

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов

БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Часть 2. БЕЛКИ. ФЕРМЕНТЫ. ВИТАМИНЫ

Учебное пособие



Санкт-Петербург

2015

УДК 577.1
ББК 28.072
Ш 68

Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.

Изложены краткие теоретические сведения о составе и свойствах белков растительных и животных тканей. Приведены примеры определения активности ферментов. Рассмотрены способы качественного определения водо- и жирорастворимых витаминов.

Рекомендуется в качестве руководства для самостоятельной работы студентов бакалавриата и магистратуры всех форм обучения по направлениям: 19.03.01; 19.04.01 Биотехнология; 19.03.02; 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03; 19.04.03 Продукты питания животного происхождения; 18.03.02; 18.04.02 Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии по дисциплинам «Биохимия»; «Основы биохимии и молекулярной биологии»; «Энзимология»; «Химия природных органических веществ»; «Биоконверсия пищевых веществ» и др.

Рецензенты: кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета (доктор биол. наук, проф. Н.Д. Ещенко); доктор техн. наук, проф., зав. кафедрой Л.А. Забодалова (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики)

Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015

© Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н., 2015

1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА БЕЛКОВ

1.1. Краткая физико-химическая характеристика белков

Белки, или протеины, – это высокомолекулярные полимеры биогенного происхождения, состоящие из аминокислот, соединенных пептидными связями.

Биологические функции белков: структурная, энергетическая, каталитическая, транспортная, сократительная, регуляторная, а также защитная.

Усредненный элементный состав белков в %: углерод – от 50,6 до 54,5; кислород – от 21,5 до 23,5; азот – от 15,0 до 17,6; водород – от 6,5 до 7,3; сера – от 0,3 до 2,5; минеральные вещества – в пределах 0–0,5.

Все белки делятся на простые и сложные.

Простые белки состоят только из остатков аминокислот. Их делят на 6 групп:

– *альбумины и глобулины* (широко распространенные кислые, глобулярные белки);

– *гистоны и протамины* (основные, относительно низкомолекулярные белки);

– *глутелины и проламины* (белки, встречающиеся только в растениях).

Сложные белки содержат в своем составе простые белки (*апопротеины*) и небелковые компоненты (простетические группы): углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды, производные витаминов, ионы металлов, гем и др. Основные группы сложных белков представлены в табл. 1.

Белки имеют сложную структурную организацию, включающую четыре уровня:

– *первичная* структура – набор и последовательность аминокислот в полипептидной цепи;

– *вторичная* структура – способ укладки полипептидной цепи (α -спираль или β -структура складчатого слоя);

– *третичная* структура – форма белковой молекулы в трехмерном пространстве (глобулярная или фибриллярная);

– *четвертичная* структура (реализуется для некоторых белков) – ассоциация отдельных белковых субъединиц.

Основные группы сложных белков и их простетические группы

| Простетическая группа | Сложный белок | |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|
| | Групповое название | Примеры |
| Атомы (ионы) металлов | Металлопротеины | Ферритин, церулоплазмин, цитохромы |
| Фосфатные группы | Фосфопротеины | Казеин |
| Гемм | Хромопротеины (гемопротеины) | Миоглобин, гемоглобин, каталаза, пероксидаза |
| Флавонуклеотиды | Хромопротеины (флавопротеины) | Ферменты оксидоредуктазы |
| Моно- или олигосахариды | Гликопротеины | Белки-ингибиторы ферментов протеолиза |
| Триацилглицеролы и сложные липиды | Липопротеины | β -липопротеин |
| РНК | Рибонуклеопротеины | Рибосомы |
| ДНК | Дезоксирибонуклеопротеины | Нуклеосомы |

Первичная структура представляет собой полипептидную цепь, содержащую, как правило, не менее 50 аминокислотных остатков **протеиногенных** аминокислот. Протеиногенными называются 20 α , *L*-аминокислот, включающихся в состав белка в процессе биологического синтеза. Десять из них в достаточном количестве синтезируются в организме человека и животных. Это – заменимые аминокислоты: глицин, аланин, серин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин, тирозин и пролин. Следующие 10 аминокислот – незаменимые: лизин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, гистидин и аргинин; из них две последние – условно незаменимые, так как они могут синтезироваться, но в недостаточном количестве.

Аминокислотный состав белков определяют путем их кислотного гидролиза с последующим разделением образовавшихся свободных аминокислот при помощи ионообменной хроматографии.

Количественное содержание каждой аминокислоты определяют нингидриновым методом. Определение локализации аминокислот в молекулах белков осуществляется путем последовательного ферментативного отщепления (секвенирования) С- или N- концевых аминокислот и их последующей идентификации.

Идентификация аминокислот основана на различиях физико-химических свойств и реакционной способности боковых радикалов. Для этой цели можно использовать специфические **цветные реакции** на аминокислоты и хроматографию.

Виды вторичной и третичной структур, физико-химические свойства и биологические функции белков зависят от первичной структуры, т. е. от набора, количественного содержания и взаимного расположения остатков аминокислот, различающихся строением боковых радикалов.

Для формирования свойственных белкам структур требуется, как правило, не менее 50 аминокислотных остатков, поэтому нижней границей молекулярной массы (ММ) белков считается 5 кДа. Белки с меньшей ММ, состоящие из двух и более аминокислотных остатков и не имеющие упорядоченной пространственной структуры, называются пептидами. **Пептиды** – низкомолекулярные вещества, которые состоят из аминокислот, соединенных пептидными связями и содержатся в составе биологических тканей наряду с белками. Многие пептиды обладают специфическим действием и высокой биологической активностью. К ним относятся рилизинг-факторы гипоталамуса, эндорфины и энкефалины коры головного мозга, гормоны задней доли гипофиза – окситоцин и вазопрессин, карнозин мышечной ткани, группа регуляторных пептидов желудочно-кишечного тракта – секретины и гастрины, антибиотик грамицидин, токсин грибов фаллоидин, активатор тиоловых ферментов глутатион и многие другие.

ММ большинства белков составляет от нескольких десятков до сотен кДа. Белки, различающиеся ММ и, соответственно, размерами молекул, разделяют методом гельфильтрации (метод молекулярных сит).

В водной среде белки образуют растворы, обладающие свойствами и коллоидных, и истинных растворов. Вследствие высокой ММ и большого размера частиц они проявляют свойства коллоидных растворов: белки не проходят через полупроницаемые мембраны

(на этом основан метод очистки белков от низкомолекулярных примесей, который называется **диализом**) и рассеивают свет (эффект Тиндаля).

Растворы белков обладают также свойствами истинных растворов, так как образуются и существуют без внесения дополнительной энергии.

Растворимость большинства белков в воде обусловлена наличием на их поверхности гидрофильных групп (гидроксильных, сульфгидрильных, амидных), принадлежащих полярным аминокислотам (серин, цистеин, аспарагин, глутамин и др.) и способных связывать воду.

Неполярные аминокислоты, обладающие гидрофобными боковыми радикалами (аланин, валин, лейцин, фенилаланин и др.), снижают растворимость белка в воде.

Второй фактор, влияющий на количество связанной с белками воды (гидратная оболочка) и устойчивость белков в водных растворах, – заряд белковых молекул.

Суммарный заряд белка определяется соотношением отрицательно и положительно заряженных аминокислот на поверхности белковых молекул, а также величиной рН раствора. Отрицательный заряд могут приобретать в нейтральной и щелочной среде глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в боковых радикалах которых содержатся свободные карбоксильные группы. Лизин, аргинин и гистидин в нейтральной и кислой среде заряжаются положительно благодаря наличию в их боковых радикалах, соответственно, аминогруппы, гуанидиновой группы и имидазольного кольца.

Значение рН, при котором суммарный заряд белка является минимально возможным (нулевым), называется **изоэлектрической точкой** (ИЭТ, pI). В изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна (изоэлектрическое состояние), вследствие чего водный раствор белка при рН, равном pI , наименее устойчив и белок легче выпадает в осадок. Это явление применяется для определения изоэлектрической точки белка. Благодаря наличию заряда белки подвижны в электрическом поле. Метод исследования белков, основанный на различной скорости движения белковых частиц, различающихся величиной заряда при определенном значении рН, называется **электрофорезом**.

Одно из фундаментальных свойств белка – способность к денатурации.

Денатурация – это нарушение нативной (природной) структуры, вызываемое действием физических и химических факторов и приводящее к изменению физико-химических свойств белка и утрате его биологических функций (структурной, транспортной, каталитической и др.). Первичная структура денатурированных белков не изменяется, но пептидные связи становятся более доступными действию протеолитических ферментов. В сложных белках при денатурации ослабляются связи с простетическими группами.

Денатурированные белки хуже растворяются в воде, чем нативные. Из растворов белки могут осаждаться при нагревании, действии солей, кислот, спиртов и т. д.

Водоотнимающие средства (соли аммония, щелочных и щелочноземельных металлов, спирт, ацетон) вызывают **обратимую** денатурацию белков и применяются для выделения и фракционирования белков методом **высаливания**. После очистки от осаждающих агентов и растворения в воде такие белки вновь приобретают присущие им **нативные** свойства.

Температура выше 50 °С, минеральные и органические кислоты, а также соли тяжелых металлов и другие агенты, вызывающие ковалентную модификацию аминокислотных остатков, необратимо денатурируют белки. **Необратимая** денатурация применяется для дезинфекции, инактивации белков (в частности, обладающих токсическими, ферментными или ингибиторными свойствами), качественного обнаружения белков в растворах и их депротеинизации, т. е. получения безбелковых растворов.

1.2. Методы выделения и фракционирования белков

Белки обладают высокой молекулярной массой, что обуславливает выраженный коллоидный характер их водных растворов. Основными факторами агрегативной устойчивости белковых коллоидов являются гидратация частиц и возникновение одноименного электрического заряда. Следовательно, выпадению белков из растворов способствуют уменьшение гидратации коллоидных частиц (разрушение гидратной оболочки) и значительное снижение или снятие их заряда.

Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, так как на первых этапах очистки фракции они содержат множество примесей. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют **фракционированием**.

На каждой стадии разделения белок находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

1.2.1. Реакции осаждения белков

Белки вступают во взаимодействие со многими соединениями (ионами металлов, кислотами и др.), а также конкурируют с ними за молекулы растворителя (воды). Во многих случаях результатом указанных процессов является осаждение белков.

Реакции осаждения белков можно разделить на две группы: 1) обратимое осаждение белков (солями аммония, нейтральных щелочных и щелочноземельных металлов, спиртов) и 2) необратимое – солями тяжелых металлов, нагреванием, минеральными и органическими кислотами, а также другими реагентами, вызывающими ковалентную модификацию белков. Эффективно осаждают белки трихлоруксусная кислота, поэтому ее наиболее часто применяют для удаления белка из белковых растворов.

Осаждение белков спиртом

Спирт (а также ацетон и другие органические растворители) дегидрирует белки. В результате происходит агрегация белковых частиц и их осаждение. Если в растворе белка присутствуют соли (NaCl и др.), осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда с коллоидных частиц. Реакция осаждения белков спиртом, проводимая на холоде и при непродолжительном его контакте с белком, обратима.

Выполнение реакции. В пробирку наливают около 2 см³ раствора яичного белка, добавляют несколько кристалликов NaCl и по каплям – этиловый спирт до выпадения хлопьев белка. После осаждения хлопьев надосадочную жидкость сливают, к осадку доливают воду, наблюдая растворение белка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов (меди, свинца, ртути и др.) необратимо осаждают белки из растворов, что объясняется следующими причинами: образованием нерастворимых в воде белково-металлических комплексных соединений, разрушением вторичной, третичной и четвертичной структуры белка вследствие образования прочных связей с SH-группами остатков цистеина. Такой белок утрачивает свои биологические свойства.

Свойства белков связывать тяжелые металлы широко используются в медицинской и ветеринарной практике. Белки применяются как противоядие при отравлениях солями ртути или свинца.

Выполнение реакции. В пробирку наливают около 2 см³ раствора яичного белка и прибавляют медленно по каплям раствор соли тяжелого металла (1 %-й раствор сульфата меди или 5 %-й раствор ацетата свинца). Наблюдают коагуляцию белка. Выпавшие хлопья белка при добавлении воды не растворяются. Избыток же сульфата меди и ацетата свинца ведет к растворению (пептизации) первоначально образовавшегося осадка, что объясняется адсорбцией на белковых частицах ионов металла и их перезарядкой.

Осаждение белков при нагревании

Нагревание раствора белка вызывает его необратимое осаждение. При нагревании белки денатурируют. Денатурация сопровождается изменением нативной конформации белковых молекул.

Выполнение реакции. В две пробирки наливают по 2–3 см³ раствора яичного белка; в одну из них добавляют одну каплю 1 %-го раствора уксусной кислоты. Нагревают содержимое обеих пробирок. Осадок белка появляется в пробирках еще до того, как содержимое закипит. При этом в пробирке с уксусной кислотой осадок выпадает скорее и полнее вследствие того, что в результате подкисления рН раствора приблизился к изоэлектрической точке.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Осаждение белка объясняется явлениями дегидратации частиц,

уменьшения заряда, разрушения электростатических связей и т. д. Избыток минеральных кислот (за исключением азотной) растворяет выпавший осадок белков вследствие их гидролиза.

Выполнение реакции. В три пробирки осторожно наливают по 0,5 см³ концентрированной кислоты: в первую – серную, во вторую – соляную и в третью – азотную. Во всех пробирках осторожно настилают на кислоту по 1 см³ раствора яичного белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белка в виде небольшого белого кольца. Каждую пробирку осторожно встряхивают. В первой и второй пробирках осадок растворяется; в третьей – с азотной кислотой – осадок при встряхивании не исчезает. Реакция используется для качественного определения белка в биологических средах.

Осаждение белков органическими кислотами

Трихлоруксусная кислота (ТХК, CCl₃COOH) является специфическим реактивом на белок и широко используется в исследовательской практике. ТХК осаждает только белки и не действует на продукты их расщепления – пептиды, аминокислоты и др. ТХК используют для полного удаления белков из биологических жидкостей (сыворотки крови, молока и др.). При этом продукты расщепления белков остаются в растворе. Реакция имеет важное значение для отдельного определения белкового и небелкового азота.

Выполнение реакции. В пробирку наливают 2–3 см³ раствора белка и добавляют несколько капель 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

Осаждение белков реактивами на алкалоиды

Реакции осаждения белков такими реагентами, как пикриновая кислота, танин, железосинеродистый калий, обуславливаются тем, что белки, как и алкалоиды, имеют аминогруппы, которые в нейтральной и кислой среде приобретают положительный заряд. Перечисленные реагенты образуют с ними нерастворимые в воде солеобразные соединения. Поскольку большинство белков являются кислыми, эти реакции необходимо проводить в кислой среде, так как в данных условиях эти белки перезаряжаются и переходят из анионов в катионы, с которыми взаимодействуют реагенты на алкалоиды.

Выполнение реакции. В три пробирки наливают по 2 см³ раствора белка и подкисляют их двумя–тремя каплями 1 %-го раствора уксусной кислоты. Затем в одну пробирку вносят 5–6 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты, в другую – две–три капли 10 %-го раствора танина, в третью – три капли 5 %-го раствора железосинеродистого калия, взбалтывая после добавления каждой капли. Во всех пробирках выпадает осадок белка.

1.2.2. Определение изоэлектрической точки белка

Принцип метода. Белки, являясь амфотерными электролитами, могут содержать как положительно, так и отрицательно заряженные группы. При определенном значении рН среды можно добиться такого соотношения ионизированных групп, при котором водный раствор белка наименее устойчив и белковые частицы выпадают в осадок. Испытывая поведение белка в растворах с различными значениями рН, находят значение рН среды, соответствующее изоэлектрической точке белка (pI).

Материалы и реактивы. Для варианта А: 0,4 %-й раствор казеина (растворяют 0,2 г казеина при небольшом нагревании на водяной бане в 5 см³ 0,1 н. раствора ацетата натрия и доводят полученный раствор до объема 50 см³ раствором ацетата натрия той же концентрации). Для варианта В: 1 %-й раствор желатина. Для обоих вариантов заранее готовят ацетатные буферные растворы с рН 3,6; 4,0; 4,7; 5,2; 5,8, используя 0,1 н. и 1 н. растворы уксусной кислоты, 0,1 н. раствор ацетата натрия, этиловый спирт.

Посуда, приборы. Штатив с пробирками, пипетки емкостью 1 и 5 см³.

Ход определения (вариант А). В пять пробирок вносят по 5 см³ ацетатного буферного раствора с различными значениями рН. Затем в каждую из пробирок прибавляют по 1 см³ раствора казеина и наблюдают за степенью помутнения раствора, которое обозначают одним или несколькими знаками (+). Отсутствие осадка обозначают знаком минус. Там, где помутнение максимально, рН раствора соответствует изоэлектрической точке казеина. Найденное значение заносят в табл. 2.

Таблица 2

| Раствор казеина в ацетатном буферном растворе | рН раствора в пробирках | | | | |
|--|-------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 3,6 | 4,0 | 4,7 | 5,2 | 5,8 |
| Помутнение | | | | | |

Ход определения (вариант В). В каждой из шести пронумерованных пробирок создают разную реакцию среды, добавляя 0,1 н. или 1 н. раствор ацетата натрия в соотношениях, указанных в табл. 3.

Таблица 3

| № пробирки | рН смеси | Раствор CH_3COOH , см^3 | | 0,1 н. раствора CH_3COONa , см^3 | Вода дистиллированная, см^3 | Степень помутнения |
|------------|----------|--|------|---|--------------------------------------|--------------------|
| | | 0,1 н. | 1 н. | | | |
| 1 | 5,6 | 0,125 | – | 1 | 1,875 | |
| 2 | 5,3 | 0,25 | – | 1 | 1,75 | |
| 3 | 5,0 | 0,5 | – | 1 | 1,50 | |
| 4 | 4,7 | 1,0 | – | 1 | 1,0 | |
| 5 | 4,4 | 2,0 | – | 1 | – | |
| 6 | 4,1 | – | 0,4 | 1 | 1,6 | |

Затем в каждую пробирку наливают по 1 см^3 1 %-го раствора желатина и взбалтывают. В четвертую пробирку, при перемешивании медленно с помощью пипетки вносят этиловый спирт до появления едва заметной мути, отсчитывают объем спирта и такое же количество его прибавляют в другие пробирки. Затем все пробирки оставляют на 30 мин, после чего отмечают пробирку с максимальным помутнением; рН раствора в этой пробирке соответствует рI белка.

1.2.3. Высаливание белков

Высаливание – это широко используемый способ выделения белков из различных биологических объектов, основанный на осаждении белков водоотнимающими средствами. Применяется при получении ферментов, а также для фракционного разделения белков.

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природе белками. Они содержатся в крови человека, молоке, белке куриного яйца, мышечной ткани, растениях и т. д. В тканях и биологических жидкостях альбумины и глобулины обычно встречаются вместе. Их выделение и разделение основано на различной растворимости в воде и солевых растворах. Так, глобулины выпадают в осадок в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе. Это объясняется тем, что у глобулинов более высокая молекулярная масса и они менее гидратированы, чем альбумины.

Материалы для исследования и реактивы. Молочная сыворотка, яичный белок, обезжиренный мясной фарш, насыщенный раствор сульфата аммония, сульфат аммония кристаллический; 10 %-й раствор гидроксида натрия; 10 %-й раствор хлорида натрия; 1 %-й раствор сульфата меди.

Посуда, приборы. Штатив с пробирками, воронка, бумажный фильтр.

Ход определения (вариант А). В пробирку наливают 2–3 см³ молочной сыворотки или раствора яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость по истечении 5–7 мин фильтруют через сухой складчатый фильтр. К прозрачному фильтрату при перемешивании добавляют избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, отбирают 2–3 см³ фильтрата и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения.

Осадок альбуминов вместе с фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4–5 см³ воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

Ход определения (вариант В). Обезжиренный мясной фарш в количестве 40–50 г смешивают с 80–100 см³ 10 %-го раствора хлорида натрия и оставляют стоять 15–20 мин при частом перемешивании. Отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр или через двойной слой марли окрашенную в красный цвет жидкость. В растворе главным образом содержатся растворимые белки ткани –

мышечные альбумины и глобулины. Отбирают в пробирку 2–3 см³ белкового раствора, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость после 5–7 мин отстаивания фильтруют через сухой складчатый фильтр. К фильтрату добавляют при перемешивании избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, берут 2–3 см³ фильтрата и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения.

Осадок альбуминов вместе с оставшимся фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4–5 см³ воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

1.3. Методы качественного исследования простых белков

1.3.1. Качественные реакции на белки и аминокислоты

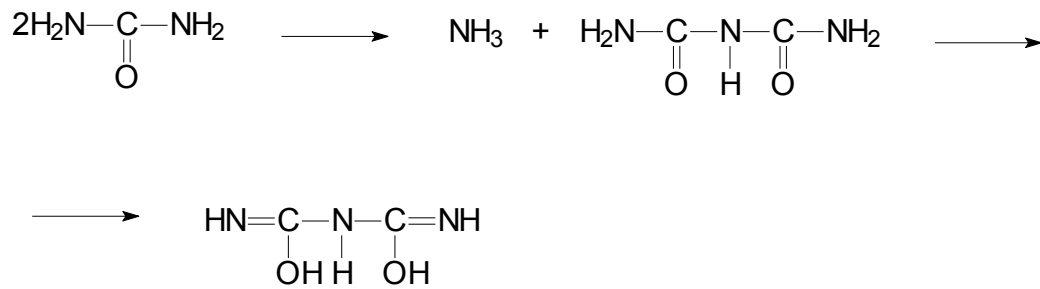
Все белки и пептиды дают цветные реакции: биуретовую – на пептидные связи и нингидриновую – на α -аминокислоты. Аминокислоты, в свою очередь, содержат разнообразные радикалы, способные вступать в специфические реакции. Это дает возможность обнаруживать белки и идентифицировать большинство аминокислот (свободных или в составе пептидов и белков) с помощью цветных реакций.

Цветные реакции применяются для качественного и количественного определения белка и аминокислот. Они делятся на универсальные реакции (биуретовая и нингидриновая), которые дают все белки, и специфические, т. е. на отдельные аминокислоты, входящие в состав белковых молекул (ксантопротеиновая, реакции на триптофан, цистеин, тирозин и др.).

