


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Биотехнологий»

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«16» марта 2020г., протокол №8

Заведующий кафедрой

 О.Н. Понаморева

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Биохимия»**

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата**

по направлению подготовки
49.03.01 Физическая культура

с направленностью (профилем)
Физкультурно-оздоровительные технологии

Формы обучения: очная, заочная

Идентификационный номер образовательной программы: 490301-01-20

Тула, 2020 г.

Разработчик методических указаний

С.В. Алферов, доцент каф. БТ, доцент, к.хим.н.
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

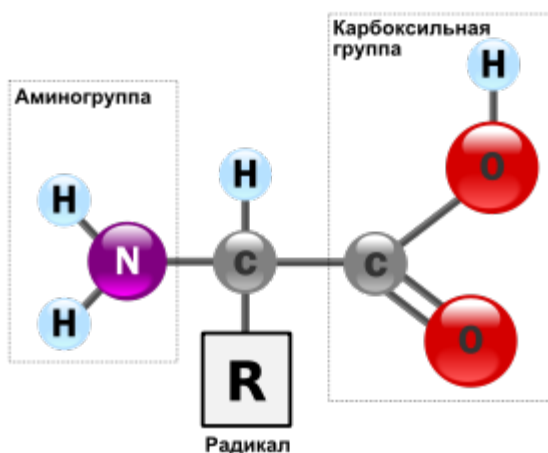
Раздел I. БЕЛКИ

Белки или *протеины* (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие») – это биологические полимеры, состоящие из α -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Белки делятся на простые и сложные. *Простые белки* состоят только из аминокислотных остатков. *Сложные белки* помимо пептидных цепей содержат в своем составе простетические группы – небелковые вещества, различные по химическому строению (нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, ионы металлов и др.).

Белки, количественно преобладают над всеми макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов.

Разнообразие существующих в природе белков определяется аминокислотным составом. Все 20 аминокислот, встречающихся в белках, характеризуются общей структурной особенностью – наличием карбоксильной и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода. Различаются же аминокислоты боковыми цепями (R-группами). Общая формула α -аминокислот:



Белки имеют несколько уровней структурной организации: первичный, вторичный, третичный и в некоторых случаях четвертичный.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков

Цель работы – Сравнить питательную ценность различных белков.

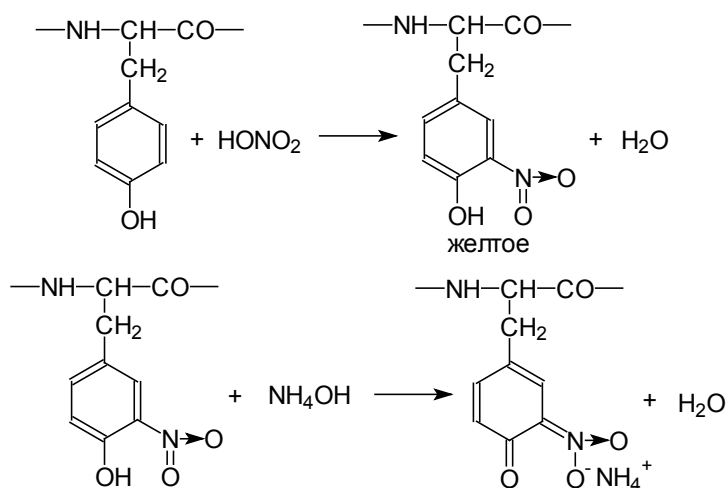
Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот. Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты.

Материал исследования: раствор яичного белка, раствор желатина (коллаген).

Опыт 1. *Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)*

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии ароматических аминокислот в белках (фенилаланина, триптофана, тирозина), поэтому она является качественной на *ароматические аминокислоты*.

При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание за счет образования нитропроизводных ароматических аминокислот. При подщелачивании раствором аммиака желтое окрашивание переходит в оранжевое (образуются аммонийные соли хиноидной структуры):



Реактивы и оборудование: концентрированная азотная кислота; концентрированный раствор аммиака; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В разные пробирки наливают по 0,5 мл растворов белков. Во все пробирки добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают на водяной бане. Пробирки охлаждают, к охлажденным растворам осторожно прибавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака.

