

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В. Н. Леонтьев, О. В. Стасевич, О. С. Игнатовец

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Лабораторный практикум

Рекомендовано

*учебно-методическим объединением по химико-технологическому
образованию в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальности 1-48 02 01 «Биотехнология»
специализации 1-48 02 01 02 «Технология ферментов,
витаминов и продуктов брожения»*

Минск 2020

УДК [577.1+543.63.062](076.5)(075.8)
ББК 28.072я73
Л47

Рецензенты:

кафедра сельскохозяйственной биотехнологии, экологии
и радиологии учреждения образования «Белорусская
государственная сельскохозяйственная академия» (кандидат
сельскохозяйственных наук, доцент, заведующий кафедрой
М. М. Добродькин; кандидат биологических наук, доцент,
доцент кафедры *Т. В. Никонович*);
кандидат биологических наук, доцент, заведующий НИЛ
прикладных проблем биологии Белорусского государственного
университета *В. П. Курченко*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или
ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения
образования «Белорусский государственный технологический университет».*

Леонтьев, В. Н.

Л47 Химия биологически активных веществ. Лабораторный
практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специально-
сти 1-48 02 01 «Биотехнология» специализации 1-48 02 01 02
«Технология ферментов, витаминов и продуктов брожения» /
В. Н. Леонтьев, О. В. Стасевич, О. С. Игнатовец. – Минск :
БГТУ, 2020. – 91 с.

ISBN 978-985-530-836-3.

В лабораторном практикуме представлены современные и традици-
онные методы и методики выделения биологически активных веществ из
природного материала. Приведены физико-химические и химические
методы количественного анализа, а также идентификации химических
соединений, которые позволяют обеспечить достаточную достоверность
и сопоставимость результатов анализа.

УДК [577.1+543.63.062](076.5)(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-530-836-3 © УО «Белорусский государственный
технологический университет», 2020
© Леонтьев В. Н., Стасевич О. В.,
Игнатовец О. С., 2020

ПРЕДИСЛОВИЕ

Дисциплина «Химия биологически активных веществ» играет важную роль в системе подготовки инженеров-химиков-технологов для предприятий пищевой и биофармацевтической промышленности, а также для предприятий по производству биоэнергосителителей. Указанная дисциплина служит основой для последующего изучения большинства дисциплин специализации. Она формирует основные представления о структуре, свойствах, методах выделения, очистки и анализа биополимеров и других биологически важных структур, а также о способах химического синтеза некоторых из них.

Лабораторный практикум включает методики, предусмотренные учебной программой для практического освоения основных методов выделения биологически активных веществ (белков, ферментов, липидов, углеводов и др.), а также их качественного и количественного анализа. В процессе выполнения лабораторных работ студенты получают практические навыки для работы с современными приборами для физико-химического анализа, такими как спектрофотометр, флуориметр, поляриметр, газовый хроматограф, и другими.

Каждая лабораторная работа содержит сведения об объекте исследования, необходимый перечень реактивов и оборудования, описание методики выполнения, вопросы для самоконтроля. Конкретным методикам в лабораторном практикуме предшествует изложение теоретических вопросов, относящихся к сущности и химизму методов анализа. Всё это способствует закреплению теоретических знаний и расширению практических навыков у будущих инженеров-химиков-технологов биотехнологической отрасли. Посobie также содержит рекомендации по оформлению лабораторных работ.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

При работе в химической лаборатории студенты должны знать и выполнять все правила по технике безопасности, соблюдать чистоту, быть внимательными и точно проводить опыты.

Студенты получают допуск к лабораторным работам после прохождения инструктажа и обучения правилам техники безопасности, в том числе и пожарной безопасности, которые проводит преподаватель, ведущий занятия.

Приступая к работе, необходимо изучить методику работы, правила ее безопасного выполнения, проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы.

Опыт необходимо проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаться очередности добавления реактивов.

Для выполнения опыта важно пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отмеривания каждого реактива нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); не следует выливать избыток реактива обратно в емкость, чтобы не испортить реактив.

Если в ходе опыта требуется нагревание реакционной смеси, надо следовать предусмотренным методическим указаниям способа нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на газовой горелке и др. Сильно летучие горючие вещества опасно нагревать на открытом огне.

Пролитые на пол и стол химические вещества необходимо обезвредить и убрать под руководством лаборанта (преподавателя) в соответствии с правилами.

При работе в лаборатории необходимо соблюдать следующие требования: выполнять работу нужно аккуратно, добросовестно, внимательно, экономно, быть наблюдательным, рационально и правильно использовать время, отведенное для работы.

По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: вымыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с кислотами и щелочами

Кислоты и щелочи в большинстве своем относятся к веществам повышенного класса опасности и способны вызвать химические ожоги и отравления. Поэтому необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

Не допускается ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, а необходимо наливать их только в отведенном для этого месте.

Разливать концентрированную азотную, серную и соляную кислоты следует только при включенной вентиляции в вытяжном шкафу.

Запрещается набирать кислоты и щелочи в пипетку ртом. Для этого следует применять резиновую грушу и прочее оборудование для отбора проб.

Для приготовления растворов серной, азотной и других кислот необходимо их приливать к воде тонкой струей при непрерывном перемешивании, а не наоборот. Приливать воду в кислоту запрещается!

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

При смешивании веществ, которое сопровождается выделением тепла, необходимо пользоваться термостойкой толстостенной стеклянной или фарфоровой посудой.

Разлитые кислоты или щелочи следует немедленно засыпать песком, нейтрализовать и только после этого проводить уборку.

При попадании на кожу или одежду кислоты или щелочи надо смыть ее большим количеством воды.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с легковоспламеняющимися и горючими жидкостями (ЛВЖ и ГЖ)

Все работы с ЛВЖ и ГЖ должны осуществляться в вытяжном шкафу при включенной вентиляции, отключенных газовых проводках и электронагревательных приборов.

Запрещается нагревать на водяных банях вещества, которые могут вступать между собой в реакцию, сопровождающуюся взрывом или выделением паров и газов.

При случайном пролипании ЛВЖ (сероуглерод, бензин, диэтиловый эфир и др.), а также при потерях горючих газов

необходимо немедленно отключить все источники открытого огня, электронагревательные приборы.

Сосуды, в которых проводились работы с ЛВЖ и ГЖ, после окончания исследований должны быть немедленно освобождены от оставшейся жидкости и промыты.

Опыты с ядовитыми веществами и веществами, которые имеют сильно выраженный запах, можно проводить только в вытяжном шкафу.

При тушении бензина, спирта, эфира необходимо пользоваться песком, которым следует засыпать вспыхнувшее пламя.

При распознавании газа по запаху, который выделяется, нюхать газ можно только на определенном расстоянии, направляя его струю движением руки от сосуда к себе.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с химической посудой

Основными травмирующими факторами, которые связаны с использованием стеклянной посуды, аппаратов и приборов, являются острые осколки стекла, способные вызвать порезы тела работающего, а также ожоги рук при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды.

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда. Держать сосуд при этом необходимо за ее горловину.

Перенося сосуды с горячей жидкостью, надо держать их двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

При закрывании пробкой толстостенной посуды следует держать ее за верхнюю часть горловины. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой до тех пор, пока он не охладится.

В опытах с нагревом необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненое место 2%-ным раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

Правила техники безопасности в лаборатории с электрооборудованием и электроприборами

Химические лаборатории (включая биохимические и микробиологические), согласно степени опасности поражения

электрическим током, относятся к помещениям с повышенной или особой опасностью, которая обусловлена возможностью воздействия на электрооборудование химически активных сред.

Все работы, связанные с применением электроприборов, должны проходить под наблюдением преподавателя (лаборанта).

При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой.

При неисправности в работе электроприбора (например, подсветка в микроскопе) следует обратиться к преподавателю. Чинить самостоятельно приборы запрещается.

При поражении электрическим током, если пострадавший остается в соприкосновении с токоведущими частями, необходимо немедленно выключить ток с помощью пускателя, или вывернуть охранную пробку, или перерубить токопроводящий провод изолированным инструментом. К пострадавшему, пока он находится под током, нельзя прикасаться незащищенными руками (без резиновых перчаток). Если пострадавший потерял сознание, после выключения тока нужно немедленно, не дожидаясь врача, делать искусственное дыхание.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с реактивами

Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве (экономия материалов и времени, которое затрачивается на опыт).

Избыток реактива нельзя высыпать и выливать обратно в сосуд, из которого он был взят.

После расходования реактива банку или стакан необходимо сразу закрыть пробкой и поставить на место.

Сухие реактивы следует брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После использования необходимо его тщательно обтереть.

Когда реактив отбирается пипеткой, ни в коем случае нельзя той же пипеткой, не вымыв ее, брать реактив из другой емкости.

При наливании реактивов запрещается наклоняться над сосудом во избежание попадания брызг на лицо или одежду.

Нельзя держать на весу банку или стакан с реактивом, которые нужно открыть, их надо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Общие положения. Лабораторные работы должны быть оформлены в отдельной тетради – рабочем журнале, в который заносятся все полученные результаты и расчеты. Работа должна быть описана достаточно подробно, чтобы можно было воспроизвести аппаратуру, реактивы, условия проведения экспериментов, метод и, как следствие, оценить результаты и качество работы. Рабочие растворы можно выливать только после проверки результата преподавателем.

Структура работы.

1. Название работы, дата выполнения.
2. Цель работы.
3. Используемые материалы, оборудование.

В первую очередь необходимо подробно изложить, какие использовались реагенты, растворы и т. д. Рекомендуется применять общепринятые номенклатуру, химические формулы. По возможности следует привести точный состав и структуру используемых веществ. Должно быть указано все оборудование и измерительные приборы.

4. Общие сведения (кратко).
5. Ход работы (кратко основные операции).

Описание методики проведения эксперимента должно включать:

- указание на последовательность операций, например, при смешивании или введении реагентов;
- пояснение, как применялась та или иная методика, с приведением количественных данных, например концентрации вводимых реагентов, условий контроля, длин волн и коэффициентов экстинкции в спектрофотометрических измерениях.

6. Результаты эксперимента (очень подробно, с соблюдением всех правил записи результатов и единиц измерений).

Должны быть приведены результаты эксперимента, выполнены необходимые расчеты, построены графики (строятся от руки на миллиметровой бумаге или выполняются на компьютере и распечатываются на листах формата А4 или А5).

7. Выводы.

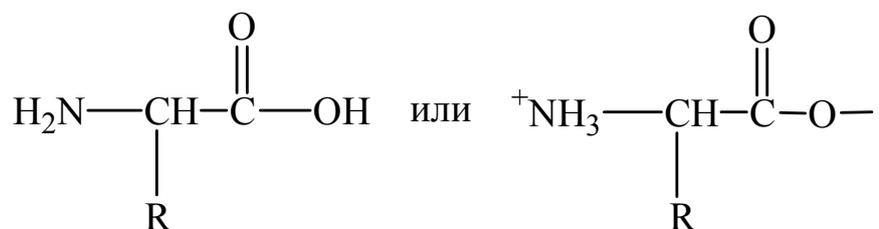
Лабораторная работа № 1

КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Цель работы – освоение методик идентификации α -аминокислот.

Основные сведения

α -Аминокислоты – это алифатические, ароматические или гетероциклические соединения, содержащие по меньшей мере одну амино- и одну карбоксильную группу, общей формулой:



В организме человека найдено 70 аминокислот. Двадцать из них входят в состав белков. Это так называемые протеиногенные аминокислоты.

Аминокислоты различаются по строению, размерам и физико-химическим свойствам радикалов, присоединенных к α -углеродному атому. Функциональные группы аминокислот определяют особенности свойств разных α -аминокислот.

В настоящее время существуют различные классификации α -аминокислот.