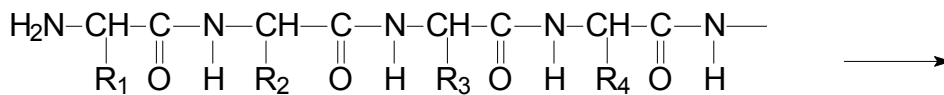
Универсальные реакции на белки

Биуретовая реакция. Эта реакция открывает в белке пептидную связь (-C(=O)-NH-). В результате взаимодействия в щелочной среде пептидных связей белка с ионами меди образуется комп-

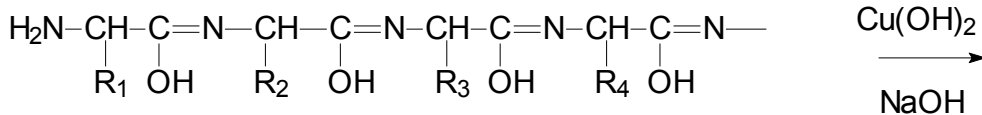
лексное соединение, окрашенное в сине-фиолетовый цвет. Биуретовую реакцию способны давать вещества, имеющие не менее двух пептидных связей. Реакция получила свое название от производного мочевины – биурета, молекула которого образуется при нагревании мочевины с отщеплением аммиака. В щелочной среде биурет переходит в енольную форму:



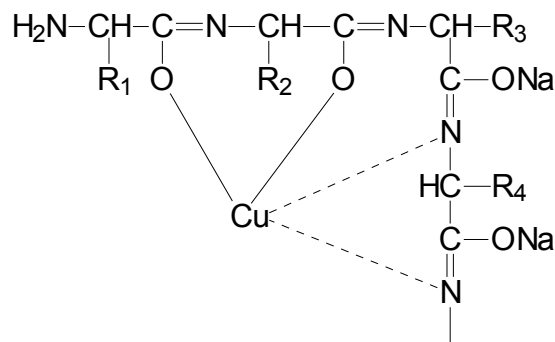
Биуретовая реакция протекает следующим образом:



Полипептид



Енольная форма полипептида

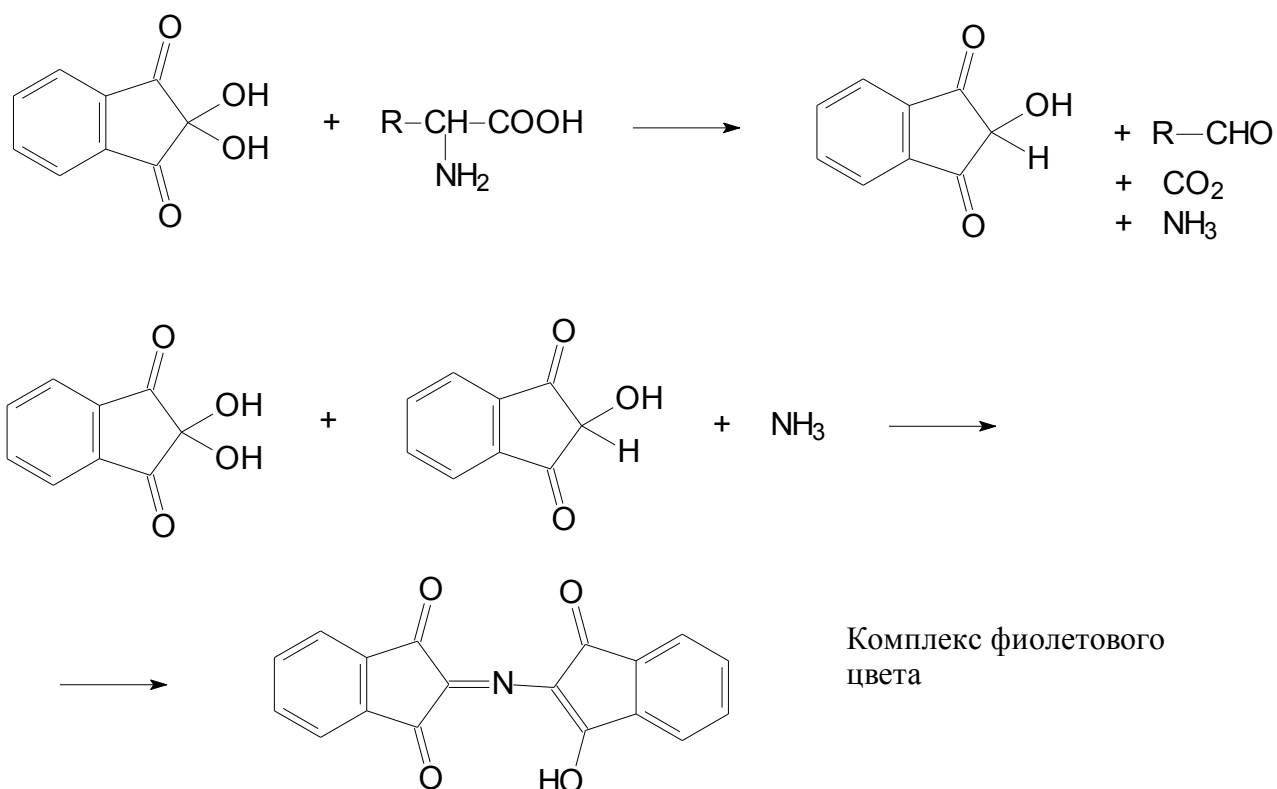


Биуретовый медный комплекс фиолетового цвета

Енольная форма полипептида, образованная в сильнощелочной среде при диссоциации OH-групп, дает отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью, и возникает ковалентная связь.

Кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи. Степень окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

Проведение реакции. В две пробирки с 1 мл 1 %-го раствора яичного белка и желатина прибавляют 1 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и 5 капель 1 %-го раствора сульфата меди. При перемешивании содержимое пробирки приобретает фиолетовый цвет.



Нингидриновая реакция. Белки, полипептиды, а также свободные аминокислоты при кипячении с водным раствором нингидрина дают синее или сине-фиолетовое окрашивание.

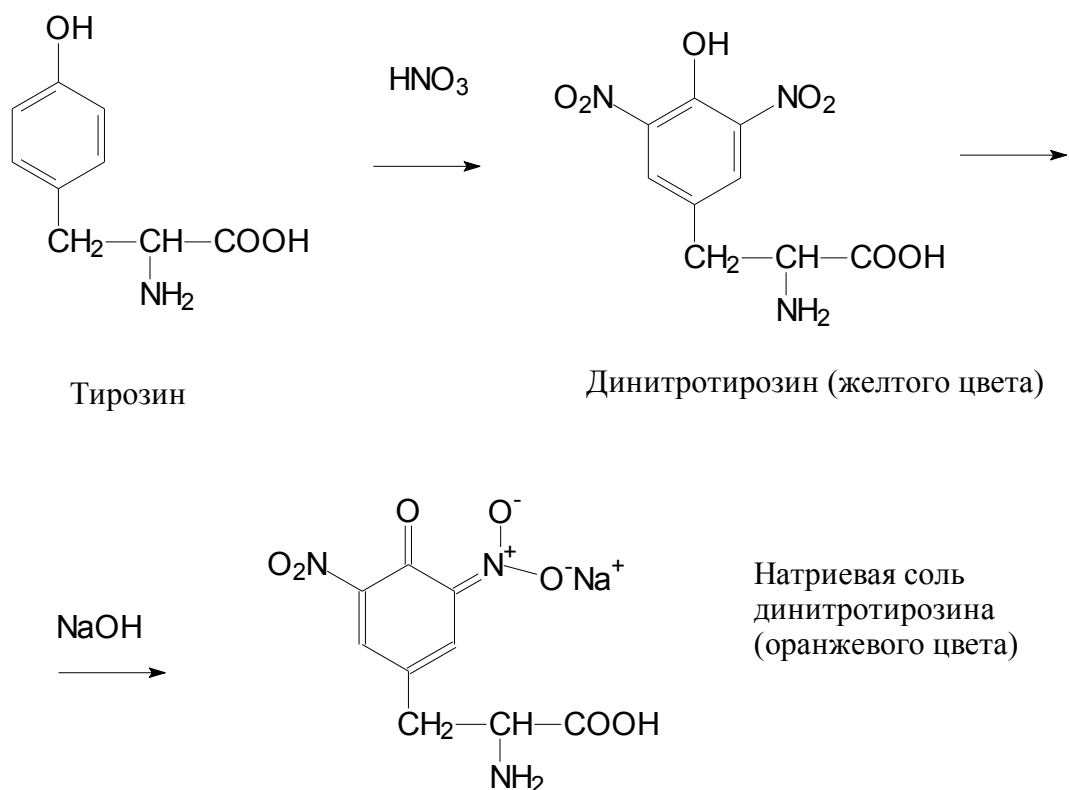
В результате взаимодействия аминокислот с нингидрином происходит их декарбоксилирование и дезаминирование. Далее восстановленный нингидрин вступает в реакцию с одной молекулой невосстановленного нингидрина и с аммиаком, образуя окрашенный в сине-фиолетовый цвет комплекс. Пролин и оксипролин дают с нингидрином желтую окраску.

Проведение реакции. В две пробирки с 1 мл раствора яичного белка и желатина добавляют по 5 капель 0,5 %-го раствора нин-

гидрина и доводят до кипения. В пробирках появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее.

Специфические реакции на аминокислоты

Ксантопротеиновая реакция. Эта реакция основана на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана, фенилаланина) легко нитроваться с образованием соединений, окрашенных в желтый цвет (на греческом языке «ксантос» – желтый). При подщелачивании окраска усиливается. Так, тирозин при нитровании переходит в динитротирозин, который под влиянием щелочи переходит в соль, имеющую хиноидную структуру:



Проведение реакции. В одну пробирку наливают 1 мл 1 %-го раствора яичного белка, а во вторую – 1 мл 1 %-го раствора желатина. Затем в обе пробирки добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В первой пробирке появляется осадок желтого цвета, а во второй – очень слабое окрашивание. После охлаждения в каждую пробирку прибавляют

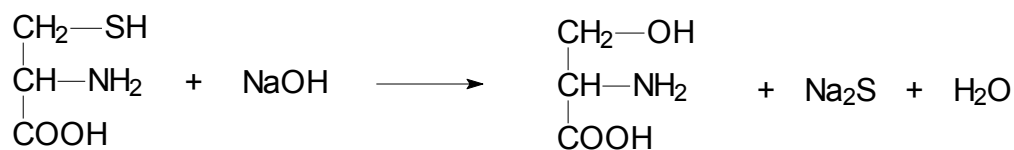
приблизительно 10–15 капель 20 %-го раствора гидроксида натрия. При наличии в белке ароматических аминокислот в пробе образуется жёлтый или оранжевый осадок вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

Реакция на триптофан. Реакция основана на способности триптофана вступать в кислой среде во взаимодействие с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.

Проведение реакции. В одну пробирку наливают около 1 см³ 1 %-го раствора яичного белка, а в другую – 1 см³ 1 %-го раствора желатина. В обе пробирки добавляют по три капли 10 %-го раствора сахарозы, после чего пипеткой наслаивают по 0,5 см³ концентрированной серной кислоты. На границе раздела жидкостей в пробе, содержащей триптофан, появляется красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца, при отсутствии триптофана окрашивания не происходит.

Сущность реакции сводится к тому, что под действием серной кислоты происходит гидролиз сахарозы до моносахаридов, которые превращаются в оксиметилфурфурол. Триптофан, реагируя с оксиметилфурфуролом, образует комплекс, окрашенный в красно-фиолетовый цвет.

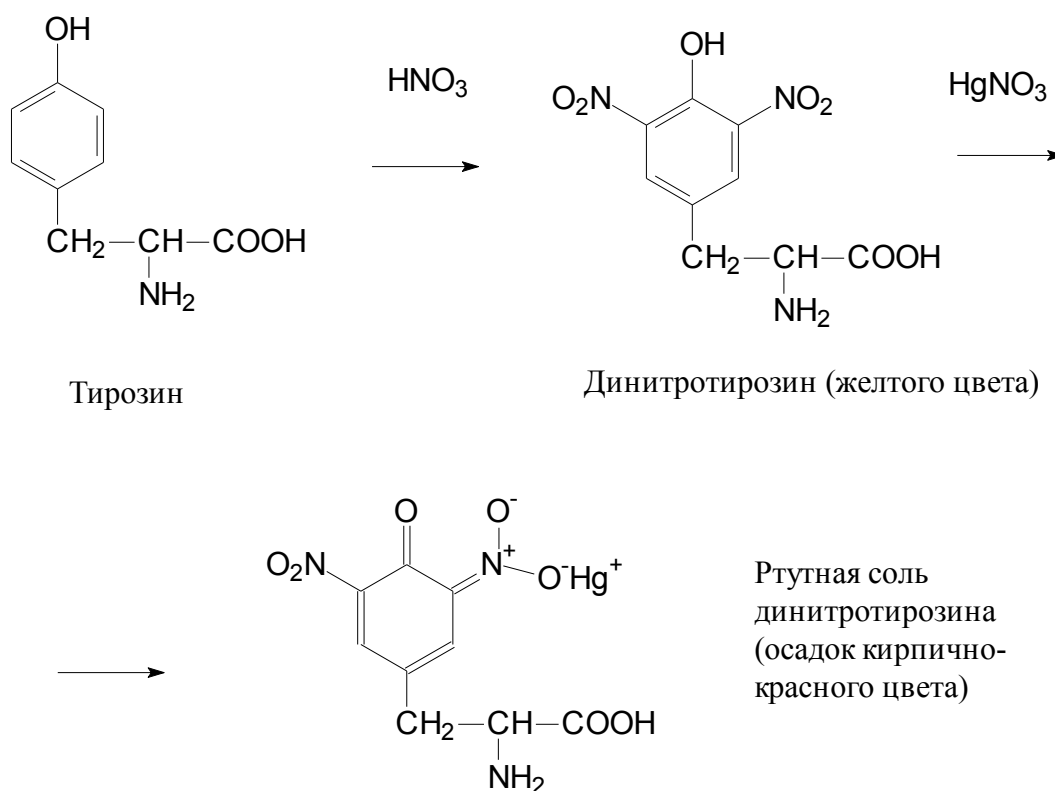
Реакция на цистеин (реакция Фоля). Применяется для обнаружения слабосвязанной серы цистеина. Метионин в этой реакции не выявляется. Сульфгидрильные группы (-SH) в белке подвергаются щелочному гидролизу, в результате чего происходит отщепление серы в виде сульфида натрия, который в реакции с ацетатом свинца дает сульфид свинца черного цвета:



Проведение реакции. В одну пробирку наливают 1 см³ неразбавленного яичного белка, в другую – 1 см³ раствора желатина. В обе пробирки добавляют равный с белковым объемом 20 %-го гидроксида натрия, нагревают до кипения и прибавляют одну–две капли 5 %-го

раствора ацетата свинца. Появление черного или бурого осадка сульфида свинца свидетельствует о положительной реакции Фоля.

Реакция на тирозин (реакция Миллона). При добавлении к раствору белка реактива Миллона (раствор ртути в азотной кислоте) и кипячении на водяной бане образуется кирпично-красный осадок ртутной соли динитротирозина благодаря наличию в тирозине фенольного кольца:



Проведение реакции. В одну пробирку наливают 1 мл 1 %-го раствора яичного белка, в другую – 1 мл раствора желатина. В каждую пробирку наливают по три капли реактива Миллона и осторожно нагревают пробирки на водяной бане. При наличии тирозина в пробе развивается кирпично-красное окрашивание, а при отрицательной реакции жидкость остается бесцветной.

После проведения качественных реакций на аминокислоты и простые белки полученные результаты заносят в табл. 4 и делают вывод о том, являются ли исследуемые вещества белками, и если да, то в чем заключаются их различия в составе и пищевой ценности.

Цветные реакции на белки

| Реакции/Белки | Универсальные реакции | | Специфические реакции | | |
|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| | Биуретовая | Нингидриновая | Ксантопротеиновая | Реакция на триптофан | Реакция Фоля |
| Яичный белок | | | | | |
| Желатин | | | | | |

1.3.2. Идентификация аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Хроматографический метод, разработанный в 1903 г. русским ученым М.С. Цветом, является одним из наиболее быстрых, точных и простых способов анализа сложных смесей веществ. Для исследования аминокислотного состава белков используются различные методы хроматографии, при этом особенно широко распространен метод распределительной хроматографии на бумаге.

Принцип метода распределительной хроматографии основан на разделении веществ, различающихся своей полярностью, в системе растворителей, состоящей из двух несмешивающихся фаз – полярной и неполярной. При смачивании хроматографической бумаги растворителем полярная фаза, в данном случае вода, взаимодействует с гидрофильными волокнами целлюлозы и движется медленно. Эта фаза, связанная с носителем, условно называется неподвижной.

Неполярная фаза растворителя, не связанная с носителем, движется быстрее, поэтому называется подвижной. Компоненты разделяемой смеси веществ, в зависимости от их гидрофильных или гидрофобных свойств, растворяются, соответственно, в полярной (неподвижной) или неполярной (подвижной) фазе растворителя. Вследствие этого скорость движения гидрофобных веществ, растворенных в подвижной фазе, будет выше, чем скорость гидрофильных, и через определенное время отдельные компоненты смеси окажутся на разных расстояниях от линии старта. Количественной характеристикой разделяемых веществ в распределительной хроматографии служит коэффициент R_f (от *Rate* – скорость и *fraction* – частица).

По направлению движения растворителя различают нисходящую и восходящую хроматографию. Хроматограммы на бумаге бывают одномерные (рис. 1), когда разделение ведут в одном направлении и вещества смеси распределяются по вертикали, и двумерные (рис. 2), когда применяют два растворителя и разделение веществ ведется последовательно в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Поскольку аминокислоты, входящие в состав белка, в зависимости от строения бокового радикала имеют различные физико-химические свойства, метод распределительной хроматографии применяется для изучения аминокислотного состава белков.

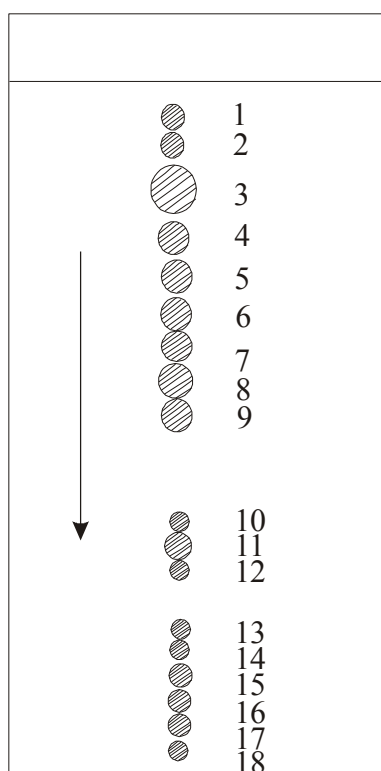


Рис.1. Одномерная нисходящая хроматограмма аминокислот:
 1 – цистин; 2 – цистеин; 3 – лизин; 4 – гистидин; 5 – аспарагиновая кислота;
 6 – серин; 7 – аргинин; 8 – глутаминовая кислота; 9 – глицин; 10 – треонин;
 11 – пролин; 12 – тирозин; 13 – аланин; 14 – триптофан; 15 – валин;
 16 – метионин; 17 – фенилаланин; 18 – лейцин

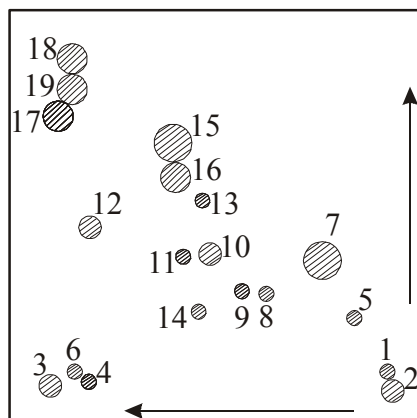


Рис. 2. Двумерная хроматограмма аминокислот:

1 – цистин; 2 – цистеин; 3 – лизин; 4 – гистидин; 5 – аспарагиновая кислота;
 6 – аргинин; 7 – глутаминовая кислота; 8 – серин; 9 – глицин; 10 – треонин;
 11 – аланин; 12 – пролин; 13 – тирозин; 14 – валин; 15 – метионин;
 16 – фенилаланин; 17 – лейцин; 18 – изолейцин; 19 – оксипролин

Материалы, реактивы и оборудование. Смесь аминокислот (гидролизат белка); система растворителей: бутанол, уксусная кислота, вода (4:1:1); проявитель: 0,5 %-й раствор нингидрина в ацетоне; хроматографическая камера, хроматографическая бумага; микропипетка для нанесения смеси аминокислот на бумагу; пульверизатор для окрашивания хроматограмм; чашки Петри; сушильный шкаф; линейка; простой карандаш; ножницы.

Ход работы. Вырезают полоску хроматографической бумаги длиной 28–30 см и шириной 2–4 см. На расстоянии 1,5–2,0 см от края проводят простым карандашом прямую линию (старт), а на противоположном конце бумаги ставят № пробы смеси аминокислот. В центр линии старта наносят микропипеткой каплю исследуемого раствора. Затем полоску бумаги подсушивают, подвешивают на крючок крышки хроматографической камеры и опускают в цилиндр, на дно которого предварительно наливают 10–15 см³ растворителя. Край бумаги при закрытом положении крышки должен погрузиться в растворитель, но не выше стартовой линии (рис. 3, а).

Цилиндр вместе с полоской хроматографической бумаги оставляют на 18–24 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени полоску бумаги (хроматограмму) извлекают, отмечают карандашом фронт растворителя и подсушивают в вытяжном шкафу. Затем хроматограмму опрыскивают раствором нингидрина и снова подсушивают в вытяжном шкафу в токе теплого воздуха.

Через некоторое время на хроматограмме проявятся окрашенные в сине-фиолетовый цвет пятна, соответствующие аминокислотам исследуемой смеси (рис. 3, б).

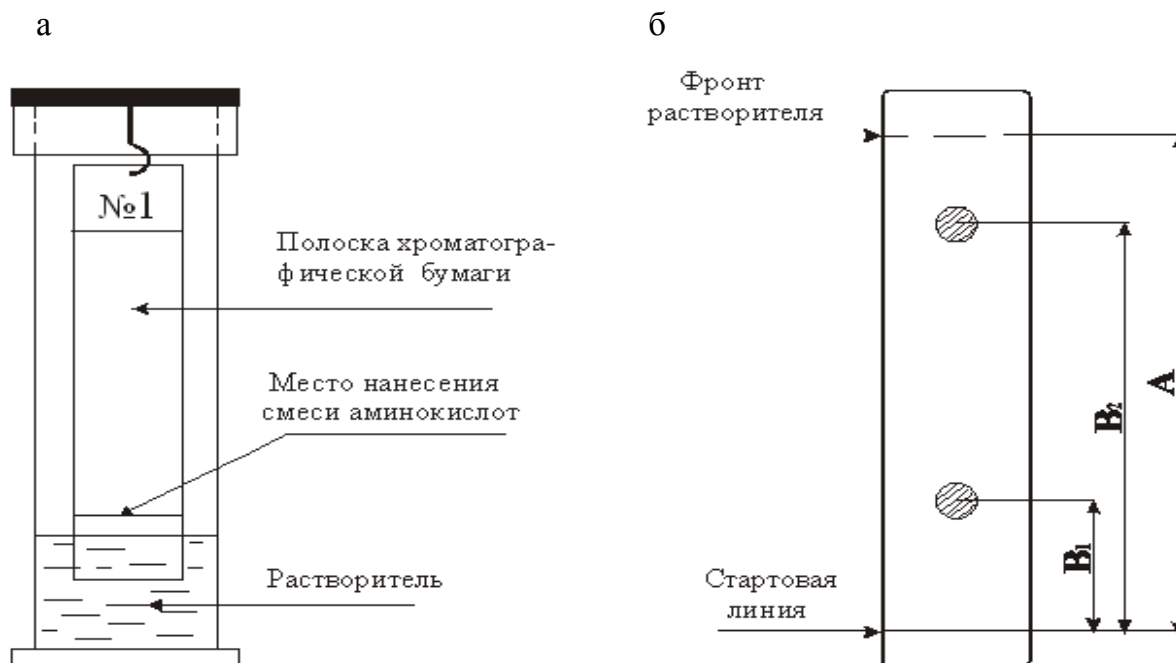


Рис. 3. Распределительная хроматография аминокислот:
а – хроматографическая камера; б – схема разделения аминокислот

Вычисление результатов. Для каждого пятна рассчитывают коэффициент R_f , по которому, пользуясь таблицей, идентифицируют аминокислоты.

Вычисление R_f производится следующим образом:

а) измеряют линейкой расстояние от центра стартовой линии до границы, пройденной подвижным растворителем, – фронт растворителя – A ;

б) измеряют расстояние от центра стартовой линии до центров проявившихся пятен – B_1 и B_2 .

Далее рассчитывают величину R_f :

$$R_{f1} = B_1/A; \quad R_{f2} = B_2/A.$$

Полученные значения R_f сравнивают со значениями, приведенными в табл. 5, и по ближайшим величинам идентифицируют аминокислоты.

Значения R_f некоторых аминокислот

| Аминокислота | R_f |
|-----------------------|-------|
| Лизин | 0,15 |
| Глицин | 0,33 |
| Аргинин | 0,36 |
| Аланин | 0,39 |
| Аспарагиновая кислота | 0,45 |
| Глутаминовая кислота | 0,48 |
| Валин | 0,52 |
| Фенилаланин | 0,65 |
| Тирозин | 0,69 |
| Лейцин | 0,72 |

1.3.3. Разделение аминокислот
методом тонкослойной хроматографии

Для разделения аминокислот используется также **метод хроматографии в тонком слое** пористого носителя (силикагель, целлюлоза, крахмал и др.), нанесенного на стеклянную или пластиковую пластинку. Промышленность выпускает для тонкослойной хроматографии готовые пластинки «Силуфол». При их изготовлении на алюминиевую фольгу наносят широкопористый силикагель, связующим веществом является крахмал.

Метод тонкослойной хроматографии по сравнению с хроматографией на бумаге требует значительно меньше времени и позволяет исследовать вещества в меньших концентрациях.

Материалы, реактивы и оборудование. Смесь аминокислот («свидетели»): фенилаланин (15,1 мг в 10 см³), валин (11,7 мг в 10 см³), треонин (11,9 мг в 10 см³); система растворителей (н-бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 4:1:1 или 6:2:2); 0,1 %-й раствор нингидрина в ацетоне; хроматографическая камера; пластинки «Силуфол»; микропипетка; пульверизатор, сушильный шкаф.

Ход определения. Исследуемые и стандартные растворы («свидетели») аминокислот наносят на стартовую линию, осторожно проведенную простым мягким карандашом на расстоянии 1–2 см от края

пластинки «Силуфол». Нанесение проводят тонким стеклянным капилляром однократным прикосновением к поверхности пластинки таким образом, чтобы диаметр наносимого пятна был в пределах 3–5 мм. Пластинку с нанесенными растворами аминокислот подсушивают и помещают в камеру так, чтобы нижний её край (со стороны стартовой линии) погружался в растворитель на 0,5–0,8 см. Пластинки устанавливают в камере в наклонном положении. Камеру герметично закрывают.