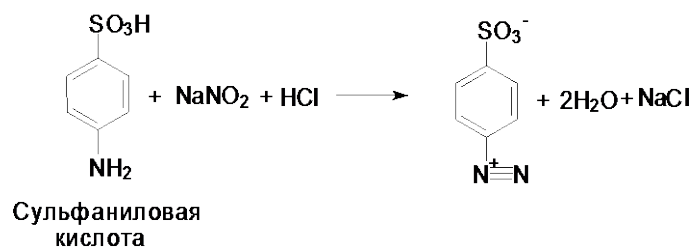
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора			
	Исходный раствор	После добавления HNO_3	После нагревания	После нейтрализации

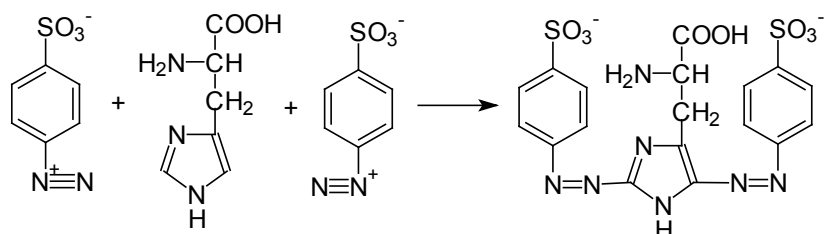
По результатам опыта делают вывод о содержании ароматических аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 3. Реакция на гистидин и тирозин (Паули)

При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота.



При реакции последней с гистидином или тирозином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, пробирки, пипетки.

Ход работы.

1. В двух пробирках смешивают по 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и по 2 мл раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают. Затем в каждую пробирку добавляют 2 мл анализируемых растворов белков и по 6 мл раствора соды.
2. Описанная выше реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству диазореактива (соотношение компонентов см. выше) добавляют несколько капель 10% раствора соды и осторожно по стенке пробирки наслаивают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется окрашенное кольцо.

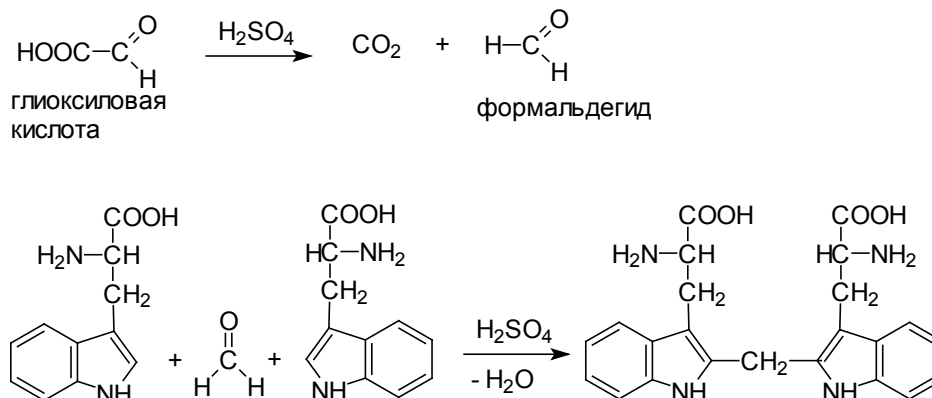
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

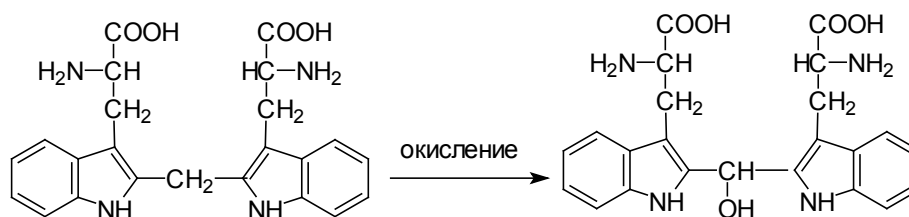
По результатам опыта делают вывод о содержании гистидина или тирозина в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на триптофан (Гопкинса-Коле или Адамкевича)

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты.



Продукт конденсации окисляется, в присутствии минеральных кислот образуются окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).



