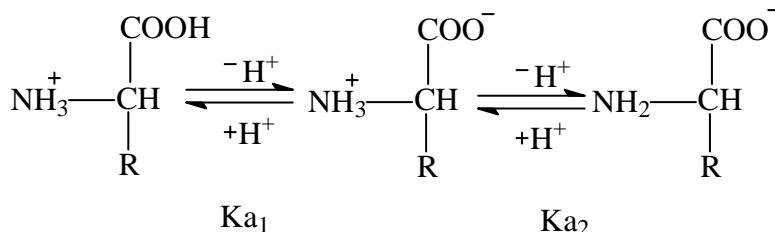
• Полярная ОН–группа (оксиаминокислоты): серин, треонин и тирозин

- HS–группа: цистеин

Амидная группа: глутамин, аспарагин

Ионное равновесие в водных растворах

Биполярный ион цвиттер–ион определяет температуру плавления выше 200°C, плохую растворимость в органических растворителях и относительно хорошую в воде. Особенности структуры АК не поглощают инфракрасный и ультрафиолетовый свет.



$$\text{pKa}_1 = -\lg \text{Ka}_1 \approx 2$$

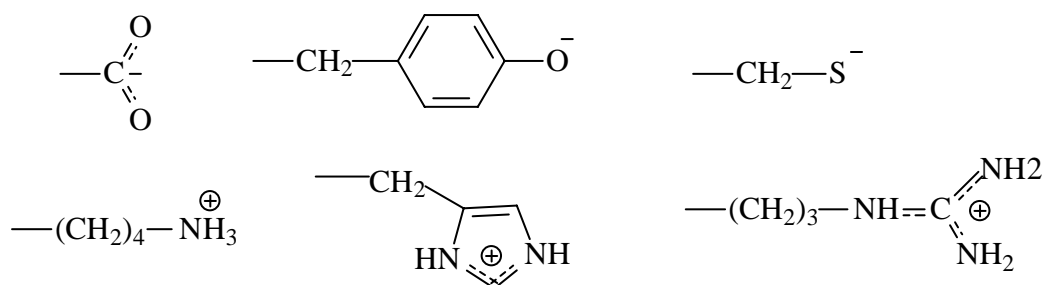
$$\text{pKa}_2 \approx 9-10$$

$$\text{pI} = \frac{\text{pKa}_1 + \text{pKa}_2}{2}$$

pKa_1 – характеризует кислотные свойства кислоты, в α -положении которой находится группа аммония, которая обладает высокой отрицательностью.

pKa_2 – определяет константу кислотности, замещенную ионом аммония, также она сравнима с константой кислотности протонированных аминов.

У некоторых аминокислот боковой радикал имеет функциональную группу, которая также обладает кислотно-основными свойствами. При растворении в воде кислота присутствует в виде катиона, цвиттер–иона, аниона. Количество форм зависит от рН среды.



Изоэлектрическая точка (pI) — это величина водородного показателя (pH) раствора, при которой заряд содержащейся в нём аминокислоты равен 0.

Явление перемещения заряженной частицы дисперсной системы под действием внешнего электрического тока называется электрофорезом. Электрофорез связан с высокой скоростью установления протолитического равновесия, поэтому в изоэлектрической точке протон быстро перемещается от одной формы к другой и заряженные частицы не успевают перемещаться ни к аноду, ни к катоду.

Примеры решения задач

Пример 1. Написать ионные состояния пептида при постепенном переходе из среды с pH = 1,5 к pH = 13,0. Определить заряды пептида в соответствующей среде:

Вал-Глу-Лиз-Тир-Асн-Арг.

Решение:

Используя значения констант кислотности, представленные в табл.2, расположим аминокислоты в порядке возрастания значения pKa:

На С-конце пептида находится аминокислота аргинин, значение pKa группы COOH которой равно 1,82.

В состав пептида входит одна ионогенная кислота, имеющая кислотную природу, – глутаминовая, значение pKa группы COOH, входящей в боковой фрагмент, равно 4,07.

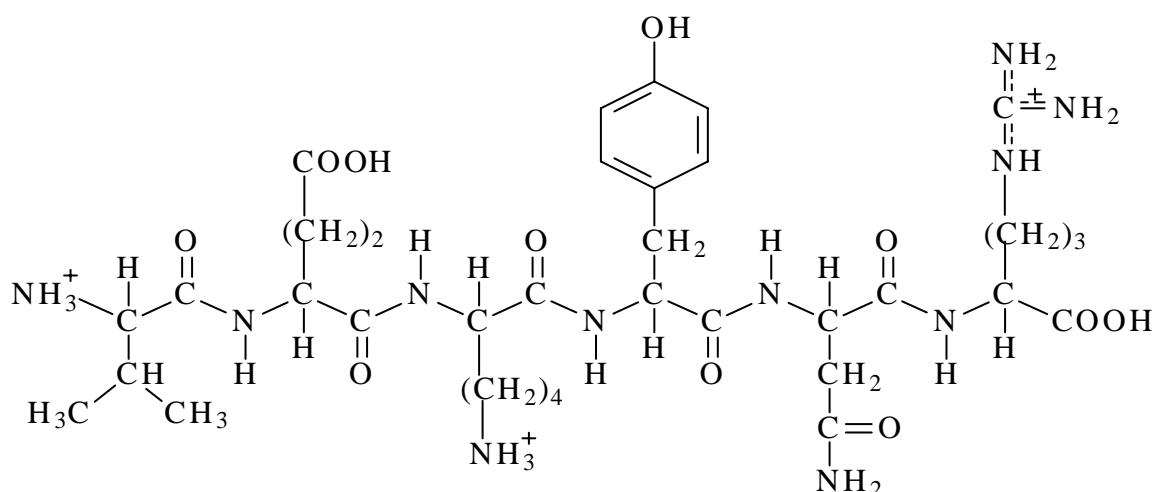
На N-конце находится аминокислота валин, величина pKa группы NH₃⁺ которой равна 9,74.

Тирозин способен ионизироваться при pH > 10, значение pKa фенольной гидроксильной группы в тирозине равно 10,46.

В состав пептида входят две ионогенных аминокислоты, имеющих основную природу, – лизин и аргинин, значение pKa группы NH₃⁺, входящей в боковой фрагмент лизина в положении ε, равно 10,54; pKa гуанидиновой группы аргинина равно 12,48.

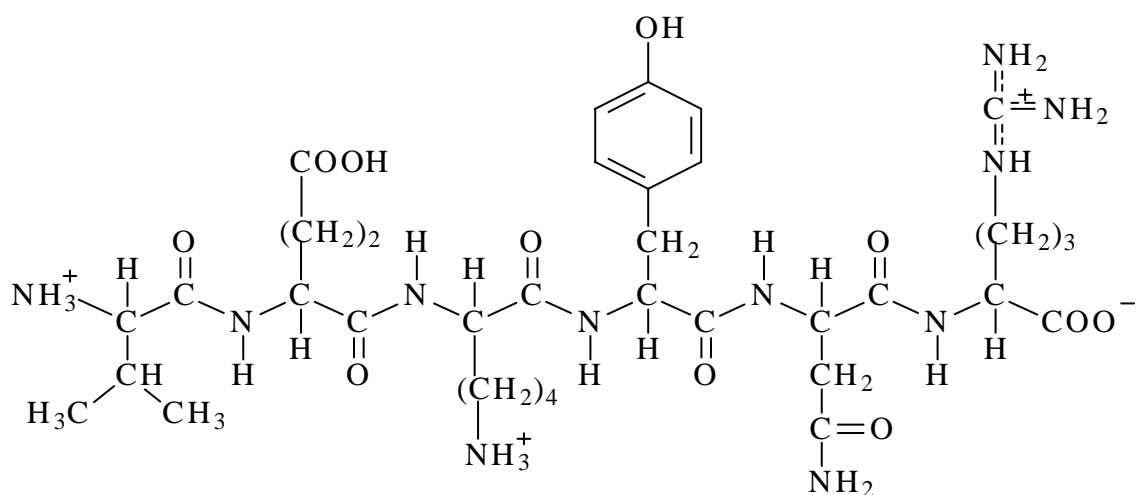
Аспарагин является нейтральной аминокислотой.

Таким образом, в сильнокислой среде при значении $pH < 1,5$ все ионизируемые функциональные группы будут находиться в протонированной форме:



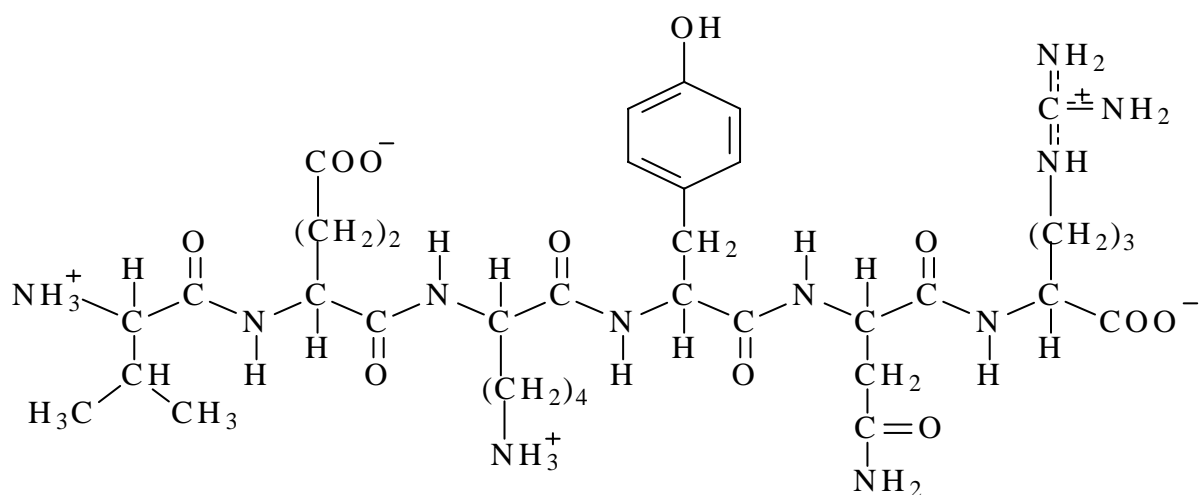
Заряд пептида в сильнокислой среде равен +3.

При достижении $pH \geq 1,82$ ионизируется группа $COOH$ аргинина на С-конце пептида:



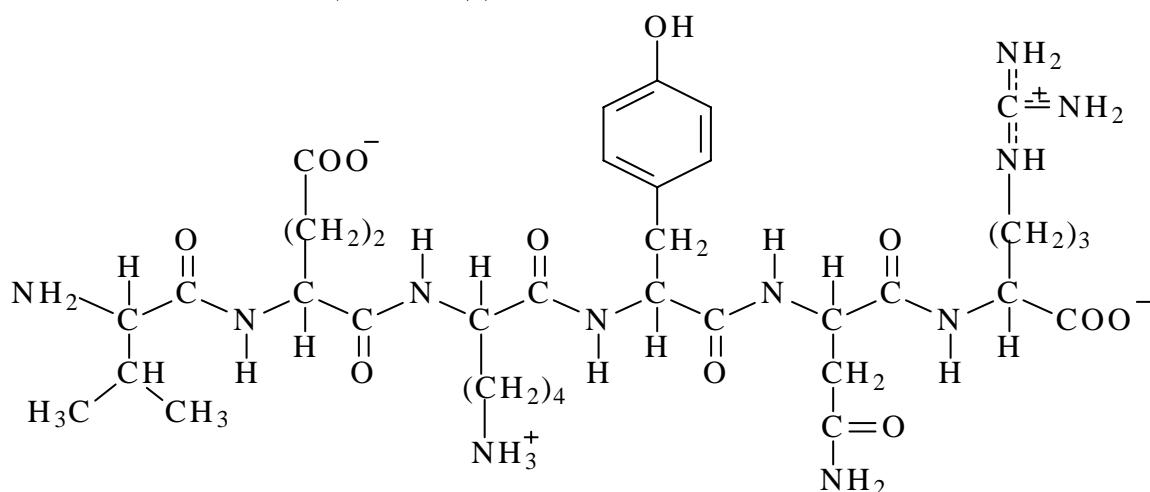
Заряд становится равным +2.