После того как растворитель поднимется на 100–120 мм, пластинку осторожно вынимают из камеры и подсушивают на воздухе. Затем пластинку опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора, избегая попадания раствора на кожу, а паров – в дыхательные пути (опрыскивание проводить в вытяжном шкафу!). Для усиления окраски пластинку, обработанную нингидрином, помещают на 5 мин в сушильный шкаф с температурой 105 °С. Определение состава смеси аминокислот проводят сопоставлением R_f цветных пятен, полученных на хроматограмме исследуемого раствора, с окраской и R_f пятен свидетелей.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию белки.
2. Каковы биологические функции белков?
3. Дайте определение понятию пептиды.
4. Каковы общие свойства белков и пептидов и в чем состоят их различия?
5. Какие биологические функции выполняют пептиды? Приведите примеры.
6. Какое строение имеют белковые молекулы?
7. Охарактеризуйте первичную структуру белка.
8. Назовите и приведите классификацию протеиногенных аминокислот.
9. Напишите химическую формулу N-концевого фрагмента полипептидной цепи (асп-фен-про-арг-глю).
10. Напишите химическую формулу C-концевого фрагмента пентапептида (глю-асн-гис-мет-лиз) полипептидной цепи.
11. Опишите методы определения первичной структуры белка.
12. Каковы методы идентификации аминокислот?

13. Перечислите универсальные и специфические цветные реакции на белки.

14. Охарактеризуйте и покажите на схемах виды вторичной структуры белка.

15. Какие связи стабилизируют третичную структуру белка?

16. Укажите боковые радикалы аминокислот, между которыми образуются: а) ионные связи; б) электростатические связи; в) водородные связи; г) гидрофобные связи.

17. Каковы особенности регуляции четвертичной структуры белков?

18. Охарактеризуйте основные положения хроматографического разделения веществ.

19. Какой метод используют для детекции аминокислот после хроматографического разделения? Напишите уравнение реакции.

20. Охарактеризуйте основные положения метода тонкослойной хроматографии.

1.4. Методы количественного определения белков и пептидов

1.4.1. Спектрофотометрические методы

В основе спектрофотометрических методов лежит способность химических групп, входящих в состав белка, поглощать лучи света в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Такие группы называют хромофорами. Хромофоры белков, как правило, поглощают свет при длине волны менее 300 нм. В молекулах простых белков имеются следующие группы хромофоров:

– пептидные связи, дающие сильное поглощение в диапазоне длин волн от 190 до 230 нм; в таком же диапазоне поглощают свет боковые радикалы аспарагиновой и глутаминовой кислот, аспарагина и глутамина, аргинина и лизина, однако интенсивность их поглощения намного ниже;

– ароматические кольца аминокислотных остатков триптофана, тирозина и фенилаланина дают менее интенсивное поглощение при 260–280 нм;

– имидазольное кольцо гистидина и дисульфидная связь цистина поглощают свет в этой же области (260–280 нм), однако интенсивность этого поглощения намного ниже;

– простетические группы сложных белков, которые могут поглощать свет как в ультрафиолетовой, так и в видимой области спектра (например, изоаллоксазиновый фрагмент флавопротеинов поглощает при 450–460 нм, а гем в составе гемопротеинов – при 550 нм).

Спектрофотометрические методы позволяют анализировать образец без его разрушения и добавления каких-либо реактивов; сам анализ проводится довольно просто и быстро. Измерения проводят в нейтральном буферном растворе в кварцевых кюветах, пропускающих свет в ультрафиолетовой области спектра. При этом обычно пользуются полосой поглощения 280 нм. Измерив отношение интенсивностей падающего (I_0) и прошедшего через раствор (I) потока света, можно, согласно закону Бугера–Ламберта–Бэра, вычислить концентрацию белка:

$$D = \lg (I/I_0) = \varepsilon Cd,$$

где C – концентрация; ε – коэффициент светопоглощения; d – толщина слоя; D – оптическая плотность раствора (величина, характеризующая поглощение света при определенной длине волны). Соответственно, $C = D/\varepsilon d$.

Однако чувствительность этого метода не очень высока, так как белковые хромофоры имеют довольно слабое поглощение. Точность этих методов также невысока, поскольку индивидуальный набор хромофоров в разных белках отличается и калибровочный график для белка, принятого за стандарт, может не вполне соответствовать анализируемым белкам. Наконец, вклад в измеряемое поглощение могут вносить и примеси небелковой природы, например, нуклеиновые кислоты. Поэтому более надежные результаты дают двухволновые методы, учитывающие вклад небелковых веществ, в частности метод Варбурга и Кристиана.

Спектрофотометрический метод Варбурга и Кристиана

В кварцевой кювете толщиной 1 см измеряют оптическую плотность при двух длинах волн (λ): 260 и 280 нм. Искомую концентрацию белка в мг/мл находят по формуле

$$C = 1,55 D_{280} - 0,76 D_{260},$$

где C – концентрация в мг/мл; D_{280} – оптическая плотность, измеренная при $\lambda = 280$ нм; D_{260} – оптическая плотность, измеренная при $\lambda = 260$ нм.

Коэффициенты 1,55 и 0,76 учитывают вклад нуклеиновых кислот в величину поглощения света.

Для нахождения концентрации можно также использовать номограмму (рис. 4). На столбцах номограммы находят величины D для двух длин волн, соединяют их прямой линией и на ее пересечении с первым столбцом находят концентрацию белка.

Метод позволяет определять концентрацию белков в присутствии нуклеиновых кислот, если количество последних не превышает 20 %. Чувствительность метода составляет приблизительно 0,1 мг/мл. Результат измерения зависит от аминокислотного состава белков, поэтому этот метод используют для прикидочного определения их концентрации или анализа серийных образцов одного и того же белка.

Спектрофотометрический двухволновый метод Кэлба и Бернлора

В этом методе также проводится измерение оптической плотности D при двух длинах волн 230 и 260 нм, что позволяет точнее оценивать вклад нуклеиновых кислот и снижает зависимость величины светопоглощения от аминокислотного состава индивидуальных белков. Концентрацию белка в мг/мл рассчитывают по формуле

$$C = 183 D_{230} - 75,8 D_{260}.$$

Чувствительность метода составляет около 0,05 мг/мл.

Турбидиметрический метод

Метод основан на помутнении белкового раствора при добавлении к нему осаждающего реагента, например, трихлоруксусной кислоты. Пробу анализируемого раствора с содержанием белка 2–40 мкг/л смешивают с равным объемом 30 %-й трихлоруксусной кислоты. Через 30 мин измеряют поглощение, вызванное помутнением, при длине волны 340 нм против контрольного 15 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. Чувствительность метода при этой длине волны составляет около 1 мкг/л.

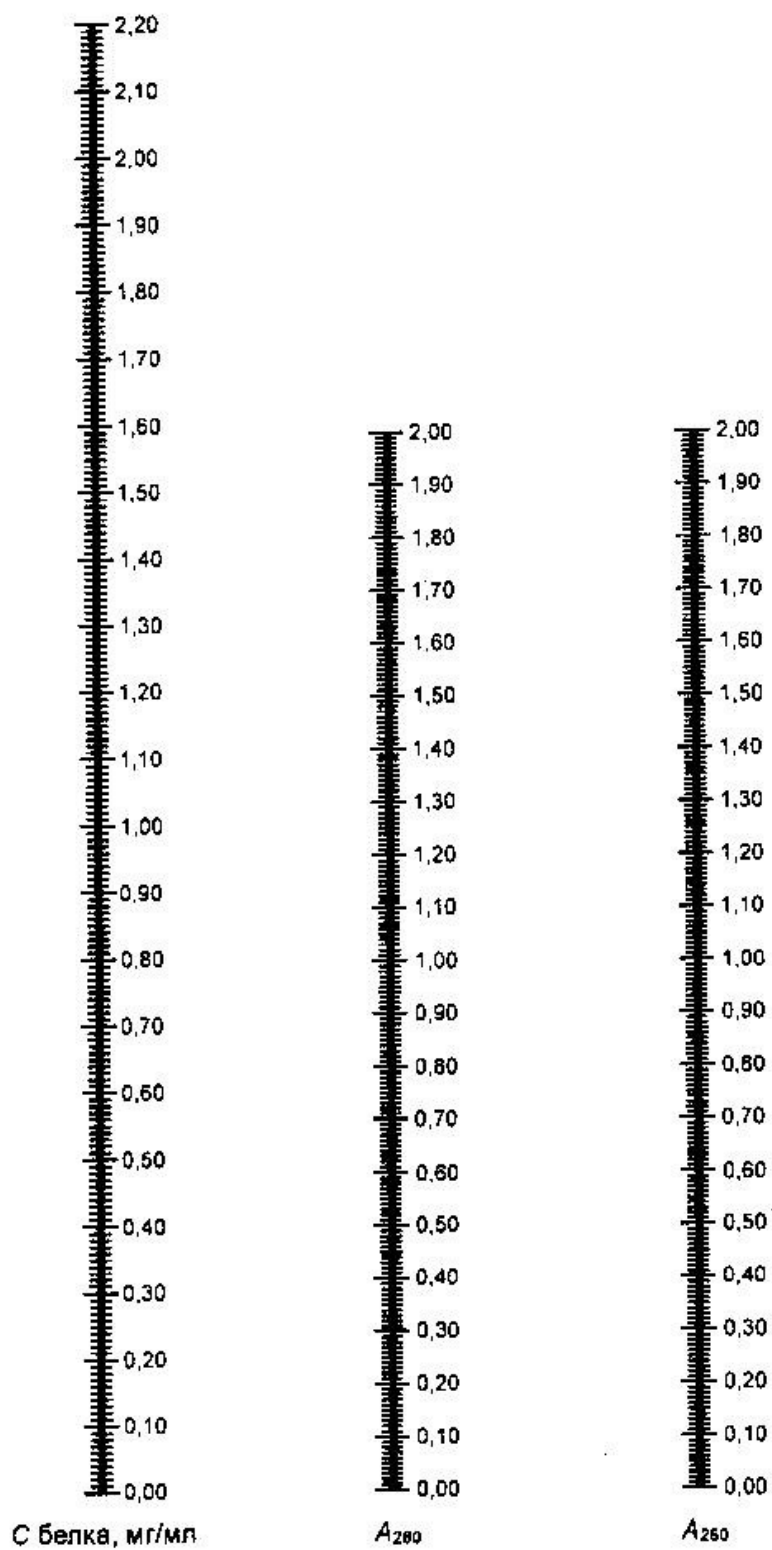


Рис. 4. Номограмма для определения содержания белка по соотношению D_{260} и D_{280}

1.4.2. Колориметрические методы Биуретовый метод

Фотоколориметрические методы основаны на образовании белками окрашенных соединений и измерении оптической плотности их растворов. Концентрации искоемых соединений обычно находят с помощью градуировочных графиков, построенных по стандартным растворам с известными концентрациями белка.

Принцип метода. При добавлении к раствору белка щелочного раствора меди появляется сине-фиолетовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка. Название «биуретовая» реакция получила по наименованию соединения (биурета) – продукта конденсации и дезаминирования двух (bi – дважды) молекул мочевины (urea – мочевина). Подобная реакция протекает и с пептидными связями. Появление окраски обусловлено наличием в исследуемом веществе, по крайней мере, двух пептидных связей (рис. 5).

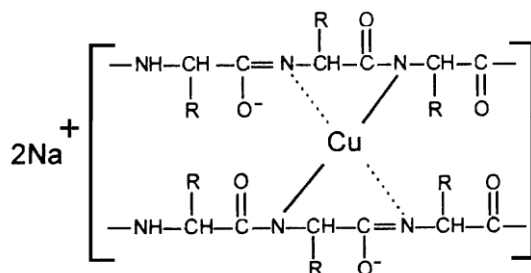


Рис. 5. Комплексное соединение, образующееся при взаимодействии белка с сульфатом меди в щелочной среде (биуретовая реакция)

Для количественного определения белка строят калибровочный график зависимости оптической плотности пробы от содержания белка с помощью растворов с известной концентрацией белка. Полученный график используют для определения содержания белка в исследуемых образцах.

Биуретовая реакция зависит от качества используемых реагентов, поэтому калибровочный график следует строить заново для каждого вновь приготовленного биуретового реактива, а также при длительном хранении реактива.

Реактивы: раствор альбумина, содержащий в 1 мл 10 мг белка; биуретовый реактив.

Приготовление биуретового реактива

К 250 мл дистиллированной воды добавляют 0,75 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) и 3 г виннокислого натрий-калия ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$). Затем при энергичном перемешивании к полученному раствору добавляют 150 мл свободного от углекислого натрия 10 %-го раствора NaOH и 1 г йодистого калия. Общий объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Реактив хранят в полиэтиленовом сосуде или в стеклянной емкости, покрытой изнутри парафином.

Для приготовления раствора щелочи, свободного от углекислого натрия, навеску едкого натра (NaOH) постепенно добавляют к равному по весу количеству воды при непрерывном перемешивании. При растворении едкого натра в воде раствор сильно нагревается, поэтому растворение производят в термостойкой емкости. После охлаждения раствор переливают в стеклянный цилиндр, закрывают резиновой пробкой и оставляют на 2–3 недели до полного осветления. Прозрачный раствор осторожно сливают, определяют его титр, после чего разбавляют до необходимой концентрации.

Построение калибровочного графика зависимости оптической плотности (D) от содержания белка в пробе

В пять пробирок помещают соответственно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мл раствора альбумина (0,2–1,0 мг белка). Затем объем раствора в первых четырех пробирках дистиллированной водой доводят до 1 мл. В шестую пробирку (контрольная проба) вносят 1 мл дистиллированной воды. Далее в каждую из шести пробирок добавляют по 4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.

Интенсивность окраски определяют на спектрофотометре при длине волны в диапазоне 540–650 мкм или на фотоэлектроколориметре (ФЭК), используя соответствующий светофильтр. Исследуемый раствор (пробу) помещают в кювету, в другую кювету сравнения наливают дистиллированную воду. Измеряют оптическую плотность D растворов в каждой из шести проб. Затем рассчитывают ΔD , вычитая из величины оптической плотности проб, содержащих белок (пробирки 1–5), величину оптической плотности контрольной пробы (пробирка 6). Результаты заносят в табл. 6. Полученные данные переносят на калибровочный график (рис. 6), откладывая по оси ординат

величину ΔD для проб с белком, а по оси абсцисс – количество белка, которое находится в соответствующей пробе (табл. 6).

Таблица 6

Калибровочный график, построенный по стандартным растворам альбумина

| Состав /№ пробы | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Раствор белка (1мг/мл), мл | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,0 |
| H ₂ O, мл | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,0 | 1,0 |
| Биуретовый реактив, мл | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Содержание белка в пробе, мг | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,0 |
| Оптическая плотность: (D_{590}) | 0,160 | 0,250 | 0,300 | 0,350 | 0,400 | 0,118 |
| (ΔD_{590}) | 0,042 | 0,132 | 0,182 | 0,232 | 0,282 | 0,000 |

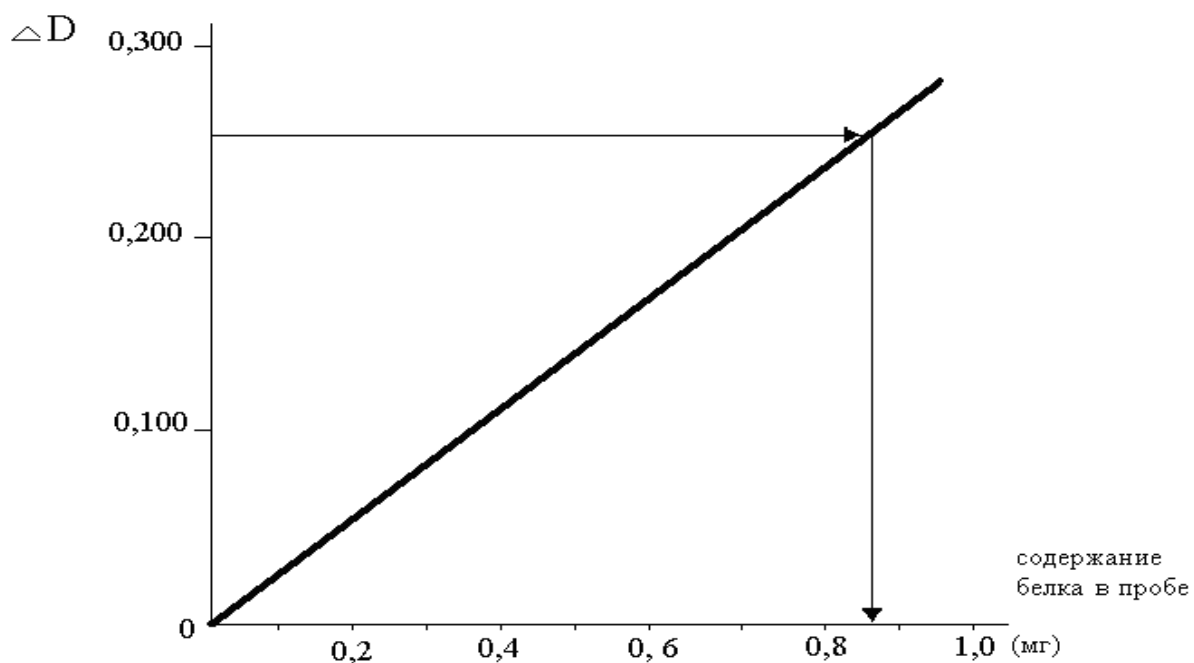


Рис. 6. Калибровочный график для определения концентрации белка биуретовым методом, построенный по данным табл. 6

Определение содержания белка в исследуемом образце.

Подготовку проб для анализа исследуемого образца проводят так же, как при построении калибровочного графика. В анализируемых пробах содержание белка должно быть в пределах 1–10 мг, поэтому необходимо провести предварительную оценку содержания белка в исследуемом образце. Для этого готовят несколько проб, содержание исследуемого образца в которых отличается в 4–5 раз, и измеряют их оптическую плотность. На основании предварительной оценки анализируемые опытные пробы разводят таким образом, чтобы концентрация белка в них была в пределах 0,2–1,0 мг/мл.

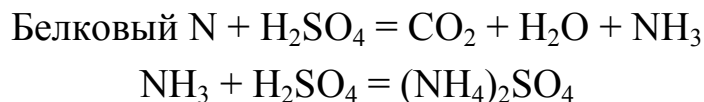
Измерив величину оптической плотности опытных проб, пользуясь калибровочным графиком, определяют содержание белка в исследуемом образце. Например, при проведении реакции с 0,5 мл исследуемого раствора получили $\Delta D_{590} = 0,250$; из графика следует, что в этом объеме пробы содержится 0,7 мг белка (см. рис. 1), т. е. концентрация белка в исследуемом растворе составляет 0,7 мг на 0,5 мл или 1,4 мг/мл.

В присутствии солей аммония могут образовываться окрашенные медноммиачные комплексы, поэтому образцы не должны содержать ионов аммония. Искажает результаты определения белка данным методом также наличие в пробе таких веществ, как ТРИС-буфер, сахароза, глицерин (влияют на развитие окраски), желчные пигменты (окрашиваются биуретовым реактивом), липиды и детергенты (вызывают помутнение проб).

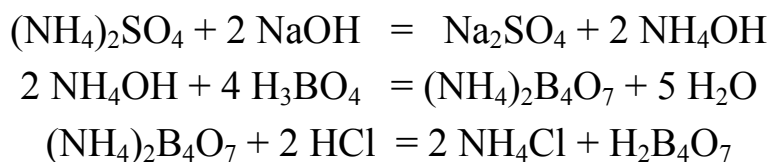
1.4.3. Количественное определение белка по Кьельдалю

Содержание белков в биологическом материале определяют также по количеству общего азота. Для этой цели чаще всего используют метод Кьельдаля. Он отличается высокой точностью и воспроизводимостью, применим для анализа плохо растворимых или совсем нерастворимых в воде образцов. Для количественного исследования белков при решении спорных вопросов в качестве арбитражного принят метод Кьельдаля. Недостатками метода являются его многоступенчатость, затрудняющая автоматизацию анализа, и длительность выполнения.

Принцип метода. Навеску анализируемого материала минерализуют в растворе концентрированной серной кислоты, при этом все органические вещества окисляются до углекислого газа и воды, а азот превращается в аммиак, который образует с серной кислотой аммонийную соль:



Далее аммонийную соль обрабатывают щелочью. Выделяющийся аммиак связывают борной кислотой (вариант А). Содержание образующегося тетрабората аммония определяют титрованием раствором соляной кислоты:



Аммиак можно связывать серной кислотой (вариант В), избыток которой определяют титрованием раствором гидроксида натрия.

Расчет белка по количеству общего азота ведут по формуле, зная, что 1 см³ 0,1 н. раствора кислоты связывает 0,0014 г азота.

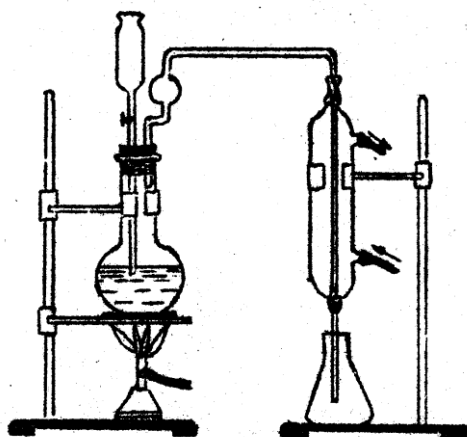
Материалы и реактивы. Молоко или мясной фарш, зернопродукты; концентрированная серная кислота; сульфат меди; 33 %-й раствор гидроксида натрия; 4 %-й раствор борной кислоты (или 0,1 н. раствор серной кислоты); 0,1 н. раствор соляной кислоты (или 0,1 н. раствор гидроксида натрия); смешанный индикатор (смесь 0,1 %-го спиртового раствора метилового красного с 0,1 %-м раствором метиленового голубого).

Посуда, приборы, установки. Колба Кьельдаля, емкость которой 500 см³; цилиндр мерный объемом 100 см³; кусочки пемзы; перегонный аппарат Кьельдаля (рис. 7).

Ход определения (вариант А). Исследуемое молоко в объеме 10 см³ выливают в колбу Кьельдаля, стараясь не замочить горлышко. Затем туда же осторожно вливают 30 см³ концентрированной серной кислоты и прибавляют в качестве катализатора 0,1 г сульфата меди.

Колбу укрепляют в наклонном положении и осторожно подогревают, доводя жидкость до кипения. Кипячение (сжигание) ведут до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной (с голубым оттенком). Для полной минерализации предлагаемой для анализа пробы молока обычно требуется 3–5 ч.

а



б



Рис. 7. Перегонный аппарат Кьельдаля:
а – схема сборки; б – общий вид автоматической установки LK-500
для отгонки по Кьельдалю

По окончании сжигания смесь охлаждают и количественно переносят в перегонную колбу емкостью 500–1000 см³, ополаскивая колбу Кьельдаля 4–5 раз порциями воды по 20–25 см³, которые выливают в ту же перегонную колбу. Общий объем жидкости должен составлять около 150 см³. Затем в перегонную колбу помещают несколько кусочков пемзы для предотвращения толчков во время кипения.

Прежде чем приступить к отгонке аммиака, в приемную колбу наливают из бюретки 50 см³ 4 %-го раствора борной кислоты и 5 ка-

пель смешанного индикатора, изменяющего цвет от зеленого (в щелочной среде) до фиолетового (в кислой). Приемную колбу устанавливают так, чтобы конец холодильника был погружен в раствор борной кислоты. Затем в перегонную колбу осторожно вливают по стенке 30–40 %-й раствор щелочи до появления фиолетового окрашивания и щелочной реакции по лакмусу. Колбу быстро соединяют с холодильником и нагревают до кипения. Конец перегонки определяют с помощью смоченной водой лакмусовой бумажки, которую подносят к концу холодильника, не касаясь его. В случае посинения бумажки (щелочная реакция) перегонку необходимо продолжить. По окончании перегонки приемную колбу отделяют от прибора и дистиллят титруют 0,1 н. раствором соляной кислоты до появления фиолетового окрашивания.

Вычисление результатов. Содержание белка в пробе молока рассчитывают по формуле

$$X = (a \cdot 0,0014 \cdot 6,37 \cdot 100 \cdot 0,95) / (b \cdot 1,03),$$

где X – содержание белка, %; a – количество 0,1 н. раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование тетрабората аммония, см³; b – количество молока, взятого для анализа, см³; 1,03 – коэффициент для пересчета количества молока из см³ в граммы; 0,95 – коэффициент, учитывающий содержание в молоке 5 %-го небелкового азота; 0,0014 – титр раствора соляной кислоты по общему азоту; 6,37 – коэффициент, учитывающий содержание азота в молочных белках (около 15,7 %, т. е. 1/0,157).