Реактивы и оборудование: раствор глиоксиловой кислоты¹; 0,04М раствор сульфата меди (II); концентрированная серная кислота, концентрированная соляная кислота, ледяная уксусная кислота, кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают 0,5 мл растворов исследуемых белков. В каждую пробирку добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл раствора глиоксиловой кислоты и по 10 капель раствора сульфата меди (II), перемешивают, и нагревают до растворения образующегося осадка. После охлаждения пробирки приливают 1 мл концентрированной соляной кислоты. Осторожно приливают небольшими порциями по стенкам пробирок 2-3 мл

¹ Глиоксиловая кислота. К 2 г магния в порошке, слегка увлажненного, приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного при 0°C насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды. Фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 200 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.

концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешались. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

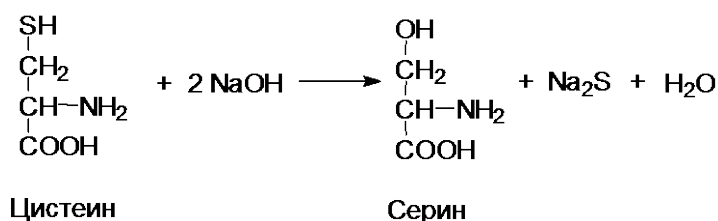
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 5. Реакция на «слабосвязанную серу» в белке (реакция Фоля)

При кипячении цистеина и цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, образующего сульфид натрия:



Образование сульфид-ионов можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих нерастворимый сульфид PbS черного цвета:



Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия; 1% раствор ацетата свинца; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов анализируемых белков. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора гидроксида натрия и по 2-3 капле раствора ацетата свинца и нагревают пробирки на кипящей водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Работа 2. Осаждение белков. Денатурация белков.

Белки могут быть высажены из раствора не только под действием сильных электролитов, но и с помощью других методов, например: добавлением к раствору белка солей тяжелых металлов, минеральных кислот, а также при нагревании.

Осадочные реакции на белки применяются для обнаружения и количественного определения белков в различных субстратах.

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 10 % раствор ацетата свинца, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, водяная баня, штатив с пробирками.

Опыт 1. *Осаждение белков солями тяжелых металлов*

Ход работы. В пробирку к 0,5 мл раствора белка прибавить несколько капель раствора ацетата свинца. При этом происходит помутнение раствора.

Опыт 2. *Осаждение белков при нагревании*

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного альбумина.

1. В первую пробирку добавляют 1-3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется.

2. К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает хлопьевидный осадок. Это объясняется тем, что при добавлении к коллоидному раствору белка кислоты мицеллы теряют заряд, белок при этом находится в изоэлектрическом состоянии.

3. Содержимое третьей пробирки нагревают на водяной бане до помутнения раствора.

4. В четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется.

5. В пятую пробирку добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают. Выпадает осадок белка.

Оформление работы. Результаты опытов занести в таблицу. Объяснить наблюдаемые явления.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения
1	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	
2	Кислая (10% раствор CH_3COOH)	
3	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)	
4	Нейтральная	
5	Щелочная (10% раствор NaOH)	
6	Кислая (10% раствор CH_3COOH) + насыщенный раствор NaCl	

РАЗДЕЛ 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков в биологических жидкостях чаще всего используются спектральные методы исследования: *фотоколориметрия и спектрофотометрия*, а также – *рефрактометрический метод*.

Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина.

Прямой спектрофотометрический метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200-220 нм и при 280 нм (зона поглощения ароматических аминокислот).

Рефрактометрический метод основан на изменении показателя преломления раствора в зависимости от концентрации белка в нем.

Работа 3. Количественное определение белка по методу Лоури

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков, научиться определять низкие содержания белков в анализируемых образцах по градуировочному графику.

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наибольшей чувствительностью обладает метод Лоури. Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются, по меньшей мере, две цветные реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакциях восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Вторая реакция не очень специфична, но весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в

сильно разбавленных растворах (всего несколько десятков микрограммов от 10 до 200 мкг/мл).

Метод Лоури менее специфичен, чем биуретовый, поскольку на интенсивность окраски влияют многие вещества, которые могут содержаться в тканях или в буферных системах, применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому для получения абсолютных данных градуировочный график следует строить по тому же белку, который необходимо определить в растворе.