В зависимости от строения радикала аминокислоты подразделяют:

– на неполярные (гидрофобные), содержащие неполярный гидрофобный радикал (линейную или разветвленную углеводородную цепочку или ароматическое кольцо);

– полярные (гидрофильные) незаряженные, которые содержат полярный гидрофильный радикал (полярные группы: $-\text{OH}$; $-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$);

– полярные заряженные, у которых имеется заряженный радикал (заряженные группы: $-{}^+\text{NH}_3$ и $-\text{COO}^-$).

Аминокислоты подразделяются также:

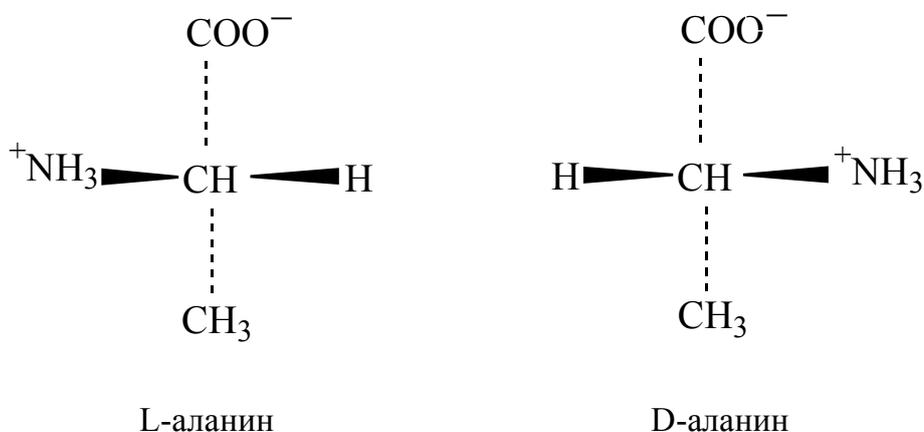
- на незаменимые (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, лизин);
- частично заменимые (аргинин и гистидин);
- заменимые (аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, глицин, глутамин, глутаминовая кислота, пролин, серин, тирозин, цистеин).

Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме человека, но необходимы для нормальной жизнедеятельности. Они должны поступать в организм с пищей. При недостатке незаменимых аминокислот задерживается рост и развитие организма.

Заменимые аминокислоты синтезируются в организме человека.

Частично заменимые аминокислоты синтезируются в организме человека, но в незначительных количествах.

Все аминокислоты, образуемые при гидролизе белков в достаточно мягких условиях, обнаруживают оптическую активность, т. е. способность вращать плоскость поляризованного света (за исключением глицина). Оптической активностью обладают все соединения, способные существовать в двух стереоизомерных формах (L- и D-изомеры).



Все природные аминокислоты, входящие в состав белков, относятся именно к L-ряду.

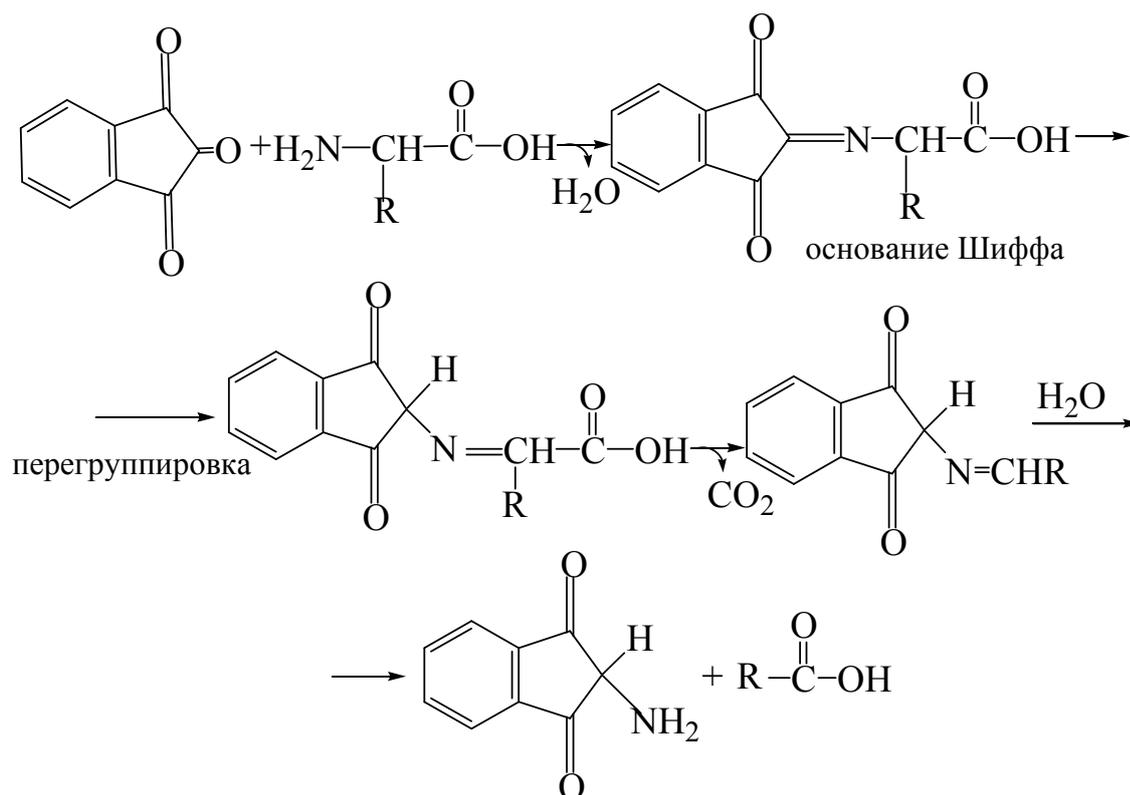
Выполнение работы

1. Нингидриновая реакция

В результате взаимодействия α -аминокислоты с нингидрином (трикетогидринденгидратом) в слабощелочной среде образуется окрашенное соединение.

При нагревании α -аминокислоты окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию с образованием аммиака и декарбоксилированию с образованием альдегида и CO_2 , а нингидрин восстанавливается.

Восстановленный нингидрин, конденсируясь с аммиаком и окисленным нингидрином, образует соединение, которое, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, имеющую сине-фиолетовый цвет.

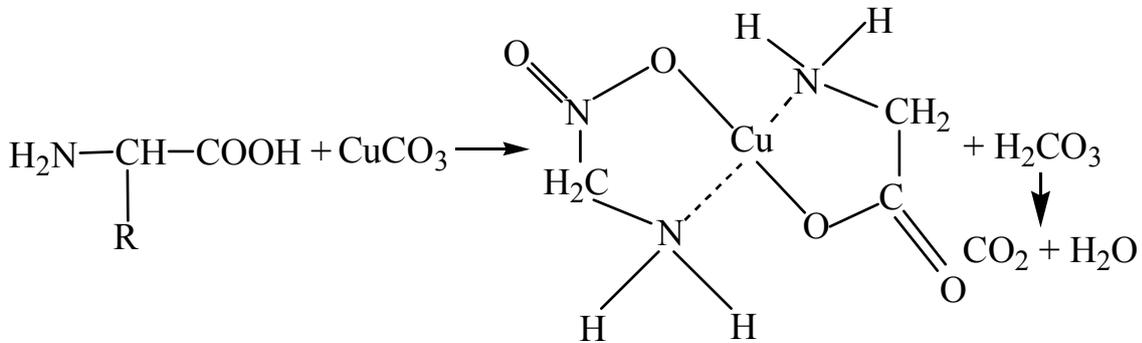


Реакция с нингидрином является специфической для аминокислот, содержащих α -аминогруппу, и характерна как для алифатических, так и циклических аминокислот. В реакции глицина с нингидрином образуется соединение, имеющее сине-фиолетовую окраску. Аспарагиновая кислота образует с нингидрином продукт сине-красного цвета, а пролин и оксипролин – желтого цвета.

Методика испытаний. В разные пробирки вносят по 1 мл 0,1%-ных растворов аминокислот и добавляют по 1 мл 0,2%-ного раствора нингидрина. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют на кипящей водяной бане в течение 5 мин. При этом наблюдают за изменением окраски реакционной смеси в зависимости от структуры аминокислоты.

2. Образование комплексной соли меди

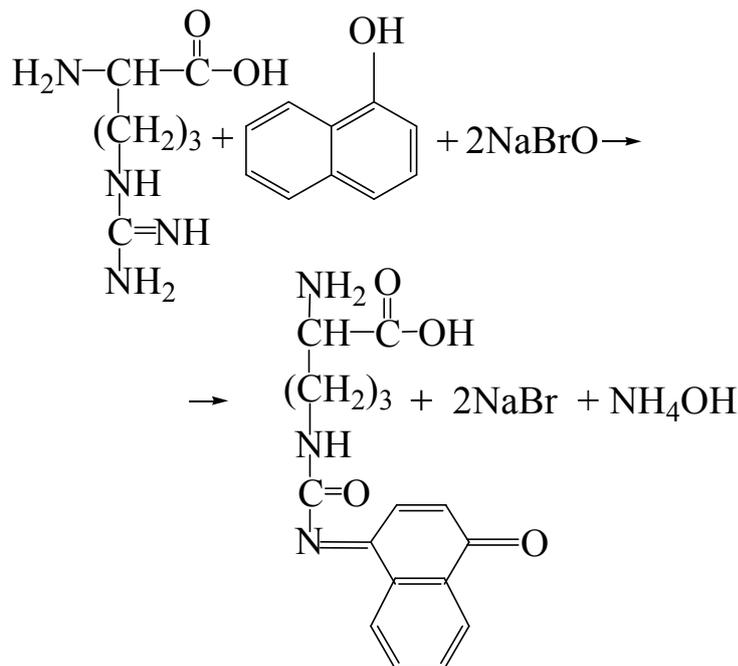
При нагревании аминокислоты с карбонатом меди (II) образуется комплексное соединение меди, имеющее синее окрашивание. В случае использования глицина уравнение реакции имеет вид



Методика испытаний. В пробирку вносят 1 мл 0,1%-ного раствора глицина и сухой карбонат меди (II) на кончике шпателя. Смесь нагревают в пламени спиртовки до кипения. При этом раствор окрашивается в синий цвет.

3. Реакция Сакагучи на аргинин

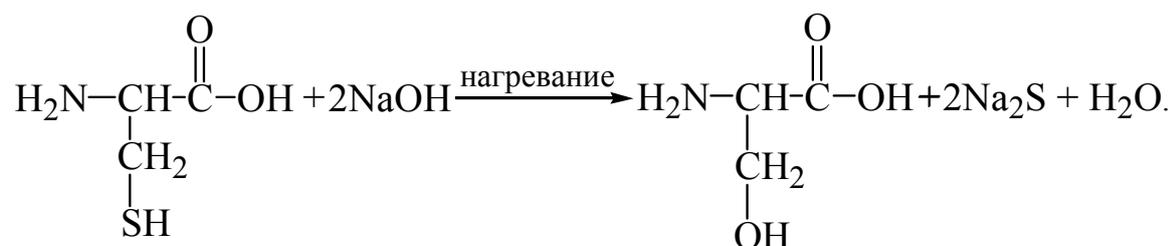
В реакции взаимодействия аргинина, содержащего гуанидиновую группировку, с гипобромитом натрия в щелочной среде происходит образование окисленной формы аргинина, которая при взаимодействии с β -нафтолом образует соединение красного цвета.



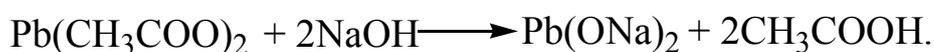
Методика испытаний. В пробирку вносят 1 мл 0,1%-ного раствора аргинина, последовательно добавляют 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора β-нафтола, 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1 мл 5%-ного раствора мочевины. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и быстро добавляют при непрерывном встряхивании 2 мл раствора гипобромита натрия. Пробирку оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем наблюдают за появлением красного окрашивания.