Ход определения (вариант В). В колбу Кьельдаля помещают 2–3 г точно взвешенного мелкоизмельченного продукта (мяса, зерна). Затем осторожно вливают 30 см³ концентрированной серной кислоты и прибавляют в качестве катализатора 0,1 г сульфата меди. Колбу укрепляют в наклонном положении и осторожно подогревают, доводя жидкость до кипения. Кипячение (сжигание) ведут до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной (с голубоватым оттенком). Для полной минерализации пробы продукта обычно требуется 3–5 ч.

По окончании сжигания смесь охлаждают и количественно переносят в перегонную колбу объемом 500–1000 см³. Колбу Кьельдаля ополаскивают 4–5 раз порциями воды по 20–25 см³, которые выливают в ту же перегонную колбу. Общий объем жидкости должен

составлять около 150 см³. Затем в перегонную колбу помещают несколько кусочков пемзы для предотвращения толчков во время кипения.

Прежде чем приступить к отгонке аммиака, в приемную колбу вливают из бюретки 50 см³ 0,1 н. раствора серной кислоты (V_1) и две–три капли смешанного индикатора Ташира, изменяющего цвет от сине-фиолетового в кислой среде до зеленого в щелочной. Приемную колбу устанавливают так, чтобы конец холодильника был погружен в раствор серной кислоты.

Далее в перегонную колбу осторожно вливают по стенке 30–40 %-й раствор щелочи до появления фиолетового окрашивания и щелочной реакции по лакмусу (около 50–110 см³). Колбу быстро соединяют с холодильником и жидкость в ней нагревают до кипения. Конец перегонки определяют с помощью смоченной водой лакмусовой бумажки, которую подносят к концу холодильника, не касаясь его. В случае посинения бумажки (щелочной реакции) перегонку необходимо продолжить.

По окончании перегонки приемную колбу отделяют от прибора. Избыток серной кислоты, не связавшейся с аммиаком, находят методом обратного титрования: содержимое приемной колбы титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до появления зеленого окрашивания (V_2). Количество связавшейся серной кислоты (a) находят по разности между объемом прилитой в приемную колбу серной кислоты и результатом обратного титрования ($V_1 - V_2$). Содержание общего азота в пробе продукта находят, умножая количество связавшейся серной кислоты (a) на 0,0014 (1 см³ 0,1 н. раствора кислоты соответствует 0,0014 г азота). Зная содержание азота в белке (в процентах), можно рассчитать общее количество взятого для сжигания белка. Так, содержание азота в белках мяса составляет 16,0 %, а в растительных белках – 17,5 %, поэтому количество общего азота следует умножить на 6,25 или на 5,7, соответственно.

Вычисление результатов. Содержание белка в пробе рассчитывают по формуле

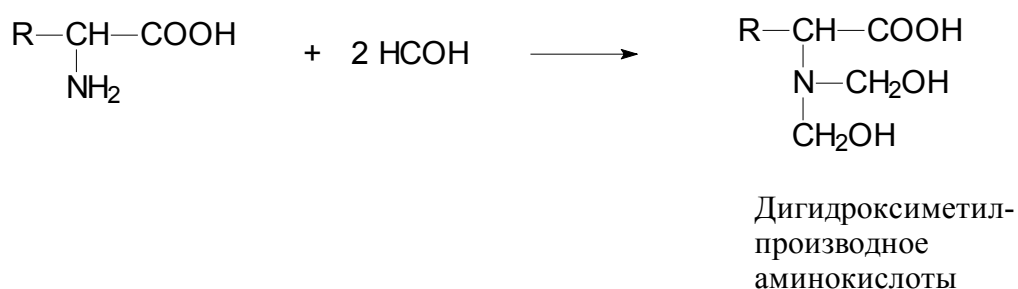
$$X = a \cdot 0,0014 \cdot K \cdot 100 / b,$$

где X – содержание белка, %; a – количество 0,1 н. раствора серной кислоты, связавшейся с аммиаком, см³; K – коэффициент пересчета общего азота на количество белка (6,25 для белков мяса и 5,7 для

растительных белков); b – навеска продукта, г; 0,0014 – титр раствора соляной кислоты по общему азоту; 100 – коэффициент, учитывающий разведение.

1.4.4. Определение аминного азота методом формольного титрования

Принцип метода формольного титрования. Аминным называют азот свободных аминокрупп аминокислот и пептидов. Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой посредством пептидных связей. Эти связи можно расщепить при высокой температуре с помощью ферментов или под действием концентрированных кислот или щелочей. При этом происходит гидролиз белка, т. е. расщепление его на аминокислоты. Гидролиз сопровождается увеличением равного количества свободных амино- и карбоксильных групп. Поскольку аминокислоты, имеющие карбоксильную группу и аминокгруппу, проявляют в водных растворах амфотерные свойства, то титровать непосредственно амино- или карбоксильные группы нельзя. Но это можно сделать, если блокировать одну из этих групп. Определение аминного азота формольным титрованием основывается на блокировании NH_2 -групп формальдегидом:



Образовавшиеся дигидроксиметилпроизводные аминокислот обладают кислыми свойствами и могут быть нейтрализованы щелочью. По количеству израсходованной щелочи вычисляют количество аминного азота, принимая во внимание, что 1 см³ 0,2 н. раствора NaOH соответствует 2,8 мг азота. Метод формольного титрования часто используется в молочной промышленности для определения содержания белка в молоке.

Материалы и реактивы. Гидролизат белка, 0,1 %-й раствор фенолфталеина, 0,2 н. раствор гидроксида натрия, 40 %-й раствор нейтрального формалина (формола) и 0,2 н. раствор соляной кислоты.

Посуда и приборы. Две конические колбы емкостью 50 мл, пипетка объемом 20 мл.

Ход определения. Аминный азот определяется двумя титрованиями – опытным и контрольным.

Контрольное титрование. К 20 см³ дистиллированной воды прибавляют 1 см³ формола (нейтрализованного по фенолфталеину раствора формалина), 5 капель фенолфталеина и 3 см³ 0,2 н. раствора соляной кислоты. Полученный раствор титруют 0,2 н. раствором NaOH до появления ярко-малинового окрашивания (что соответствует рН 9,1). Рассчитывают объем титранта, пошедший на контрольное титрование ($V_{\text{контроль}}$):

$$V_{\text{контроль}} = V_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}},$$

где V_{NaOH} – объем раствора щелочи, пошедший на титрование; V_{HCl} – объем раствора соляной кислоты, взятый на анализ.

Опытное титрование. К 20 см³ испытуемого раствора (гидролизата) прибавляют 5 капель фенолфталеина, 1 см³ формола и титруют 0,2 н. раствором NaOH до ярко-малиновой окраски, одинаковой с контрольной пробой. При этом $V_{\text{опыт}} = V_{\text{NaOH}}$. Вычисление результатов:

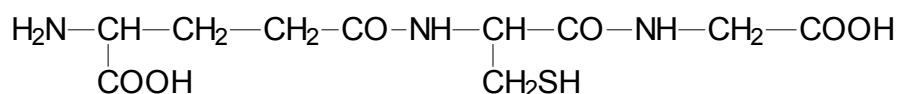
$$m(N) = (V_{\text{опыт}} - V_{\text{контроль}}) 2,8 \text{ мг/мл},$$

где $m(N)$ – масса аминного азота в пробе, взятой на анализ; $V_{\text{опыт}}$ – объем раствора щелочи, пошедший на титрование; $V_{\text{контроль}}$ – объем раствора титранта, пошедший на контрольный опыт; 2,8 – титр раствора гидроксида натрия по аминному азоту.

1.4.5. Количественное определение глутатиона

Важную роль в клетках микроорганизмов, растений и животных играет внутриклеточный трипептид глутатион (γ -глутаминилцистеилглицин). Особенностью строения глутатиона является то, что пептидная связь между глутаминовой кислотой и цистеином образована γ -карбоксильной группой бокового радикала глутами-

новой кислоты, что возможно в пептидах, но не встречается в молекулах белка:



Глутатион содержится в клетках крови, мышечной ткани, семенах растений, в дрожжевых и плесневых грибах. В биологических тканях он находится в восстановленной и окисленной формах, участвуя в регуляции окислительно-восстановительного состояния. Обладая высокой восстанавливающей активностью, глутатион легко окисляется, предохраняя от окисления другие жизненно важные вещества. Наряду с аскорбиновой кислотой, витамином Е и другими антиоксидантами глутатион входит в систему антиоксидантной защиты клеток. Восстановление глутатиона катализирует фермент глутатионредуктаза, коферментом которой служит восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ · 2H). На долю глутатиона в клетках приходится до 90 % активных низкомолекулярных тиоловых SH-групп.

Восстановленная форма глутатиона повышает активность тиоловых ферментов, содержащих в активном центре SH-группу цистеина и, в частности, протеаз, имеющих важное значение в пищевых технологиях и применяемых при переработке пищевого сырья.

При старении дрожжей количество глутатиона в них возрастает, а хлебопекарные качества снижаются, поэтому определение глутатиона в дрожжевых клетках может служить для оценки возраста и качества дрожжей.

Метод количественного вычисления глутатиона заключается в определении его восстановленной формы путем окисления SH-групп с помощью KIO_3 .

Материалы и реактивы. Дрожжи; 5 %-й раствор метафосфорной кислоты HPO_3 ; 1,5 %-й раствор KJ ; 1 %-й раствор крахмала, насыщенный раствор NaCl (индикатор); 0,001 н. раствор KIO_3 ; кварцевый песок.

Посуда и приборы. Мерная колба емкостью 50 см^3 ; коническая колба объемом $100\text{--}150 \text{ см}^3$; пипетки; бумажный фильтр; фарфоровая ступка с пестиком.

Ход определения. В ступке растирают 2 г дрожжей с кварцевым песком. Растертую массу при помощи дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу объемом 50 см³, доводя объем жидкости до метки. Полученный раствор настаивают в течение 5 мин, после чего колбу сильно встряхивают в течение 2–3 мин. Смесь фильтруют через сухой обезвоженный фильтр. В фильтрате определяют количество SH-групп и пересчитывают на содержание восстановленного глутатиона.

В коническую колбу пипеткой вносят 10 см³ фильтрата, добавляют 1,0 см³ 1,5 %-го раствора КJ и 5 капель 1 %-го раствора крахмала. Полученный раствор титруют 0,001 н. раствором КJО₃ до появления устойчивой синей окраски.

Вычисление результатов. Расчет восстановленного глутатиона проводят по формуле

$$W_{(\text{GSH})} = V_{(\text{KJO}_3)} \cdot 0,307 \cdot 250.$$

Здесь $W_{(\text{GSH})}$ – содержание глутатиона в образце дрожжей, взятом на анализ в мг/100 г биологического материала; $V_{(\text{KJO}_3)}$ – объем раствора йодата калия, пошедший на титрование; 250 – коэффициент, позволяющий учесть разведение раствора; 0,307 – титр раствора йодата калия по глутатиону.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение денатурации белков.
2. Какие структуры изменяются при денатурации?
3. Назовите причины денатурации белков.
4. Какие факторы определяют растворимость белков в воде?
5. Назовите причины выпадения белка в осадок.
6. Какую роль играет заряд белковых молекул?
7. Как влияет первичная структура белка на его заряд?
8. Какой заряд приобретет пептид глн-асп-иле-гис при рН: 4,0; 7,0; 10?
9. Укажите заряд пептида тре-арг-асн-фен при рН: 5,0; 7,0 и 9,0.
10. При каком значении рН заряд пептида мет-сер-глу минимальный?
11. Дайте определение изоэлектрической точке белка.

12. В чем заключается принцип метода высаливания?
13. Назовите факторы, вызывающие необратимое осаждение белков.
14. Какой метод нужно применить для разделения белков с разной молекулярной массой?
15. Как можно очистить белок от низкомолекулярных примесей?
16. Каким методом разделяют белки, различающиеся величиной заряда?
17. Перечислите универсальные и специфические цветные реакции на белки.
18. Охарактеризуйте и покажите на схемах виды вторичной структуры белка.
19. Какие связи стабилизируют третичную структуру белка?
20. Каковы особенности регуляции белков четвертичной структуры?
21. На чем основан метод распределительной хроматографии?
22. Охарактеризуйте особенности метода тонкослойной хроматографии.
23. Какой физический закон лежит в основе фотометрических методов исследования?
24. В чем заключается принцип биуретового метода определения белка?
25. Дайте сравнительную оценку методу определения белка по Лоури.
26. Опишите метод Кьельдаля: этапы определения, применение метода.
27. Какой принцип лежит в основе формольного титрования?
28. Обоснуйте применение метода формольного титрования для определения содержания белка в молоке.
29. Напишите формулу окисленной и восстановленной формы глутатиона и перечислите его биологические функции.
30. Объясните принцип йодометрического метода определения глутатиона.

1.5. Выделение сложных белков и определение их состава

Сложные белки состоят из апопротеинов (простых белков) и небелковых компонентов или простетических групп (фосфорная кислота, углеводы, липиды, окрашенные соединения, производные витаминов, нуклеиновые кислоты, ионы металлов и др.). Исследование сложных белков заключается в определении в их составе простых белков и специфических небелковых соединений.

1.5.1. Фосфопротеины

Качественное определение фосфопротеинов в молоке

Фосфопротеины – сложные белки, содержащие в качестве простетической части остатки фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с гидроксильной группой серина или треонина сложной эфирной связью.

К фосфопротеинам относятся казеин молока, вителлин яичного желтка, ихтулин икры рыб и другие белки.

Принцип метода. Для определения фосфорной кислоты в составе фосфопротеина казеина необходимо осуществить его гидролиз и проделать реакцию с молибденовым реактивом.

Материалы и реактивы. Обезжиренное молоко или порошок казеина; 0,1 %-й раствор уксусной кислоты; 0,1 %-й раствор карбоната натрия; 10 %-й раствор гидроксида натрия; 1 %-й раствор сульфата меди; 0,5 %-й раствор фенолфталеина; азотная кислота концентрированная; молибденовый реактив (раствор молибдата аммония в азотной кислоте).

Посуда, приборы. Штатив с пробирками; стакан емкостью 200 см³; воронки; фильтры; стеклянная палочка; пробирка для гидролиза (с обратным холодильником); пипетки объемом 2 и 5 см³.

Ход определения. Для выделения казеина из молока в стакан к 30 см³ обезжиренного молока приливают равный объем дистиллированной воды. Казеин осаждают, добавляя по каплям при перемешивании 0,1 %-й раствор уксусной кислоты. Необходимо избегать избытка кислоты, так как казеин в ней растворяется. Выпавший осадок казеина отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой.

При щелочном гидролизе казеина происходит его распад на белок и фосфат. После осаждения казеина из молока все содержимое с фильтра переносят в колбу для гидролиза с обратным холодильником (или используют 100 мг казеина в виде порошка). Сюда добавляют 2 см³ 0,1 %-го раствора карбоната натрия и 4 см³ 10 %-го раствора гидроксида натрия, затем в течение 15 мин с момента закипания кипятят на умеренном огне (на асбестовой сетке). После охлаждения к гидролизату добавляют равный объем 0,1 %-го раствора карбоната натрия. Раствор делят на две части и проводят реакции на составные части фосфопротеинов.

Простой белок обнаруживают биуретовой реакцией (см. цветные реакции на простые белки).

Для обнаружения фосфорной кислоты (молибденовая проба) к 1 см³ разведенного в пробирке гидролизата казеина добавляют одну каплю фенолфталеина и нейтрализуют одной–двумя каплями концентрированной азотной кислоты. После обесцвечивания вносят 2 см³ молибденового реактива. Затем раствор доводят до кипения, а потом быстро охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется желтый осадок фосфорно-молибденового аммония.

1.5.2. Гликопротеины

Качественное определение гликопротеинов в слюне

Гликопротеины – широко распространенные сложные белки, состоящие из простых белков и простетической группы, представленной нейтральными или кислыми мукополисахаридами. В состав углеводной группы входят гексозы, гексозамины, фукоза, глюкуроновая, нейраминовая (продукт альдольной конденсации маннозамина с пировиноградной кислотой), сиаловая (N-ацетилнейраминовая) кислоты и др. Гликопротеины содержатся в слюне, желудочном соке, плазме крови, яичном белке, молоке, соединительных тканях животных и т. д.

Принцип метода. Для доказательства наличия углеводов в гликопротеинах берут слюну, в которой содержится гликопротеин муцин, и в кислой среде проводят реакцию с α -нафтолом.

Материалы и реактивы. Слюна; уксусная кислота (концентрированная или 1 %-й раствор); 10 %-й раствор гидроксида натрия; 1 %-й раствор сульфата меди; серная кислота концентрированная; 0,2 %-й спиртовой раствор α -нафтола.

Посуда и приборы. Штатив с пробирками; стеклянная палочка.

Ход определения. В две пробирки собирают по 1–2 см³ слюны и по каплям вливают концентрированную уксусную кислоту (или 1 %-й раствор уксусной кислоты) до появления осадка муцина. Осадок муцина в пробирках осторожно промывают водой, придерживая сгусток стеклянной палочкой. Со сгустком муцина проводят реакции на обнаружение белка и углеводов.

В целях обнаружения простого белка к сгустку муцина в первой пробирке добавляют 1 см³ 10 %-го раствора NaOH, размешивают и после растворения проводят биуретовую реакцию.

Для выявления углеводов во вторую пробирку прибавляют 5–6 капель 0,2 %-го раствора α -нафтола, перемешивают и осторожно по стенке наслаивают концентрированную серную кислоту. На границе двух слоев жидкости появляется розово-фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена наличием в муцине моносахаридов и их производных, которые под влиянием серной кислоты превращаются в оксиметилфурфурол, а последний с α -нафтолом дает окрашенное соединение.

1.5.3. Хромопротеины

Качественное определение хромопротеинов в крови

Хромопротеины – сложные белки, простетической группой которых являются окрашенные соединения (от греческого *chromos* – цвет). Наиболее представительной подгруппой этих белков являются гемопроотеины, простетическая группа которых представлена гемом – железосодержащим протопорфирином (рис. 8):

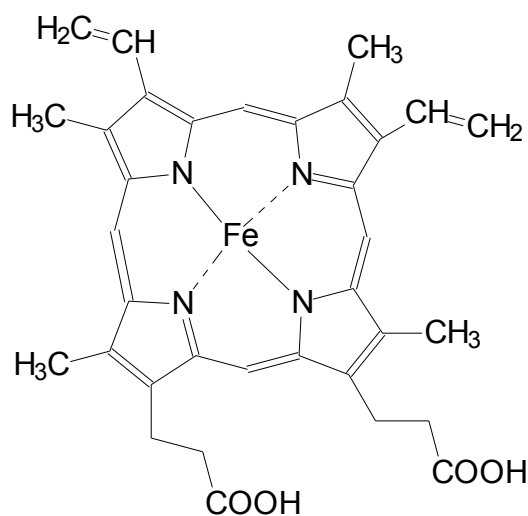


Рис. 8. Строение гема

Представителями гемопротеинов являются гемоглобин крови, миоглобин мышц, ферменты каталаза и пероксидаза, цитохромы тканевого дыхания и микросомального окисления. Хлорофиллсодержащие белки в протопорфириновых кольцах хлорофиллов вместо железа содержат магний.

Хромопротеины принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях тканевого дыхания, фотосинтеза и обезвреживания ксенобиотиков, осуществляют транспорт кислорода и углекислого газа по кровеносной системе, депонируют кислород в тканях, участвуют в световосприятии (родопсин).

Принцип метода. Качественное определение геминовой группировки в гемоглобине основано на способности катализировать окисление бензидина перекисью водорода. Бензидин при этом окисляется в парахинон-диимин, жидкость приобретает синюю окраску, а при отстаивании – красную. Аналогично протекает реакция и с гваяковой кислотой. Эти реакции очень чувствительны и служат для обнаружения минимальных количеств крови.

Материалы и реактивы. Кровь, разбавленная водой; 3 %-й раствор перекиси водорода; 1 %-й раствор бензидина; 1 %-й раствор роданида аммония или роданида калия; концентрированная азотная кислота; 10 %-й раствор хлористоводородной кислоты.

Приборы и посуда. Штатив с пробирками; стеклянная палочка; пипетки объемом 1 см³.

Ход определения. Для проведения бензидиновой пробы в первую пробирку наливают 5 капель крови, во вторую – 5 капель воды. В обе пробирки добавляют по 5 капель 1 %-го раствора бензидина и по 5 капель 3 %-го раствора перекиси водорода. В одной из пробирок жидкость окрашивается в синий цвет.

В целях обнаружения железа на крышку тигля вносят одну–две капли крови и озоляют, добавив три–четыре капли концентрированной азотной кислоты, нагревают до образования сухого остатка. Железо при этом переходит из двухвалентного в трёхвалентное состояние. Затем остаток растворяют в 0,5–1 мл 10 %-го раствора хлористоводородной кислоты. К раствору прибавляют одну–две капли раствора роданида аммония (калия) и наблюдают образование роданида железа $\text{Fe}(\text{CNS})_3$, окрашивающего жидкость в розовый или красный цвет.

1.5.4. Нуклеопроотеины

Качественное определение компонентов нуклеопроотеинов в гидролизате дрожжей

Нуклеопроотеины – это сложные белки, простетическая группа которых представлена нуклеиновыми кислотами. Апопротеинами нуклеопроотеинов служат основные белки гистоны и протамины, иногда негистоновые белки.

Нуклеопроотеины участвуют в хранении и передаче наследственной информации и в процессах биосинтеза белка.

Для качественного определения состава нуклеопроотеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей, после чего специфическими реакциями открывают продукты гидролиза: полипептиды, пуриновые азотистые основания, углевод (пентозу) и фосфорную кислоту.

Материалы и реактивы. Дрожжи пекарские; 10 %-й раствор серной кислоты; 10 %-й раствор гидроксида натрия; 1 %-й раствор сульфата меди; концентрированный раствор аммиака; 2 %-й аммиачный раствор нитрата серебра; молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 см³ 32 %-й азотной кислоты); концентрированная серная кислота; 1 %-й спиртовой раствор тимола; лакмус; 1 %-й раствор дифениламинового реактива.

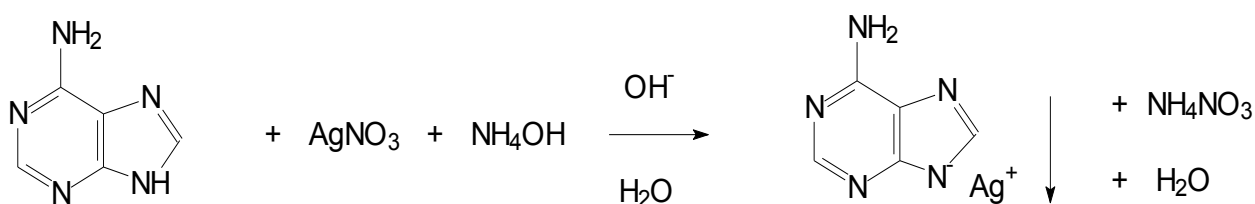
Приборы и посуда. Круглодонная колба с воздушным холодильником; воронка с фильтром; мерный цилиндр объемом 50 см³.

Ход определения. Для проведения гидролиза 2,5 г свежих (или 0,5 г сухих) пекарских дрожжей помещают в круглодонную колбу емкостью 100 см³ с воздушным холодильником, добавляют 20 см³ 10 %-го раствора серной кислоты. Колбу устанавливают на асбестовую сетку и проводят кипячение в течение 1 ч на слабом огне. Затем колбу охлаждают и фильтруют гидролизат через складчатый бумажный фильтр. В прозрачном фильтрате определяют продукты гидролиза нуклеопроотеинов.

В целях обнаружения простого белка к 5 каплям гидролизата дрожжей вливают 10 капель 10 %-го раствора гидроксида натрия до отчетливой щелочной реакции по опущенному в пробирку лакмусу и две капли 1 %-го раствора сульфата меди. Появление розовой или розово-фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в гидролизате соединений, имеющих пептидные связи.

Для проведения серебряной пробы на пуриновые основания к 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют по каплям крепкий раствор аммиака (приблизительно 10 капель) до щелочной реакции по лакмусу, опущенному в пробирку, и 10 капель 2 %-го аммиачного раствора нитрата серебра. Пробирку помещают в штатив и после 7–10 мин отстаивания наблюдают образование светло-коричневого осадка серебряных солей пуриновых оснований (содержимое пробирки перемешивать при отстаивании не допускается).