Материал исследования: биологические жидкости (в определяемом объеме должно находиться от 10 до 100 мкг белка).

Реактивы и оборудование: стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин), реактив А (2% раствор карбоната натрия в 0,1 н растворе гидроксида натрия), реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия), реактив Фолина², фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В - (раствор С), реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200 мкг/мл, готовят растворы белка с разной концентрацией, как показано в таблице.

№ пр.	станд. 200 мкг/мл раствор БСА, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Содержание белка в пробе, мкг
р-р сравнения	-	1,00	0	0
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	40	40
3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160

² Реактив Фолина. В круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ного раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, затем прибавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой и фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Его хранят в темной склянке и перед употреблением разбавляют дистиллированной водой 1 : 1.

5	1,00	-	200	200
---	------	---	-----	-----

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5 мл разведенного в 2 раза реактива Фолина тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°С на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на фотометре при длине волны 700 нм.

По результатам измерений строят градуировочный график с использованием компьютерных программ (Microsoft Excel или SigmaPlot) и определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Описать принцип метода Лоури. Результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь. Рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод по работе.

РАЗДЕЛ 3. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) – это биологические катализаторы, представляющие собой простые или сложные белки. Простетическая группа сложных белков может быть представлена ионами металлов (*кофакторы*) или различными органическими соединениями (*коферменты*).

Наука, занимающаяся изучением ферментов, называется *энзимологией*.

В трехмерной структуре фермента различают ряд участков, выполняющих определенные функции. Связывание и химическое превращение субстрата происходит в *активном центре* фермента, в котором различают *связывающий* и *каталитический* участки. *Регуляторный* или *аллостерический* центр фермента служит для модификации фермента под действием различных эффекторов.

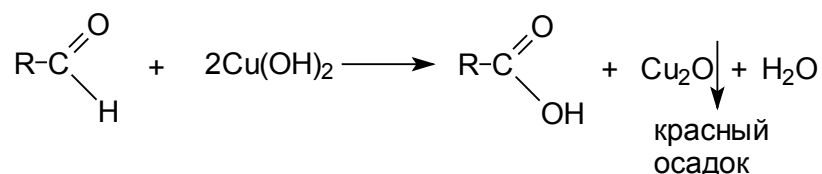
Ферменты содержатся во всех тканях, клетках и биологических жидкостях. Без них не осуществляется ни один химический процесс в организме.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Работа 4. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия, что обусловлено особенностями строения и механизмом их действия.

Под действием фермента амилазы слюны в ротовой полости начинается процесс переваривания углеводов. Этот фермент эффективно катализирует гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-связей в молекуле крахмала, расщепляя полисахарид на олигосахариды и дисахариды - мальтозу и изомальтозу. Мальтоза и изомальтоза являются восстанавливающими дисахаридами могут быть обнаружены по реакции Троммера:



Негидролизированный крахмал можно обнаружить по реакции с йодом, который взаимодействует с крахмалом с образованием синего комплекса.

Ионы водорода (H^+) также являются катализаторами процесса гидролиза. Однако, их действие менее эффективно и неспецифично. В результате гидролиза образуется смесь олигосахаридов и глюкозы. Глюкоза также дает реакцию Троммера.

Цель работы – сравнить эффективность биокатализаторов – ферментов с неорганическими катализаторами.

Материал исследования: раствор амилазы слюны (биологический катализатор), 10% раствор соляной кислоты (неорганический катализатор).

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат, кипящая водяная баня, раствор Люголя, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, крахмал 1% в 0,3% хлориде натрия, дистиллированная вода.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую - 1 мл 10% соляной кислоты, а в третью – 1 мл раствора амилазы. Пробирки 1 и 3 помещают в термостат при $t = 38^\circ\text{C}$, а пробирку 2 – в кипящую водяную баню. Через 15–20 мин все пробирки вынимают, охлаждают и из каждой берут пробы на крахмал и восстанавливающие сахара.

Для этого на предметное стекло наносят по капле раствора из трех пробирок и добавляют к каждой по капле раствора Люголя. По интенсивности окраски делают заключение о степени гидролиза.

Для определения восстанавливающих сахаров из каждой пробирки отбирают по 1 мл раствора и добавляют 0,5 мл раствора гидроксида натрия и 5 капель раствора сульфата меди. Нагревают пробирки до кипения.