При $pH \geq 4,07$ депротонируется группа $COOH$ в боковом фрагменте глутаминовой кислоты:



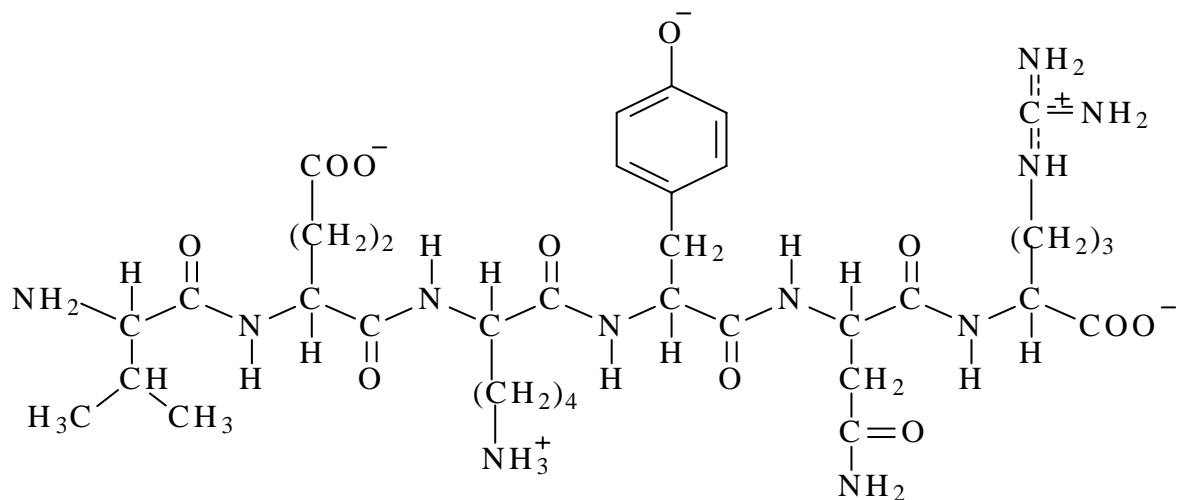
Заряд становится равен +1.

В основной среде при достижении рН 9,74 депротонируется аминогруппа валина на N-конце пептида:

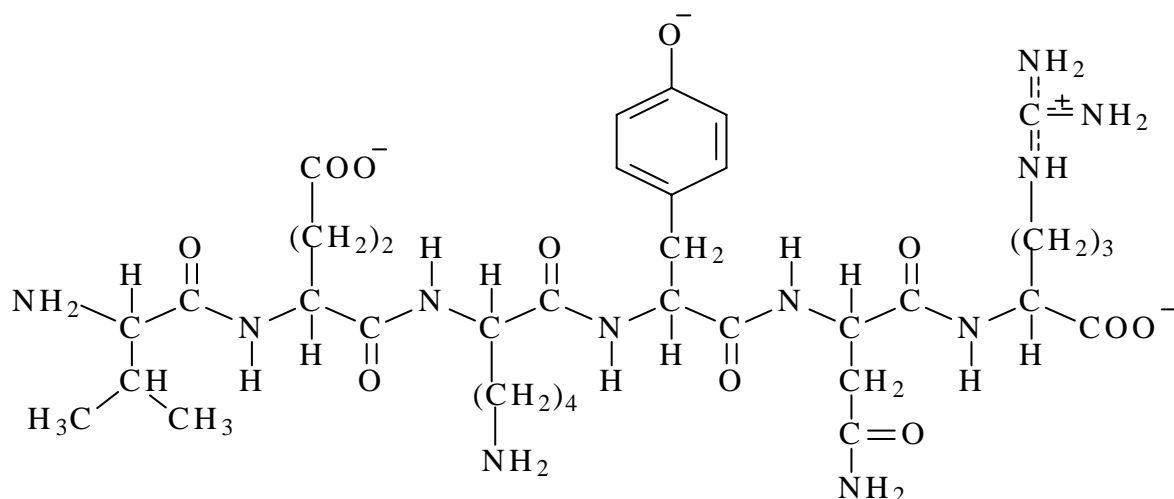


Пептид становится, вплоть до рН = 10,46, нейтральным.

При достижении рН 10,46 ионизируется гидроксильная группа фенольного кольца тирозина, а уже при рН = 10,54 депротонируется и аминогруппа в боковом фрагменте лизина:

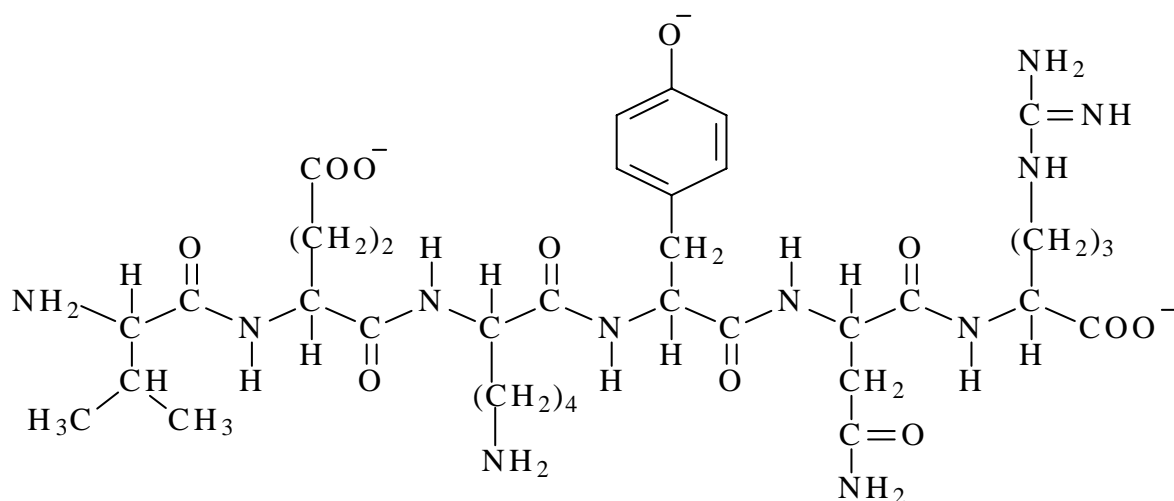


Заряд пептида в интервале $10,46 \leq \text{pH} \leq 10,54$ равен -1 .



Заряд пептида -2 .

Наконец, в сильноосновной среде при $\text{pH} \geq 12,48$ депротонируется гуанидиновая группа аргинина, а заряд становится равным -3 :



Задачи для самостоятельной работы

1. Написать реакции протолитических превращений аминокислот. Рассчитать изоэлектрическую точку аминокислоты. Определить, к какому полюсу при электрофорезе на бумаге будет перемещаться аминокислота при $\text{pH}=6$ (использовать данные табл.1 приложения):

- 1.1. Асп, Ала, Лиз
- 1.2. Глу, Арг, Асп
- 1.3. Вал, Глу, Гис
- 1.4. Гли, Лиз, Асп
- 1.5. Иле, Цис, Арг
- 1.6. Тир, Асп, Лей
- 1.7. Фен, Асп, Лиз
- 1.8. Три, Лиз, Глу

- 1.9. Гли, Тир, Асп
- 1.10. Ала, Гис, Глу
- 1.11. Вал, Иле, Цис
- 1.12. Тир, Три, Ала
- 1.13. Арг, Сер, Фен
- 1.14. Глн, Мет, Асп
- 1.15. Глу, Мет, Тир

2. Написать химическую формулу пептида, проанализировать изменение заряда пептида при постепенном увеличении рН от 1,5 до 13 (использовать данные табл.1 приложения).

- 2.1. Ала-Тир-Цис-Тре-Лиз-Гли-Про-Глу-Асн
- 2.2. Арг-Асн-Сер-Цис-Сер-Глу-Гис-Лиз-Вал-Про
- 2.3. Тре-Лиз-Глу-Арг-Глу-Асн-Асп-Асп-Мет-Лей
- 2.4. Вал-Гис-Асп-Мет-Лей-Три-Арг-Глу-Асн-Асп
- 2.5. Гли-Гис-Фен-Лиз-Гис-Арг-Про-Вал-Асп-Глу
- 2.6. Про-Лиз-Асн-Вал-Сер-Асп-Тре-Лиз-Лиз-Гли
- 2.7. Мет-Арг-Глу-Ала-Гли-Тир-Фен-Три-Мет-Арг
- 2.8. Сер-Тир-Асп-Вал-Сер-Асп-Тре-Лиз-Лиз-Гли
- 2.9. Иле-Арг-Глу-Глн-Глу-Лиз-Гис-Арг-Про-Вал
- 2.10. Тир-Гис-Лиз-Тре-Три-Ала-Гис-Арг-Лиз-Гис
- 2.11. Тир-Фен-Три-Мет-Арг-Глу-Тир-Тре-Три-Глн
- 2.12. Тре-Тре-Цис-Цис-Ала-Асп-Глу-Глу-Лиз-Вал
- 2.13. Глу-Цис-Про-Глу-Асн-Лиз-Глу-Глн-Асн-Асн
- 2.14. Мет-Цис-Сер-Асп-Гис-Иле-Тир-Глу-Глу-Глн
- 2.15. Арг-Асн-Асп-Глу-Лиз-Лиз-Тир-Гли-Вал-Три
- 2.16. Лиз-Сер-Лиз-Асп-Глу-Цис-Гис-Гис-Арг-Сер
- 2.17. Гли-Лиз-Арг-Арг-Гис-Гис-Лиз-Глу-Лиз-Арг
- 2.18. Лей-Тир-Фен-Три-Мет-Арг-Лиз-Лиз-Лиз-Глу
- 2.19. Глн-Асн-Асн-Гис-Гис-Арг-Лиз-Лиз-Вал-Арг
- 2.20. Гис-Гис-Лиз-Глу-Лиз-Арг-Тир-Тре-Сер-Глу
- 2.21. Гис-Вал-Гли-Лиз-Асп-Глу-Арг-Асн-Глу-Про
- 2.22. Мет-Три-Ала-Гис-Лиз-Гис-Асн-Асн-Гли-Лей
- 2.23. Арг-Глу-Асн-Тре-Лиз-Гис-Гис-Три-Про-Иле
- 2.24. Три-Мет-Арг-Глу-Сер-Глу-Гис-Лиз-Вал-Цис
- 2.25. Асн-Лиз-Глу-Тир-Фен-Три-Цис-Про-Глу-Глн

3. Отобразить ионное состояние пептида в сильноокислой среде, определить заряд. Как изменится заряд пептида при переходе в сильноосновную среду? Отобразить ионное состояние пептида при $\text{pH} \gg 7$:

- 3.1. Вал-Сер-Асп-Тре-Лиз-Лиз-Гли-Про-Глу-Асн-Асн.