4. Реакция Фоля на «слабосвязанную» серу цистеина и цистина

При кипячении цистеина или цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, который в щелочной среде образует сульфид натрия. Для цистеина уравнение реакции имеет вид



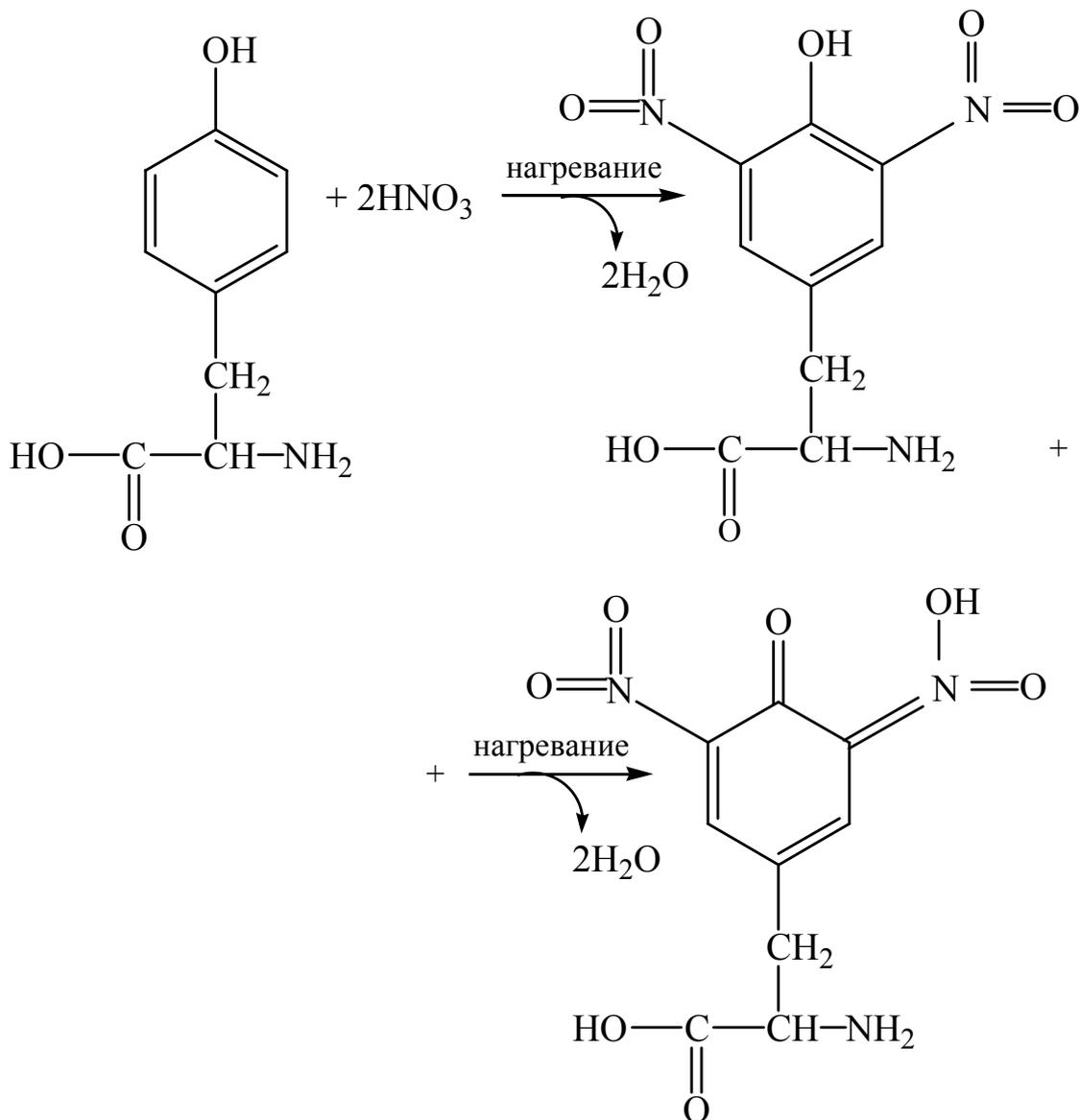
Образование сульфида натрия можно обнаружить с помощью ионов тяжелых металлов, например ионов свинца, образующих с ионами серы нерастворимый сульфид свинца черного цвета. Для выявления сульфида натрия можно использовать ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия образует плюмбит натрия. Последний, в свою очередь, реагируя с сульфидом натрия, приводит к образованию черного осадка сульфида свинца.



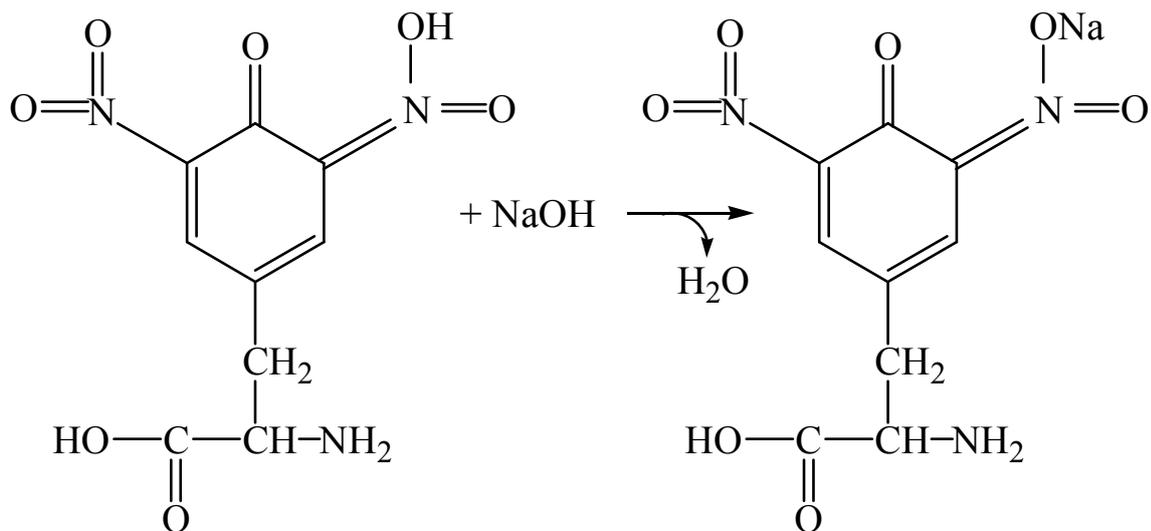
Методика испытаний. В пробирку вносят 2 мл 0,1%-ного раствора цистеина, добавляют 1 мл 6 н раствора NaOH и 0,5 мл 2%-ного раствора ацетата свинца. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют на кипящей водяной бане в течение 5 мин. При этом наблюдают выпадение бурого или черного осадка сульфида свинца.

5. Ксантопротеиновая реакция на ароматические аминокислоты

В ароматических аминокислотах (фенилаланин, тирозин и триптофан) под действием азотной кислоты происходит реакция нитрования бензольного кольца с образованием окрашенного в желтый цвет нитросоединения. Для тирозина уравнение реакции имеет вид



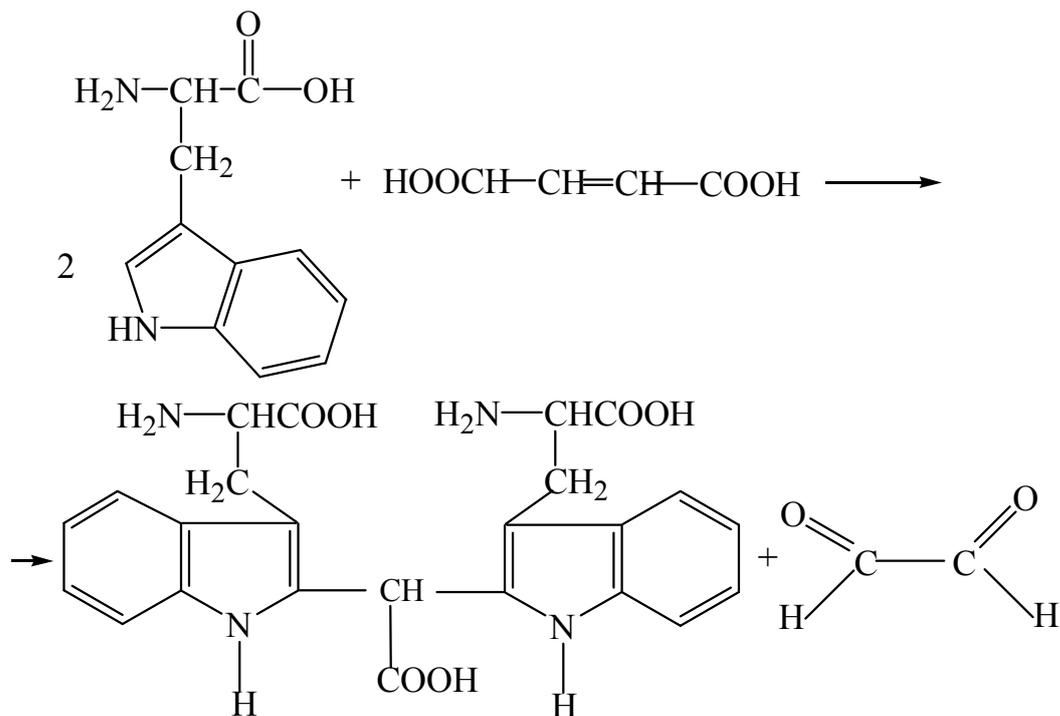
Последующая реакция взаимодействия гидроксида натрия с хиноидной формой динитротирозина приводит к образованию натриевой соли динитротирозина, имеющей оранжевую окраску.



Методика испытаний. В пробирки вносят по 0,5 мл 0,1%-ных растворов аминокислот и по 1 мл концентрированной азотной кислоты. Смесь осторожно нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Затем пробирки охлаждают и при перемешивании осторожно добавляют по 3,5 мл 6 н раствора NaOH. При этом наблюдают за изменением окраски реакционной смеси.

6. Реакция Адамкевича на триптофан

Триптофан в кислой среде вступает в реакцию с глиоксиловой кислотой (альдегидами), образуя при этом окрашенные в красно-фиолетовый цвет продукты конденсации.



Методика испытаний. В пробирку вносят 0,5 мл 0,1%-ного раствора триптофана и 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, которая всегда содержит небольшое количество глиоксиловой кислоты. Полученную смесь сначала нагревают на кипящей водяной бане, а затем охлаждают и по стенке пробирки осторожно, по каплям, чтобы жидкости не смешивались, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Через 10 мин на границе раздела фаз двух жидкостей наблюдается образование красно-фиолетового кольца. Реакцию можно ускорить, поместив пробирку с реагирующей смесью в кипящую водяную баню.

Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

Качественное определение аминокислот

Исследуемый раствор	Выявляющий агент	Название реакции	Наблюдаемая окраска	Выявляемая R-группа

Замечание. Все вышеперечисленные реакции протекают также с молекулами нативных белков. По результатам этих реакций судят о присутствии данных аминокислот в белках.

?

Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют аминокислоты и чем они различаются?
2. Чем обусловлены амфотерные свойства аминокислот и в чем они проявляются?
3. Как классифицируют аминокислоты в зависимости от полярности R-групп? Приведите примеры.
4. Какие аминокислоты относят к незаменимым?
5. Какие функциональные группы аминокислот принимают участие в формировании пептидной связи? Напишите уравнение реакции.
6. Объясните принципы качественных реакций на аминокислоты и белки: нингидриновой, с солями меди (II), на аргинин, цистеин и цистин.
7. Какие реакции используют для обнаружения ароматических аминокислот? Объясните их принципы.