Оформление работы. Наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	реакция на крахмал	реакция Троммера
Проба 1		
Проба 2		
Проба 3		

Работа 5. Влияние ингибиторов на активность ферментов

Цель работы – оценить влияние тяжелых металлов на активность ферментов

Ионы меди - ингибиторы фермента амилазы. При добавлении Cu^{2+} к реакционной смеси снижается скорость ферментативной реакции. Степень расщепления крахмала амилазой контролируют, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы слюны

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с температурой 40°C , 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди, реактив Люголя.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

1. В две пробирки наливают по 1 мл раствора крахмала. В одну пробирку добавляют 5 капель раствора сульфата меди, в другую - 5 капель воды, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора амилазы и засекают на секундомере время от начала реакции.

2. Полноту прохождения гидролиза контролируют по раствору в пробирке без ингибитора. Для этого через каждую минуту отбирают пипеткой каплю реакционной массы на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Как только начнет исчезать синее окрашивание в контрольном растворе, проверяют степень прохождения ферментативного гидролиза в пробирке с ингибитором.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

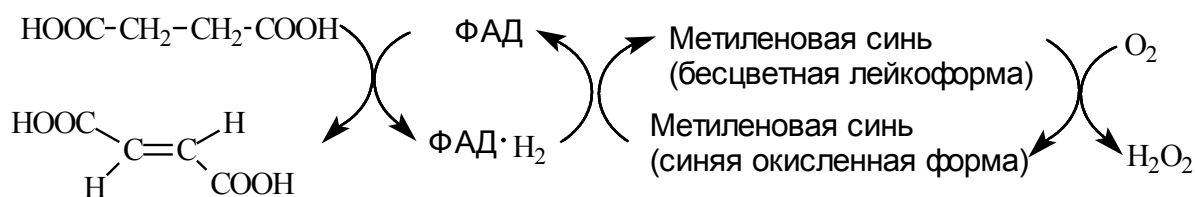
Фермент	Субстрат	Время инкубации, мин	Окраска раствора после добавления йода	
			без ингибитора	с ингибитором

Амилаза	Крахмал	1		
		2		
		3		
		4		

Работа 6. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназой активности

Цель работы – рассмотреть механизмы конкурентного ингибирования ферментов.

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином, одним из компонентов цепи переноса электронов. Этот фермент локализован в митохондриях. Субстратом сукцинатдегидрогеназы является янтарная кислота, которая окисляется до фумаровой кислоты. В роли искусственного акцептора атомов водорода выступает метиленовая синь. Окисленная форма метиленового синего окрашена в синий цвет, а восстановленная лейкоформа бесцветна. Малоновая кислота является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. При добавлении к реакционной смеси ингибитора, синяя окраска исчезает медленнее.



Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, 0,01 н раствор янтарной кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,01 н раствор малоновой кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,05% раствор метиленового синего, вазелиновое масло, фосфатный буфер (pH 6,8), ножницы, ступка, пробирки, пипетки, термостат.

Материал исследования: мышечная ткань.

Ход работы. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке. Полученную массу равномерно распределяют в три пробирки.

Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице:

№ пробы	Буфер (V, мл)	Янтарная кислота (V, мл)	H ₂ O (V, мл)	Малоновая кислота (V, мл)	Метиленовая синь (V, мкл)
---------	---------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------

1 (субстрат)	1	1	1	-	100
2 (субстрат и ингибитор)	1	1	-	1	100
3 (без субстрата и без ингибитора)	1	-	2	-	100

Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

В заполненные пробирки слоем около 1 см наливают вазелиновое масло, чтобы избежать окисления красителя кислородом воздуха. Пробирки помещают в термостат при 40 °С на 5-20 мин. (зависит от активности фермента).

Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, субстрат, ингибитор, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят в тетрадь таблицу, добавив графу с наблюдениями.

Раздел 4. ЛИПИДЫ

Работа 7. Обнаружение действия животной липазы и определение её активности

Цель работы - установить значимость фермента животной липазы для процесса пищеварения. Освоить метод определения активности животной липазы.