Реакция идет по следующему уравнению:

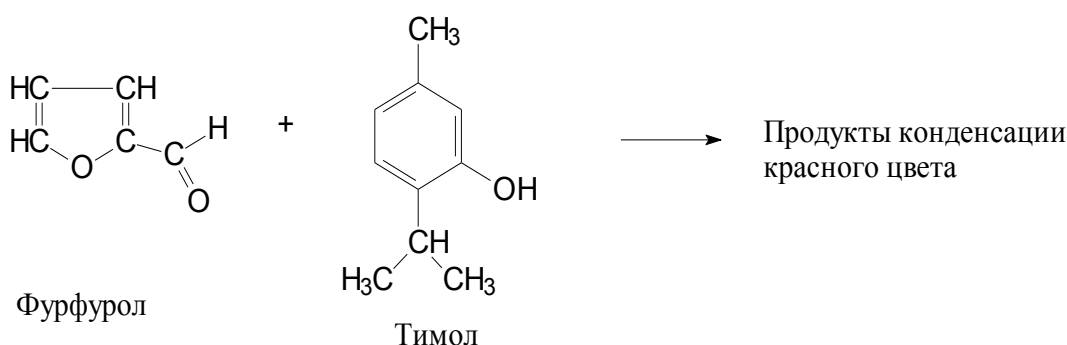
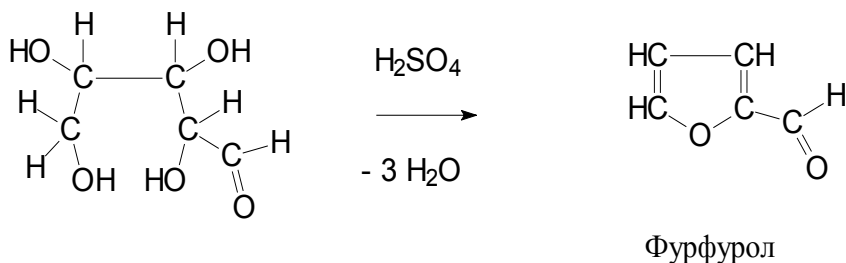
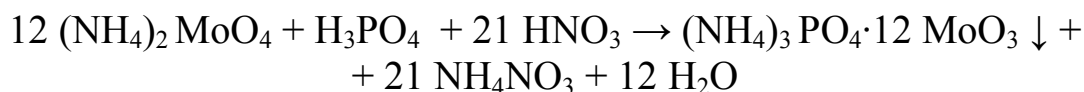


Для качественной реакции на пентозу (реакция Молиша) к 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют три капли 1 %-го спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно доливают 20–30 капель концентрированной серной кислоты. После встряхивания пробирки на дне оседает продукт конденсации красного цвета. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с пентозой происходит ее дегидратация с образованием фурфурола, который дает с тимолом продукт конденсации красного цвета.

При реакции на дезоксирибозу и рибозу дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с раствором рибозы – зеленое. К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель 1 %-го раствора дифениламина, пробирки ставят на 15 мин в кипящую водяную баню. Наблюдается сине-зеленое окрашивание.

Для молибденовой пробы на фосфорную кислоту к 10 каплям гидролизата дрожжей приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет (не осадок). Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорно-молибденового аммония.

Реакция идет по уравнению:



Контрольные вопросы

1. Дайте определение сложным белкам.
2. Приведите примеры сложных белков.
3. Охарактеризуйте строение и биологическую роль гликопротеинов.
4. Приведите примеры углеводов, входящих в состав гликопротеинов.
5. Какие вещества относятся к хромопротеинам?
6. Какие вещества называются металлопротеинами?
7. Охарактеризуйте строение простетической группы гемопро-теинов.
8. В состав каких сложных белков входят производные вита-мина В₂?
9. Охарактеризуйте строение и биологическую роль нуклео-протеинов.
10. Приведите примеры фосфопротеинов. Какова их биологи-ческая роль?

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

2.1. Химическая природа ферментов

Ферменты (энзимы) – это вещества, которые присутствуют в тканях и клетках всех живых организмов и способны во много раз ускорять протекающие в них химические реакции.

Представления о белковой природе ферментов сложились в 30-х годах XX века, однако в 80-х годах были обнаружены ферменты рибонуклеотидной природы – рибозимы, тем не менее большинство биологических катализаторов имеют белковую природу.

Ферменты – самый крупный и наиболее высокоспециализированный класс белковых молекул. Они могут быть простыми белками (например, гидролитические ферменты – протеазы, липазы, рибонуклеаза). Но в большинстве случаев ферменты – сложные белки. **Холоферменты** содержат наряду с белковой частью (**апоферментом**) небелковый компонент (**кофермент** или **простетическую группу**).

Небелковый компонент может быть связан с белковой частью молекулы ковалентными и нековалентными связями. В первом случае он называется простетической группой (например, ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота). Во втором случае кофермент взаимодействует с ферментом только на время химической реакции (например, НАД⁺, НАДФ⁺). Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях субстрата. В состав коферментов входит большинство водорастворимых витаминов.

Более 25 % всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Ионы металлов выполняют в ферментах разнообразные функции. Одни непосредственно участвуют в каталитическом акте, другие стабилизируют активный центр или поддерживают конформацию молекулы фермента; ионы двухвалентных металлов могут стабилизировать фермент-субстратный комплекс.

2.2. Свойства ферментов

В отличие от большинства катализаторов неорганической природы ферменты обладают более высокой эффективностью и **спе-**

цифичностью действия. В то время как небелковые катализаторы обычно ускоряют реакции в $10-10^3$ раз, степень ускорения реакций под действием ферментов составляет 10^6-10^{12} .

Один и тот же неорганический катализатор может быть использован для ускорения многих реакций, в которых участвуют самые разнообразные вещества. Что же касается ферментов, то они воздействуют либо только на один субстрат (**абсолютная субстратная специфичность**), либо на определенный класс субстратов (**относительная субстратная специфичность**). Например, уреаза катализирует только гидролиз мочевины, а пепсин – только гидролиз белков. Субстратная специфичность объясняется пространственным соответствием активного центра фермента и его субстрата.

Ферменты **термолабильны** – нагревание до температуры $70-80\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к инактивации большинства ферментов за счет денатурации – разрушения вторичной и третичной структуры белка, т. е. потери пространственной конфигурации молекулы фермента, в том числе его активного центра.

Ферменты **чувствительны также к изменению рН среды**, при которой они действуют. Это связано с изменением пространственной конфигурации молекулы фермента при присоединении или отщеплении протонов. Для каждого из ферментов существуют определенные **оптимальные значения температуры и рН среды**, при которых они проявляют свою максимальную активность. Например, пепсин наиболее активен при рН 1,5–2,0 (кислая среда), а трипсин – при 7,8–8,0 (слабощелочная среда). Если рН среды значительно отличается от оптимума, то фермент полностью или частично теряет свою активность.

Температура и рН относятся к неспецифическим факторам, так как в той или иной мере влияют на активность всех ферментов. Кроме того, существуют специфические факторы, которые в очень низких концентрациях повышают активность ферментов (**активаторы**) или, напротив, снижают ее (**ингибиторы**).

Регуляция активности ферментов в организме происходит через **аллостерический центр**, который обычно удален от активного центра. Этот процесс происходит чаще всего по принципу обратной отрицательной связи, когда продукт реакции аллостерически подавляет активность фермента.

Снижение активности фермента наблюдается и при конкуренции ингибитора с субстратом за активный центр фермента в случае их структурного сходства (*конкурентное ингибирование*). Это варианты обратимого ингибирования, при котором после удаления ингибитора активность фермента восстанавливается. Однако возможно и необратимое ингибирование вследствие химической модификации активного центра.

2.3. Классификация и номенклатура ферментов

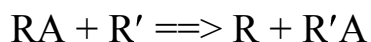
В настоящее время известно более 4000 ферментов. Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве.

Основой принятой классификации является *тип катализируемой реакции*, который является специфичным для действия любого фермента.

Согласно Международной классификации, ферменты делят на *шесть главных классов*:

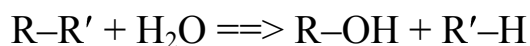
1. *Оксидоредуктазы* – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. В активном центре оксидоредуктаз содержатся в качестве коферментов электронноакцепторные или электроннодонорные группы (например: гем, НАД⁺ или ФАД). К числу оксидоредуктаз относятся дегидрогеназы, участвующие в энергетических процессах. Они катализируют реакции окисления биологических субстратов – углеводов, органических кислот, аминокислот, спиртов, а выделяющаяся при этом энергия затем аккумулируется в макроэргических связях аденозинтрифосфата (АТФ). Именно с НАД⁺ или ФАД начинается последовательность оксидоредуктаз в митохондриях клетки, называемая цепью тканевого дыхания. Она включает в себя также ФМН, убихинон и цитохромы, а конечным акцептором электронов и протонов является O₂.

2. *Трансферазы* – ферменты, которые катализируют обратимые реакции внутримолекулярного или межмолекулярного переноса атомов или группы атомов:



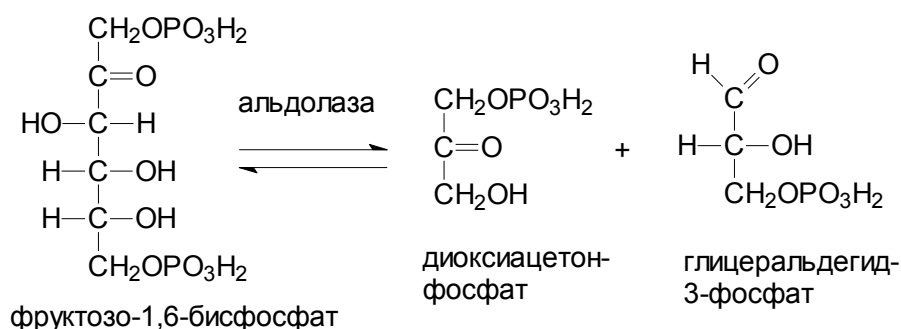
Трансферазы участвуют в реакциях метаболизма, связывающих процессы обмена углеводов, белков и липидов.

3. **Гидролазы** – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, т.е. реакции расщепления веществ с присоединением элементов воды по месту расщепляемой связи:

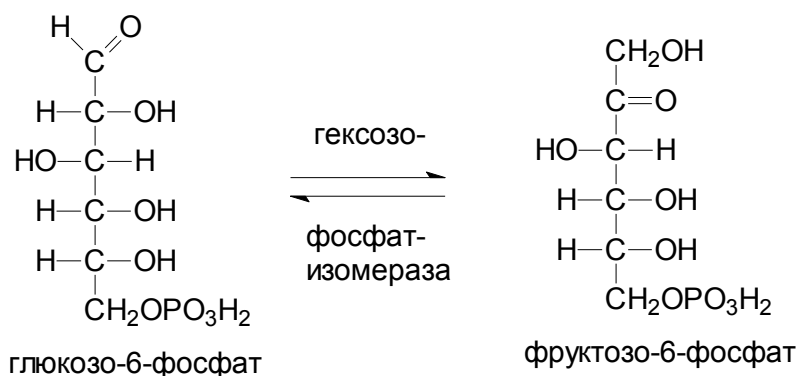


Гидролазы широко представлены в живых организмах. К ним относятся ферменты, участвующие в переваривании белков, углеводов и липидов в желудочно-кишечном тракте (протеазы, гликозидазы и липазы соответственно). Многие гидролазы применяются в пищевых технологиях.

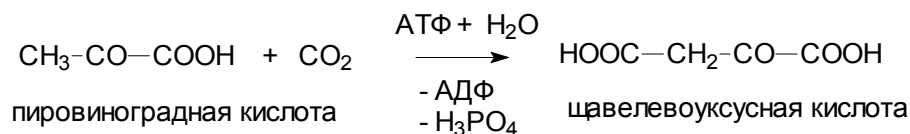
4. **Лиазы** – ферменты, катализирующие негидролитический разрыв связей C–C с образованием двойных связей. Примером такой реакции служит расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата с образованием двух фосфотриоз, катализируемое ферментом альдолазой:



5. **Изомеразы** – ферменты, которые катализируют реакции изомеризации. Например, фермент гексозофосфатизомераза катализирует изомерные превращения гексоз:



6. **Лигазы (синтетазы)** – ферменты, которые катализируют необратимые реакции синтеза. Эти реакции идут с затратой энергии, чаще всего в форме АТФ. Например, карбоксилирование пировиноградной кислоты под действием карбоксилазы:



Внутри основных классов выделяются **подклассы**: например, гидролазы по типу гидролизуемых субстратов делятся на ферменты, катализирующие гидролиз эфиров карбоновых кислот (подкласс 3.1), гликозидов (подкласс 3.2), простых эфиров и тиоэфиров (подкласс 3.3), пептидов (подкласс 3.4) и т.д. В свою очередь подклассы делятся на подподклассы, а внутри подподклассов каждый фермент получает порядковый номер. В соответствии с этим каждому ферменту присваивается четырехзначный цифровой шифр. Например, шифр ацетилхолинэстеразы КФ 3.1.1.7, где КФ – классификация ферментов, шифр алкогольдегидрогеназы – КФ 1.1.1.1.

Общепринятыми являются названия ферментов с окончанием «аза», прибавляемым к названию субстрата, превращение которого ускоряется данным ферментом (например, амилаза от греч. *Amylon* – крахмал, или липаза от греч. *Lipos* – жир и т.д.). Ферменты, кроме того, имеют названия, которые разделяются на рабочие и систематические. Рабочее название образуется из объединения названия субстрата, типа реакции и окончания «-аза».

Например: лактат + дегидроген(изация) + аза = лактатдегидрогеназа.

Систематическое название фермента формируется следующим образом: (название субстратов (через дробь), название типа химического превращения + аза). Лактатдегидрогеназа будет иметь систематическое название «L-лактат:NAD⁺ оксидоредуктаза».

Разделение ферментов на классы строгое и не допускает произвольного изменения номеров.

2.4. Единицы активности ферментов

Как правило, ферменты присутствуют в биологических объектах в ничтожно малых концентрациях, поэтому больший интерес представляет не количественное содержание ферментов, а их активность по скорости ферментативной реакции. Скорость реакции измеряется по убыли субстрата или накоплению продукта за единицу времени.

Международная единица активности ферментов (Е) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в оптимальных для данного фермента условиях.

В Международной системе единиц (СИ) единицей активности фермента является **катал (кат)** – количество фермента, необходимое для каталитического превращения 1 моля субстрата за 1 с.

Характеристикой ферментативной реакции является величина «число оборотов фермента», показывающая, сколько молекул субстрата подвергается превращению за единицу времени в расчете на одну молекулу фермента.

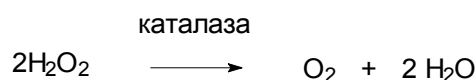
Регуляция активности ферментативных реакций многообразна. Она может осуществляться за счет изменения факторов, влияющих на активность фермента, в том числе рН, температуры, концентрации субстратов, активаторов и ингибиторов.

2.5. Качественные реакции на присутствие ферментов

Присутствие ферментов в тканях животного и растительного происхождения можно обнаружить по их активности при помощи качественных реакций.

2.5.1. Обнаружение активности каталазы в крови

Каталаза – окислительно-восстановительный фермент, широко встречающийся в животных и растительных тканях. Биологическая роль каталазы заключается в расщеплении токсичного для тканей пероксида водорода, образующегося в ходе физиологических окислительно-восстановительных процессов, и в повышенных количествах – в условиях патологии



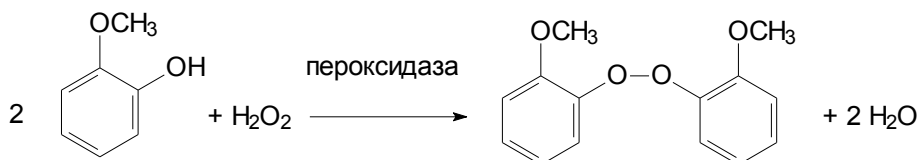
Материалы исследования и реактивы. Кровь дефибринированная, 1 %-й раствор пероксида водорода.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают около 1 мл крови и затем добавляют 10–20 капель раствора пероксида водорода. Происходит бурное выделение кислорода, жидкость в пробирке вспенивается. Повторяют пробу с прокипяченной кровью. Отмечают различие.

2.5.2. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле

Окислительно-восстановительный фермент *пероксидаза* широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных тканях (хрен, картофель и др.). В организме животных пероксидаза содержится преимущественно в крови, мышечной ткани, молоке. В молочной промышленности с помощью реакции на пероксидазу контролируют эффективность пастеризации молока. Пероксидаза катализирует с помощью перекиси водорода окисление многих фенолов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и др.). Так, при окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета:



Материалы исследования и реактивы. Сырой и вареный картофель, 5 %-й спиртовой раствор гваякола, 1 %-й раствор пероксида водорода.

Приборы. Нож, пипетки или капельницы.

Ход определения. На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят по 1–2 капли растворов гваякола и пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется. Необходимо отметить результаты и объяснить различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

метиленового синего. Смесь взбалтывают и ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С. Через некоторое время молоко в первой пробирке обесцветится вследствие катализируемого ксантиноксидазой восстановления метиленового синего и превращения последнего в неокрашенную восстановленную форму. При этом формальдегид окисляется в муравьиную кислоту. Во второй пробирке с кипяченым молоком обесцвечивания метиленового синего не произойдет вследствие тепловой денатурации фермента.

2.5.4. Обнаружение активности амилазы в слюне

Гидролитический фермент слюны *α-амилаза* катализирует реакцию гидролиза α -1,4-гликозидных связей крахмала с образованием дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов гидролиза, называемых декстринами, которые дают с раствором йода различное окрашивание:

| | |
|-----------------|------------------------------|
| крахмал | синяя окраска с йодом |
| ↓ | |
| амилодекстрины | синяя окраска с йодом |
| ↓ | |
| эритродекстрины | красно-бурая окраска с йодом |
| ↓ | |
| ахродекстрины | отсутствие окраски с йодом |
| ↓ | |
| мальтоза | отсутствие окраски с йодом |

Декстрины, близкие по строению к крахмалу (амилодекстрины), дают сине-фиолетовое окрашивание с йодом, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза вообще не дают окрашивания.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10–20 раз, 1 %-й раствор крахмала, раствор йода.

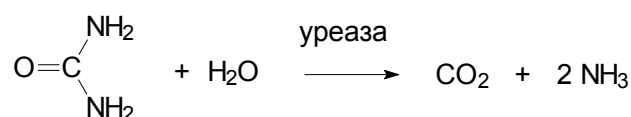
Приборы. Пробирки, стеклянные палочки, часовые стекла.

Ход определения. В пробирку наливают 5–10 мл 1 %-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10–20 раз слюны.

Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С. Затем через 2, 4, 6 и 8 мин стеклянной палочкой из пробирки отбирают 1–2 капли раствора крахмала и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость с йодом будет давать синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться йодом в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, перестанут окрашиваться совсем (останется желтый цвет йода).

2.5.5. Обнаружение активности уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака:



Уреаза содержится в соевых бобах, синтезируется некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

Материалы для исследования и реактивы. Соевая мука, 2 %-й раствор мочевины, 1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетка емкостью 5 мл, водяная баня.

Ход определения. В две пробирки наливают по 5 мл раствора мочевины и вносят по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавляют 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхивают и пробирки ставят на 5–10 мин в водяную баню с температурой 37–40 °С. Активность уреазы определяют путем обнаружения аммиака. Выделение аммиака в первой пробирке определяют по характерному запаху или по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака.

2.6. Свойства ферментов

2.6.1. Специфичность действия ферментов

Ферменты специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов, на которые они действуют. Так, амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на белки. Сычужный фермент воздействует на казеин молока, но не влияет на полисахариды и т. д.

Материалы исследования и реактивы. 1 %-й раствор крахмала, молоко, слюна, разбавленная в 5–10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-м растворе йодида калия, 1 %-й раствор сычужного фермента.

Приборы. Пробирки, водяная баня, пипетки емкостью 1 и 5 мл.

Ход определения. Берут четыре пробирки, нумеруют их. В пробирки 1 и 2 наливают по 5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 – по 5 мл молока. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 1 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 – по 1 мл раствора сычужного фермента. Все 4 пробирки на 10–15 мин ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирках с молоком, а расщепление крахмала проверяют добавлением в пробирки 2–3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в табл. 7.

Таблица 7

Определение специфичности ферментов

| Субстраты и ферменты | Номера пробирок | | | |
|--------------------------|-----------------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Крахмал | + | + | – | – |
| Казеин молока | – | – | + | + |
| Амилаза | + | – | + | – |
| Сычужный фермент | – | + | – | + |
| Изменение цвета раствора | | | | |

Результаты опыта объясняются тем, что створаживание белка молока происходит вследствие частичного гидролиза казеина при участии сычужного фермента, а крахмал расщепляется только под действием амилазы слюны.

2.6.2. Термолабильность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является *термолабильность*, т. е. чувствительность фермента к небольшим изменениям температуры среды. Большинство ферментов при нагревании выше температуры 70 °С утрачивают свои каталитические свойства – инактивируются. Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. В термолабильности ферментов можно убедиться при исследовании гидролиза крахмала с помощью *амилазы*.

Материалы исследования и реактивы. 1 %-й раствор крахмала, слюна, разбавленная в 10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-м растворе йодида калия.

Приборы. Пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 5 мл.

Ход определения. В одну из пробирок наливают около 1 мл прокипяченной в течение 5–8 мин разбавленной слюны, в другую – около 1 мл некипяченной разбавленной слюны. В обе пробирки наливают по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки помещают на 10 мин в водяную баню с температурой 37–40 °С.

Затем в обе пробирки прибавляют по 2–3 капли раствора йода и по окраске смесей делают выводы о протекании гидролиза крахмала.

2.6.3. Влияние рН среды на активность ферментов

Для разных ферментов существуют определенные значения рН (кислотности раствора), при котором фермент наиболее активен (оптимум рН).

Например, для пепсина оптимум рН 1,5–2,5, для щелочной фосфатазы рН 9–10 и т.д. Для амилазы слюны оптимум рН 6,8; в кислой и щелочной среде активность амилазы снижается. Оптимум рН для амилазы слюны можно установить при определении степени гидролиза крахмала при различных значениях рН. О расщеплении крахмала судят по его реакции с раствором йода. При определенном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет частично или же крахмал совсем не будет расщепляться.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10–20 раз, 1 %-й раствор крахмала, раствор йода, буферные растворы с рН 3,0, 7,0 и 9,0.

Приборы. Штатив с пробирками, термостат или водяная баня температурой 37–40 °С.

Ход определения. В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В пробирки соответственно добавляют 1 мл буферного раствора с рН 3,0; 7,0 и 9,0 и по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню. Через 10 мин пробирки вынимают, добавляют в каждую по 2–3 капли раствора йода и по окраске жидкости судят о степени гидролиза крахмала. Результаты наблюдений заносят в табл. 8 и делают вывод об оптимальном значении рН для действия фермента амилазы.

Таблица 8

Определение оптимума рН амилазы

| Номер пробирки | рН раствора | Окраска с йодом |
|----------------|-------------|-----------------|
| 1 | 3,0 | |
| 2 | 7,0 | |
| 3 | 9,0 | |

2.6.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Активаторы и ингибиторы прямо или косвенно (аллостерически) влияют на активный центр фермента и изменяют его каталитическую активность. Активаторами часто служат ионы металлов I или II групп, некоторые анионы, трипептид глутатион и др. Ингибиторами могут быть соли тяжёлых металлов, промежуточные или конечные продукты реакции, структурные аналоги субстратов, некоторые белки и другие вещества. Действие активаторов и ингибиторов можно наблюдать на примере активности амилазы.

Материалы для исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 3–5 раз, 1 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор хлорида натрия, 1 %-й раствор сульфата меди, раствор йода.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетки объемом 1 и 5 мл.

Ход определения. В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В первую пробирку добавляют 1 мл раствора хлорида натрия, во вторую 1 мл 1 %-го раствора сульфата меди, в третью – 1 мл воды. Затем в каждую пробирку отмеривают по 1 мл раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

Далее из каждой пробирки отбирают по 0,5 мл содержимого в другие пробирки, добавляют туда по капле раствора йода и наблюдают окраску. То же самое проделывают дважды с интервалом в 5 мин. Результаты заносят в табл. 9 и делают выводы.

Таблица 9

Определение активатора и ингибитора амилазы

| Время реакции, мин | Окраска с йодом | | |
|-----------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| | NaCl | CuSO ₄ | H ₂ O |
| 5 | | | |
| 10 | | | |
| 15 | | | |

2.7. Методы количественного определения активности ферментов

Активность фермента обычно определяют по скорости убыли субстрата или по скорости накопления продуктов реакции. За единицу активности фермента принят **катал** (кат), равный количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 с. Кроме того, применяются кратные единицы, например, 1 нкат (нанокатал), равный $1 \cdot 10^{-9}$ катала. Более широко употребляется международная единица активности ферментов. Активность в международных единицах соответствует количеству субстрата в микромолях, превращенного за 1 мин: $1\text{Е} = 1 \text{ мкмоль/мин}$. Удельная активность – это отношение активности к массе очищенного фермента или к массе белка. Она выражается в кат/кг или Е/мг.