- 3.2. Арг-Фен-Гис-Лиз-Арг-Асп-Глн-Глу-Глу-Тир-Иле.
- 3.3. Мет-Лей-Три-Арг-Глу-Асн-Асп-Асп-Про-Гис-Тир.
- 3.4. Цис-Сер-Глу-Гис-Лиз-Вал-Про-Глн-Асн-Сер-Мет.
- 3.5. Гли-Тир-Тре-Три-Глн-Глу-Лиз-Гис-Арг-Про-Вал.
- 3.6. Иле-Асп-Глу-Асп-Асп-Про-Глн-Асн-Тре-Лиз-Лиз.
- 3.7. Про-Фен-Сер-Арг-Глу-Асн-Асп-Асп-Мет-Лей-Три.
- 3.8. Тре-Три-Ала-Гис-Арг-Лиз-Гис-Асн-Асп-Асп-Глу.
- 3.9. Сер-Арг-Глу-Асн-Тре-Лиз-Лиз-Гли-Про-Мет-Лей.
- 3.10. Глн-Глу-Лиз-Гис-Арг-Про-Вал-Асп-Глу-Асп-Асп.
- 3.11. Ала-Гли-Тир-Фен-Три-Мет-Арг-Глу-Асн-Асп-Гис.
- 3.12. Лиз-Лиз-Гли-Про-Глу-Асн-Тир-Тре-Три-Глн-Глу.
- 3.13. Глн-Асн-Сер-Мет-Три-Ала-Гис-Лиз-Гис-Арг-Про.
- 3.14. Асп-Арг-Цис-Лей-Иле-Сер-Глу-Гис-Лиз-Вал-Гли.
- 3.15. Три-Гис-Вал-Гли-Лиз-Асп-Глу-Арг-Асн-Глу-Глн.
- 3.16. Лей-Тир-Фен-Три-Мет-Арг-Глу-Асн-Асп-Лиз-Лиз.
- 3.17. Асн-Сер-Арг-Глу-Асн-Лиз-Гли-Про-Арг-Глу-Асп.
- 3.18. Глу-Глн-Асн-Асн-Гис-Гис-Арг-Лиз-Лиз-Вал-Арг.
- 3.19. Глн-Глу-Глу-Глу-Глу-Цис-Сер-Фен-Лиз-Асп-Асп.
- 3.20. Лиз-Гли-Лиз-Арг-Арг-Гис-Гис-Лиз-Глу-Лиз-Арг.
- 3.21. Гли-Лиз-Асп-Глу-Арг-Гли-Лиз-Арг-Арг-Гис-Ала.
- 3.22. Асн-Асн-Гис-Глу-Глу-Цис-Про-Глу-Асн-Лиз-Гис.
- 3.23. Сер-Арг-Глу-Глу-Асп-Асп-Про-Глн-Асн-Лиз-Вал.
- 3.24. Лиз-Вал-Гис-Гис-Арг-Лиз-Глу-Асн-Тре-Тре-Цис.
- 3.25. Ала-Гли-Тир-Цис-Ала-Асп-Глу-Глу-Асп-Глу-Глу.

4. Каков суммарный заряд пептидов: а) гли–ала–асп–про, б) глу–тре–про–вал, в) цис–тре–вал–про–фен, г) вал–арг–лиз–гис в кислой, нейтральной, щелочной средах? Напишите формулы указанных пептидов.

5. Указать направление перемещения (к катоду, старт, аноду) пептидов в процессе электрофореза на бумаге при $\text{pH}=1,6; 6,5; 11$?

- 5.1. Лиз-Гис-Асн-Лей.
- 5.2. Арг-Гли-Ала-Ала.
- 5.3. Гис-Гли-Ала-Глу.
- 5.4. Асп-Гли-Ала-Глу.
- 5.5. Глн-Гли-Ала-Арг.
- 5.6. Асн-Лиз-Глу-Тир.
- 5.7. Цис-Тир-Иле-Глу.
- 5.8. Лей-Тир-Фен-Три.
- 5.9. Сер-Тир-Асп-Вал.
- 5.10. Ала-Лиз-Глу-Тре.

6. Методом электрофореза на бумаге в сыворотке крови человека было обнаружено 5 белковых компонентов: сывороточный альбумин, α_1 , α_2 , β и γ – глобулины. Изоэлектрическая точка (ИЭТ) сывороточного альбумина равна 5,2, γ – глобулина равна 7,3. У трех остальных компонентов положение изоточек промежуточное. Электрофоретическое фракционирование белков сыворотки крови проводили при рН = 8,0. Указать направление перемещения указанных белков и степень их подвижности при данном значении рН. При каком значении рН возможно разделение смеси двух белков – сывороточного альбумина и γ – глобулина?

7. Указать направление перемещения при электрофорезе следующих белков:

7.1. Тропомиозина (рI = 5,1) в буферной системе с рН = 5,1; 8,0.

7.2. Гемоглобина (рI = 6,8) в буферной системе с рН = 4,8; 8,0.

7.3. Рибонуклеазы (рI = 9,45) в буферной системе с рН = 4,2; 11,0.

7.4. β -казеина (рI = 5,3) в буферной системе с рН = 4,0; 5,3.

7.5. α -Лактальбумина (рI = 5,1) в буферной системе с рН = 8,0; 4,0.

7.6. γ -Глобулина ячменя (рI = 5,75) в буферной системе с рН = 9,0; 5,75.

7.7. Инсулина (рI = 5,35) в буферной системе с рН = 9,0; 4,0.

7.8. Пепсина (рI = 1,0) в буферной системе с рН = 2,0; 7,0.

7.9. Коллагена (рI = 6,6 – 6,8) в буферной системе с рН = 2,0; 10,0.

7.10. Цитохрома с (рI = 10,65) в буферной системе с рН = 10,0; 7,0.

8. При каких значениях рН наиболее целесообразно электрофоретическое фракционирование белковых смесей?

8.1. Миозина и гемоглобина.

8.2. Уреазы и гемоглобина.

8.3. Щелочной фосфатазы, сывороточного альбумина и уреазы.

8.4. Цитохрома с и гемоглобина.

8.5. Коллагена и каталазы.

8.6. Родопсина и пепсина.

8.7. Миозина и цитохрома с.

8.8. Уреазы и каталазы.

8.9. Карбоксипептидазы и родопсина.

8.10. Миозина и миоглобина.

Изоэлектрическая точка миозина – 5,4; щелочной фосфатазы – 4,5; гемоглобина – 6,8; уреазы – 5,0; цитохрома с – 10,65; коллагена – 6,6-6,8; каталазы – 5,6; родопсина – 4,47-4,57; пепсина – 1,0; карбоксипептидазы – 6,0; миоглобина – 7,0.

9. Какая из нижеприведенных аминокислот будет сходиться с ионообменной хроматографической колонны первой, если через колонку пропускают буфер с а) рН 3, б) рН 7: а) асп и лиз, б) арг и мет, в) глу и вал, г) глу и лей.

10. Чем объяснить розово-фиолетовое окрашивание щелочного раствора белка в присутствии катионов меди? Напишите уравнение биуретовой реакции с пептидом ала–иле–гли–вал–фен.

11. Какие аминокислоты в белке обуславливают ксантопротеиновую реакцию? Напишите уравнение ксантопротеиновой реакции с одной из них.

12. ИЭТ белка равна 6,8. Фракционирование ведется при рН 7,0. Как изменится его электрофоретическая подвижность, если в его молекуле изменить: а) глу на вал, б) лиз на глу, в) ала на асп?

13. В форме каких ионов находится аланин, гистидин, аргинин при значениях рН 7,1 и 7,4, характерных для плазмы крови и межклеточной жидкости, соответственно, если $pK_1=2,1$; $pK_2=9,0$; $pK_3(\text{гис})=6,0$; $pK_3(\text{арг})=12,5$?

14. Какими реакциями можно открыть в пептиде вал–тир–цис–гис–глу аминокислоты тирозин и гистидин? Напишите уравнения этих реакций.

15. Какие аминокислоты преобладают в составе белка, если ИЭТ лежит в пределах: а) рН 3, б) рН 10? Приведите примеры белков кислого и основного характера.

16. В какой среде (кислая, щелочная, нейтральная) находится ИЭТ следующих пептидов: а) глу–сер–фен–три–асп–цис–про–вал, б) мет–гис–тир–тре–арг–лиз–ала, в) иле–про–лей–мет–вал–фен–мет–тир.

17. Пепсин желудочного сока имеет изоэлектрическую точку около рН 1. Какие функциональные группы должны присутствовать в пепсине в относительно больших количествах?

18. Какие аминокислоты должны присутствовать в гистонах, если изоэлектрическая точка их около рН 10,8?

19. Укажите, каким образом действует химотрипсин на пептид: лей-тир-цис-фен-лиз-ала-три-арг-цис-фен-глу-ала-лей-иле.

20. Укажите, каким образом действует пепсин на пептид: лиз-ала-гли-асп-фен-гли-асп-ала-фен-глу-сер-арг-фен-ала-ада-гли.

21. Какие пептиды образуются при обработке трипсином приведенного ниже пептида: вал-лиз-глу-мет-арг-цис-глу-лиз-фен-вал-арг-иле-про-гли-лиз-сер-гли-тре?

22. Основная функция белка-гемоглобина А (HbA) - транспорт кислорода к тканям. В популяции людей известны множественные формы этого белка с измененными свойствами и функцией - так называемые аномальные гемоглобины. Например, установлено, что гемоглобин S, обнаруженный в эритроцитах больных серповидно-клеточной анемией (HbS), имеет низкую растворимость в условиях низкого парциального давления кислорода (как это имеет место в венозной крови). Это приводит к образованию агрегатов данного белка. Белок утрачивает свою функцию, выпадает в осадок, а эритроциты приобретают неправильную форму (некоторые из них образуют форму серпа) и быстрее обычного разрушаются в селезенке. В результате развивается серповидно-клеточная анемия.

Единственное различие в первичной структуре HbA и HbS обнаружено в N-концевом участке β-цепи гемоглобина. Сравните N-концевые участки β-цепи и покажите, как изменения в первичной структуре белка влияют на его свойства и функции.

1	2	3	4	5	6	7	8
HbA: Вал – Гис – Лей – Тре – Про – Глу – Глу – Лиз –							
1	2	3	4	5	6	7	8

HbS: Вал – Гис – Лей – Тре – Про – Вал – Глу – Лиз –							
--	--	--	--	--	--	--	--

Для этого:

а) напишите формулы аминокислот, по которым различаются HbA и HbS; сравните свойства этих аминокислот (полярность, заряд).

б) сделайте вывод о причине снижения растворимости HbS и нарушении транспорта кислорода в ткани.

23. Гормон глюкагон, вызывает повышение содержания глюкозы в крови и распад гликогена в печени, представляет собой пептид:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ГИС – СЕР – ГЛУ – ГЛИ – ТРЕ – ФЕН – ТРЕ – СЕР – АСП – ТИР – СЕР –										
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
– ЛИЗ – ТИР – ИЛЕ – АСП – СЕР – АРГ – АРГ – АЛА – ГЛУ – АСП –										

22 23 24 25 26 27 28 29
– ФЕН – ВАЛ – ГЛУ – ТИР – ЛЕЙ – МЕТ – АСН – ТРЕ.

Запишите фрагмент молекулы с десятого по семнадцатое звено. Перечислите гидрофобные аминокислоты.

24. Гормон брадикинин, являющийся активным сосудорасширяющим веществом, вызывающим также сокращение гладкой мускулатуры, представляет собой пептид:

1 2 3 4 5 6 7 8 9
АРГ–ПРО–ПРО–ГЛИ–ФЕН–СЕР–ПРО–ФЕН–АРГ.

Написать формулу пептида с 4-го по 9-е звено, определить заряд брадикинина при $pH=3$?

25. Гормон окситоцин представляет собой пептид:

1 2 3 4 5 6 7 8 9
ЦИС–ТИР–ИЛЕ–ГЛУ–АСП–ЦИС–ПРО–ЛЕЙ–ГЛИ



Написать формулу пептида с 1-го по 5-е звено, определить заряд окситоцина при $pH=7$?

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа №1

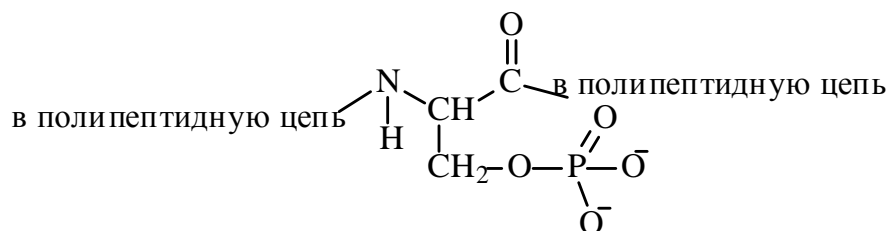
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Цель работы:

Исследовать физико-химические свойства белков молока; показать, что исследуемые растворы белков дают положительную биуретовую и нингидриновую реакции.