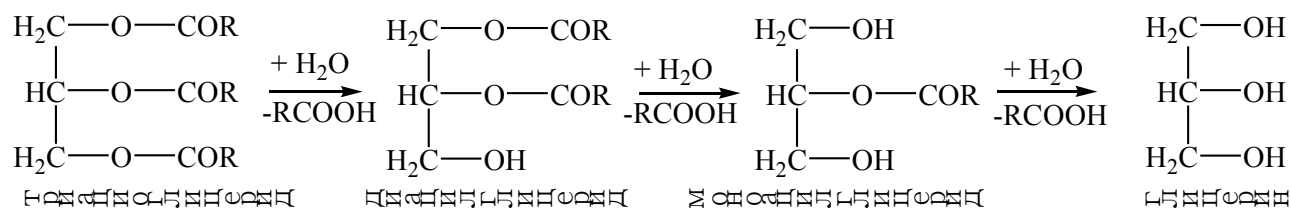
Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Панкреатическая липаза поступает в кишечник в виде неактивного предшественника – пролипазы. В просвете кишечника происходит активация пролипазы путем образования комплекса с низкомолекулярным белком – колипазой. Последняя присоединяется к пролипазе в молярном отношении 2:1. В результате липаза становится активной и устойчивой к действию трипсина.

Активная липаза катализирует гидролиз эфирных связей в $\alpha(1)$ - и $\alpha'(3)$ -положениях, в результате образуется β -моноацилглицерид и освобождаются две жирные кислоты. В панкреатическом соке помимо липазы содержится моноглицеридная изомераза – фермент, катализирующий внутримолекулярный перенос ацила из β -положения моноацилглицерида в α -положение. А эфирная связь в α -положении чувствительна к действию панкреатической липазы.

Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моноацилглицерида) всасываются в стенках кишечника. В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания. Липаза один из ферментов

подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, действуют в присутствии воды на сложно-эфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.



Значительная часть населения страдает ожирением, которое, в свою очередь, провоцирует развитие болезней сердечно-сосудистой системы. Для лечения этих заболеваний необходимо понимание механизма их развития, что невозможно без знания нормальных процессов обмена липидов.

Причиной расстройств метаболизма липидов в организме часто является нарушение их пищеварения и всасывания, что в значительной мере зависит от присутствия желчных кислот. Это сопровождается стеатореей (*повышенное выведения жиров из организма с калом*), развитием гиповитаминозов жирорастворимых витаминов.

Принцип метода: При воздействии липазы на эмульгированные жиры молока происходит их гидролиз. Гидролиз жира сопровождается образованием свободных насыщенных жирных кислот (пальмитиновая, миристиновая, стеариновая и т.д.), количество которых постоянно увеличивается. Их определяют титрованием NaOH в присутствии фенолфталеина, который при нейтрализации кислот приобретает слабо-розовый цвет.

Материал: молоко, разведенное водой в соотношении 1:10

Реактивы и оборудование: 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01н раствор NaOH; раствор панкреатина (6 мг/мл), содержащий липазу, колбы конические на 100 мл, пипетки, пробирки, бюретки, термостат.

Ход работы.

1. Определение кислотности молока.

В конические колбы наливают 5 мл разбавленного молока (1:10), добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (НЕ ПЕРЕТИТРОВАТЬ!!!). При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы. Данные 2 титрований записывают в таблицу.

2. Определение активности липазы

В 6 пробирок наливают по 5 мл разбавленного молока и 0,5 мл раствора панктеатина. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат (температура 38 -40 °С). Каждые 10 минут из термостата вынимают по 2 пробирки, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (интенсивность окраски должна быть одинаковой для всех проб). Данные титрования записывают в таблицу.

Промежуток времени	V (NaOH), мл		
	№1	№2	Средний
до начала гидролиза			
через 10 мин			
через 20 мин			
через 30мин			

Оформление работы. На основании полученных данных изобразите графически динамику расщепления жира липазой, где по оси абсцисс откладывают время в минутах, а по оси ординат – объемом 0,01н раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени, после предварительного вычитания количества щелочи, израсходованной на титрование контрольной пробы.