Лабораторная работа № 2

МЕТОДЫ ДЕНАТУРАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель работы – освоение методов выделения и количественного определения белков.

Основные сведения

Белки – высокомолекулярные биополимеры, построенные из остатков аминокислот. Молекулярная масса белков колеблется в пределах от 6000 до 2 000 000 Да. Этим удивительным по разнообразию полимерам присущи одни из наиболее важных и разнообразных клеточных функций. К биологическим функциям белков относятся: каталитическая (ферментативная) и регуляторная (способность регулировать скорость химических реакций в клетке и уровень метаболизма в целом организме), транспортная (транспорт веществ в организме и перенос их через биомембраны), структурная (в составе хромосом, цитоскелета, соединительных, мышечных, опорных тканей), рецепторная (взаимодействие рецепторных молекул с внеклеточными компонентами и инициирование специфического клеточного ответа). Кроме этого, белки выполняют защитные, запасные, токсические, сократительные и другие функции.

Кроме простых белков, в состав которых входят только аминокислоты, существуют сложные белки, которые помимо аминокислот могут содержать ионы металлов (металлопротеины), молекулы пигментов (хромопротеины), образовывать комплексы с другими молекулами (липо-, нуклео-, гликопротеины), а также ковалентно связывать неорганический фосфат (фосфопротеины).

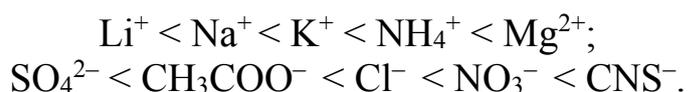
Растворы белков являются молекулярно-дисперсными, или истинными растворами (размеры частиц – 0,100–0,001 мкм), однако вследствие большого размера растворенных молекул такие растворы имеют некоторые свойства, общие с коллоидными растворами (гидрофобные и гидрофильные свойства, осмотическое давление, вязкость, способность к диффузии, седиментация и др.). Растворимость

белков в воде определяется наличием гидрофильных групп у аминокислот, входящих в состав белка. Также имеют значение суммарный заряд и конформация молекулы биополимера. Факторы, влияющие на гидратацию, заряд и форму белковых молекул, изменяют и их растворимость.

Выполнение работы

1. Методы обратимой денатурации белка

1.1. Высаливание белков (эксперимент 1). Процесс высаливания зависит в основном от гидрофобности белка. Типичная белковая молекула имеет гидрофобные участки, обусловленные участками таких аминокислот, как пролин, тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин. Взаимодействие таких аминокислотных остатков с водным растворителем приводит к образованию термодинамически неустойчивой системы. При внесении солей с высокой концентрацией происходит сольватация их ионов, в результате чего уменьшается количество свободных молекул воды в растворе. Дальнейшее увеличение концентрации соли приводит к отрыву молекул воды от гидрофобных участков белка в растворе. Белки, имеющие на своей поверхности большое количество гидрофобных остатков, агрегируют и выпадают в осадок. Белки с незначительным содержанием неполярных остатков на поверхности молекул остаются в растворе даже при полном насыщении солями. При высаливании смеси белков часто имеет место соосаждение. Тем не менее многие ферменты осаждаются из раствора в достаточно узкой области концентрации солей, что делает эту методику достаточно эффективной для фракционирования белков. На величину высаливания белков оказывают влияние не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура. Катионы и анионы нейтральных солей, как правило, по-разному влияют на конформационную стабильность белков. Считают, что главную роль при этом играет валентность ионов соли. Предложены лиотропные ряды катионов и анионов:



Растворимость белков может изменяться и при изменении рН. Если самую высокую растворимость в солевых растворах белки

имеют при рН 7 (когда они содержат наибольшее число заряженных групп), то наиболее полное осаждение белка происходит вблизи его изоэлектрической точки.

Реактивы: яичный овальбумин, вода дистиллированная, сульфат аммония кристаллический, хлорид натрия.

Методика испытаний. 5 мл 2%-ного яичного овальбумина в физиологическом растворе смешивают с равным количеством насыщенного сульфата аммония (для приготовления 100% насыщенного раствора смешивают 7,67 г сульфата аммония и 10 мл дистиллированной воды), оставляют на 10 мин. Полученный осадок отделяют центрифугированием при 5000 мин^{-1} в течение 20 мин. Осадок оставляют для дальнейших исследований.

1.2. Изоэлектрическое осаждение белков (эксперимент 2). Большинство ферментов хорошо растворимо при физиологических концентрациях солей, ионной силе 0,15–0,20 М и нейтральном значении рН.

Растворимость можно рассматривать как результат полярного взаимодействия растворенного вещества с водным растворителем и ионных взаимодействий его с присутствующими солями, а также в некоторой степени как результат электростатического отталкивания между одноименно заряженными молекулами или небольшими (растворимыми) агрегатами молекул. В небольших агрегатах сильные разноименные заряды взаимопогашаются. Например, если поверхность глобулы характеризуется высокой гидрофобностью, то это значит, что лишь малая ее часть взаимодействует с растворителем и, соответственно, меньшее число заряженных групп реагирует с солями. Если заряд снижается до нуля, электростатическое отталкивание уменьшается и по мере приближения к изоэлектрической точке молекулы притягиваются друг к другу с образованием крупных агрегатов. Этот процесс называется изоэлектрическим осаждением. Следовательно, осаждаются из растворов в изоэлектрической точке могут только гидрофильные белки.

Изоэлектрическая точка (pI) – это значение рН, при котором положительные и отрицательные заряды белка полностью скомпенсированы и суммарный заряд молекулы равен нулю. Изоэлектрические точки у разных белков разные, что обусловлено их первичной структурой. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН ~ 5).

В смеси белков ситуация осложняется соосаждением – разные белки со сходными свойствами агрегируют и осаждаются при достижении изоэлектрической точки.

Реактивы: 0,2 М раствор уксусной кислоты, 2%-ный раствор яичного овальбумина в 0,2 М растворе ацетата натрия, вода дистиллированная, сульфат аммония кристаллический, хлорид натрия.

Методика испытаний. В каждую из семи пробирок помещают 0,2 М раствор уксусной кислоты и воду в объемах, указанных в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Изоэлектрическое осаждение яичного альбумина

Количество 0,2 М раствора уксусной кислоты, мл	Количество дистиллированной воды, мл	Количество 2 %-ного раствора белка в 0,2 М растворе ацетата натрия, мл	pH смеси
8,0	2,0	1,0	3,8
4,0	6,0	1,0	4,1
2,0	8,0	1,0	4,4
1,0	9,0	1,0	4,7
0,5	9,5	1,0	5,0
0,3	9,7	1,0	5,3
0,1	9,9	1,0	5,6

Содержимое тщательно перемешивают и в каждую пробирку добавляют по 1,0 мл 2%-ного раствора яичного овальбумина в 0,2 М растворе ацетата натрия, аккуратно встряхивают, не допуская вспенивания, и оставляют для наблюдения. Если через 10–15 мин ни в одной из пробирок не регистрируется значительное помутнение, то в каждую пробирку добавляют по 2 мл 96%-ного этанола и визуально оценивают степень помутнения растворов. Наибольшая степень помутнения соответствует изоэлектрической точке альбумина. Наиболее мутный раствор центрифугируют при 5000 мин⁻¹ в течение 20 мин. Полученный осадок оставляют для дальнейших исследований.

1.3. Осаждение белков органическими растворителями (эксперимент 3). Из органических растворителей наиболее часто используются ацетон и этанол, которые смешиваются с водой в любых соотношениях. Добавление этих растворителей к водным растворам белков приводит к уменьшению диэлектрической проницаемости растворителя и изменению конформации белковых

макромолекул. По мере возрастания концентрации органических растворителей снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул белка. Молекулы воды, расположенные упорядоченным образом вокруг гидрофобных участков на поверхности белка, могут быть замещены молекулами органического растворителя. Растворитель связывает воду, вызывая дегидратацию молекул белка и неустойчивость их в растворе. При этом происходит агрегация молекул за счет электростатических взаимодействий между противоположно заряженными участками на поверхности белков, что аналогично осаждению в изоэлектрической точке.

Вблизи изоэлектрической точки белков осаждение происходит при более низкой концентрации органического растворителя.

На осаждение белков под действием органических растворителей влияет также размер молекулы. Как правило, чем ниже молекулярная масса белка, тем выше концентрация органического растворителя, необходимая для его осаждения. Крупные молекулы агрегируют быстрее, чем мелкие.

Осаждение органическими растворителями проводят при пониженной температуре (0°C). Низкая температура не только предохраняет белок от денатурации, но и усиливает осаждающее действие растворителя.

При осаждении этанолом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Реакция облегчается присутствием электролита (например, хлористого натрия) вследствие снятия заряда с частиц белка. Реакция осаждения белка этанолом обратима при низких температурах и кратковременном действии. Ацетон обладает меньшим денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при низкой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

Одним из преимуществ фракционирования с помощью органических растворителей является то, что его можно проводить при температуре ниже нуля, так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже 0°C . Это предотвращает денатурирующее действие органического растворителя, которое становится заметным при температуре выше $+10^{\circ}\text{C}$.

Реактивы: 2%-ный раствор яичного овальбумина в физиологическом растворе, 96 %-ный этанол.

Методика испытаний. К 5 мл раствора яичного овальбумина, охлажденного до 0°C, небольшими порциями доливают 5 мл охлажденного этилового спирта. Выдерживают 10–15 мин и центрифугируют при 5000 мин⁻¹ в течение 20 мин. Супернатант отделяют, а осадок оставляют для дальнейшего использования.

2. Методы необратимой денатурации белков

2.1. Осаждение белков при нагревании (эксперимент 4).

Тепловая денатурация белков обусловлена конформационной перестройкой молекул. Температурный интервал денатурации для разных белков отличается и определяется их первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурами. В связи с этим важную роль при тепловой денатурации играют ионная сила раствора, рН, его солевой состав и время экспозиции. Для основной массы белков температурный режим находится в области 50–60°C, однако существуют и термостабильные белки, которые выдерживают кратковременное кипячение без обратной денатурации. Быстрее всего белки денатурируют, когда находятся в нейтральных или слабокислых растворах, что объясняется дегидратацией и минимальной стабильностью белковой молекулы в изоэлектрической точке. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой реакции. В сильно кислых растворах молекулы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость. Подобно этому в щелочных растворах стабильность белкового коллоида обусловлена отрицательным зарядом.

Повышение ионной силы раствора способствует ускорению необратимой денатурации белка за счет снижения сольватации макромолекул.

Реактивы: 1%-ный раствор яичного овальбумина в физиологическом растворе, 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор уксусной кислоты, насыщенный раствор NaCl, 10%-ный раствор NaOH.

Методика испытаний. В пять пробирок вносят по 2,0 мл 1%-ного раствора белка и добавляют реактивы, приведенные в табл. 2.2.

Количество и концентрация добавляемых реактивов

№ пробирки	Количество добавляемого реактива, мл	pH смеси
1	–	7
2	0,25 мл 1 %-ного CH_3COOH	5
3	0,25 мл 10 %-ного CH_3COOH	3
4	0,25 мл 10 %-ного CH_3COOH , 0,25 мл насыщенного раствора NaCl	3
5	0,25 мл 10 %-ного NaOH	8–10

Нагревают пробирки над пламенем спиртовки до кипения, затем охлаждают при комнатной температуре и центрифугируют при 5000 мин^{-1} в течение 20 мин. Белковые растворы, полученные на предыдущей стадии, переносят в целлофановые мешочки, которые завязывают и помещают в стакан с 1000 мл физиологического раствора таким образом, чтобы уровни жидкости в мешочках и стакане совпадали. Диализ проводят в холодильнике в течение одних суток. После этого диализованные белковые растворы замораживают.