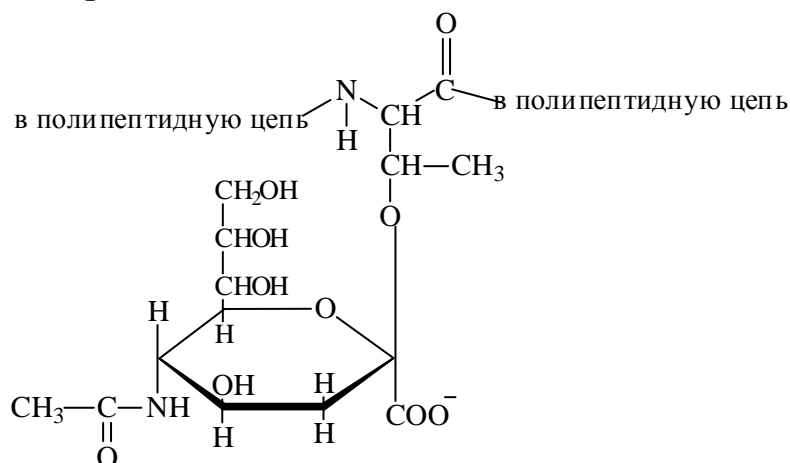
1. Краткие сведения из теории

Белки молока являются гетерогенными. Главную фракцию составляют казеины, которые по своему химическому составу относятся к сложным белкам и включают кроме аминокислот фрагменты фосфорной кислоты. Фосфатные группы связаны с белковой молекулой ковалентно через образование фосфодиэфирной связи с фрагментами серина, т.е. фосфорная кислота в казеиновой фракции – простетическая группа:



В свою очередь казеины классифицируются на α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -казеины с содержанием 38,10,39 и 13% соответственно от всего казеина, которые отличаются по аминокислотному составу, растворимости в различных веществах при разной температуре, а также по электрофоретической подвижности.

Фракция κ -казеинов является гликофосфопротеиновой, содержит углевод сиаловую кислоту, которая связана O-гликозидной связью с фрагментами треонина:



Казеины свежего молока (рН 6,6-6,8) содержат достаточно большое количество ионогенных аминокислот, причем ионогенные группы относительно неравномерно распределены в белковой молекуле. Например, в α_{s1} -казеине участок между аминокислотными остатками 1-40 несет суммарный заряд +3; между 41-80 – заряд –22,5; 81-120 – 0; 121-160 заряд – 2,5. В β -казеине участок между аминокислотными остатками 1-43 несет заряд – 16; 44-92 заряд –3,5; 93-135 заряд +2; 178-209 заряд +2, т.е. β -казеин является типичной дифильной молекулой.

С другой стороны, в состав казеинов молока входит большое количество пролина. Так как у пролина атом азота является частью жесткой кольцевой структуры, то вращение у $C_{\alpha} - N$ невозможно, а в месте нахождения пролина полипептидная цепь не способна ни к α -спирализации, ни к формированию β -складчатых слоев. По этой причине казеины обладают неупорядоченной вторичной структурой.

Дестабилизируют α -спираль и такие аминокислоты, как аргинин, лизин, изолейцин, серин, треонин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты.

Неупорядоченность вторичной и третичной структур приводит к тому, что ионогенные группы открыты, «не спрятаны» внутри глобул и доступны для воздействия воды, кислот и щелочей.

Молекулы воды вследствие дифильности электростатически взаимодействуют с ионогенными группами, образуя вокруг белковых молекул гидратную оболочку, которая служит одновременно и защитной оболочкой, препятствующей агрегатизации белка в нативном состоянии. Более того, белки молока относятся к самым активным водосвязывающим компонентам биологических систем. Количество связанной воды составляет 0,3-0,4 г на 1 г сухого белка.

Водосвязывающая способность белков характеризуется физисорбцией воды при участии ионогенных (аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин, гистидин) и полярных (аспарагин, глутамин, серин, тирозин, треонин, цистеин) гидрофильных фрагментов аминокислот.

Чем больше заряд белковой молекулы, тем выше степень ее сольватации и тем стабильнее она в растворе. Белки молока характеризуются очень высокой степенью гидратации, несмотря на их в целом гидрофобный характер.

От числа ионогенных групп и их распределения в белковой молекуле зависят не только способность к гидратации и растворимость, но и электрофоретическая подвижность, способность к солеобразованию, гелеобразованию, поверхностно-активные свойства, склонность к эмульгированию, кислый или основной характер нативных белков.

При снижении рН постепенно в соответствии с константами протолитических равновесий происходит нейтрализация отрицательных заря-

дов и при определенном рН (для казеина 4,6-4,7) количество положительных зарядов белковой молекулы становится равным количеству отрицательных. В изоэлектрическом состоянии стабильность казеинов самая низкая и они коагулируют.

Собственно к казеинам относятся фосфопротеины, которые осаждаются из сырого обезжиренного молока при его подкислении до рН 4,6 при температуре 20°C.

Остающиеся в фильтрате после осаждения казеиновой фракции белки получили название сывороточных. В отличие от казеинов нативные сывороточные белки свежего молока растворимы при всех значениях рН. Главными фракциями сывороточных белков являются β-лактоглобулин и α-лактальбумин.

Молочные альбумины и глобулины обладают всеми свойствами белков соответствующих групп. Они свертываются при нагревании, альбумины высаливаются в насыщенном растворе сульфата аммония; глобулины в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Таким образом, устойчивость белковых растворов к осаждению связана с наличием у молекул белка при определенном значении рН одноименных зарядов, а также образованием сольватных (гидратных) оболочек вокруг гидрофильных белковых молекул или отдельных участков белка.

Всякий фактор (действие минеральных и органических кислот, солей тяжелых металлов, сульфата аммония, некоторых органических растворителей), изменяющий рН среды, нейтрализующий заряд белковой молекулы, снижающий степень сольватации, способствует осаждению белка из раствора.

Осаждение белка может быть как обратимым, так и необратимым. При обратимом осаждении не происходит глубоких изменений в структуре белка, и при сохранении нативной структуры белок может быть ренатурирован.

При необратимом осаждении разбавленными растворами солей тяжелых металлов, концентрированными растворами минеральных кислот, некоторыми органическими кислотами осуществляется денатурация белка с разрушением его нативной структуры.

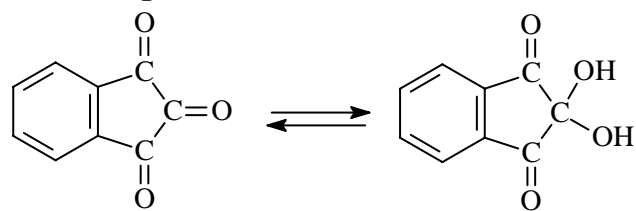
Методы качественного обнаружения белков основаны на реакциях, обусловленных свойствами пептидных связей и химической природой аминокислотных остатков.

Характерными реакциями первого типа являются нингидриновая и биуретовая реакции.

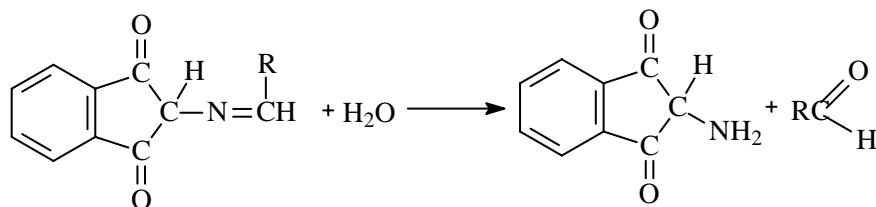
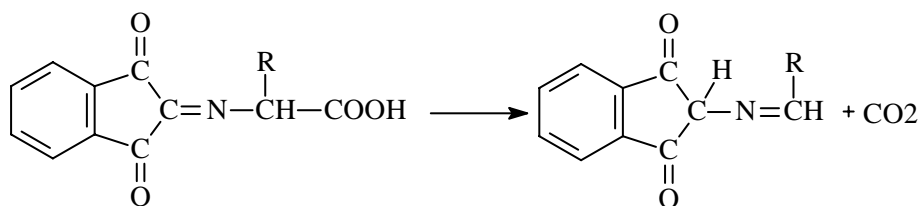
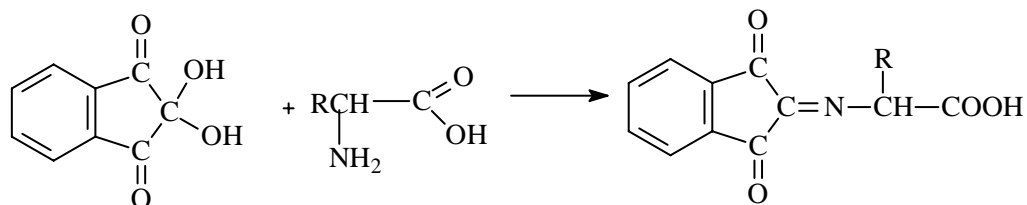
Нингидриновая реакция:

Аминокислота реагирует с нингидрином (водным раствором индантриона-1,2,3), образуя продукт конденсации, из которого путем перегрупп-

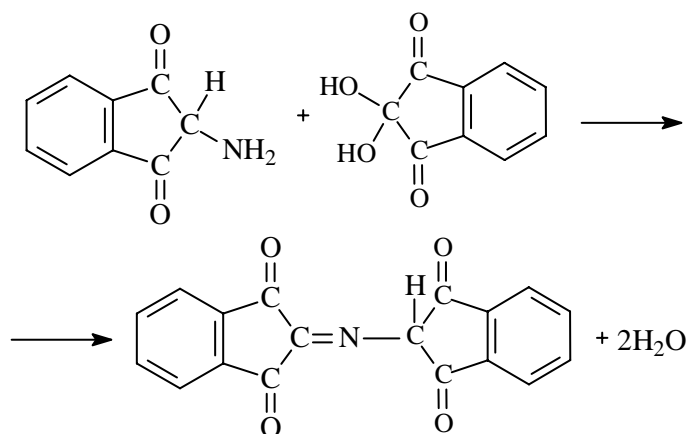
пировки, декарбоксилирования и гидролиза синтезируется 2-аминоиндандион; взаимодействие последнего с нингидрином дает продукт синей окраски.



индантрион-1,2,3 или нингидрин



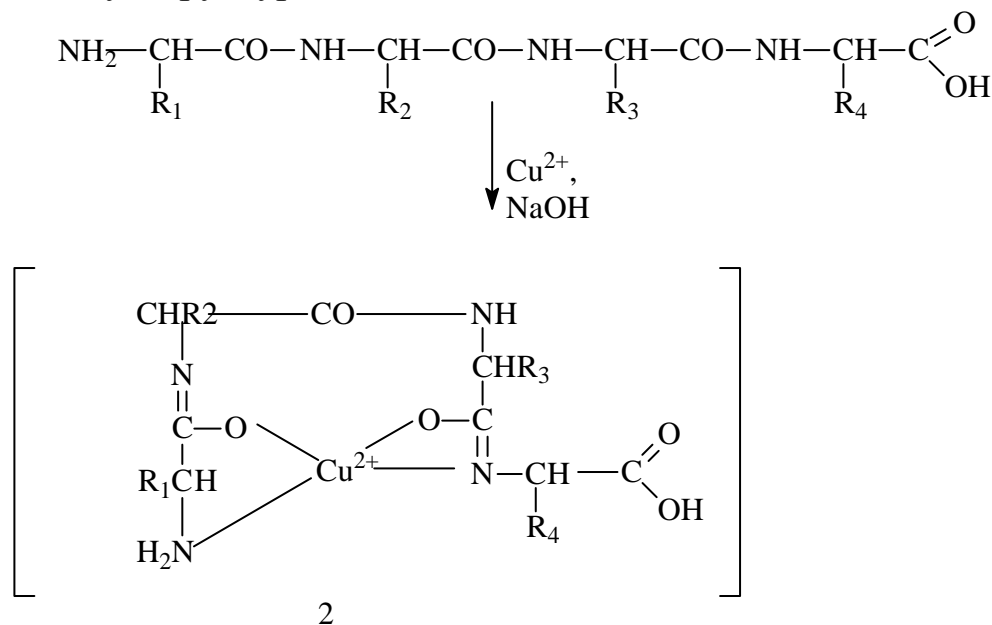
2-аминоиндандион



1

Окраска нингидриновой реакции связана с образованием красителя – синего Руэмана 1. Продукт реакции между пролином и нингидрином имеет желтую окраску. Нингидрин реагирует не только с α – аминокислотами, но и с другими аминами. При этом тоже появляется синяя окраска, но без выделения CO_2 .