2.7.1. Определение активности липазы

Гидролитический фермент **липаза** широко распространен в тканях животных и растений. Особенно много его содержится в поджелудочной железе, тканях мышц, семенах различных растений;

также в значительных количествах его образуют плесневые грибы и некоторые бактерии. Липаза катализирует реакцию расщепления жиров на глицерин и жирные кислоты, которая начинается обычно с отщепления остатка жирной кислоты в первом положении:



Полученные при этом жирные кислоты можно нейтрализовать щелочью. По количеству щелочи, пошедшей на титрование свободных жирных кислот, образующихся за определенный промежуток времени, судят об активности липазы.

Материалы исследования и реактивы. Молоко пастеризованное, липаза поджелудочной железы, 0,1 н. и 0,01 н. растворы гидроксида натрия, 0,1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Колбы конические объемом 100 мл, градуированная пипетка емкостью 1 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

Ход определения. В колбу отмеривают 50 мл пастеризованного молока, прибавляют 3–5 капель фенолфталеина и нейтрализуют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Затем колбу ставят на 3–5 мин в водяную баню с температурой 37–40 °С и после этого в нее добавляют 3 мл раствора липазы (замечая при этом время). Содержимое колбы тщательно перемешивают, отбирают в коническую колбу 5 мл смеси, охлаждают под струей водопроводной воды и титруют из микропипетки 0,01 н. раствором NaOH. Полученные результаты выражают графически, откладывая по вертикали количество пошедшего на титрование 0,1 н. раствора NaOH, а по горизонтали – время инкубации. Вычисляют активность (А) в мкмоль/мин по формуле

$$A = (V_1 - V_0) 50 / (5 t),$$

где А – активность липазы в мкмоль/мин; V_0 – объем раствора щелочи, пошедший на нейтрализацию молока в начале эксперимента; V_1 – объем раствора щелочи, пошедший на титрование 5 мл смеси в конце опыта; 50 – объем молока, взятый на анализ; 5 – объем реакционной смеси, взятый на титрование; t – время эксперимента.

2.7.2. Определение активности трипсина

Трипсин относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в реакционной среде, где в качестве субстрата используется казеин.

Материалы исследования и реактивы. Раствор казеина, раствор трипсина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, раствор формалина (формол), 1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Колбы конические емкостью 100 мл, пипетка объемом 10 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

Ход определения. В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до температуры 35–37 °С и прибавляют 2 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования. Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при температуре 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота.

Определение аминного азота методом формольного титрования

К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (не записывая объем). Затем в раствор добавляют 2 мл формола и вновь титруют 0,1 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (записывая объем).

Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – время инкубации. Активность трипсина (А) в мкмоль/мин вычисляют по формуле

$$A = (V_1 - V_0) 50 / (10 t),$$

где А – активность трипсина в мкмоль/мин; V_0 – объем раствора щелочи, пошедший на титрование реакционной смеси в начале эксперимента; V_1 – объем раствора щелочи, пошедший на титрование 10 мл смеси в конце опыта; 50 – объем молока, взятый на анализ; 10 – объем реакционной смеси, взятый на титрование; t – время эксперимента.

2.7.3. Определение активности амилазы

Определение активности амилазы методом серийных разведений

Метод основан на определении наименьшего количества *амилазы*, полностью расщепляющей при стандартных условиях (оптимальном значении рН и температуры) весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается в условных единицах (у.е.) по количеству 0,1 %-го раствора крахмала, расщепляемого 1 мл неразведенной слюны при температуре 37 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160–320 у.е.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,1 %-й раствор крахмала, раствор йода в йодиде калия.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетка объемом 1 мл, термостат на 37 °С.

Ход определения. В 10 пробирок наливают по 1 мл воды. Далее в первую пробирку добавляют 1 мл разбавленной в 10 раз слюны и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку и также тщательно перемешивают. В третью пробирку из второй переносят 1 мл жидкости и т. д. Из последней (десятой) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 1 мл раствора крахмала и перемешивают. Все пробирки помещают на 30 мин в термостат при температуре 37 °С. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой и добавляют по 1–2 капли раствора йода. Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвет. Результаты наблюдений заносят в табл. 10.

Таблица 10

| Окраска с йодом (номера пробирок) | Разведение слюны в пробирках | | | | | | | | | |
|--|------------------------------|------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 | 1/5120 | 1/10240 |
| Желтая | | | | | | | | | | |
| Розовая | | | | | | | | | | |
| Фиолетовая | | | | | | | | | | |

Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской жидкости, где гидролиз крахмала прошел полностью, и делают расчет амилазной активности слюны.

Пример. Допустим, что желтая окраска появилась в четвертой пробирке, где слюна была разбавлена в 160 раз. Умножив величину разведения на 2 (раствор крахмала в опыте в миллилитрах), получим амилазную активность для данного раствора: $160 \cdot 2 = 320$, т. е. под влиянием амилазы, содержащейся в 1 мл неразбавленной слюны, произошло расщепление 320 мл 1 %-го раствора крахмала.

Определение активности альфа-амилазы фотокolorиметрическим методом

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,15 %-й раствор крахмала-индикатора, раствор йода в йодиде калия ($D_{400} = 0,22 \pm 0,01$). Приготовление раствора крахмала: взвесить 1,5 г крахмала-индикатора, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавить около 30 мл дистиллированной воды, поместить в кипящую водяную баню при постоянном перемешивании до появления опалесценции. Колбу охладить, добавить 10 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,7), объем в колбе довести до 100 мл дистиллированной водой.

Приборы. Штатив с пробирками, колбы омкостью 50 мл, пипетки объемом 1 и 10 мл, термостат на 37 °С, фотоэлектрокolorиметр.

Ход определения. 5 мл исследуемого раствора фермента выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение 5–7 мин, затем добавляют 10 мл раствора крахмала. Инкубируют в термостате при температуре 30 °С в течение 10 мин. Из смеси отбирают по 0,25 мл, помещают в колбу, куда заранее вносят 25 мл йодного реагента ($D_{400} = 0,22 \pm 0,01$). Измеряют оптическую плотность ($\lambda = 670$ нм) на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Активность α -амилазы (А) рассчитывают по формуле

$$(D_k - D_o) / D_k \cdot 0,1 = C,$$

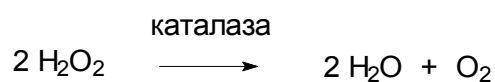
здесь D_k – оптическая плотность контрольного раствора; D_o – оптическая плотность опытного раствора; C – безразмерная величина, выражающая соотношение оптических плотностей опытного и контрольного растворов ($0,02 < C < 0,07$).

$$A = (7,26 \cdot C - 0,03766) / a,$$

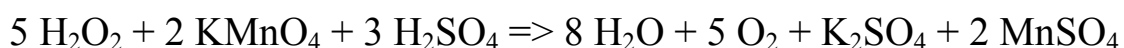
где A – активность альфа-амилазы; a – разведение.

2.7.4. Определение активности каталазы

Фермент каталаза содержится в сыром молоке, особенно много каталазы находится в молозиве и в молоке, полученном от животных, больных маститом. Каталаза присутствует также в крови человека и животных и в любых растительных и животных тканях, являясь одним из компонентов антиоксидантной системы организма. Каталаза вызывает разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород:



Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграммов перекиси водорода, разрушенной за 30 мин при определенных условиях опыта. Для определения наличия перекиси водорода используется титрование ее раствором перманганата калия в кислой среде:



Определение активности каталазы молока по методу А.Н. Баха и С.Р. Зубковой

Материалы исследования и реактивы. Молоко сырое, разведенное в 2 раза (5 мл молока смешивают с 5 мл воды), 1 %-й раствор перекиси водорода, 10 %-й раствор серной кислоты, 0,1 н. раствор перманганата калия.

Приборы. Конические колбы вместимостью 100 мл, пипетки градуированные емкостью 5 и 10 мл, пипетки объемом 1 мл.

Ход определения. В две конические колбы отбирают по 7 мл дистиллированной воды. Затем в одну из них прибавляют 1 мл разведенного в 2 раза сырого молока, а в другую 1 мл разведенного молока, но предварительно прокипяченного. В обе колбы добавляют по 1 мл 1 %-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин.

Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и оттитровывают 0,1 н. раствором перманганата калия остаточное количество пероксида водорода до появления светло-розового окрашивания. Расчёт результата анализа проводится по формуле

$$A = ((V_k - V_o) 0,5 \cdot 2) / t = (V_k - V_o) / t,$$

где А – активность каталазы в ммоль/мл·мин; V_k – объем раствора перманганата, пошедший на титрование контрольной пробы; V_o – объем раствора перманганата, пошедший на титрование опытной пробы; 0,5 – фактор эквивалентности пероксида водорода; 2 – коэффициент, учитывающий разведение молока; t – время эксперимента, 30 мин.

Определение активности каталазы картофеля

Материалы исследования и реактивы. Картофель, 1 %-й раствор перекиси водорода, 10 %-й раствор серной кислоты, 0,1 н. раствор перманганата калия.

Приборы. Мерные колбы емкостью 100 мл и конические колбы объемом 200 мл, пипетки градуированные вместимостью 5 и 20 мл, воронки, бюретки.

Ход определения. Растирают в ступке 1 г сырого картофеля с кварцевым песком, постепенно добавляя 2–3 мл воды. Для уменьшения кислотности среды на кончике шпателя добавляют карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу и объем жидкости доводят водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30–60 мин, затем фильтруют через складчатый фильтр. В две конические колбы объемом 200 мл отбирают мерной пипеткой по 20 мл вытяжки и одну из них доводят до кипения (контрольная проба). В обе колбы добавляют по 2 мл 1 %-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и титруют остаточное количество пероксида водорода 0,1 н. раствором перманганата калия до появления светло-розового окрашивания. По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству пероксида водорода, расщепленного с участием фермента.

$$A = ((V_k - V_o) 0,5 \cdot 100) / t \cdot 20 = 2,5 (V_k - V_o) / t,$$

где A – активность каталазы картофеля в ммоль/г·мин; V_k – объем раствора перманганата, пошедший на титрование контрольной пробы; V_o – объем раствора перманганата, пошедший на титрование опытной пробы; 0,5 – фактор эквивалентности пероксида водорода; 100 – объем мерной колбы; 20 – объем мерной пипетки; t – время эксперимента, 30 мин.

2.7.5. Определение активности сычужного фермента

Сычужный фермент обладает способностью свертывать молоко и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при температуре 35 °С в течение 40 мин.

Материалы исследования и реактивы. Молоко сырое, 1 %-й раствор сычужного фермента (порошка).

Приборы. Химический стакан емкостью 100 мл, пипетка градуированная объемом 1 мл, секундомер, водяная баня (температура бани в течение всего опыта должна быть равна 35 °С).

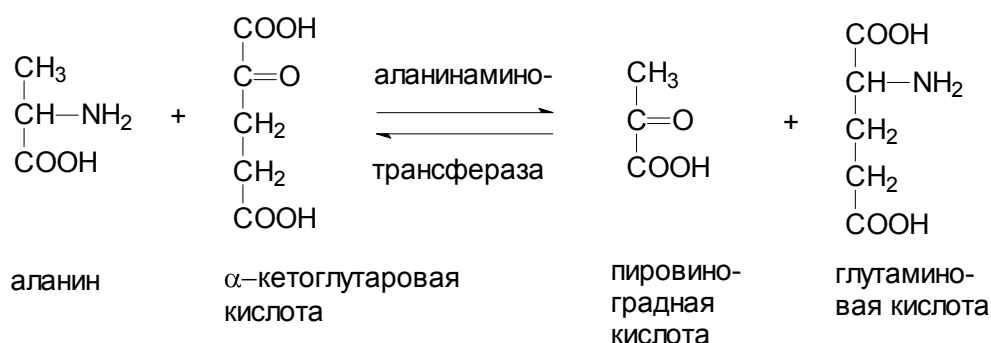
Ход определения. В химический стакан наливают 50 мл молока и ставят в водяную баню с температурой 35 °С. Через 3–5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает начало свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, т. е. время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев. Активность сычужного фермента вычисляют по формуле

$$A = (a \cdot 40) / (0,005 \cdot n),$$

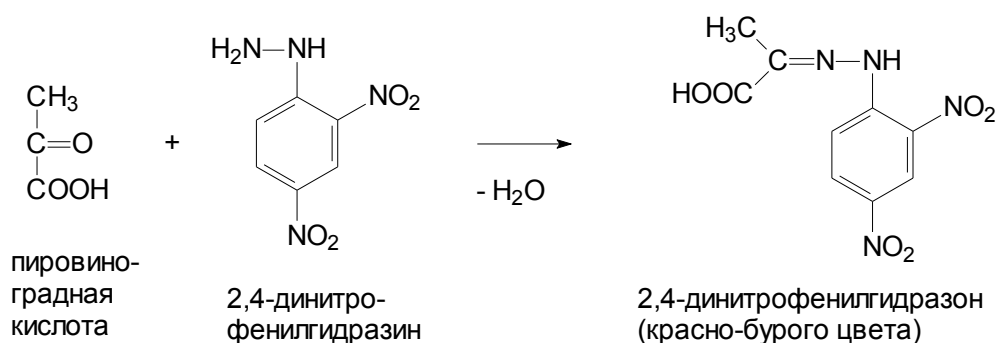
где A – активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.); a – количество взятого молока, мл; 40 – стандартное время свертывания молока (минуты); 0,005 – масса сычужного фермента, взятого на анализ; n – продолжительность свертывания молока в эксперименте (минуты).

2.7.6. Определение активности аланинаминотрансферазы в мышечной ткани животных

Аминотрансферазы (трансаминазы) катализируют межмолекулярный перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты, причем коферментом в этой реакции служит пиридоксальфосфат, который выполняет роль промежуточного акцептора аминогруппы. Например, аланинаминотрансфераза (АлАТ) катализирует реакцию переаминирования между аланином и α -кетоглутаровой кислотой:



По количеству образовавшейся пировиноградной кислоты за единицу времени можно судить об активности фермента. Пировиноградную кислоту определяют колориметрически по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, приводящей к образованию окрашенного 2,4-динитрофенилгидразона:



Материалы исследования и реактивы. Мясо или рыба. Субстратная смесь, приготовленная следующим образом: в 100 мл фосфатного буфера с рН 7,4 растворяют 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г L-аланина) и 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты (смесь хранится в замороженном виде); 0,02 %-й раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 н. HCl; 0,4 н. раствор NaOH.

Приборы. Фотоэлектрический колориметр ФЭК-Н-57 с зеленым светофильтром ($\lambda = 560$) нм и кюветами с рабочим расстоянием 10 мм; термостат на 38 °С.

Ход работы. На технических весах взвешивают около 0,4 г мяса или рыбы (с точностью до 0,01 г) и растирают в ступке с кварцевым песком, предварительно добавив 4 мл воды. Полученный гомогенат фильтруют через бумажный фильтр. В две пробирки вносят по 0,5 мл только что размороженной субстратной смеси, в одну из них добавляют 0,2 мл воды (контроль), а в другую – 0,2 мл фильтрата гомогената. Содержимое обеих пробирок хорошо перемешивают и помещают на 30 мин в термостат при температуре 38 °С. Далее в обе пробирки прибавляют по 0,5 мл 0,02 %-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем в каждую пробирку прибавляют по 5,0 мл раствора гидроксида натрия, перемешивают и измеряют оптическую плотность рабочего раствора относительно контроля.

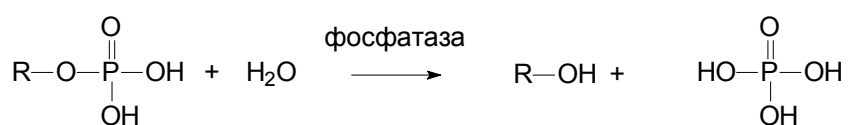
Активность аланинаминотрансферазы выражают в международных единицах (Е). За единицу активности принимают образование 1 мкмоль пировиноградной кислоты за 1 мин. Количество пировиноградной кислоты находят по калибровочной кривой, построенной с помощью ряда стандартных растворов разных концентраций, содержащих динитрофенилгидразоны пировиноградной и α -кетоглutarовой кислот. Активность (А) в Е/г рассчитывают по формуле

$$A = (C \cdot 20) / (m \cdot t),$$

где C – количество пировиноградной кислоты в мкмольях; 20 – коэффициент, учитывающий разведение; m – навеска мяса или рыбы в граммах; t – время инкубации (30 мин).

2.7.7. Определение активности фосфатаз

Фосфатазы – ферменты класса гидролаз, содержащиеся в тканях животных и растений и катализирующие отщепление фосфатного остатка от молекул сложных эфиров фосфорной кислоты и спиртов или фенолов:

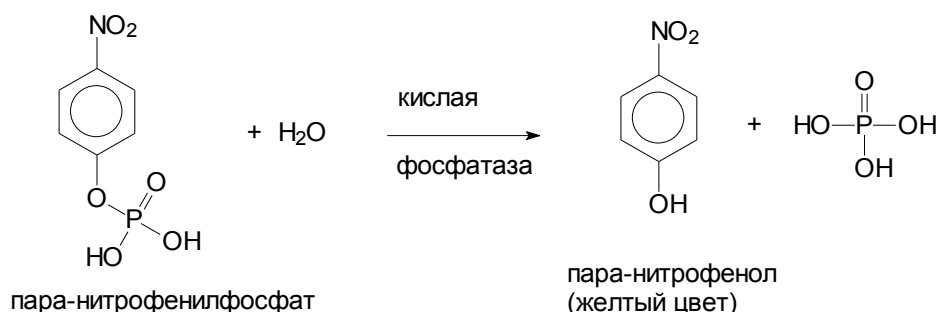


По оптимальному значению рН фосфатазы могут быть кислыми или щелочными. Они различаются по локализации в тканях и клетках. Определение активности кислой фосфатазы может быть использовано для контроля качества колбасы, а щелочной – пастеризованного молока.

Определение активности кислой фосфатазы в мясе и колбасе

В ходе термической обработки мяса при изготовлении вареных колбас кислая фосфатаза полностью разрушается (для этого необходима температура 80 °С при выдержке в течение 20 мин). Поэтому обнаружение в вареной колбасе остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции.

Метод определения кислой фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз пара-нитрофенилфосфата с образованием пара-нитрофенола, натриевая соль которого окрашена в желтый цвет:



Материалы исследования и реактивы. Мясо, вареная колбаса. Ацетатный буферный раствор рН 5,4, который готовят смешением одного объема 1 н. раствора уксусной кислоты и пяти объемов 1 н. раствора ацетата натрия. Раствор гидроксида натрия (40 %). Раствор субстрата: растворяют 0,8 г бариевой соли пара-нитрофенилфосфата в 100 мл 0,001 н. соляной кислоты, раствор фильтруют от осадка и, если он имеет желтую окраску, взбалтывают его 2–3 раза в делительной воронке с диэтиловым эфиром до получения бесцветного водного слоя, который отделяют от эфира. Раствор субстрата хранят на холоде в темной склянке.

Приборы. Пробирки, термостат, воронки, бумажные фильтры.

Ход определения. В ступке растирают 2 г вареной колбасы (пробу берут из внутренней части изделия) с 5 мл воды. В ступке с кварцевым песком также растирают 2 г мяса с 5 мл воды. Оба гомогената фильтруют через складчатый фильтр, наливают в две пробирки по 1 мл полученных фильтратов, прибавляют по 2 капли ацетатного буфера и по 0,5 мл субстратного раствора. Затем пробирки на 1 ч помещают в термостат при температуре 40 °С. Далее в каждую пробирку добавляют по 1 капле 40 %-го раствора NaOH. При этом в пробирке с гомогенатом мяса появляется желтое окрашивание натриевой соли пара-нитрофенола, а в пробирке с гомогенатом колбасы в случае надлежащего технологического режима при ее производстве раствор остается бесцветным. Количественное определение активности фосфатазы может быть осуществлено фотоколориметрически с синим светофильтром. Ее рассчитывают по формуле

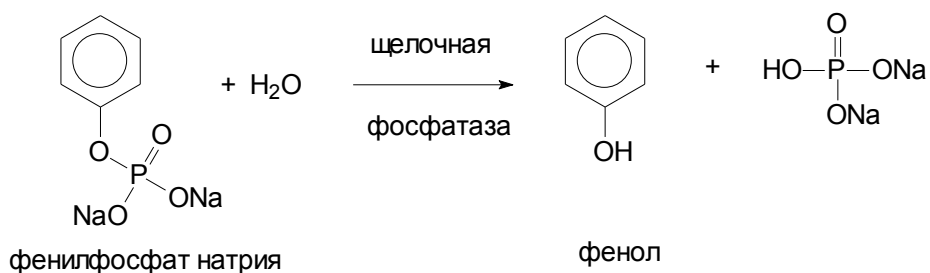
$$A = n/m t,$$

здесь A – активность кислой фосфатазы в ммоль/мин·г; n – количество образовавшегося паранитрофенола, найденное по калибровочному графику, ммоль; m – масса навески мяса или колбасы, 2 г; t – время эксперимента, 60 мин.

Определение активности щелочной фосфатазы в молоке

Щелочная фосфатаза полностью инактивируется при температуре 63 °С с выдержкой в течение 30 мин, т. е. в условиях, применяемых для пастеризации молока, сливок или кисломолочных продуктов. Поэтому обнаружение в этих продуктах остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции.

Метод определения щелочной фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз динатриевой соли фенолфосфорной кислоты с образованием фенола, который дает с индикатором 4-аминоантипирином окрашенный в розовый цвет комплекс



Материалы исследования и реактивы. Молоко пастеризованное и сырое, раствор субстрата (смесь динатрийфенилфосфата с 4-аминоантипирином, для его приготовления непосредственно перед определением смешивают растворы А и Б в соотношении 1:9). Раствор А: 1,25 г динатриевой соли фенилфосфата растворяют в 100 мл буферного раствора (40 г хлорида аммония растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 348 мл 25 %-го водного аммиака и общий объем доводят водой до 1 л). Раствор Б: 0,8 г 4-аминоантипирина растворяют в 900 мл дистиллированной воды, осадитель белков системы цинк–медь (растворяют 30 г сульфата цинка и 6 г сульфата меди в 1 л дистиллированной воды).

Приборы. Пробирки, термостат, воронки, бумажные фильтры.

Ход определения. В две пробирки наливают по 3 мл сырого и пастеризованного молока, добавляют по 2 мл раствора субстрата, содержимое пробирок перемешивают и ставят на 30 мин в водяную баню (или термостат) с температурой 40–45 °С. Затем в каждую пробирку добавляют по 5 мл осадителя белков системы цинк–медь, перемешивают, ставят в термостат на 10 мин, вынимают пробирки из термостата и отмечают окраску раствора над осадком белка.

При наличии фосфатазной активности (сырое молоко или плохое качество пастеризации) раствор окрасится в розовый или красный цвет, а при хорошем качестве пастеризации останется бесцветным.

2.7.8. Определение активности креатинфосфокиназы в мышечной ткани животных

Креатинфосфокиназа – фермент класса трансфераз, катализирующий перенос фосфатного остатка с АТФ на креатин, или наоборот – с креатинфосфата на АДФ:

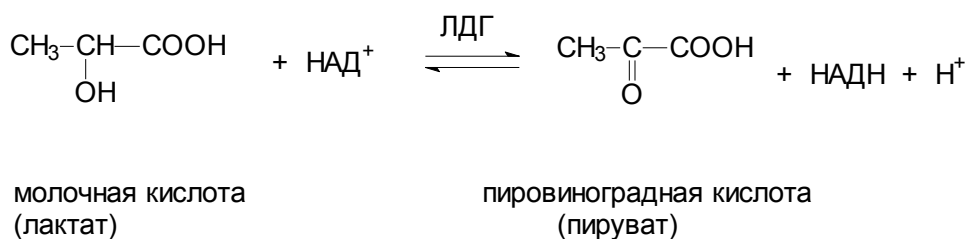
роенному с помощью стандартной смеси, которую готовят путем смешения 1 мл стандартного раствора креатина, 1 мл раствора α -нафтола и 0,5 мл рабочего раствора диацетила. Полученную смесь также выдерживают в темном месте в течение 30 мин и измеряют ее оптическую плотность против воды. Активность фермента рассчитывают по следующей формуле:

$$A = 5 Q / 131 t,$$

где A – активность фермента в мкмоль/г·мин; Q – количество креатина в мкг, образовавшееся в ходе креатинкиназной реакции (находят по калибровочному графику); t – время инкубации в минутах; 5 – коэффициент, учитывающий разведение; 131 – молекулярная масса креатина.

2.7.9. Определение активности лактатдегидрогеназы методом Варбурга

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент класса *оксидоредуктаз*, катализирующий окисление молочной кислоты в пировиноградную с участием кофермента НАД⁺, а также обратный процесс восстановления пирувата до лактата:



Измерение активности ЛДГ может быть произведено спектрофотометрически в ходе восстановления пирувата по убыли восстановленной формы НАДН с помощью измерения оптической плотности (D) при длине волны $\lambda = 340$ нм.