Выразите активность липазы как концентрацию карбоксильных групп жирных кислот, образовавшихся в 100 мл молока за все время исследования, пользуясь следующей формулой:

$$C = \frac{4,5 \times C_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH}}{V_{\text{молока}}}$$

где C - концентрация жирных кислот, образующихся в 100 мл молока (г/100мл);

C_{NaOH} - концентрация раствора NaOH (0,01н);

ΔV_{NaOH} — разность объемов раствора NaOH, израсходованный на титрование 5 мл молока за все время инкубации и контрольной пробы, мл;

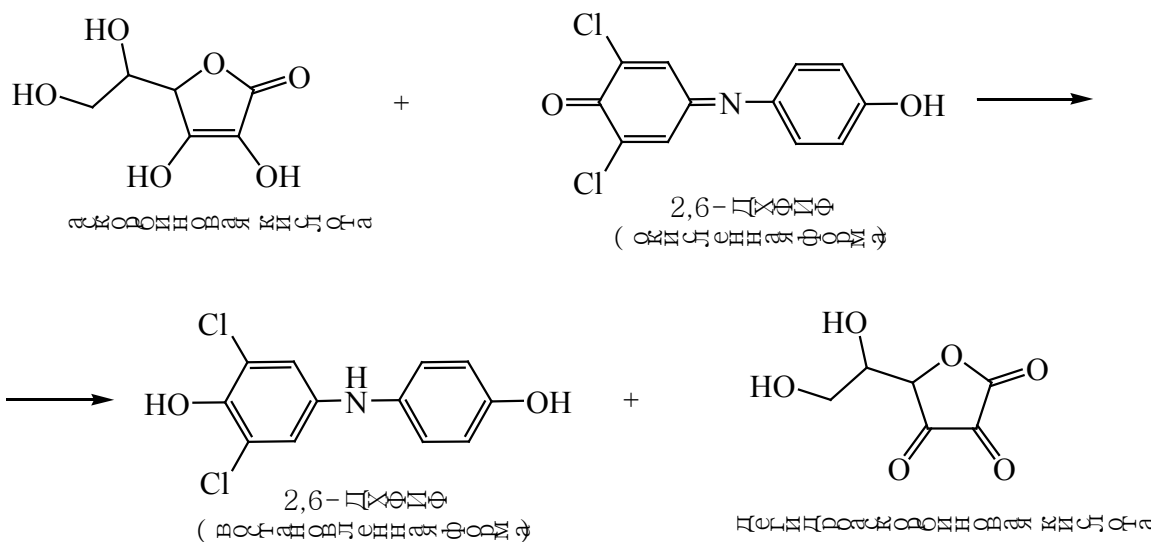
$V_{\text{молока}}$ - объем молока в титруемой пробе, (5мл).

Раздел 5. ВИТАМИНЫ

Работа 8. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Цель работы – освоить метод количественного определения витамина С в продуктах.

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ):



Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола в щелочной и нейтральной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную; восстановленная форма ДХФИФ – бесцветная.

По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

Реактивы и оборудование: 0,0005 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 5% раствор соляной кислоты, кварцевый песок, ступка и пестик; мерные колбы на 100 мл; коническая колба на 50 мл; микробюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Ход работы.

Приготовление экстракта из растительного материала. Нарезают 10 г исследуемого материала (капуста, морковь, лимон, шиповник) мелкими кусочками и переносят в ступку. Тщательно растирают, добавляя маленькими порциями 5%-ный раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100

мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5%-ным раствором соляной кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл соляной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2,5%) После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте. В коническую колбу на 50 мл берут пипеткой 10 мл полученного экстракта растительного материала. Содержимое колбы титруют 0,0005 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Работу повторяют с новой порцией того же экстракта.

Оформление работы. Результаты титрования записывают в лабораторный журнал. На основании средней величины титрования, полученной из 2 – 3 определений, вычисляют количество витамина С по формуле:

$$c = 100 \times C_{\text{ДХФИФ}} \times V_{\text{ДХФИФ}} \times M_{\text{аск.к-ты}}$$

где c – содержание аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г исследуемого продукта);

$C_{\text{ДХФИФ}}$ – концентрация 2,6-дихлорфенолиндофенола (моль/л);

V – затраченный при титровании объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл);

$M_{\text{аск.к-ты}}$ – молярная масса аскорбиновой кислоты (г/моль).

Делают вывод о содержании витамина С в исследуемом образце.