2.2. Денатурация белка сильными органическими кислотами (эксперимент 5). В основе осаждения белков сильными органическими кислотами лежит дегидратация макромолекул. Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 2,5–5,0% часто используется для полного выделения белков из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), так как ТХУ осаждает только белки, а продукты их распада остаются в растворе. В отличие от ТХУ, сульфосалициловая кислота осаждает и высокомолекулярные полипептиды.

Реактивы: 1%-ный раствор яичного овальбумина в физиологическом растворе, 10%-ная сульфосалициловая кислота, 10%-ная ТХУ кислота.

Методика испытаний. В две пробирки вносят по 5 мл 1%-ного раствора яичного овальбумина. Затем добавляют в одну из пробирок 1,5 мл 10%-ной сульфосалициловой кислоты, а в другую – 1,5 мл 10%-ной ТХУ кислоты. Выдерживают 5 мин и центрифугируют при 5000 мин^{-1} в течение 20 мин. Далее проводят диализ, как описано в п. 2.1. После этого диализованные белковые растворы замораживают.

3. Методы количественного определения белка

Существует много различных методов определения концентрации белка, которые различаются сложностью методик, приборным

оснащением и чувствительностью. Среди них выделяют гравиметрический анализ, метод определения общего азота, аминокислотный анализ, а также колориметрические, спектрофотометрические и флуориметрические методы.

Гравиметрические методы используются редко, поскольку требуют для анализа значительных количеств материала (порядка нескольких десятков миллиграммов).

Аминокислотный анализ предусматривает полный гидролиз исследуемого белка и определение аминокислотного состава гидролизата. Каждая аминокислота может быть легко идентифицирована, если ее количество составляет 5–10 нмоль, а в некоторых случаях – 50–100 пикомоль.

Методы аминокислотного анализа и флуориметрии (в белок вводится флуоресцентная метка) являются высокочувствительными методами анализа, однако требуют дорогой аппаратуры. Поэтому наиболее приемлемыми являются метод определения общего азота, колориметрические и спектрофотометрические методы.

Определение общего азота по методу Кьельдаля основано на том, что удельное содержание азота в большинстве белков практически одинаково (~16%). По количеству определяемого общего азота (общего количества азотсодержащих соединений), умноженному на пересчетный коэффициент 6,25, находят количество белка в пробе. Органические соединения минерализуют нагреванием с концентрированной серной кислотой в присутствии катализаторов и окислителей, при этом азот переходит в сульфат аммония, который можно определить количественно. Однако этот метод является наименее чувствительным и позволяет определить содержание не истинного белка, а так называемого «сырого протеина».

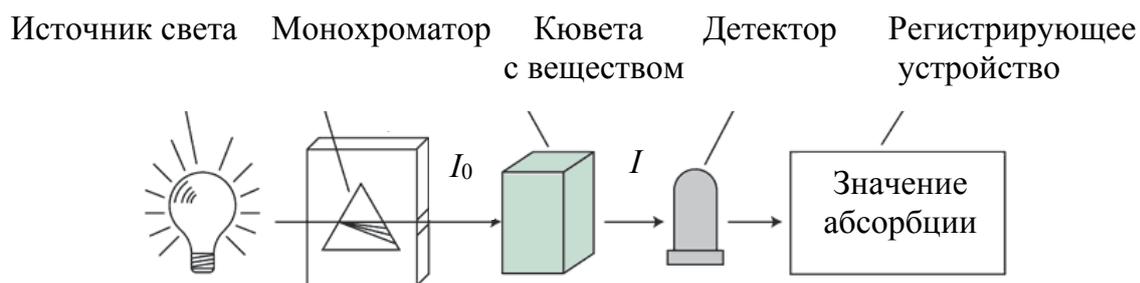
Наибольшее распространение получили колориметрические и спектрофотометрические методы, а также наиболее чувствительный, но вместе с тем дорогостоящий и трудоемкий аминокислотный анализ.

Колориметрические методы основаны на измерении экстинкции цветных продуктов реакции исследуемого белка с соответствующим реагентом в видимой (340–900 нм) области спектра и сравнении ее с экстинкцией продуктов реакции взаимодействия белка-стандарта с этим же реагентом. Измерения экстинкции

проводят в максимуме поглощения цветного продукта реакции с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра.

В отличие от колориметрии спектрофотометрические методы позволяют проводить измерения экстинкции растворов как в видимой, так и в ультрафиолетовой (УФ) (200–340 нм) областях спектра с применением монохроматического излучения определенной длины волны. Спектрофотометрические методы определения концентрации белка в УФ-области спектра можно рассматривать как методы неразрушающего контроля.

Принципиальная схема спектрофотометра представлена на рисунке. Источник света излучает в широком диапазоне длин волн, а монохроматор выделяет свет только определенной длины волны. Монохроматический свет проходит через образец, помещенный в кювету толщиной l , где частично поглощается. Прошедший сквозь кювету свет имеет меньшую интенсивность, которая измеряется с помощью детектора.



Принципиальная схема спектрофотометра

Поглощение света (A или D) пропорционально толщине поглощающего слоя (длине светового пути) и концентрации поглощающего вещества. Эта зависимость выражается законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$A = D = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon l C, \quad (2.1)$$

где A или D – абсорбция, или оптическая плотность, отн. ед.; I_0 – интенсивность источника излучения на определенной длине волны; I – интенсивность этого излучения, прошедшего через поглощающий слой раствора; ϵ – молярный коэффициент экстинкции (поглощения), л/(моль·см); l – толщина светопоглощающего слоя, см; C – концентрация поглощающего раствора, моль/л.

Молярный коэффициент экстинкции (ϵ) равен оптической плотности 1 М раствора вещества с толщиной слоя 1 см. Это индивидуальная характеристика вещества, коэффициент зависит от природы вещества и длины волны, при которой измеряется поглощение. Иногда для расчета концентрации используют удельный показатель экстинкции (E), который представляет собой оптическую плотность 1% (1 г в 100 мл воды) раствора вещества при толщине поглощающего слоя 1 см. Если информации о молярном или удельном коэффициентах поглощения чистого вещества в литературных данных нет, при расчете концентрации вещества пользуются градуировочным графиком, который представляет собой зависимость оптического поглощения от концентрации вещества в стандартных растворах [1, 2].

3.1. Метод Варбурга и Христиана (эксперимент 6). Метод основан на определении соотношения величин поглощения раствора белка при 280 и 260 нм и позволяет определять белок в присутствии нуклеиновых кислот. Большинство белков имеет в спектре максимум поглощения при 280 нм, что обусловлено содержанием в них остатков триптофана и тирозина. Нуклеиновые кислоты, присутствующие часто в виде примесей к белкам, также обладают сильным поглощением при 280 нм, но максимум поглощения этих соединений находится при 260 нм. Так как содержание триптофана и тирозина в белках очень сильно варьируется, величина удельной экстинкции E_{280} 1% также варьируется в значительной степени. У большинства белков величина E_{280} 1% лежит в интервале 0,4–1,5. А. Варбург и К. Христиан экспериментально определили значения экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 280 и 260 нм и рассчитали их соотношения (фактор F) (табл. 2.3). Это самый простой метод определения концентрации белков.

Методика испытаний. Полученные в предыдущих опытах осадки белка ресуспендируют в 5 мл физиологического раствора и измеряют экстинкцию исследуемого белкового раствора при 280 и 260 нм в кварцевых кюветах длиной 1 см на спектрофотометре против холостой пробы. Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Таблица 2.3

Взаимосвязь отношения экстинкции E_{280} / E_{260} и фактора F с содержанием нуклеиновых кислот в выделенной из биологического материала белковой фракции

E_{280} / E_{260}	Нуклеиновая кислота, %	F
1,750	0,0	1,116
1,630	0,25	1,081
1,520	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,360	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,250	1,50	0,944
1,160	2,00	0,899
1,090	2,50	0,852
1,030	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

Вычисляют отношение полученных величин, по табл. 2.3 находят соответствующее значение F и определяют концентрацию белка по следующей формуле:

$$C_{\text{белка}} = F / (l \cdot E_{280}), \quad (2.2)$$

где $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/мл; F – фактор; l – толщина кюветы, см; E_{280} – экстинкция раствора при 280 нм.

При невозможности рассчитать концентрацию белка через фактор F используют формулу

$$C_{\text{белка}} = 1,55 \cdot E_{280} - 0,76 \cdot E_{260}, \quad (2.3)$$

где $C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/мл; E_{280} – экстинкция раствора при 280 нм; E_{260} – экстинкция раствора при 260 нм.

3.2. Метод Лоури (эксперимент 7). Метод основан на двух реакциях – биуретовой реакции с пептидными связями и реакции ароматических боковых цепей аминокислот с реактивом Фолина – Чикольте (фенольным реагентом). В результате реакции образуются продукты восстановления фосфорно-молибденового и фосфорно-вольфрамового реагента медно-белковым комплексом, окрашенные в сине-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка. Образующееся окрашивание обусловлено присутствием в белке главным образом остатков тирозина, но определенный вклад вносят и остатки триптофана, гистидина и цистеина.

Определению белка данным методом мешают детергенты, соли аммония и большие количества фосфата.

Реактивы.

1) Раствор А – 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н растворе NaOH .

2) Раствор В – 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе цитрата натрия.

3) Раствор С (готовится непосредственно перед работой): к 50 мл раствора А приливают 1 мл раствора В.

4) Раствор Д – 2 н реактив Фолина – Чикольте (коммерческий препарат).

5) Раствор Е (готовят перед употреблением): 2 н реактив Фолина – Чикольте разбавляют дистиллированной водой до концентрации 1 н.

6) Раствор белка-стандарта: готовят раствор БСА с концентрацией 2000 мкг/мл (100 мг БСА растворяют в 50 мл 0,1 н раствора NaOH). Затем проводят разбавление этого раствора, как указано в табл. 2.4.

Методика испытаний. Полученные после диализа растворы белка размораживают и подвергают количественному определению. К 0,4 мл раствора белка приливают 3 мл раствора С и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 мл раствора Е, тщательно перемешивают и через 30 мин измеряют величину экстинкции раствора при 750 нм в кюветах $l = 0,5$ см на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы

(вместо раствора белка берут 0,1 н раствор NaOH, остальные растворы добавляют в тех же объемах и смесь выдерживают такое же время). Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Таблица 2.4

Разведения раствора белка-стандарта для метода Лоури

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем 0,1 н раствора NaOH, мл
1	100	0,5	9,50
2	200	0,5	4,50
3	300	0,5	2,80
4	400	0,5	2,00
5	500	1,0	3,00
6	600	1,0	2,30
7	700	1,0	1,85
8	800	1,0	1,50
9	900	1,0	1,20
10	1000	1,0	1,00

Концентрацию белка в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику, предварительно построенному для растворов белка-стандарта.

? Вопросы для самоконтроля

1. Чем определяется растворимость белков в различных растворителях? Какие факторы стабилизируют белки в растворе?
2. Перечислите этапы выделения и очистки индивидуальных белков. Какие особенности белков следует при этом учитывать?
3. Каковы общие принципы осаждения белка из раствора?
4. Какими способами можно осадить белки из раствора, не вызывая их денатурацию? Дайте характеристику каждого из способов.
5. Что такое изоэлектрическая точка белка? Как изменяется растворимость белков вблизи изоэлектрической точки?
6. С какой целью используют методы необратимого осаждения белков? Перечислите их.

7. Какие методы применяют для освобождения белковых растворов от низкомолекулярных соединений? На чем они основаны?

8. Какие методы применяют для количественного определения белков и чем они различаются?

9. В чем суть закона Бугера – Ламберта – Бера?

10. Что такое молярный коэффициент экстинкции? В чем его физический смысл?