Материалы исследования и реактивы. Сыворотка крови; 0,01 М раствор пирувата натрия (растворяют 1,1 мг пирувата натрия в 1 мл дистиллированной воды); 0,2 М фосфатный буфер с рН 7,8; 0,001 %-й раствор НАДН (растворяют 5 мг НАДН в 5 мл 0,2 М фосфатного буфера с рН 7,8).

Приборы. Спектрофотометр со светофильтром $\lambda = 340$ нм, кюветы с толщиной слоя 1 см и емкостью 3 мл, секундомер.

Ход определения. В контрольную кювету вносят 0,1 мл сыворотки и 2,9 мл фосфатного буфера, перемешивают и помещают в камеру спектрофотометра в качестве кюветы сравнения. В другую кювету вносят 0,1 мл сыворотки, 0,2 мл раствора НАДН и 2,6 мл фосфатного буфера. Через 2 мин вносят 0,1 мл 0,01 М раствора пирувата натрия, перемешивают и включают отсчет времени по секундомеру. Затем записывают значения D через каждую минуту в течение 3–5 мин. Строят графическую зависимость D от времени и проводят расчет по начальному участку графика, где сохраняется пропорциональная зависимость D от t . Затем рассчитывают активность ЛДГ сыворотки A в мкмоль/мин·мл по следующей формуле:

$$A = \Delta D \cdot 10000 / (\Delta t \cdot 2,07),$$

где ΔD – изменение оптической плотности; Δt – время эксперимента; 10 000 и 2,07 – коэффициенты, учитывающие разбавление и молярное поглощение НАДН.

Контрольные вопросы

1. Ферменты и их химическая природа.
2. Строение молекулы фермента. Активные и регуляторные центры.
3. Ферменты четвертичной структуры. Изоферменты.
4. Общие свойства ферментов с другими катализаторами.
5. Отличия ферментов от небелковых катализаторов.
6. Механизм действия ферментов. Схема ферментативной реакции.
7. Влияние температуры и рН среды на активность ферментов.
8. Оптимумы рН и температуры, их значение для определения ферментативной активности.
9. В каких единицах выражается активность ферментов?
10. Принципы и методы определения активности ферментов.
11. Оксидоредуктазы. Биологическое значение.
12. Трансферазы. Особенности катализируемых реакций и их роль в обмене веществ.
13. Гидролазы. Примеры катализируемых реакций, промышленное применение.
14. Лиазы. Примеры реакций и их механизм.

15. Изомеразы. Примеры реакций и их значение в обмене веществ.

16. Синтетазы. Особенности катализируемых реакций и их биологическая роль.

17. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции.

18. Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции.

19. Перечислите источники ферментов.

20. Приведите примеры использования ферментных препаратов в пищевой промышленности.

3. ВИТАМИНЫ

Витамины – низкомолекулярные органические соединения разнообразного строения, необходимые для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, но не синтезирующиеся в нем, и поэтому их присутствие в пище необходимо. В отличие от белков, липидов и углеводов они не служат источником энергии или строительным материалом для клеток и требуются в чрезвычайно малых количествах, исчисляемых микро- и миллиграммами в сутки.

Многие водорастворимые витамины входят в состав коферментных групп различных ферментов, обеспечивая, таким образом, нормальное течение биохимических процессов в организме. Следует отметить, что набор специфических ферментов у человека и животных различен, следовательно, различен и перечень необходимых витаминов. Так, например, витамин С может синтезироваться в организме всех млекопитающих, кроме морских свинок, приматов и человека, и авитаминоз С возможен только у этих видов.

Производные некоторых витаминов, например, ретиноевая кислота, образующаяся из витамина А, или кальцитриол, производное витамина D, обладают гормоноподобным действием, являясь индукторами синтеза специфических белков (гликопротеинов и кальцийсвязывающих белков, соответственно). Отсутствие витаминов в пище или их недостаток приводят к нарушениям обмена веществ и синтеза белков и, следовательно, к заболеваниям, которые называют авитаминозами (при полном отсутствии витаминов) или гиповитаминозами (при их недостатке). В связи с этим в физиологии и медицине, помимо химических названий витаминов, используются названия болезни, развивающейся при их недостатке, с приставкой

«анти-» (например, витамин D – антирахитический, витамин B₁ – антиневритный и т. д.).

Классификация витаминов основана на их растворимости в воде и неполярных органических растворителях (бензин, петролейный эфир, сложные эфиры, например, жиры). К жирорастворимым относятся витамины A, D, E, K, а к водорастворимым – витамины группы B, а также витамины C и P.

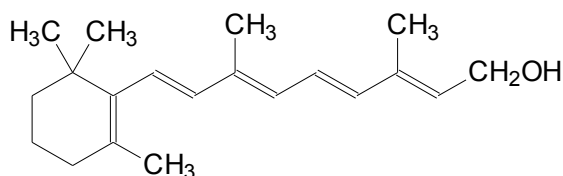
Авитаминозы могут вызываться не только недостаточным поступлением витаминов с пищей, но и нарушением их всасывания (в основном это жирорастворимые витамины и витамин B₁₂). Жирорастворимые витамины, помимо гипо- и авитаминоза, могут быть причиной гипервитаминоза, т. е. отравления избытком витамина. Они развиваются при использовании в пищу нетрадиционных продуктов питания: например, гипервитаминоз A у европейцев при употреблении печени акулы или белого медведя, а также гипервитаминоз D – при передозировке соответствующего лекарственного препарата, используемого в лечении рахита. Для водорастворимых витаминов гипервитаминозы нехарактерны, так как их избыток обычно быстро выводится из организма.

Витамины можно обнаружить и количественно определить с помощью различных химических реакций.

3.1. Жирорастворимые витамины

3.1.1. Качественные реакции на витамин А

Витамин А (ретинол) содержит кольцо β-иона и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и спиртовой группы:



Провитамин А является желтый пигмент растений – каротин. В организме каротин превращается в витамин А под влиянием фермента каротиназы. Признаками авитаминоза А являются «куриная слепота», сухость роговицы глаза (ксерофтальмия), задержка роста.

Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин А взаимодействует с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе. В результате реакции образуется окрашенный в синий цвет продукт. Реакция используется при колориметрическом методе количественного определения витамина А.

Материалы исследования и реактивы. 20 %-й раствор рыбьего жира или 0,05 %-й раствор витамина А в хлороформе, насыщенный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В сухую пробирку вносят 2–3 капли 20 %-го раствора рыбьего жира или 0,05 %-го раствора витамина А в хлороформе, добавляют 5 капель насыщенного раствора треххлористой сурьмы в хлороформе. Появляется темно-синее окрашивание, которое постепенно переходит в розово-фиолетовое.

Реакция с сульфатом железа

Витамин А с сульфатом железа дает голубое окрашивание, а каротины – зеленоватое окрашивание.

Материалы исследования и реактивы. Рыбий жир, насыщенная сульфатом железа ледяная уксусная кислота, концентрированная серная кислота.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. К 1–2 каплям рыбьего жира в пробирке добавляют 5–10 капель насыщенной сульфатом железа ледяной уксусной кислоты и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

Реакция с серной кислотой

Серная кислота отнимает от витамина А воду с образованием цветных продуктов реакции.

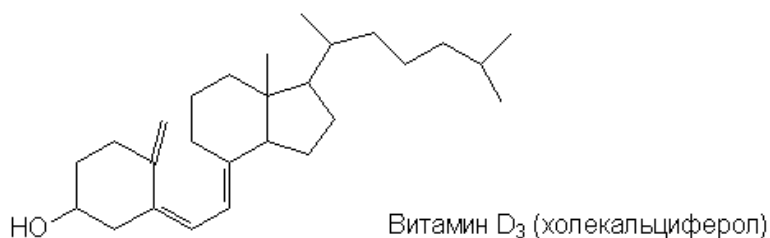
Материалы исследования и реактивы. Рыбий жир, хлороформ, концентрированная серная кислота.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. Одну каплю рыбьего жира растворяют в 4–5 каплях хлороформа и прибавляют 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется сине-фиолетовое окрашивание, быстро переходящее в буро-красное.

3.1.2. Качественные реакции на витамин D

Витамины группы D (кальциферолы) являются производными циклопентанпергидрофенантрена. Наиболее распространены холекальциферол – витамин D₃ и эргокальциферол – витамин D₂. Витамин D₃ образуется в животном организме из 7-дегидрохолестерина под влиянием ультрафиолетовых лучей. Витамины группы D влияют на обмен кальция и фосфора. Основным проявлением гиповитаминоза D у детей является рахит. Недостаток витамина D у взрослых проявляется в виде остеомаляции (размягчения костей), возникающей вследствие вымывания из костей солей кальция.



Бромхлороформная проба

Витамин D, содержащийся в рыбьем жире, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

Материалы исследования и реактивы. Рыбий жир или концентрат витамина D, раствор брома в хлороформе (1:60).

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В сухую пробирку вносят 2–3 капли рыбьего жира или 1 каплю концентрата витамина D и 2–4 капли раствора брома в хлороформе. В присутствии витамина D постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание.

Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин D реагирует с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе с образованием окрашенного в оранжево-красный цвет соединения. Цветная реакция используется для количественного определения витамина D.

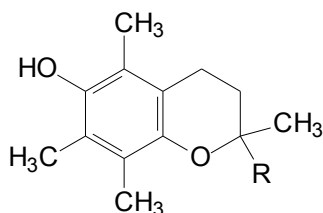
Материалы исследования и реактивы. Раствор витамина D, раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 3 капли раствора витамина D, добавляют 2 мл раствора треххлористой сурьмы в хлороформе. Появляется оранжево-красное окрашивание.

3.1.3. Качественные реакции на витамин E

Витамин E (*токоферол*) существует в виде нескольких изомеров: – α -, β -, γ -, и δ -токоферолов. Недостаток витамина E у животных вызывает бесплодие. Витамин E обладает антиоксидантными свойствами.



α – токоферол (R - остаток изогексадекана)

Реакция с хлоридом железа

Спиртовой раствор α -токоферола окисляется хлоридом железа (III) в токоферил-хинон, при этом раствор окрашивается в красный цвет.

Материалы исследования и реактивы. 0,1 %-й спиртовой раствор α -токоферола, раствор хлорида железа

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 4–5 капель 0,1 %-го спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 мл хлорида железа и тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красную окраску.

Реакция с азотной кислотой

Витамин Е, взаимодействуя с концентрированной азотной кислотой, окисляется с образованием токофил-хинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет. Метод используется для количественного определения витамина Е.

Материалы исследования и реактивы. Масляный раствор витамина Е или 0,1 %-й спиртовой раствор α -токоферола, концентрированная азотная кислота.

Приборы. Пробирки, пипетки, водяная баня.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 2–3 капли масляного раствора витамина Е (или 4–5 капель 0,1 %-го спиртового раствора α -токоферола), прибавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

3.1.4. Количественное определение витамина Е

Метод основан на способности *токоферолов* давать розовую окраску с реактивом Эммери–Энгеля. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации витамина, что позволяет определить его колориметрически.

Материалы исследования и реактивы. Растительное масло, стандартный раствор синтетического токоферола 1 г/л (0,1 %-й) для построения калибровочного графика (из него готовят рабочие растворы с концентрациями от 0,005 до 0,05 г/л методом последовательных разведений; также можно использовать синтетический токоферола ацетат, подвергая его омылению и экстракции по описанной ниже методике). Реактив Эммери–Энгеля готовят смешением равных объемов 0,25 %-го спиртового раствора α , α' – дипиридила и 0,1 %-го спиртового раствора хлорного железа FeCl_3 , добавляя 10 %-й спиртовой раствор КОН, пиригаллол, диэтиловый эфир, этанол.

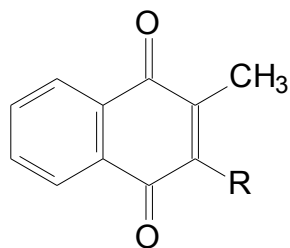
Приборы. Спектрофотометр со светофильтром объемом 520 нм, кюветы с толщиной слоя 1 см и емкостью 3 мл, колба с обратным холодильником, делительная воронка, пробирки.

Ход определения. Взвешивают в колбу около 3 г растительного масла с точностью до сотых долей грамма, добавляют немного

пирогаллола (на кончике шпателя), и вливают 15 мл 10 %-го спиртового раствора KOH, затем присоединяют воздушный обратный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин для омыления жиров. После охлаждения содержимое колбы выливают в делительную воронку с 30 мл холодной воды. Остатки смывают из колбы небольшим количеством спирта, содержимое делительной воронки три раза экстрагируют порциями по 10 мл диэтилового эфира (при этом каждый раз тщательно встряхивают делительную воронку, затем оставляют до полного расслоения, водную фазу сливают через кран, а органическую – через шлиф воронки). Объединенные эфирные экстракты упаривают в вакууме. Полученный остаток представляет собой неомыляемую фракцию липидов, содержащую в том числе и токоферол. Остаток растворяют в 4 мл этанола и добавляют 1 мл реактива Эммери–Энгеля. Через 5 мин измеряют оптическую плотность раствора, используя в качестве раствора сравнения смесь 1 мл реактива Эммери–Энгеля с 4 мл этанола. Концентрацию токоферола C (в процентах) определяют по калибровочному графику, построенному при помощи ряда стандартных растворов с концентрациями токоферола от 0,005 до 0,05 г/л (0,0005 % – 0,005 %). Получают результат X в процентах по массе, учитывая массу взятой навески M растительного масла в граммах: $X = C / M$.

3.1.5. Качественные реакции на витамин К

Витамин К является производным нафтохинона. Он существует в виде двух витамеров (сходных веществ с близкой активностью) – филлохинона и менахинона:



Витамин K_1 - филлохинон
(R - остаток спирта фитола)

Витамин K_2 - менахинон (R - остаток из
6, 7 или 9 изопреновых звеньев)

Витамин К участвует в биосинтезе протромбина, необходимого для процесса свертывания крови. Известны искусственно синтезированные аналоги витамина К, например, викасол.

Реакция со щелочным раствором цистеина

Витамин К в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Материалы исследования и реактивы. Спиртовой раствор витамина К (промышленный препарат) или 0,1 %-й спиртовой раствор викасола, 0,025 %-й раствор цистеина и 10 %-й раствор гидроксида натрия.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 1 мл спиртового раствора витамина К (промышленного препарата) или 0,1 %-го спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли 0,025 %-го раствора цистеина и 2 капли 10 %-го раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание.

Реакция с диэтилмалоновым эфиром

В щелочной среде витамин К гидролизуеться с образованием фитола, взаимодействующего с диэтилмалоновым эфиром ($C_2H_5OOC-CH_2-COOC_2H_5$). Продукт конденсации окрашивается в фиолетово-красный цвет. Цветная реакция используется для количественного определения витамина К.

Материалы исследования и реактивы. Спиртовой раствор витамина К (промышленный препарат) или 0,1 %-й спиртовой раствор викасола, 1 %-й раствор диэтилмалонового эфира и 1 %-й раствор гидроксида калия.

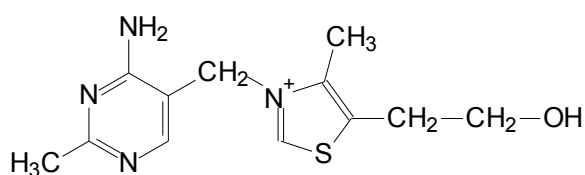
Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 2 мл раствора витамина К, добавляют 0,5 мл 1 %-го раствора диэтилмалонового эфира и 0,1 мл 1 %-го раствора гидроксида калия. Появляется фиолетово-красное окрашивание.

3.2. Водорастворимые витамины

3.2.1. Качественная реакция на тиамин

Тиамин (витамин В₁) содержит серу и азот. Он состоит из пиридинового и тиазолового колец.



Тиамин (витамин В₁)

Витамин В₁ в форме тиаминпирофосфата участвует в окислительном декарбоксилировании α-кетокислот (пировиноградной и α-кетоглутаровой). Недостаток тиамин в пище вызывает поражение нервной системы – полиневрит.

В щелочной среде под влиянием сильных окислителей тиамин окисляется, образуя тиохром, обладающий в ультрафиолетовых лучах сине-голубой флуоресценцией. Метод используется для количественного определения тиамин.

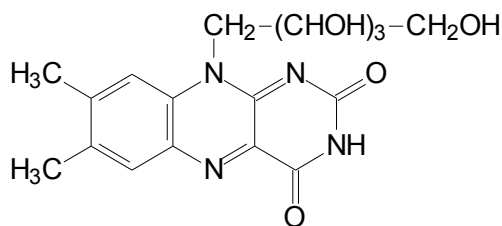
Материалы исследования и реактивы. 5 %-й раствор тиамин, 10 %-й раствор гидроксида натрия, 5 %-й раствор гексацианоферрата (III) калия, изобутиловый спирт, ультрафиолетовая лампа.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку вносят 1 мл 5 %-го раствора тиамин, добавляют 2–3 капли 10 %-го раствора гидроксида натрия, затем прибавляют несколько капель 5 %-го раствора гексацианоферрата (III) калия до появления зеленовато-желтого окрашивания. Раствор несколько раз встряхивают, прибавляют 1 мл изобутилового спирта и снова встряхивают. Далее жидкости дают отстояться для разделения слоев. При освещении спиртового слоя ультрафиолетовыми лучами наблюдается голубая флуоресценция, обусловленная наличием тиохрома – продукта окисления тиамин.

3.2.2. Качественная реакция на рибофлавин

Рибофлавин (витамин В₂) состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола.



3.2.3. Количественное определение рибофлавина

Метод основан на способности раствора рибофлавина давать в ультрафиолетовых лучах желто-зеленую флуоресценцию. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации рибофлавина.

Материалы исследования и реактивы. Белок свежих яиц (данным методом можно определить содержание рибофлавина и в желтке яйца), 96 %-й этиловый спирт, стандартный раствор рибофлавина (основной раствор готовят растворением 10 мг рибофлавина в воде в мерной колбе емкостью 250 мл; рабочий раствор готовят путем разбавления основного раствора в 10 раз); гидрокарбонат натрия; тиосульфат натрия.

Приборы. Градуированный цилиндр объемом 200 мл с притертой пробкой; аппарат для встряхивания; воронка; бумажный фильтр; колба емкостью 100 мл; флуориметр.

Ход определения. Рибофлавин экстрагируют из белка яйца. С этой целью в мерный цилиндр с притертой пробкой осторожно переносят около 25 г яичного белка, избегая образования пены, добавляют 75 мл 96 %-го этилового спирта, закрывают цилиндр пробкой, перемешивают содержимое и через несколько минут записывают объем жидкости в цилиндре.

Цилиндр встряхивают в специальном аппарате в течение 2 ч, содержимое фильтруют через сухой бумажный фильтр и затем измеряют флуоресценцию полученного экстракта.

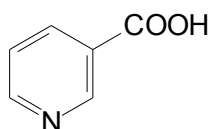
Флуориметр калибруют по рабочему стандартному раствору рибофлавина (4 мкг/мл), после чего определяют концентрацию витамина в полученном экстракте. Чтобы избежать завышения результата, путем гашения флуоресценции витамина определяют также нерибофлавиновую флуоресценцию, возникающую за счет примесей. Для этого к исследуемой на флуориметре части экстракта после измерения флуоресценции дважды в течение 5 мин добавляют приблизительно по 0,1 г гидрокарбоната и тиосульфата натрия и затем снова измеряют флуоресценцию раствора, выражая ее в микрограммах рибофлавина на 1 мл раствора. Содержимое рибофлавина в микрограммах на 1 г белка определяют по формуле

$$X = (a - b) V/c,$$

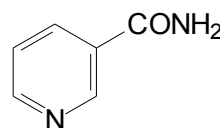
где a – количество рибофлавина, соответствующее флуоресценции исследуемого экстракта, мкг/мл; b – количество рибофлавина, соответствующее нерибофлавиновой флуоресценции исследуемого экстракта, мкг/мл; V – общий объем экстракта рибофлавина, мл; c – навеска белка, г.

3.2.4. Качественная реакция на никотиновую кислоту

Никотиновая кислота (витамин В₅, или РР) является производным пиридина. Витаминной активностью обладает и ее амид (никотинамид).



НИКОТИНОВАЯ КИСЛОТА



НИКОТИНАМИД

Из витамина В₅ (РР) образуются два кофермента – никотинамидаденин-динуклеотид (НАД⁺) и никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ⁺). Эти коферменты входят в состав ферментов класса оксидоредуктаз и участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях, имеющих энергетическое значение. Отсутствие в пище данного витамина вызывает заболевание пеллагру.

Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок медной соли никотиновой кислоты, мало-растворимой в воде.

Материалы исследования и реактивы. 3 %-й раствор никотиновой кислоты в 10 %-й уксусной кислоте, 5 %-й раствор ацетата меди.

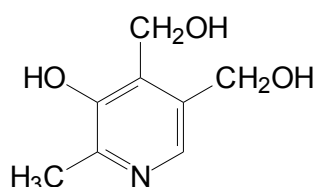
Приборы. Пробирки, пипетки, спиртовка (газовая горелка), спички.

Ход определения. В пробирку наливают 20 капель 3 %-го раствора никотиновой кислоты в 10 %-й уксусной кислоте (перед определением витамина раствор следует взболтать) и нагревают до кипения, при этом мутный раствор становится прозрачным. К нагретому раствору витамина добавляют 20 капель 5 %-го раствора ацетата меди, предварительно его взболтав. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают ее под струей холодной воды.

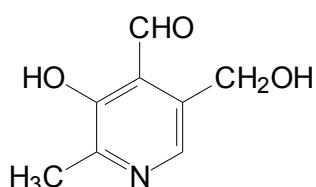
При этом на дне пробирки образуется синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

3.2.5. Качественная реакция на витамин В₆

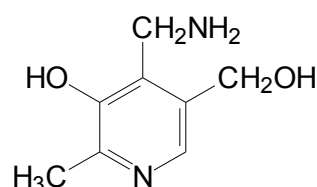
Активностью витамина В₆ обладают производные пиридина пиридоксол, пиридоксаль и пиридоксамин (собирательное название – пиридоксин):



пиридоксол



пиридоксаль



пиридоксамин

Витамин В₆ в форме фосфопиридоксала выполняет коферментную функцию у ферментов обмена аминокислот – декарбоксилаз и аминотрансфераз. Качественное определение витамина В₆ основано на том, что при взаимодействии с раствором хлорида железа (III) он образует комплексную соль фенолята железа красного цвета.

Материалы исследования и реактивы. 1 %-й раствор витамина В₆, 1 %-й раствор хлорида железа.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. К 5 каплям 1 %-го раствора витамина В₆ добавляют равное количество 1 %-го раствора хлорида железа и перемешивают. Появляется красное окрашивание.

3.2.6. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту

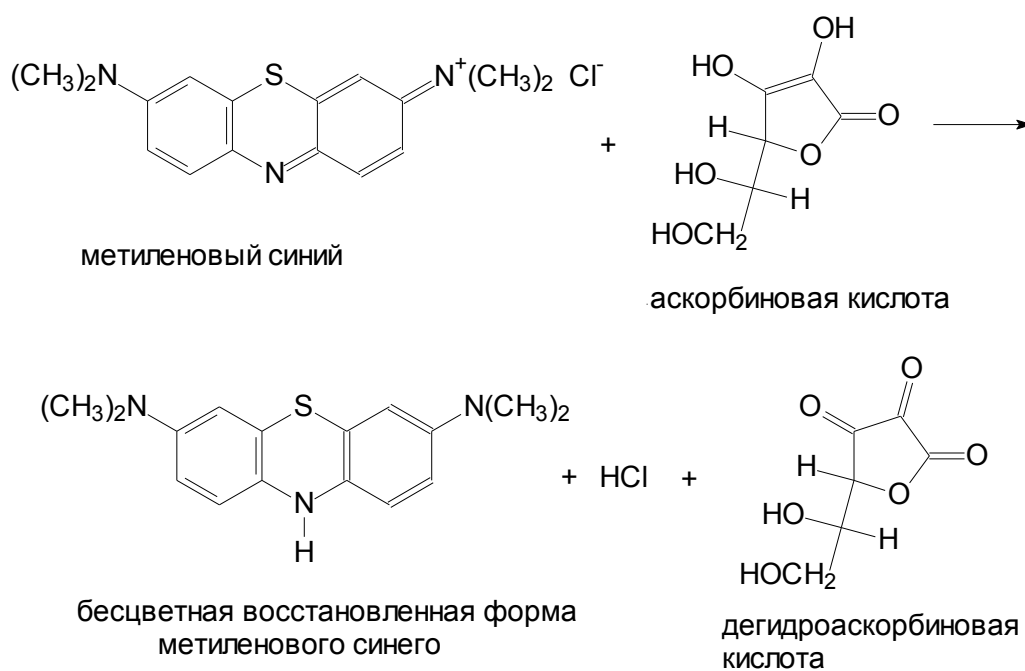
Аскорбиновая кислота (витамин С) является лактоном 2,3-дигидро-L-гулоновой кислоты. Биологическая роль аскорбиновой кислоты в организме многообразна. Она содержится в высоких концентрациях в надпочечниках и в лейкоцитах животных, а также в тканях растений. Аскорбиновая кислота принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, гидроксировании пролина и лизина в коллагене (белок соединительной ткани), синтезе адреналина и стероидных гормонов, усиливает всасывание железа в кишечнике и т. д. Отсутствие аскорбиновой кислоты в пище при-

водит к развитию цинги. Гиповитаминоз С характеризуется понижением устойчивости организма к различным вредным факторам окружающей среды, к стрессу и к инфекционным заболеваниям. Аскорбиновая кислота, ее изомеры и соли широко применяются в различных пищевых технологиях.