Для качественного обнаружения пептидных связей используется биуретовая реакция, которая основана на образовании внутрикомплексного соединения ионов Cu^{2+} с двумя пептидными связями в щелочной среде. Цвет внутрикомплексного соединения меди зависит от числа пептидных связей: розовый – для биурета $\text{H}_2\text{NCO} - \text{NH} - \text{CONH}_2$, розово-фиолетовый для пептидов с числом пептидных связей более трех, сине-фиолетовый для полипептидов и белков. Основой комплексного соединения является, по-видимому, структура 2:



Вследствие разнообразия химической природы аминокислотных фрагментов существует возможность использовать цветные реакции для обнаружения специфичных аминокислотных остатков в составе белков. Например, ксантопротеиновая реакция характерна для бензольного кольца таких аминокислот, как тирозин, фенилаланин, триптофан; реакция Фоля для серосодержащих аминокислот: цистеина, цистина, метионина.

2. Экспериментальная часть

2.1.1. Материалы, реактивы, оборудование:

Исследуемый материал: сырое молоко

Реактивы: 3%-й раствор уксусной кислоты, 3%-й CuSO_4 , концентрированные кислоты: HNO_3 , H_3PO_4 , H_2SO_4 , насыщенный раствор сульфата аммония, 1%-й раствор NaOH , 10%-й раствор NaOH .

Оборудование: пробирки, мерный цилиндр, воронка, фильтровальная бумага.

2.2. Порядок выполнения работы

2.2.1. Реакции осаждения белков

а) в 2 пробирки (№1 и №2) наливают по 2,5 мл молока и добавляют:
 - в первую пробирку 5 мл дистиллированной воды и после перемешивания по каплям 0,5 мл 3%р-ра уксусной к-ты.

- Во вторую несколько капель 3%-ра сульфата меди (6-7 капель, не меньше)!

Перемешиваем, оставляем на 5-10 минут. Наблюдаем за изменениями.

б) в сухую пробирку №3 наливают 1-2 мл концентрированную HNO_3 . Затем, наклонив пробирку от себя, осторожно, по стенке приливают из пипетки 1 мл молока, не смешивая с кислотой, наблюдают за изменениями. Осторожно встряхивают содержимое постукиванием пальцем по дну пробирки. Операцию повторяют с пробирками №4 и 5, используя кислоты H_3PO_4 и H_2SO_4 .

в) осадок, сформировавшийся в первой пробирке, отфильтровывают, промывают водой и оставляют на бумажном фильтре для проведения биуретовой реакции.

2.2.2. Обнаружение в белках пептидных связей

Биуретовая реакция. Осадок, полученный в эксперименте 2.2.1, растворяют на бумажном фильтре в пробирку двумя мл 1% раствора NaOH . К полученному раствору добавляют 1 мл 10% NaOH и 1-2 капли 3% раствора CuSO_4 .

3. ВЫВОДЫ

Лабораторная работа №2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ КАЗЕИНА МЕТОДОМ КИСЛОТНОГО ТИТРОВАНИЯ

Цель работы: определение массовой доли казеиновой фракции в исследуемом молоке методом кислотного титрования.

1. Теоретическая часть

В основе метода кислотного титрования лежит способность казеина нейтрализоваться щелочью по фрагментам аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также серинфосфатным. Для этого казеин в одной пробе молока осаждают разбавленной серной кислотой и гетерогенную систему непосредственно титруют раствором щелочи (без фильтрования). В другой пробе казеин осаждают и отфильтровывают, а полученный фильтрат без казеина вновь титруют. Количество казеина рассчитывают по разности раствора щелочи, пошедшего на оба титрования.

2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы, оборудование, реактивы:

Исследуемый материал: молоко

Реактивы: 0,05N р-р H₂SO₄, 0,1 N р-р NaOH, 2% спиртовой р-р фенолфталеина.

Приборы и посуда: конические колбы, пипетки, мерный цилиндр, бюретки для титрования, воронки, бумажный фильтр.

2.2. Порядок выполнения работы:

Исследуемое молоко в количестве 20 мл добавляют в коническую колбу объемом 200 мл, вливают 80 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Прибавляют по каплям при постоянном перемешивании из бюретки 0,05N р-р H₂SO₄ до тех пор, пока не выпадет большими хлопьями казеиновая фракция (обычно требуется 14-24 мл кислоты). Недостатка и избытка кислоты следует избегать. После того как сформировался осадок (через 15 минут), содержимое колбы фильтруют в коническую колбу.

Во время фильтрования берут другую коническую колбу, добавляют в нее 20 мл молока, 80 воды и из бюретки при перемешивании вливают такое же количество серной кислоты, сколько было добавлено при осаждении казеина в первой колбе. Затем, прибавив к гетерогенной смеси 3-5 капель фенолфталеина, титруют раствором NaOH до слабо-розовой окраски (выпавшие хлопья практически полностью растворяются).

По окончании фильтрования 100 мл фильтрата помещают в коническую колбу, прибавляют 3-5 капель фенолфталеина и титруют щелочью до слабо-розового окрашивания.

Расчетные формулы

Количество щелочи, пошедшей на титрование 100 мл фильтрата, пересчитывают на весь объем жидкости (общий объем жидкости складывается из количества молока, воды и серной кислоты) по формуле

$$x_1 = \frac{a(100+b)}{100}, \quad (1)$$

где a – количество 0,1 N раствора NaOH, пошедшего на титрование 100 мл фильтрата, мл; b – количество 0,05 N раствора H₂SO₄, прибавленное для осаждения казеина, мл.

Массовую долю казеина в молоке (%) рассчитывают по формуле

$$M = \frac{0,1131(x_2-x_1)}{20} 100, \quad (2)$$

где x_2 – количество 0,1 N раствора NaOH, пошедшего на титрование второй пробы (смеси с казеином), мл; x_1 – количество 0,1 N раствора NaOH, рассчитанного по формуле (1), мл; 0,1131 – количество казеина, эквивалентное 1 мл 0,1 N раствора NaOH, г (определено по калибровочному графику).

УГЛЕВОДЫ

Лабораторная работа №3

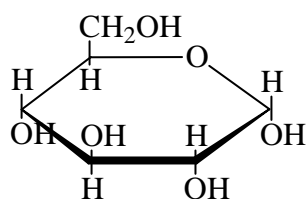
ИДЕНТИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ В РАСТВОРЕ

Цель работы:

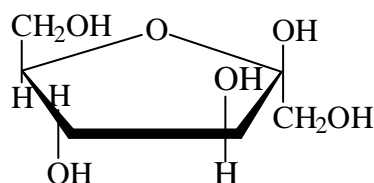
используя качественные реакции, идентифицировать углеводы в исследуемых растворах.

1. Краткие сведения из теории

В качестве исследуемых в работе используются растворы моносахаридов: глюкозы и фруктозы, а также дисахаридов: сахарозы и лактозы. Глюкоза относится к альдозам, фруктоза – к кетозам:

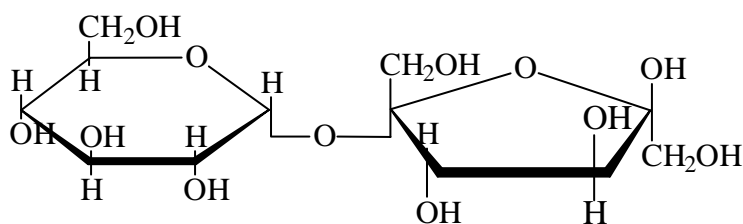


α -D-глюкоза



β -D-фруктоза

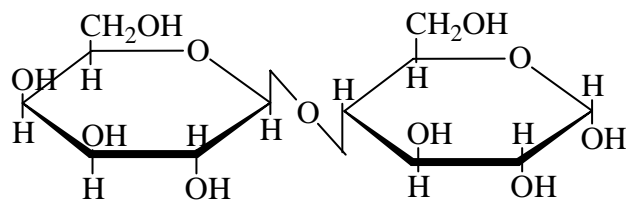
У сахарозы остаток β -D-фруктозы присоединяется к гликозидному радикалу α -D-глюкозы по месту своего гликозидного гидроксила с образованием α,β -1,2-гликозидной связи. По этому признаку сахарозу относят к гликозидо-гликозидам:



сахароза

У гликозидо-гликозидов типа сахарозы, где оба гликозидных гидроксила задействованы в образовании гликозидной связи, раскрытие цикла невозможно. По этой причине для них не свойственны реакции по альдегидной и кетонной группам. Гликозидо-гликозиды являются нередуцирующими (невосстанавливающими) дисахаридами.

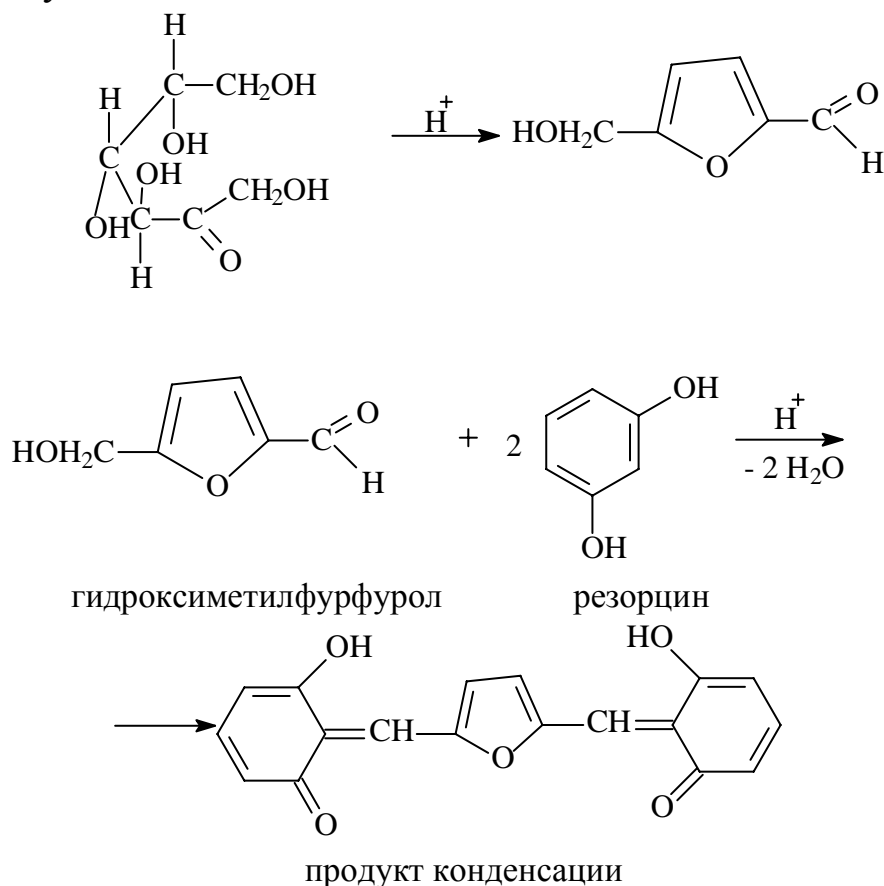
У лактозы остаток α -глюкозы присоединяется к гликозидному остатку β -галактозы по месту своего спиртового гидроксила с образованием α,β -4,1- гликозидной связи. Такие соединения относят к гликозидо-глюкозам. В них возможна кольчато-цепная таутомерия с образованием свободной альдегидной группы, в связи с чем гликозидо-глюкозы являются редуцирующими (восстанавливающими) дисахаридами:



лактоза

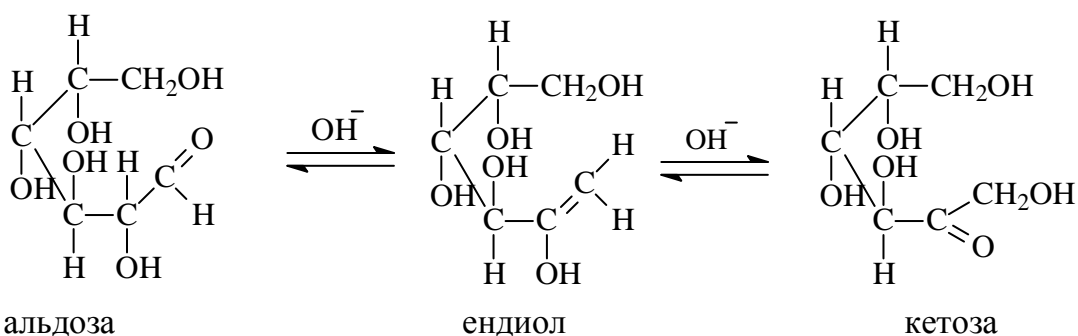
Растворы лактозы, в отличие от растворов сахарозы, мутаротируют.

Реакция Селиванова является качественной только на кетозы. В слабнокислой среде кетозы образуют гидроксиметилфурфурол существенно легче, чем альдозы. Конденсация гидроксиметилфурфуrolа с резорцином приводит к продуктам конденсации вишневого цвета:

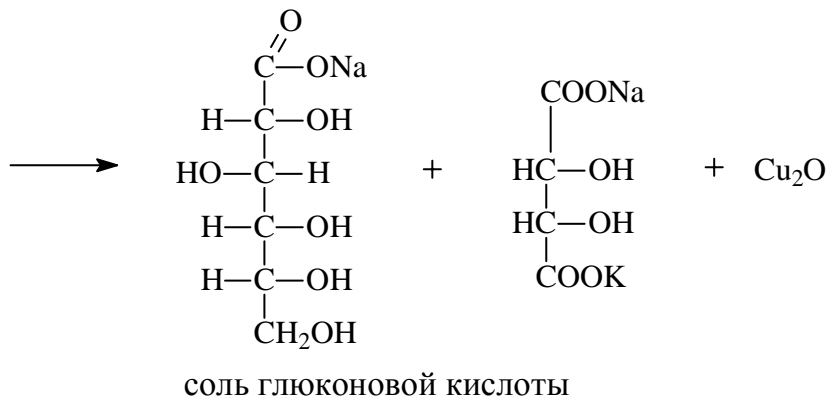
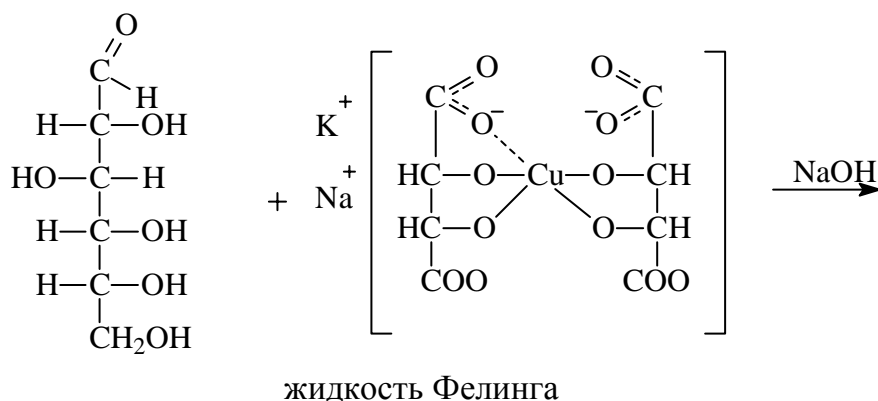


Реакция Селиванова характерна для и для полисахаридов, содержащих кетозы (например, для сахарозы). В присутствии соляной кислоты первоначально происходит гидролиз полисахаридов с образованием свободных кетоз.

В основе реакции с жидкостью Фелинга лежит способность углеводов, имеющих свободные альдегидные и кетонные группы, окисляться в щелочной среде. Хотя альдозы окисляются в целом легче кетоз, в щелочной среде это различие не проявляется, поскольку в присутствии щелочи легко происходит таутомерная изомеризация через эндиольную структуру:

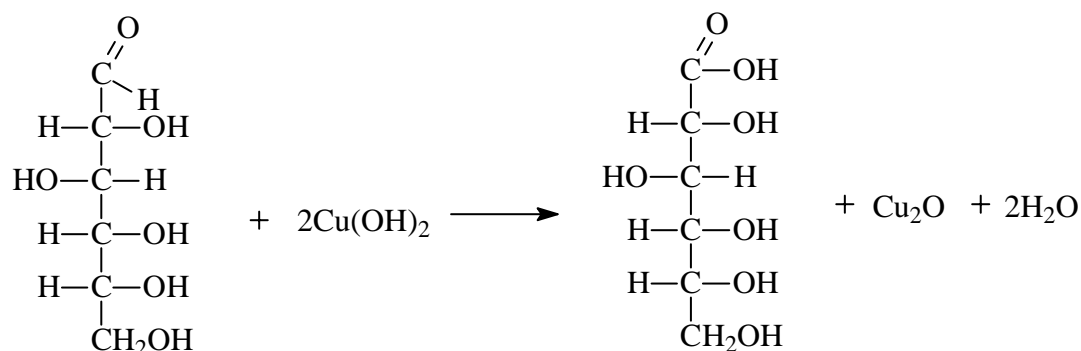


При мягком окислении жидкостью Фелинга образуются альдоновые кислоты, а ион Cu^{2+} восстанавливается до Cu^+ в форме закиси меди, выпадающей в виде ярко-красного осадка:



В реакции используется K, Na виннокислый (K, Na тартрат), который образует с ионом меди комплексную соль и тем самым препятствует образованию черного осадка окиси меди (II) при избытке сульфата меди в жидкости Фелинга. С полисахаридами реакция с жидкостью Фелинга может протекать лишь в том случае, если предварительно проведен их гидролиз до свободных кетоз или альдоз.

В еще более мягких условиях (в среде, близкой к нейтральной) восстанавливающей способностью будут обладать только альдозы. Типичной реакцией является реакция Троммера:



2. Экспериментальная часть

2.1.1. Материалы, реактивы, оборудование:

Оборудование: Пробирки, пипетки

Реактивы: Жидкость Фелинга (15 мл 4%-й CuSO_4 и 15 мл сегнетовой соли), 2% р-ры глюкозы, сахарозы, лактозы и фруктозы, 20% соляная кислота, резорцин, 1% р-р NaOH , 2% р-р CuSO_4 .

2.2. Порядок выполнения работы

2.2.1. Реакция с жидкостью Фелинга

Из каждой пробирки с исследуемыми растворами углеводов отбирают по 1 мл. К 1 мл исследуемого раствора приливают 5 мл жидкости Фелинга и нагревают в течение нескольких минут до выпадения осадка, который появится, если в растворе моносахарид или редуцирующий дисахарид.

Результаты занести в табл.2.

2.2.2. Реакция Селиванова

Из каждой пробирки с исследуемым раствором отбирают по 0,1 мл. К углеводу добавляют 5 мл 20% раствора соляной кислоты и несколько кристаллов резорцина. Смесь нагревают. В пробирке, содержащей кетозы, появится вишневое окрашивание.

Результаты занести в табл. 2.

2.2.3. Реакция Троммера

Отбирают по 0,2 мл исследуемого раствора углеводов. К каждому раствору добавляют 6-8 капель 1% раствора NaOH . Затем, по каплям 2% р-р CuSO_4 до образования голубого, нерастворимого в воде осадка $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Смесь нагревают. Голубой осадок постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди (раствор содержит свободную альдегидную группу). В случае кетоз голубая окраска переходит в желтую, но ярко-красный осадок не образуется.

Результаты занести в табл. 2.

3. ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований по идентификации углеводов представить в табл. 2,3.

Таблица 2

Результаты проведения качественных реакций

Реакции	Исследуемые растворы (номер пробирки)			
	1	2	3	4
С жидкостью Фелинга				
Селиванова				
Троммера				

Таблица 3

Результаты идентификации углеводов

№ пробирки	Признаки исследуемых растворов						Название углевода
	Углевод	Моносахарид	Кетоза	Альдоза	Дисахарид		
					Редуц.	Нередуц.	
1							
2							
3							
4							

Приложение. Жидкость Фелинга.

Готовят отдельно два раствора, которые перед употреблением смешивают в равных объемах:

1) 20 г сегнетовой соли и 15 г NaOH растворяют в мерной колбе на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой;

2) 4 г CuSO_4 растворяют в мерной колбе на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

Лабораторная работа №4

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА.
ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
 α – АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ**

Цель работы: определить активность амилазы слюны по Вельгемуту; рН-оптимум при 37°C; исследовать активирующее и ингибирующее действие добавок солей на каталитическую активность амилазы слюны.

1. Краткие сведения из теории

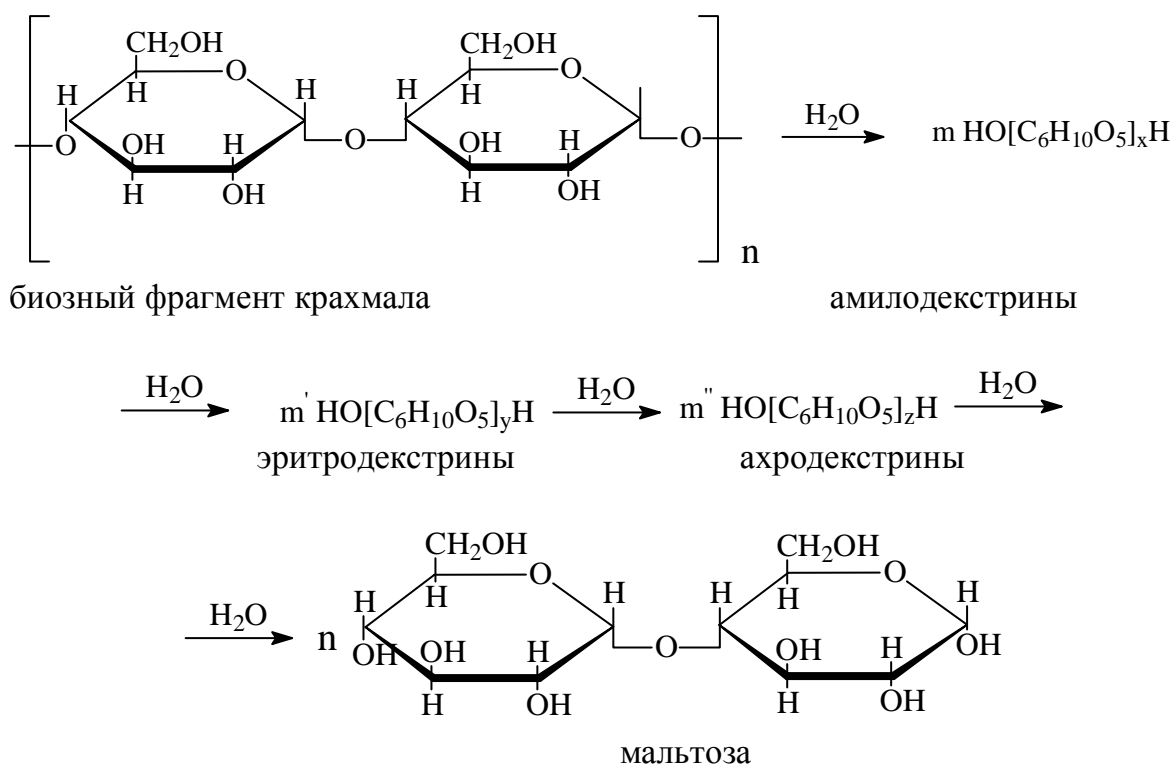
Амилазы – ферменты 3-го класса гидролаз, 2-го подкласса гликозидаз, ускоряющие реакции гидролиза 1,4- и 1,6-гликозидных связей, подкласс 1. В природе существует несколько типов амилаз: глюкоамилаза, или γ -амилаза; β -амилаза; α -амилаза; амило-1,6-глюкозидаза. Характер-

ной особенностью амилаз является отсутствие абсолютной специфичности. При их участии гидролизуются различные соединения: крахмал, гликоген, олигосахариды и родственные им вещества, построенные из остатков α -D-глюкозы, связанных 1,4 и 1,6-гликозидными связями.