11. Что такое удельный показатель поглощения? В чем его физический смысл?

12. Какие аминокислоты белков имеют максимум поглощения при 280 нм? Как это свойство используется в лабораторной практике?

13. Объясните принципы метода Лоури.

Лабораторная работа № 3

ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИОЗИНА В КУРИНОЙ ГРУДКЕ

Цель работы – выделение миозина из куриной грудки экстракцией и гель-хроматографией, а также его количественное определение спектрофотометрическим методом анализа.

Общие сведения

Общая характеристика миозина. Миозин – фибриллярный белок, один из главных компонентов сократительных волокон мышц миофибрилл. Составляет 40–60% от общего количества мышечных белков. Это очень длинная палочковидная молекула с хвостом, состоящим из двух навитых друг на друга α -спиральных полипептидов (рис. 3.1). Она имеет также сложную по своему строению «головку», обладающую ферментативной активностью, заключающуюся в катализе процесса гидролитического расщепления аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) на аденозиндифосфорную кислоту (АДФ) и фосфат. Таким образом, благодаря АТФ-азной активности миозина химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения.

Общая молекулярная масса миозина составляет 450 кДа, молекула имеет длину около 160 нм и содержит шесть полипептидных цепей. Длинный хвост состоит из двух цепей, каждая с молекулярной массой 200 кДа; это тяжелые цепи, в которых находятся гибкие шарнирные участки. Головка имеет глобулярную форму и содержит концы тяжелых цепей, а также четыре легкие цепи, свернутые в виде глобул, каждая с молекулярной массой около 18 кДа.

Многочисленные молекулы миозина, регулярно уложенные в виде пучка, образуют толстые нити скелетной мышцы, с которыми тесно взаимодействуют тонкие нити, состоящие из белка актина, совместно они образуют актиномиозиновый комплекс – основной структурный элемент сократительной системы мышц.

Актин существует в двух формах: в виде глобулярного актина (G-актин) и фибриллярного актина (F-актин). Фибриллярный актин представляет собой длинную цепочку из молекул G-актина с молекулярной массой 46 кДа, связанных друг с другом в одну нить. Две нити F-актина навиваются одна на другую и образуют двухнитевую скрученную структуру.

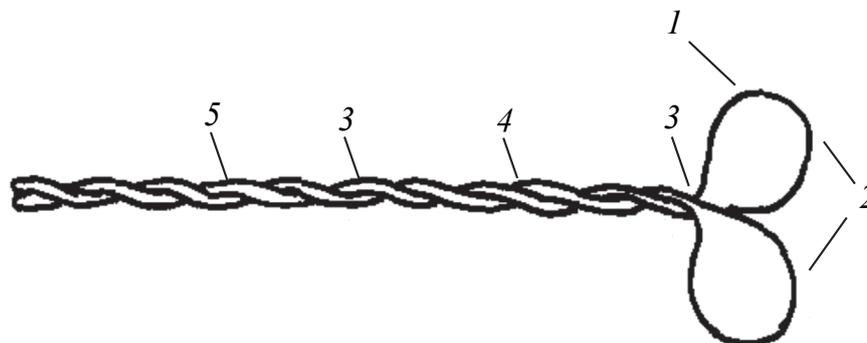


Рис. 3.1. Структура миозина [1]:

1 – головка молекулы миозина; 2 – легкие цепи; 3 – шарнирная область;
4 – две α -спиральные полипептидные цепи,
закрученные одна вокруг другой; 5 – тяжелые цепи

Взаимодействие между актином и миозином должно регулироваться таким образом, чтобы мышечное сокращение происходило только в ответ на соответствующий сигнал нервной системы. Эта регуляция осуществляется с помощью двух белков – тропомиозина (70 кДа) и тропонина (18–38 кДа) [1, 2].

Чистый миозин растворим в воде и образует вязкий раствор с массовой долей до 4% белка. Растворы солей щелочных металлов небольшой молярной концентрации (0,25–0,04 моль/дм³) осаждают миозин из его растворов; в солевых растворах повышенной молярной концентрации (до 0,6 моль/дм³) он растворяется. Температура денатурации миозина птичьего миозина около 51°C; изоэлектрическая точка определяется при pH 5,4.

Общие принципы выделения белков и ферментов из биологического материала. Мышечную ткань разрушают с помощью мясорубки, а также гомогенизатора. Далее выделяемый белок экстрагируют из измельченной ткани тем или иным буферным раствором.

Клеточный экстракт, называемый грубым экстрактом, наряду с интересующим белком или ферментом содержит и другие вещества белковой и небелковой природы. Для извлечения отдельных клеточных фракций или специфических органелл иногда на этом

этапе применяют *центрифугирование*. Также экстракт подвергают процедуре, позволяющей разделить белки на фракции, пользуясь различиями в размерах или зарядах белковых молекул. Данный процесс называется *фракционированием*. Последовательность их применения может быть различной.

На первых стадиях фракционирования пользуются различной растворимостью белков, зависящей от таких условий, как рН, температура, концентрация соли и др. Растворимость белков обычно снижается при повышении концентрации соли в растворе; данный эффект называют «высаливанием» или осаждением солями (см. лабораторную работу № 2).

В процессе очистки стабильность выделяемого фермента снижается, поэтому вся работа должна проводиться по возможности быстро. Как правило, все операции следует проводить при 2–4°C (лучше – в холодной комнате), а фракционирование органическими растворителями – при температуре ниже 0°C. При этом важным является поддержание определенного уровня рН среды. Химические реактивы должны быть высокой степени чистоты [3].

Прежде всего, белки отделяют от низкомолекулярных веществ, содержащихся в клеточном или тканевом экстракте, путем *диализа* (рис. 3.2).

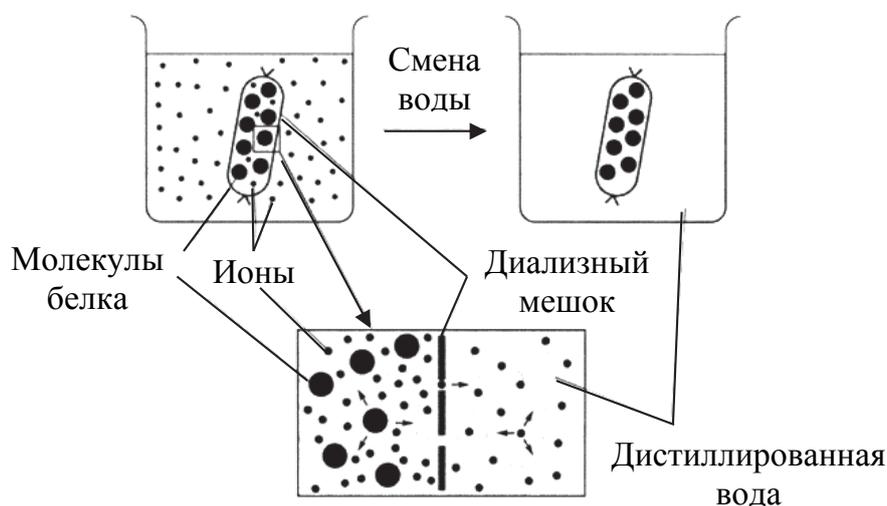


Рис. 3.2. Принципиальная схема диализа

Крупные молекулы, такие как молекулы белков, остаются внутри диализного мешочка, сделанного из материала, содержащего ультрамикроскопические поры, например из целлофана.

Если такой мешочек с клеточным или тканевым экстрактом погрузить в воду, то содержащиеся в экстракте малые молекулы, например соли, пройдут сквозь поры, а высокомолекулярные белки останутся в мешочке. Диализ можно использовать, например, для удаления сульфата аммония из препарата белка [1].

После того как смесь белков будет освобождена от малых молекул в ходе диализа, белки можно разделить с помощью препаративной *колоночной хроматографии*, метода разделения, основанном на различии сродства белков (размеров, зарядов, аффинности и других свойств) к подвижной и неподвижной фазам. Колонку заполняют твердым пористым материалом (неподвижная фаза), сквозь который пропускают буферный раствор (подвижная фаза). Раствор белка наносят на верхнюю часть колонки, и он начинает проходить сквозь неподвижную фазу. Сверху из резервуара в колонку постоянно поступает подвижная фаза (элюент), она протекает сквозь колонку и выходит снизу вместе с молекулами белков (элюат). Отдельные белки двигаются вместе с подвижной фазой по колонке медленнее или быстрее в зависимости от их свойств. По мере выхода раствора из колонки фракции элюата собирают в отдельные пробирки. Затем каждую фракцию тестируют на присутствие искомого белка и других белков. Строят профиль элюирования – зависимость оптической плотности проб от объема или их номера (рис. 3.3). Все фракции, в которых содержится искомым белок, можно объединить.



Рис. 3.3. Общий вид профиля элюирования

Для препаративного разделения белков чаще всего применяются следующие виды хроматографии: ионообменная, эксклюзионная (гель-фильтрация), аффинная.

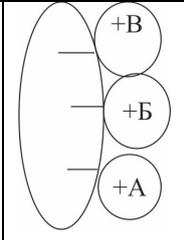
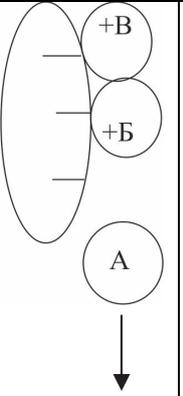
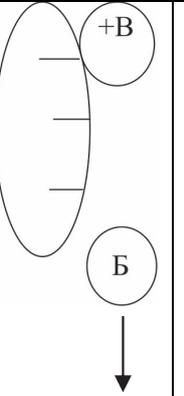
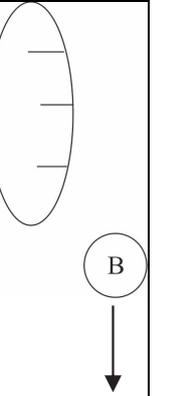
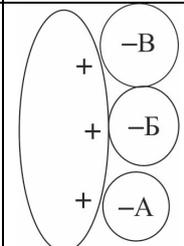
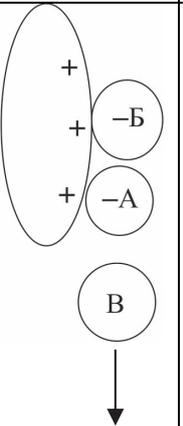
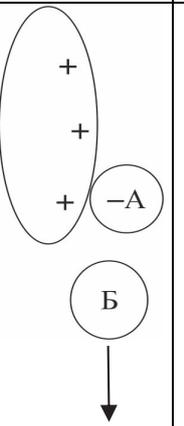
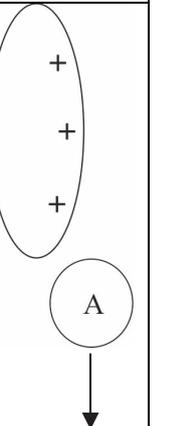
Ионообменная хроматография основана на различной способности белков удерживаться на неподвижной фазе при помощи заряда при данном значении рН. Носитель, которым заполняют колонку, представляет собой чаще всего гидрофильную полисахаридную матрицу, содержащую связанные заряженные группы. Носители с анионными группами называют катионообменниками, т. е. способны связывать на своей поверхности положительно заряженные молекулы белка, а носители с катионными группами – анионообменниками (способны связывать на своей поверхности отрицательно заряженные молекулы белка). Сродство каждого белка к заряженным группам носителя зависит от рН (который определяет степень ионизации функциональных групп боковых цепей аминокислотных остатков белка) и концентрации конкурирующих свободных ионов в растворе [2].

Разделение осуществляют путем постепенного изменения рН и (или) концентрации солей в подвижной фазе, т. е. путем создания градиента рН или концентрации соли. В изоэлектрической точке белка (значении рН, при котором суммарный заряд белка равен нулю) сродство белка с неподвижной фазой минимально, и этот белок элюируется из колонки (таблица).