Качественные реакции на аскорбиновую кислоту основаны на ее способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции и восстанавливать, например, метиленовый синий, гексацианоферрат калия, 2,6-дихлорфенолиндофенол и другие вещества.

Реакция с метиленовым синим

Аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовый синий до бесцветной лейкоформы:



Материалы исследования и реактивы. 0,5 %-й раствор витамина С (молоко, сок капусты или картофеля), 0,01 %-й раствор метиленового синего.

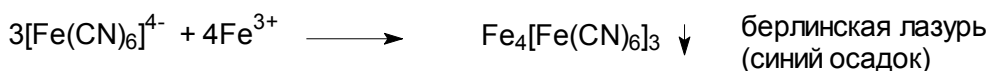
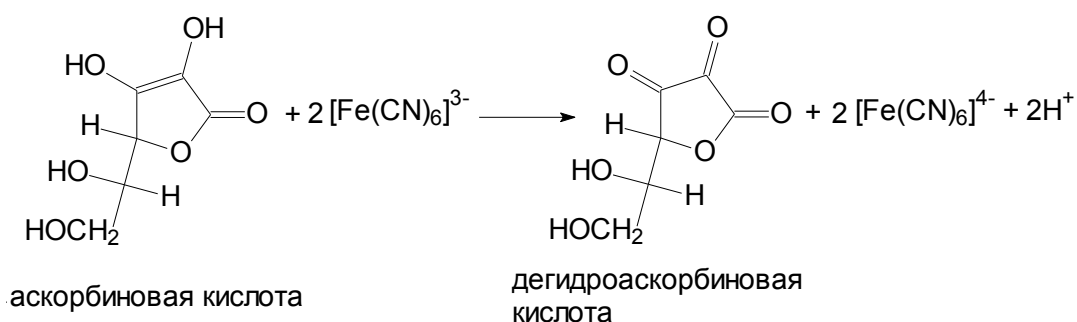
Приборы. Пробирки с пробками, пипетки. Термостат на 37–40 °С.

Ход определения. К 1 мл 0,5 %-го раствора витамина С (молока, сока капусты или картофеля) добавляют 1 мл 0,01 %-го раствора метиленового синего, перемешивают и закрывают пробкой для пре-

дохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при температуре 37–40 °С. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается.

Реакция с гексацианоферратом (III) калия

Аскорбиновая кислота восстанавливает гексацианоферрат (III) калия в гексацианоферрат (II) калия, который при добавлении хлорида железа (III) образует осадок синего цвета – берлинскую лазурь, или гексацианоферрат (II) железа (III):



Материалы исследования и реактивы. Раствор витамина С, 1 %-й раствор гексацианоферрата (III) калия, 10 %-й раствор соляной кислоты и 1 %-й раствор хлорида железа.

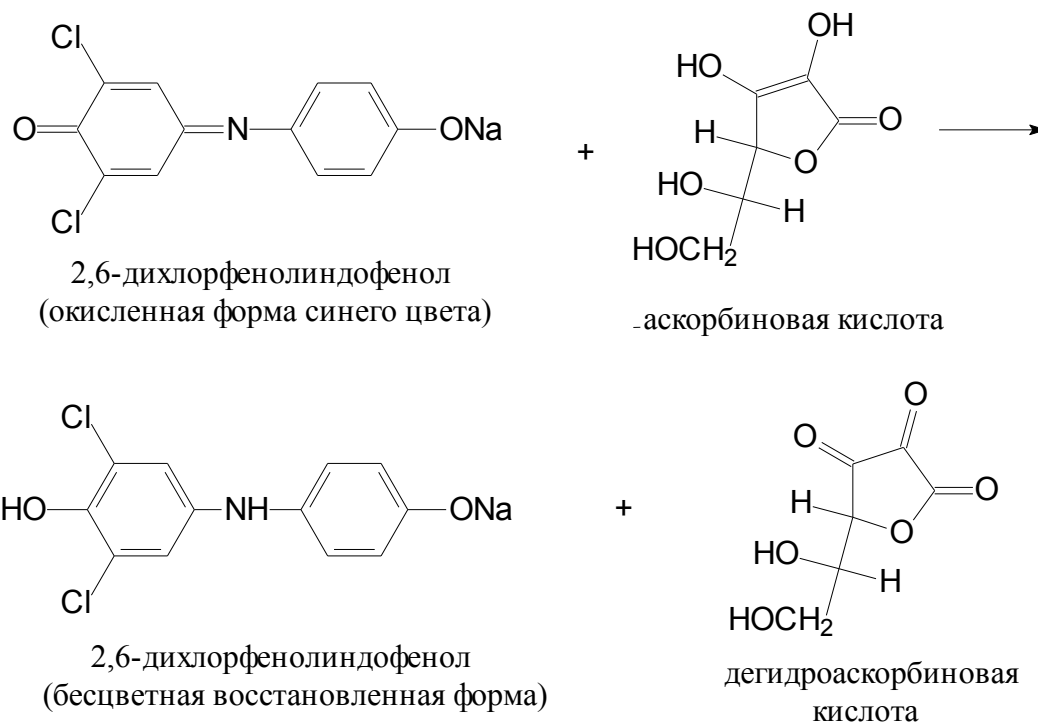
Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 2–3 мл раствора витамина С, две капли 1 %-го раствора гексацианоферрата (III) калия и перемешивают содержимое пробирки. Затем в пробирку добавляют 6–8 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и 1–2 капли 1 %-го раствора хлорида железа. Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

3.2.7. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Метод основан на окислительно-восстановительной реакции между аскорбиновой кислотой и 2,6-дихлорфенолиндофенолом (краска Тильманса). В результате реакции аскорбиновая кислота

окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту, а индикатор восстанавливается до бесцветной формы. В тот момент, когда вся аскорбиновая кислота прореагировала, избыток красителя в кислой среде дает розовое окрашивание. По количеству 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на окисление аскорбиновой кислоты, определяют ее содержание в исследуемом продукте.



Количественное определение аскорбиновой кислоты в продуктах растительного происхождения

Материалы для исследования и реактивы. Растительное сырье (картофель, капуста и др.), 5 %-й раствор соляной кислоты, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,5 %-й раствор солей меди, железа и алюминия.

Приборы. Колбы конические объемом 50 мл (4 шт.), пипетки емкостью 2, 5 и 10 мл, градуированная пипетка объемом 1 мл, воронка, бумажный фильтр, фарфоровая ступка с пестиком, кварцевый песок.

Ход определения в растительном сырье. Взвешивают 10 г продукта (картофеля, капусты и т. д.), измельчают его и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя маленькими порциями 5 %-й раствор соляной кислоты

до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл. Ступку и пестик обмывают раствором кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу. Затем содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат должен быть прозрачным.

Из полученного фильтрата в коническую колбу отбирают пипеткой 10 мл и титруют из микробюретки или пипетки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, прибавляя его осторожно по каплям до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Содержание аскорбиновой кислоты в продукте в мг % (мг на 100 г продукта) вычисляют по формуле

$$C = (a \cdot 0,088 \cdot V_1 \cdot 100) / (b \cdot V_2) = a \cdot 8,8,$$

где a – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг (титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте); b – навеска продукта (10 г); V_1 – объем приготовленного экстракта (100 мл); V_2 – объем фильтрата, взятого для титрования (10 мл).

Под воздействием различных факторов содержание аскорбиновой кислоты в продуктах снижается вследствие ее легкой окисляемости. Разрушению аскорбиновой кислоты способствуют нагревание, щелочная среда, контакт с кислородом воздуха, соли железа и меди, а соли алюминия не ускоряют разрушение витамина.

Ход определения. В три конические колбы объемом 100 мл отбирают по 10 мл полученного выше экстракта. В первой колбе экстракт кипятят, во второй колбе к нему добавляют 1 мл 0,5 %-го раствора соли меди или железа, а в третью – 1 мл раствора соли алюминия. Во всех трех пробах определяют содержание аскорбиновой кислоты по вышеприведенному методу. Полученные результаты сравнивают с содержанием витамина в исходной пробе (без обработки), которое принимают за 100 %. Затем подсчитывают (в процентах) степень разрушения аскорбиновой кислоты при тепловой обработке и в присутствии солей металлов. Делают вывод о влиянии нагревания и солей исследуемых металлов на сохранность аскорбиновой кислоты в продуктах.

Определение количества аскорбиновой кислоты в молоке

Материалы для исследования и реактивы. Молоко, 17 %-я уксусная кислота, 5 %-й раствор уксуснокислого свинца в 5 %-й уксусной кислоте, 80 %-я уксусная кислота, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,5 %-й раствор солей меди, железа и алюминия.

Приборы. Колба коническая объемом 100 мл (4 шт.), пипетки вместимостью 2, 5 и 10 мл, градуированная пипетка емкостью 1 мл, воронка (2 шт.), вата, бумажный фильтр.

Ход определения аскорбиновой кислоты в сыром молоке. К 50 мл сырого молока в конической колбе емкостью 100 мл добавляют 2 мл 17 %-й уксусной кислоты, перемешивают и фильтруют через тонкий слой ваты. Из полученного фильтрата в коническую колбу отмеривают 10 мл, прибавляют 5 мл раствора уксуснокислого свинца в уксусной кислоте (раствор готовят заранее). Жидкость перемешивают и фильтруют через плотный бумажный фильтр в коническую колбу. К 5 мл совершенно прозрачного фильтрата добавляют 2,5 мл 80 %-й уксусной кислоты, 10 мл воды и титруют из микробюретки или пипетки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, прибавляя его осторожно по каплям до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Содержание аскорбиновой кислоты в молоке вычисляют по формуле

$$X = (a K \cdot 1,04 \cdot 1,5 \cdot 0,088 \cdot 0,97 \cdot 100) / 5 = a K \cdot 2,66,$$

где a – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл; K – поправочный коэффициент к титру раствора краски; 1,04 – коэффициент разведения молока; 1,5 – коэффициент разведения фильтрата; 5 – количество фильтрата, взятого для титрования; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг; 0,97 – коэффициент для пересчета количества молока из кубических сантиметров в граммы.

Ход определения аскорбиновой кислоты в молоке после обработки. Под воздействием различных факторов содержание аскорбиновой кислоты в продуктах вследствие ее легкой окисляемости снижается. Так, содержание витамина С снижается при термической

обработке молока (кипячение, пастеризация, стерилизация, сушка). Разрушению аскорбиновой кислоты способствуют соли железа и меди, а соли алюминия не ускоряют разрушение витамина.

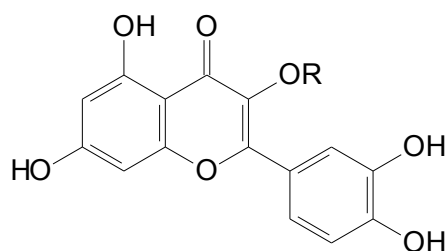
В две конические колбы объемом 100 мл отбирают по 50 мл исследуемого молока. Молоко в первой колбе кипятят, во второй колбе к нему добавляют 1мл раствора соли меди, железа или алюминия. В двух пробах определяют содержание аскорбиновой кислоты по вышеприведенному методу. Полученные результаты сравнивают с содержанием витамина в исходной пробе с сырым молоком, которое принимают за 100 %. Подсчитывают степень разрушения аскорбиновой кислоты при обработке молока (в процентах).

3.2.8. Качественные реакции на витамин Р

Под термином «витамин Р» (от лат. *permeability* – проницаемость) объединяется группа веществ со сходной биологической активностью: катехины, халконы, дигидрохалконы, флавины, флавононы, флавоны, флавонолы и др., обладающих Р-витаминной активностью, т. е. капилляроукрепляющим действием.

В основе их структуры лежит дифенилпропановый углеродный «скелет» хромона или флавона. Этим объясняется их общее название «биофлавоноиды».

Витамин Р (рутин) – представитель большого класса природных полифенольных соединений, называемых флавоноидами. Флавоноиды широко распространены в растительном царстве. Большинство встречается в виде гликозидов:



рутин (R - остаток дисахарида рутинозы)

Все флавоноиды обладают антиоксидантным действием.

Реакция с хлоридом железа

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет.

Материалы исследования и реактивы. Насыщенный водный раствор рутина, 1 %-й раствор хлорида железа.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. К 1–2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1 %-го раствора хлорида железа. Возникает зеленое окрашивание.

Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота образует с флавонами соли, обладающие ярко-желтой окраской.

Материалы исследования и реактивы. Насыщенный водный раствор рутина, концентрированная серная кислота.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. К 1–2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает кольцо, окрашенное в желтый цвет.

3.2.9. Количественное определение витамина Р в растительном пищевом сырье

Перманганатометрический метод определения рутина

Рутин (витамин Р) способен окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин.

Материалы исследования и реактивы. Чай или готовый экстракт; 0,05 н. раствор перманганата калия; 0,1 %-й раствор индигокармина.

Приборы. Колба объемом 100 мл; пипетка вместимостью 10 мл; микробюретка.

Ход определения. В колбу к 100 мг чая добавляют 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. Отмеривают в колбу 10 мл экстракта, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель раствора индигокармина (появляется синее окрашивание). Затем титруют из микробюретки 0,05 н. раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски. Содержание рутина в чае рассчитывают по следующей формуле:

$$X = (a \cdot 3,2 \cdot V_1 \cdot 100) / (V_2 m),$$

где a – количество 0,05 н. раствора перманганата калия, пошедшего на титрование, мл; 3,2 – количество рутина, соответствующее 1 мл 0,05 н. раствора перманганата калия, мкг; V_1 – объем, в котором растворена навеска чая, мл; V_2 – объем экстракта чая, взятого для титрования, мл; m – навеска чая, мг.

Фотоколориметрический метод определения флавоноидов

Общим свойством флавоноидов является образование окрашенного в жёлтый цвет соединения с хлоридом алюминия. Эта реакция широко используется для качественного и количественного анализа флавоноидов.

Материалы исследования и реактивы. Растительное сырье; 90 %-й этиловый спирт; концентрированная соляная кислота; 1 %-й раствор алюминия хлорида в 95 %-м этиловом спирте.

Приборы. Колба круглодонная со шлифом вместимостью 150 мл; обратный холодильник; водяная баня; бумажный фильтр; мерная колба вместимостью 100 мл; мерная колба вместимостью 25 мл; фотоэлектродиметр.

Ход определения. 1 г измельченного растительного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90 %-го этилового спирта, содержащего 1 % концентрированной HCl.

Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин с момента закипания. Охлаждают до комнатной температуры. Далее содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Экстракцию повторяют дважды аналогичным образом. Извлечения объединяют и доводят 90 %-м спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу емкостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, 1 мл 1 %-го раствора алюминия хлорида в 95 %-м спирте и доводят 95 %-м спиртом до метки.

Через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 430 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 2 мл раствора А, доведённого 95 %-м спиртом до метки в мерной колбе объемом 25 мл.

Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на кверцетин в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = (D \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100) / (764,6 \cdot m \cdot 2 \cdot (100 - W)),$$

где D – оптическая плотность раствора; m – масса сырья (г); W – влажность сырья (в процентах, как правило, 10 %); 25, 100, 764,6 – коэффициенты, учитывающие разведение раствора и молярное поглощение кверцетина.

Контрольные вопросы

1. Роль витаминов в жизнедеятельности организма.
2. Классификация витаминов.
3. Общая характеристика водорастворимых витаминов, их природные источники.
4. Коферментная функция водорастворимых витаминов.
5. Причины и последствия отсутствия или недостаточности витаминов в продуктах питания человека.
6. Тиамин. Строение, физико-химические свойства, природные источники, роль в обмене веществ.
7. Рибофлавин. Строение, механизм действия.
8. Никотинамид. Строение, механизм действия.
9. Пантотеновая кислота. Строение, природные источники, участие в обмене веществ.
10. Пиридоксин. Строение, природные источники, участие в обмене веществ.

11. Аскорбиновая кислота. Строение, природные источники, суточная потребность.
12. Физико-химические свойства аскорбиновой кислоты, условия ее сохранности в пищевых продуктах.
13. Биохимическая роль аскорбиновой кислоты в организме.
14. Гиповитаминоз аскорбиновой кислоты.
15. Жирорастворимые витамины, общность строения, свойства, биологическая роль.
16. Витамин А. Строение, природные источники, механизмы действия.
17. Витамин D. Строение, природные источники, механизмы действия.
18. Витамин E. Строение, природные источники, биологическая роль.
19. Витамин K. Строение, природные источники, биологическая роль.
20. Гипервитаминоз. Привести примеры, объяснить причины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биохимия: Учеб. / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 784 с.
2. **Ленинджер А.** Основы биохимии: В 3 т. – М., 1985.
3. **Остерман Л.А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М., 1981. – 286 с.
4. **Остерман Л.А., Диксон М., Уэбб Э.** Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 1117 с.
5. **Остерман Л.А.** Хроматография белков и нуклеиновых кислот – М., 1985. – 536 с.
6. Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие / Е.В. Романовская, Т.В. Гришина, И.Е. Красовская и др.; Под ред. Е.В. Романовской, Н.Д. Ещенко. – СПб., 2010. – 194 с.
7. **Рабинович В.А., Хавин З.Я.** Краткий химический справочник: Справ. изд. / Под ред. А.А. Потехина и А.И. Ефимова. 4-е изд., стер. – СПб.: Химия, 1994. – 432 с.
8. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
9. Ферменты и нуклеиновые кислоты: Учеб. пособие / Под ред. С.Н. Лызловой, В.Г. Владимирова. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 1997. – 151 с.
10. Фотометрические методы анализа
<http://lib.rushkolnik.ru/text/1149/index-1.html?page=6>

Интернет-ресурсы по биохимии

1. http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/
2. <http://www.foodingredients.ru/article-isomaltulose.html>
3. Практическая Молекулярная Биология: <http://molbiol.edu.ru>
4. <http://www.bsu.ru/content/hecadem/biochemistry/>
5. <http://ru.wikipedia.org/wiki/>
6. Биохимия. Справочник (он-лайн):
<http://www.humbio.ru/humbio/biochem/>
7. Каталог научно-образовательных ресурсов МГУ
<http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/index.htm>
8. Новости в науке: <http://www.vesti-nauka.ru>
9. Новости в науке: <http://www.lenta.ru/science>

10. Наука, новости науки и техники для студентов:
<http://www.sci-lib.com>
11. Наука, новости <http://www.biomolecula.ru>
12. Российское образование – Федеральный портал:
<http://www.edu.ru>
13. Информационный портал «Пищевик»- <http://mppnik.ru/>
14. Электронные книги по пищевой промышленности:
<http://www.twirpx.com/files/food/quality/>

Электронные библиотечные системы

1. Электронная библиотека Университета ИТМО
http://ihbt.edu.ru/struktura/podrazdeleniya/biblioteka/elektronnye_resursy/
2. Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru;>
3. Библиотека. Единое окно доступа к образовательным ресурсам: <http://window.edu.ru;>
4. Российская электронная библиотека: <http://www.elbib.ru;>
5. Публичная Интернет-библиотека: <http://www.public.ru;>
6. Студенческая библиотека – онлайн: <http://www.referats.net.>

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| 1. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА БЕЛКОВ | 3 |
| 1.1. Краткая физико-химическая характеристика белков..... | 3 |
| 1.2. Методы выделения и фракционирования белков..... | 7 |
| 1.2.1. Реакции осаждения белков..... | 8 |
| 1.2.2. Определение изоэлектрической точки белка | 11 |
| 1.2.3. Высаливание белков | 12 |
| 1.3. Методы качественного исследования простых белков | 14 |
| 1.3.1. Качественные реакции на белки и аминокислоты | 14 |
| 1.3.2. Идентификация аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге..... | 20 |
| 1.3.3. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии | 24 |
| 1.4. Методы количественного определения белков и пептидов | 26 |
| 1.4.1. Спектрофотометрические методы..... | 26 |
| 1.4.2. Колориметрические методы. Биуретовый метод | 30 |
| 1.4.3. Количественное определение белка по Кьельдалю | 33 |
| 1.4.4. Определение аминного азота методом формольного титрования | 38 |
| 1.4.5. Количественное определение глутатиона | 39 |
| 1.5. Выделение сложных белков и определение их состава..... | 43 |
| 1.5.1. Фосфопротеины. Качественное определение фосфопротеинов в молоке..... | 43 |
| 1.5.2. Гликопротеины. Качественное определение гликопротеинов в слюне | 44 |
| 1.5.3. Хромопротеины. Качественное определение хромопротеинов в крови | 45 |
| 1.5.4. Нуклеопротеины. Качественное определение компонентов нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей..... | 47 |
| 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ | 50 |
| 2.1. Химическая природа ферментов..... | 50 |
| 2.2. Свойства ферментов | 50 |
| 2.3. Классификация и номенклатура ферментов | 52 |
| 2.4. Единицы активности ферментов..... | 55 |
| 2.5. Качественные реакции на присутствие ферментов..... | 55 |
| 2.5.1. Обнаружение активности каталазы в крови..... | 55 |
| 2.5.2. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле | 56 |
| 2.5.3. Обнаружение активности ксантиноксидазы в сыром молоке..... | 57 |
| 2.5.4. Обнаружение активности амилазы в слюне..... | 58 |
| 2.5.5. Обнаружение активности уреазы в соевой муке | 59 |

| | |
|---|-----|
| 2.6. Свойства ферментов | 60 |
| 2.6.1. Специфичность действия ферментов..... | 60 |
| 2.6.2. Термолабильность ферментов | 61 |
| 2.6.3. Влияние рН среды на активность ферментов | 61 |
| 2.6.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов | 62 |
| 2.7. Методы количественного определения активности ферментов | 63 |
| 2.7.1. Определение активности липазы | 63 |
| 2.7.2. Определение активности трипсина | 65 |
| 2.7.3. Определение активности амилазы | 66 |
| 2.7.4. Определение активности каталазы | 68 |
| 2.7.5. Определение активности сычужного фермента | 70 |
| 2.7.6. Определение активности аланинаминотрансферазы в мышечной ткани животных | 71 |
| 2.7.7. Определение активности фосфатаз | 72 |
| 2.7.8. Определение активности креатинфосфокиназы в мышечной ткани животных | 75 |
| 2.7.9. Определение активности лактатдегидрогеназы методом Варбурга | 77 |
| 3. ВИТАМИНЫ | 79 |
| 3.1. Жирорастворимые витамины | 80 |
| 3.1.1. Качественные реакции на витамин А | 80 |
| 3.1.2. Качественные реакции на витамин D | 82 |
| 3.1.3. Качественные реакции на витамин E..... | 83 |
| 3.1.4. Количественное определение витамина E..... | 84 |
| 3.1.5. Качественные реакции на витамин К | 85 |
| 3.2. Водорастворимые витамины | 86 |
| 3.2.1. Качественная реакция на тиамин | 86 |
| 3.2.2. Качественная реакция на рибофлавин | 87 |
| 3.2.3. Количественное определение рибофлавина..... | 89 |
| 3.2.4. Качественная реакция на никотиновую кислоту | 90 |
| 3.2.5. Качественная реакция на витамин В ₆ | 91 |
| 3.2.6. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту | 91 |
| 3.2.7. Количественное определение аскорбиновой кислоты | 93 |
| 3.2.8. Качественные реакции на витамин Р | 97 |
| 3.2.9. Количественное определение витамина Р в растительном пищевом сырье..... | 98 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 102 |

Шлейкин Александр Герасимович
Скворцова Наталья Николаевна
Бландов Александр Николаевич

БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Часть 2. БЕЛКИ. ФЕРМЕНТЫ. ВИТАМИНЫ

Учебное пособие

Ответственный редактор

Т.Г. Смирнова

Редактор

Р.А. Сафарова

Компьютерная верстка

Н.В. Гуральник

Дизайн обложки

Н.А. Потехина

Подписано в печать 17.11.2015. Формат 60×84 1/16

Усл. печ. л. 6,28. Печ. л. 6,75. Уч.-изд. л. 6,56

Тираж 100 экз. Заказ № С 59

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