α -Амилаза – водорастворимый глобулярный белок, металлопротеин, содержащий в качестве кофактора ионы кальция, при их отсутствии фермент инактивируется. α -амилаза – четко выраженный эндо-фермент. Она действует на внутренние α -1,4-О-гликозидные связи в любой части молекулы крахмала без какого-либо определенного порядка.

В зависимости от характера ферментов разрыв гликозидных связей может происходить в различных положениях, в соответствии с чем, конечными продуктами гидролиза могут быть либо глюкоза (γ -амилаза), либо β -мальтоза (β -амилаза), либо α -мальтоза (α -амилаза), либо олигосахариды. Промежуточные продукты гидролиза полисахаридов называются декстринами.

В качестве главного конечного продукта гидролиза крахмала при участии α -амилазы слюны образуется α -мальтоза; в дисахаридах 1,4-гликозидная связь под действием амилазы слюны не гидролизуеться:



Степень гидролиза крахмала можно контролировать, используя качественную реакцию с йодом. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекулы (величины x, y, z) окрашиваются йодом в разные цвета – от фиолетового до красно-бурого. Конечный продукт гидролиза крахмала – мальтоза – раствором йода не окрашивается.

За единицу активности амилазы принимают количество фермента, необходимое для расщепления 1 мл 0,1% раствора крахмала за 30 минут при 37°C. Единица активности амилазы, определенная таким образом, называется амилазной единицей Вельгемута и обозначается – А 37°/30. Определение активности амилазы слюны по Вельгемуту основано на нахождении максимального разведения слюны (или другой биологической жидкости), при которой происходит полное расщепление крахмала.

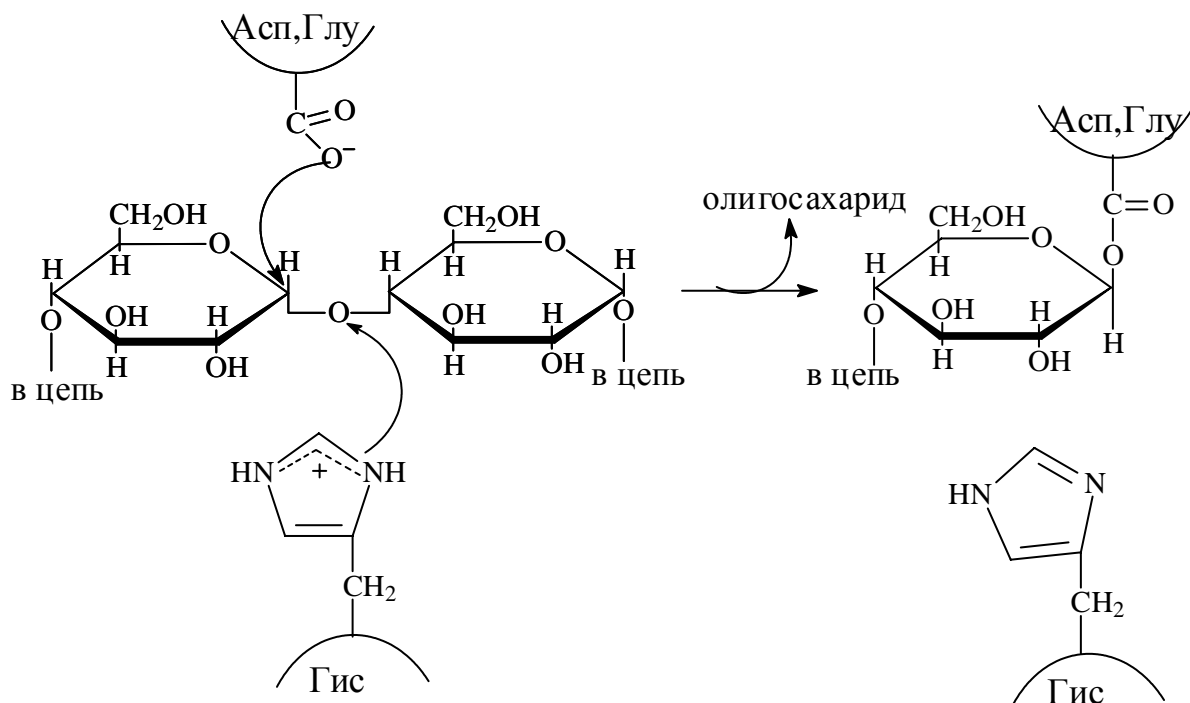


Рис. 1. Схема образования фермент-субстратного комплекса

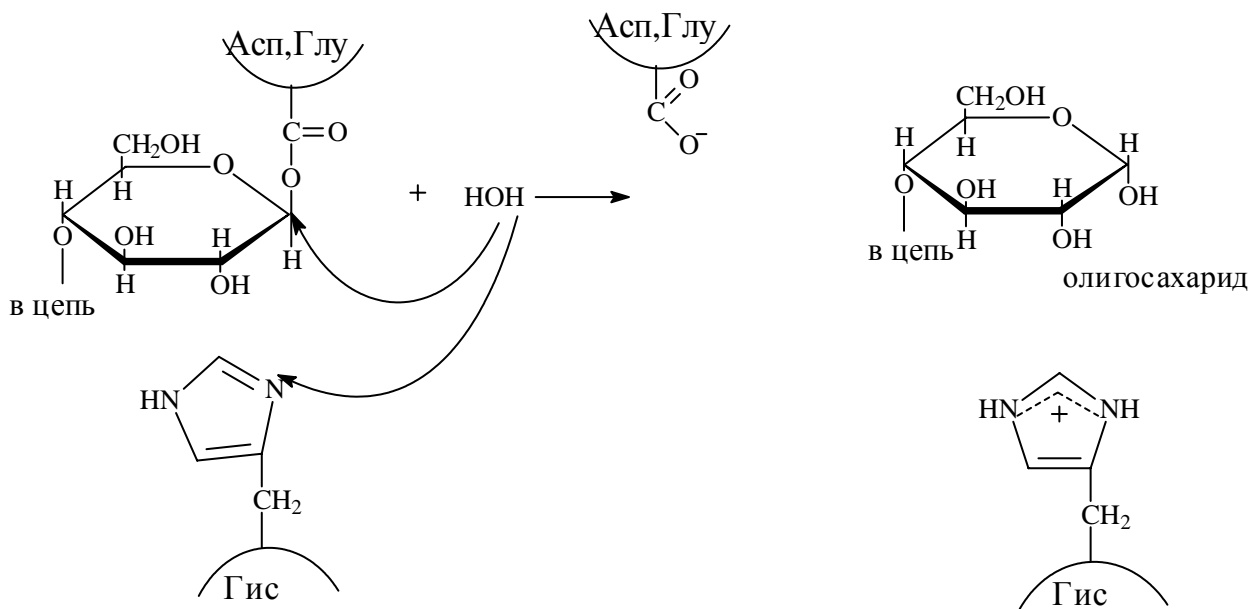


Рис. 2. Схема разложения фермент-субстратного комплекса

Для каждого фермента существует оптимальное значение рН, при котором он наиболее активен. Поскольку каталитический центр амилазы образован остатками COO^- и протонированным фрагментом гистидина (рис.1,2), то влияние рН, определяющего степень ионизации функциональных групп Гис, Асп, Глу, на каталитическую активность амилазы имеет достаточно большое значение. Величина рН, при которой наблюдается максимальная скорость реакции, называется рН-оптимумом. Оптимум рН действия амилазы слюны определяют по взаимодействию ее с крахмалом при различных значениях рН среды.

Действие ферментов может усиливаться веществами, называемыми активаторами. Вещества, снижающие каталитическую активность фермента, называются ингибиторами.

2. Экспериментальная часть

2.1. Количественное определение активности амилазы слюны по Вельгемуту

2.1.1. Материалы, реактивы, оборудование:

Оборудование: Пробирки, пипетки, мерный цилиндр, термостат, баня со льдом

Реактивы: 0,1% р-р крахмала, 1% р-р I_2 в йодистом калии, дистиллированная вода.

2.1.2. Порядок выполнения работы:

В пробирку собирают 1 мл слюны (рот ополаскивают дистиллированной водой) и доводят до метки 10 мл дистиллированной водой (разведение 1:10).

В шесть пронумерованных пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды. В первую вносят 1 мл разведенной в 10 раз слюны. Раствор тщательно перемешивают и 1 мл смеси добавляют в пробирку №2, раствор перемешивают и из пробирки №2 добавляют 1 мл в пробирку №3 и т.д. до пробирки №6, из которой после перемешивания отбирают 1 мл и выливают в слив. Таким образом, в каждой пробирке остается по 1 мл раствора слюны следующих разведений:

№ пробирки	1	2	3	4	5	6
Разведение	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640

В каждую пробирку вносят по 2 мл 0,1%-го раствора крахмала и термостатируют при 37°C в течение 30 минут. После чего пробирки охлаждают в бане со льдом до $10-15^\circ\text{C}$ и добавляют в каждую пробирку по одной капле 1%-го раствора йода в KI и тщательно перемешивают.

В пробирках, где синее окрашивание, расщепления крахмала не произошло. Для расчета амилазной активности принимают во внимание последнее разведение, при котором после добавления йода не появился синий цвет. Например, это четвертая пробирка, а в пятой уже синее окрашивание. Следовательно, расчет активности амилазы следует вести по разведению 1:160.

2.1.3. Расчет активность амилазы

Если для гидролиза 2 мл 0,1%-го раствора крахмала потребовалось 1/160 мл разведенной слюны, то 1 мл неразведенной слюны в тех же условиях может расщепить x мл крахмала:

1 мл слюны – x мл крахмала,

1/160 мл слюны – 2 мл крахмала,

Следовательно, $A_{37^\circ/30} = 320$ ед., т.е. 1 мл неразбавленной слюны может расщепить 320 мл 0,1%-го раствора крахмала за 30 минут при 37°C .

2.2. Влияние pH среды на активность амилазы слюны

2.2.1. Материалы, реактивы, оборудование:

Оборудование: Термостат, пробирки, пипетки.

Реактивы: 0,2М р-р Na_2HPO_4 , 0,1М р-р лимонной кислоты, 0,5% раствор крахмала, 0,1% р-р йода в KI.

2.2.2. Порядок выполнения работы:

В шести пронумерованных пробирках готовят буферные растворы, имеющие pH от 5,6 до 7,8.