Эксклюзионная хроматография представляет собой разновидность хроматографии, которая основывается на разделении белков по размерам. Раствор, содержащий смесь белков, пропускают через колонку, заполненную очень мелкими пористыми гранулами высокогидратированного полимера (например, полидекстрана, торговое название которого «сефадекс»). Молекулы белков, имеющие сравнительно небольшие размеры, проникают через поры внутрь этих гранул, в результате чего их прохождение через колонку замедляется, тогда как молекулы более крупных белков не могут проникнуть внутрь гранул и проходят через колонку значительно быстрее (рис. 3.4).

Белки промежуточных размеров будут проходить через колонку с промежуточными скоростями в зависимости от их способности проникать внутрь гранул. Такая колонка, в которой осуществляется гель-фильтрация, представляет собой молекулярное сито.

Общая схема разделения белков с изоэлектрическими точками $pI_A = 4,6$; $pI_B = 5,2$; $pI_V = 7,0$ на катионообменнике и анионообменнике

Значение pH (повышается)	3,0	4,6	5,3	7,0
Катионообменник				
Значение pH (понижается)	8,0	7,0	5,3	4,6
Анионообменник				

Гранула полидекстрана сефадекса

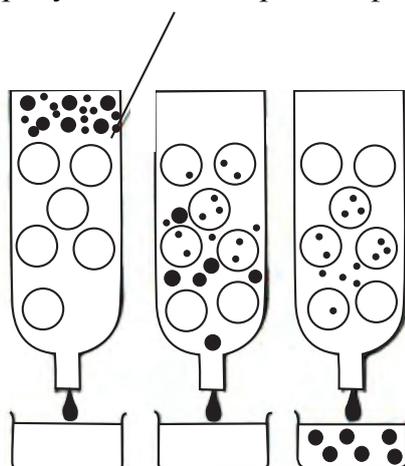


Рис. 3.4. Общий вид разделения белков
эксклюзионной хроматографией

Аффинная хроматография позволяет разделять белки в соответствии с их способностью связываться со специфическим носителем. Сорбент в колонке на своей поверхности несет присоединенные ковалентной связью химические группы, называемые лигандами (химическими группами или молекулами, связывающимися с макромолекулой белка). При нанесении на колонку смеси белков каждый белок, имеющий сродство к этому лиганду, связывается с сорбентом, в результате его продвижение вдоль колонки замедляется, а балластные белки выходят из колонки. Далее искомым белком элюируют раствором лиганда (рис. 3.5) [2].

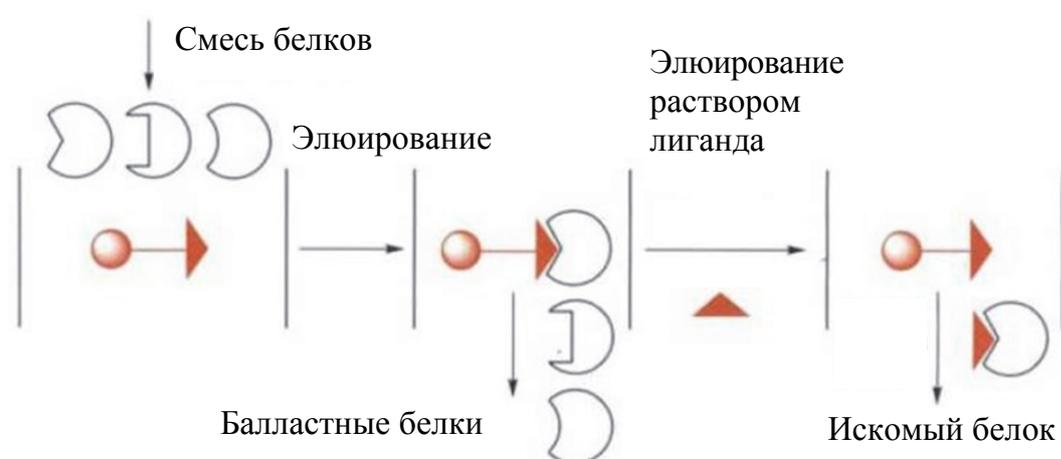


Рис. 3.5. Общий вид разделения белков аффинной хроматографией

Хранение фермента осуществляют в замороженном состоянии (при температуре ниже -25°C). Перед замораживанием ферментный раствор разливают по отдельным пробиркам, чтобы каждую порцию подвергать замораживанию и оттаиванию только один раз [3]. Иногда в пробирки добавляют глицерин для снижения процесса денатурации белка при размораживании. Если фермент кристаллизуется (или осаждается) из раствора сульфата аммония, его хранят в этом растворе в виде суспензии; на холоде его каталитическая активность, как правило, остается практически неизменной достаточно долго. Перед работой часть суспензии центрифугируют, осадок растворяют в буферном растворе и используют для работы.

Реактивы, материалы и оборудование: охлажденная куриная грудка; бумага фильтровальная; гомогенизатор (блендер) или мясорубка механическая; холодильник; спектрофотометр, обеспечивающий измерение при длине волны 280 нм, укомплектованный кварцевыми

кюветами; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г; рН-метр; марля; пластиковая емкость; ледяная баня; сорбент сефадекс G-200; центрифуга, пластиковые пробирки для центрифугирования объемом 15 мл; стеклянные палочки, стаканы; чашки Петри; колбы мерные объемом 100 и 200 мл; дистиллированная вода; 0,05 М Трис-НСl рН 6,5 с 0,3 М КСl; 1 М раствор соляной кислоты (НСl); мерные цилиндры; стеклянная колонка (40×1,2 см); конические колбы, автоматические и стеклянные пипетки.

Выполнение работы

Гель сефадекс G-200 массой 1 г помещают в коническую колбу на 200 мл и добавляют 120 мл буферного раствора Трис-НСl. Суспензию оставляют для набухания в течение 12 ч при комнатной температуре.

В течение всего хода работы выделяемый белок необходимо держать на холоду (ледяной бане).

Охлажденную куриную грудку массой 10 г помещают в пластиковую емкость и измельчают в блендере. Взвешивают 2,5 г измельченной пробы и переносят в стеклянный стаканчик, который помещают в ледяную баню, заливают пробу 25 мл буферного раствора, размешивают стеклянной палочкой, оставляют для экстракции миозина на 10 мин, периодически перемешивая.

Полученный экстракт отделяют от мышечной ткани на охлажденной влажной марле, сложенной в 4–6 слоев, и отжимают. Марлю для отделения грубого экстракта от мышечной ткани предварительно смачивают в буферном растворе и выдерживают в холодильнике в течение 30 мин.

Экстракт миозина помещают в пластиковые пробирки, уравновешивают так, чтобы их масса не отличалась друг от друга на более чем 0,02 г, подвергают центрифугированию при скорости 6000 об/мин в течение 15 мин [1].

Супернатант отделяют от осадка, определяют его точный объем, одну его часть смешивают с глицерином в соотношении 9 : 1 и замораживают в пластиковых пробирках. Вторую часть (1 мл) подвергают дальнейшей очистке с помощью гель-хроматографии. Набивку колонки осуществляют суспензией сорбента сефадекс G-200, при этом избегают высокого гидростатического давления. Уравнивание проводят буферным раствором в течение 30 мин со скоростью 0,3 мл/мин [4, 5].

Образец супернатанта объемом 1 мл вносят автоматической пипеткой в колонку с сорбентом. Для этого жидкость с поверхности

наполнителя осторожно удаляют, оставляя слой в 1–2 мм; при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться; остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента (буферным раствором); после того как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой в 5–10 см. После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, наполненным буферным раствором, устанавливают скорость протекания элюирующего раствора 0,3 мл/мин путем изменения гидростатического давления и начинают сбор фракций по 3 мл каждая с помощью коллектора. Собирают фракции элюата необходимо с момента нанесения образца на колонку. После окончания элюирования, которое длится, как правило, в течение 3,5 ч, измеряют оптическое поглощение собранных фракций на спектрофотометре при 280 нм.

Многочисленное использование колонки с сефадексом приводит к замедлению протекания жидкости через нее. В этом случае гель извлекают из колонки, отмучивают его от мелких частиц и колонку набивают заново. Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02%-ного азидата натрия или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-кратным объемом 50%-ного этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадекс выдерживают с 2-кратным объемом 96%-ного этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60–80°C [3].

По результатам измерений строят профиль элюирования – зависимость оптической плотности разделенных на колонке фракций (D , ед. абсорбции) от их объема (V , мл).

Собирают фракции, обогащенные миозином, измеряют их точный объем и оптическую плотность при 280 нм, далее рассчитывают концентрацию раствора обогащенного миозина по закону Бугера – Ламберта – Бера.

$$C = \frac{D}{El}, \quad (3.1)$$

где C – концентрация миозина в обогащенной фракции, г/мл; D – оптическая плотность испытуемого раствора; $E = 5,3 \cdot 10^2$ мл/см·г – удельный показатель поглощения чистого миозина при длине волны 280 нм; l – толщина поглощающего слоя (кюветы), см [6].

Определяют концентрацию миозина в супернатанте и массу выделенного миозина по формулам:

$$C_1 = \frac{CV_2}{V_1}; \quad (3.2)$$

$$m = \frac{CV_2}{V_1} V_3, \quad (3.3)$$

где C_1 – концентрация миозина в супернатанте, г/мл; m – масса миозина, г; C – концентрация миозина в обогащенной фракции, г/мл; V_2 – объем фракции миозина, мл; V_1 – объем супернатанта, внесенного в колонку, мл; V_3 – объем экстракта, полученного после центрифугирования, мл.

Рассчитывают выход миозина из куриной грудки:

$$w = \frac{m}{m_0} 100\%, \quad (3.4)$$

где m – масса миозина, г; m_0 – масса куриной грудки, г.

Делают вывод о зависимости молекулярной массы белков и очередности их выхода при разделении гель-хроматографией, а также степени извлечения белка миозина из куриной грудки.

?

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите этапы выделения и очистки индивидуальных белков. Какие особенности белков следует при этом учитывать?
2. Для чего предназначена стадия гомогенизации биологического материала?
3. Расскажите, какие методы используют для выделения индивидуального белка из обогащенной фракции и на различиях каких физико-химических свойств белков они основаны.
4. Что такое хроматография? Каким образом осуществляется разделение смеси веществ на индивидуальные компоненты, чем обеспечивается эффективность разделения?
5. Приведите классификации хроматографических методов.
6. Объясните принципы гель-фильтрации, адсорбционной, ионообменной и аффинной хроматографии. Что служит неподвижной и подвижной фазами в каждом случае?
7. Объясните принципы спектрофотометрического метода количественного определения белка.
8. Что из себя представляет миозин, какова его биологическая значимость?