Таблица 4

Приготовление буферных смесей

Раствор, мл \ №проб.	1	2	3	4	5	6
0,2М Na_2HPO_4	0,58	0,63	0,69	0,77	0,87	0,94
0,1М лимон.к-та	0,42	0,37	0,31	0,23	0,13	0,06
pH	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,8

В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5%-го раствора крахмала и по 10 капель слюны, разведенной в 10 раз. Содержимое пробирок перемешивают и термостатируют при 37°C 10 минут. После чего из четвертой пробирки, значение pH которой считается оптимальным, отбирают 5 капель смеси и добавляют одну каплю 0,1%-го раствора йода. Если синее окрашивание, то термостатируют еще 5 мин и повторяют пробу с йодом. Эту операцию повторяют до тех пор, пока окрашивание не станет красным или оранжевым. В этом случае в каждую из пронумерованных пробирок добавляют по одной капле 0,1%-го раствора йода, перемешивают и наблюдают окрашивание. Записывают результаты в табл. 5. Оптимальное значение pH для амилазы будет в той пробирке, в которой крахмал полностью расщепился до мальтозы, т.е. желтая окраска.

Определение оптимального значения рН

рН	5,6	6,0	6,4	6,8	7,2	7,8
Окрас раствора						

Оптимальная величина рН для амилазы слюны будет в той же пробирке, в которой крахмал полностью расщепился до мальтозы, т.е. наблюдается желтая окраска.

3. ВЫВОДЫ

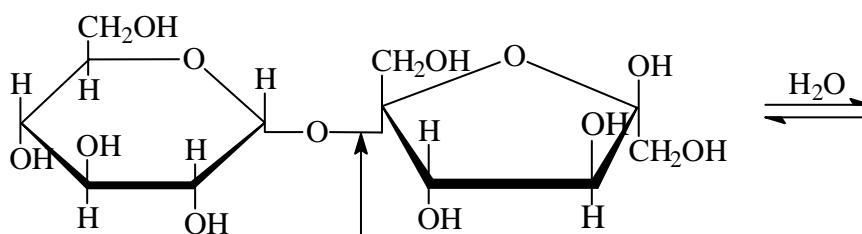
Лабораторная работа №5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАЛЬСИФИКАЦИИ НАТУРАЛЬНОГО МЕДА

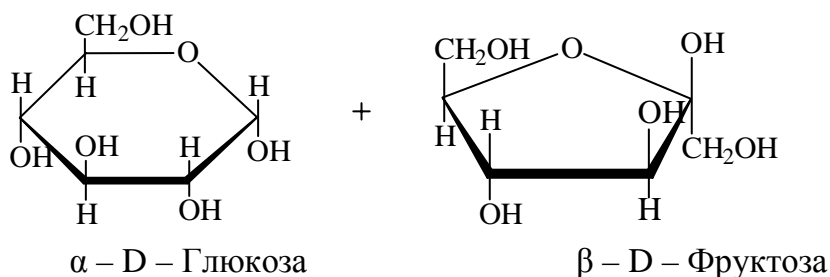
Цель работы: определить наличие инвертного сахара (искусственного меда) в исследуемой пробе меда.

1. Краткие сведения из теории

Пчелиный мед – сладкое сиропообразное вещество, вырабатываемое медоносной пчелой обычно из цветочного нектара. В цветочном меде примерно 13 – 20 % воды, 75 – 80 % углеводов, в качестве минорных компонентов – минеральные и ароматические вещества, органические кислоты, витамины, ферменты. И если углеводы, особенно фруктоза, определяют сладость меда, то минорные вещества – лечебные, биологически активные и такие органолептические свойства, как уникальный запах и цвет. Соотношение между глюкозой и фруктозой в меде равно 1:1. Смесь моносахаридов в таком соотношении образуется в результате гидролиза сахарозы под действием фермента, вырабатываемого пчелами – β -фруктофуранозидазы (часто используют также названия сахараза, инвертаза):



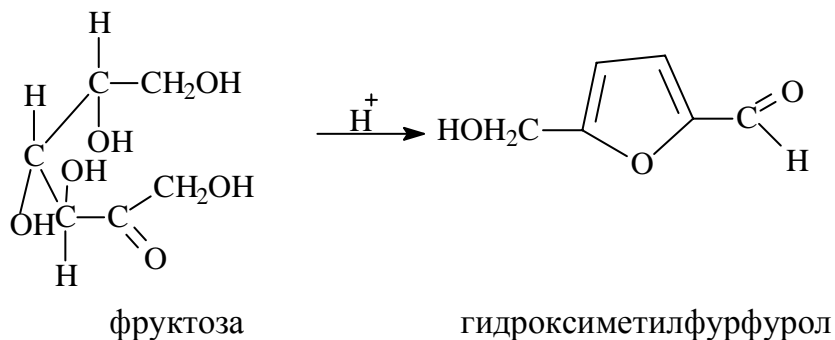
Ферментативный гидролиз сахарозы β -фруктофуранозидазой



Полученная смесь моносахаридов вращает плоскость поляризации не вправо, а влево. Такое преобразование правовращающей сахарозы в левовращающую смесь моносахаридов называется инверсией, а саму смесь инвертированной сахарозой (инвертным сахаром).

В промышленных условиях гидролиз сахарозы проводят химическим способом с использованием в качестве катализатора неорганических или органических кислот. Обычно для приготовления инвертного сиропа (инвертный сироп – это водный раствор смеси равных количеств глюкозы и фруктозы), содержащего 76 – 78 % редуцирующих сахаров, применяют 80 %-й раствор сахара, а в качестве катализатора соляную или одну из органических кислот – винную, лимонную, молочную, уксусную. Количество добавляемой соляной кислоты в зависимости от качества сахара изменяется в пределах 0,015 – 0,03 % от массы сахара.

Кислоту добавляют в сахарный сироп при повышенной температуре, обычно 90°C, в виде 10 %-го раствора. Хотя продолжительность инверсии невысокая, в кислой среде при повышенной температуре всегда в качестве побочных образуются продукты разложения фруктозы и глюкозы. Одним из таких продуктов является гидроксиметилфурфурол, причем фруктоза в кислой среде при нагревании образует его существенно легче, чем глюкоза:



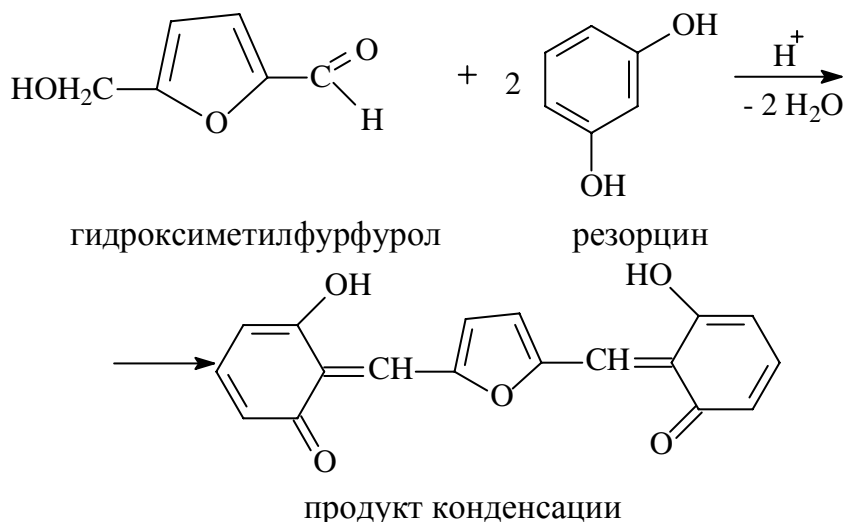
По завершении процесса инверсии полученный сироп охлаждают и нейтрализуют основное количество кислоты 10%-м раствором соды (инвертный сироп должен иметь слабокислую реакцию).

Химический состав инвертного сиропа непостоянен и зависит от условий инверсии: качества сахарного песка, природы и концентрации кислоты-катализатора, температуры, продолжительности реакции и других факторов. В среднем инвертный сироп содержит редуцирующих сахаров (глюкоза+фруктоза) 76-78%, сахарозы 1-3%, воды 19-20% и небольшое количество продуктов распада глюкозы и фруктозы, в том числе гидроксиметилфурфура.

Поскольку углеводный состав инвертного сиропа идентичен натуральному меду, то это свойство используется при его фальсификации. При производстве коммерческих образцов меда смешивают инвертный сироп,

полученный методом кислотного гидролиза сахарозы, с натуральным медом, при этом органолептические свойства (запах и цвет) часто сохраняются, хотя они выражены менее ярко, чем в натуральном продукте. Определить в этом случае наличие инвертного сиропа можно только химическим способом, который основан на обнаружении в исследуемом образце меда гидроксиметилфурфура.

Идентификация гидроксиметилфурфура основана на образовании окрашенного в красный цвет продукта конденсации гидроксиметилфурфура с резорцином в кислой среде:



2. Экспериментальная часть

Оборудование и посуда: электрическая плитка, фарфоровая чашка и пестик, мерный цилиндр, пипетка.

Реактивы: мед, диэтиловый эфир, 1%-й раствор резорцина в концентрированной соляной кислоте.

Порядок выполнения работы:

В сухую фарфоровую ступку помещают около 10 мл исследуемого меда (3 чайные ложки) и 15 мл сухого диэтилового эфира. Содержимое тщательно перемешивают. Эфирную вытяжку декантируют (сливают) с меда в сухую фарфоровую чашку, а в ступку вносят новую порцию диэтилового эфира в том же количестве и снова тщательно перемешивают. Эфирные вытяжки объединяют в фарфоровой чашке и эфир полностью выпаривают под тягой при температуре не выше 30°C. К сухому остатку добавляют 2-3 капли раствора резорцина и наблюдают изменение окраски в течение 20 минут. Красная окраска свидетельствует о наличии гидроксиметилфурфура и, следовательно, о фальсификации исследуемого меда. В случае натурального меда при действии резорцина допускается появление зеленовато-желтой, темно-желтой, грязно-зеленой окраски.

3. ВЫВОДЫ.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1.П
Значения рКа кислотных групп α-аминокислот*

Аминокислота	-COOH	-NH ₃	Функциональная группа бокового фрагмента
Аланин (Ала)	2,35	9,87	
Аргинин (Арг)	1,82	8,99	12,48
Аспарагин (Асп)	2,14	8,72	
Аспарагиновая кислота (Асп)	1,99	9,90	3,90
Валин (Вал)	2,29	9,74	
Глицин (Гли)	2,35	9,78	
Глутамин (Глн)	2,17	9,14	
Глутаминовая кислота (Глу)	2,10	9,47	
Гистидин (Гис)	1,80	9,33	6,04
Изолейцин (Иле)	2,32	9,76	
Лейцин (Лей)	2,33	9,74	
Лизин (Лиз)	2,16	9,06	10,54
Метионин (Мет)	2,13	9,28	
Пролин (Про)	1,95	10,64	
Серин (Сер)	2,19	9,21	
Тирозин (Тир)	2,20	9,21	10,46
Треонин (Тре)	2,09	9,10	
Триптофан (Три)	2,46	9,41	
Фенилаланин (Фен)	2,20	9,31	
Цистеин (Цис)	1,92	8,37	10,70

* Досон, Р. Справочник биохимика/ р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова, Т.Н. Введение в биохимию. Ч.1: учеб.пособие / Т.Н.Соколова, В.Р.Карташов / НГТУ; Н.Новгород, 2002. 281 – с.
2. Филлипович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филлипович. – М.: Изд-во «Агар», 1999. – 512 с.
3. Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. Т.1.-367 с.; Т.2.- 368 с.; Т.3. – 320 с.
4. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия / Д.Г. Кнорре, С.Д.Мызина. – М.: Высшая школа, 2000. – 279 с.
5. Комов, В.П. Биохимия / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004.- 640 с.
6. Щербаков, В.Г. Биохимия / В.Г. Щербаков [и др.]. – СПб.: ГИОРД, 2003. – 440 с.
7. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.Г. Рем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
8. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами; под ред. Е.С. Северина, А.Я. Николаева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 448 с.
9. Досон, Р. Справочник биохимика / р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.