Лабораторная работа № 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИОЗИНА КУРИНОЙ ГРУДКИ

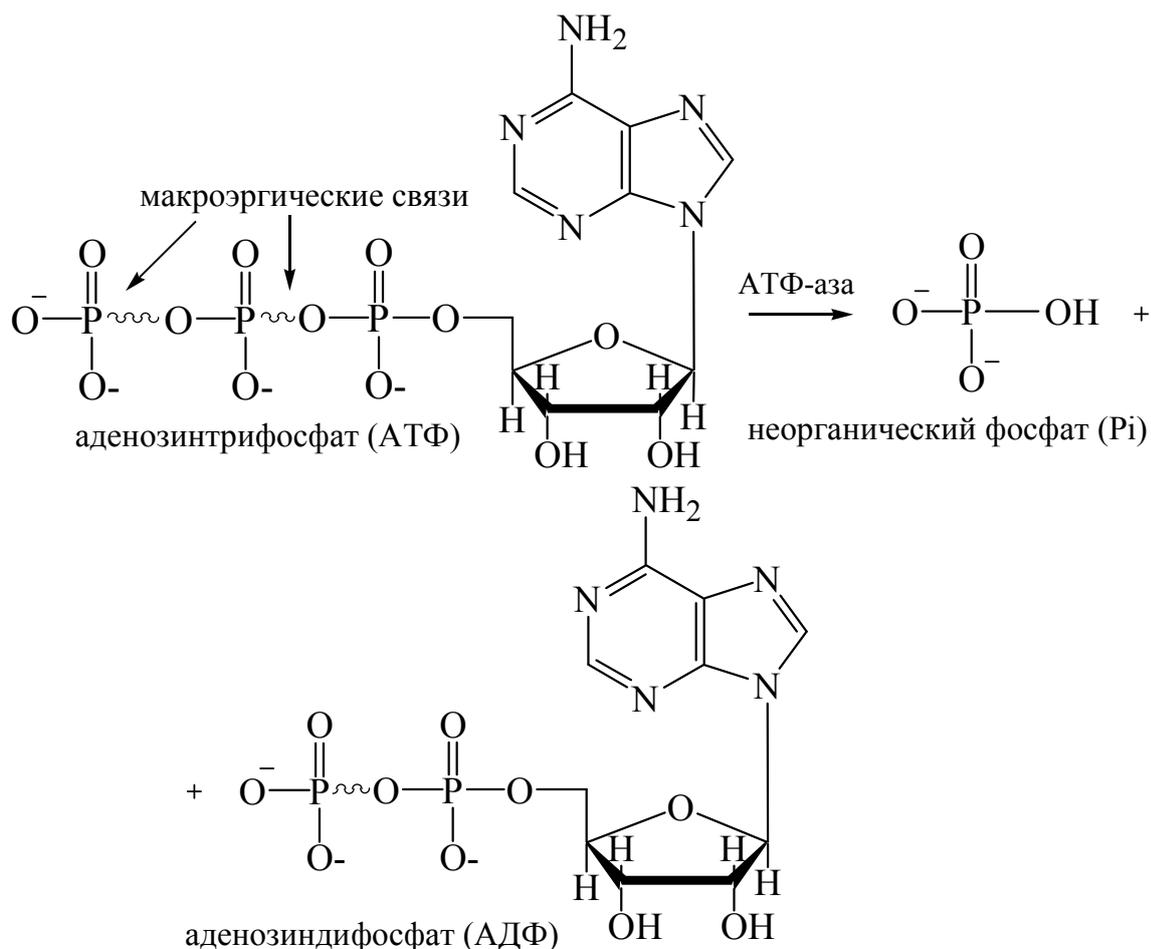
Цель работы – определение кинетических параметров ферментативной реакции расщепления аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) миозином, выделенным из куриной грудки.

Общие сведения

Миозин обладает АТФ-азной активностью, которая обусловлена способностью расщеплять аденозинтрифосфорную кислоту, таким образом, химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения. При этом АТФ является субстратом ферментативной реакции, она гидролизуются до аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганического фосфата (Pi), которые являются продуктом реакции.

АТФ также является источником энергии для многих клеточных процессов в результате реакции расщепления, в которой АТФ теряет две концевые фосфорильные группы, что приводит к образованию неорганического пирофосфата ($H_2P_2O_7^{2-}$), часто обозначаемого PPi и аденозинмонофосфата (АМФ).

В сократительной системе мышцы толстые нити (состоящие из молекул миозина) и тонкие нити (состоящие из G-актина) уложены параллельными рядами и представляют собой актино-миозиновый комплекс. Сокращение скелетной мышцы происходит в присутствии в системе АТФ благодаря скольжению тонких нитей вдоль толстых, причем это скольжение индуцируется в присутствии других мышечных белков (тропонина и тропомиозина), а также ионов Ca^{2+} . АТФ-азную активность актино-миозинового комплекса стимулируют ионы Mg^{2+} . Сигналом для сокращения мышц является электрический импульс, входящий из двигательного нерва через нервно-мышечное соединение [1, 2, 7].



Молекулярный механизм мышечного сокращения состоит из четырех основных стадий.

На стадии 1 молекула АТФ связывается с миозином, актино-миозиновый комплекс распадается, и актин высвобождается.

На стадии 2 молекула АТФ гидролизуется, вызывая конформационные изменения в белке и его переход в состояние с более высоким уровнем энергии, в результате чего «головка» миозина поворачивается и меняет свою ориентацию относительно нити актина. Затем между «головкой» миозина и следующим мономерным звеном актина возникает слабая связь.

На стадии 3 от миозина отсоединяется фосфат, образовавшийся в процессе гидролиза АТФ, что сопряжено с очередным конформационным изменением в молекуле миозина, приводящим к более прочному взаимодействию в актиномиозиновом комплексе.

Далее на стадии 4 «головка» миозина приходит в исходное состояние, так что в результате «хвост» миозина смещается относительно нити актина. В завершение цикла молекула АДФ высвобождается.

В результате каждого такого цикла толстая нить смещается относительно тонкой нити на 5–10 нм [1, 2].

Количество выделившегося в результате неорганического фосфата определяют по методу Ратбуна и Бетлах [8]. Все колориметрические методы для определения неорганического фосфата основаны на измерении интенсивности окраски молибденовой сини, образующейся при восстановлении фосфорно-молибденовой кислоты в кислой среде. Фосфорно-молибденовая кислота является продуктом реакции между фосфорной кислотой и молибденовокислым аммонием. Реакция также протекает в кислой среде:



Фосфорно-молибденовая кислота относится к гетерополисоєдинєниям – комплексным соединениям, анионы которых образованы двумя различными кислотообразующими окислами, и при этом на молекулу одного из окислов приходится несколько молекул другого. Например, фосфорно-молибденовая кислота может быть представлена формулой $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{MoO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Молибденовая синь – смесь различных окислов молибдена. Возможный состав молибденовой сини: $\text{Mo}_8\text{O}_{23} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{Mo}_4\text{O}_{11} \times \times \text{H}_2\text{O}$; $\text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Метод Ратбуна и Бетлах позволяет определить от 0,02 до 0,10 мкмоль неорганического фосфата в пробе. В качестве восстановителя используется хлористое олово. Проведение реакции в буферном растворе при pH 4,4 позволяет определять неорганический фосфат в присутствии АТФ. Если в исследуемом растворе содержится белок, то необходимо его предварительно удалить.

Белки из исследуемого раствора осаждают трихлоруксусной или хлорной кислотой, добавляя ее к раствору до конечной концентрации 2,5%. Раствор хорошо перемешивают, осадок белка удаляют фильтрованием или центрифугированием. Для удаления кислот безбелковый раствор можно просто нейтрализовать раствором NaOH. Неорганический фосфат определяют прямо из полученного безбелкового раствора [8].

Сущность определения АТФ-азной активности миозина состоит в определении кинетических параметров (скорости) ферментативной реакции гидролиза АТФ до АДФ.

Скорость реакции в любой момент времени определяется как тангенс угла наклона касательной к кривой зависимости количества образующегося продукта от времени (рис. 4.1). Начальная скорость – это тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке. Однако проведение такой касательной не обеспечивает достаточной точности определения начальной скорости (v_0), поэтому выбирают экспериментальные условия, при которых измерения можно проводить на начальном участке кривой, имеющем линейный характер. Это может быть достигнуто снижением концентрации фермента либо увеличением чувствительности прибора.

Поскольку ферментативная реакция подчиняется кинетике Михаэлиса – Ментен, согласно которой образование специфического фермент-субстратного комплекса является необходимым промежуточным этапом катализа, то экспериментально можно определить константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции.

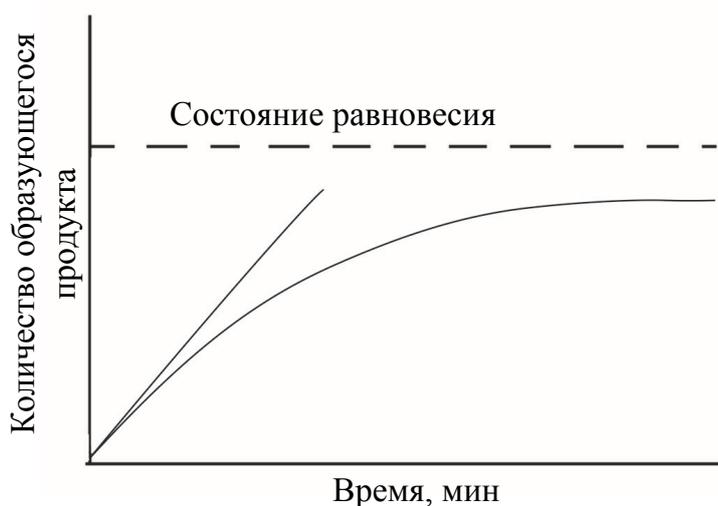
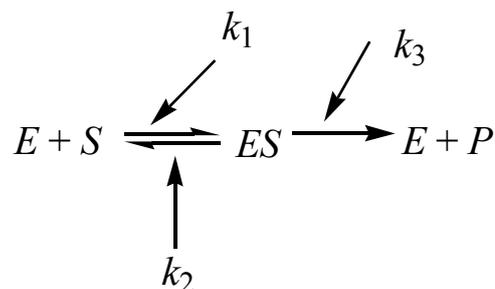


Рис. 4.1. Ход ферментативной реакции во времени

Фермент E соединяется с субстратом S , образуя ES -комплекс. Константа скорости этого процесса k_1 . Судьба ES -комплекса складывается двояко: он может либо диссоциировать на фермент E и субстрат S с константой скорости k_2 , либо подвергнуться дальнейшему превращению, образуя продукт P и свободный фермент E , с константой скорости k_3 . При этом постулируется, что продукт реакции не превращается в исходный субстрат. Это условие соблюдается на начальной стадии реакции, пока концентрация продукта невелика.



Скорость катализа определяют в стационарных условиях, при которых концентрация промежуточных продуктов остается постоянной, тогда как концентрация исходных веществ и конечных продуктов изменяется. Это имеет место в том случае, когда скорость образования ES -комплекса равна скорости его распада.

Константа Михаэлиса (K_M , моль/л)

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}. \quad (4.1)$$

Уравнение Михаэлиса – Ментен, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата, имеет вид

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}. \quad (4.2)$$

Это уравнение соответствует графику зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 4.2).



Рис. 4.2. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата

При низких концентрациях субстрата, когда $[S]$ намного ниже K_M , $v = v_{\max}[S] / K_M$, т. е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата. При высоких концентрациях субстрата, когда $[S]$ намного выше K_M , $v = v_{\max}$, т. е. скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата.

Если $[S] = K_M$, то $v = v_{\max} / 2$.

Таким образом, K_M равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.

Константа Михаэлиса K_M и максимальная скорость реакции v_{\max} являются важными характеристиками ферментативной реакции при разных концентрациях субстрата, v_{\max} – величина постоянная для каждого фермента, позволяющая оценить эффективность его действия [9].

В случае односубстратной реакции задача определения константы Михаэлиса и максимальной скорости сводится к получению серии данных, характеризующих зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата, и к соответствующей графической обработке этих данных.

В связи с тем, что определение v_{\max} и K_M непосредственно из графической зависимости Михаэлиса – Ментен является неоднозначным, прибегают к линеаризации данного уравнения. Для этого его преобразуют в такую форму, чтобы графически оно выражалось прямой. Существует несколько методов линеаризации, среди которых наиболее часто применяют методы Лайнуивера – Бэрка и Эди – Хофсти.

Преобразование Лайнуивера – Бэрка имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]}. \quad (4.3)$$

Строят график зависимости $1 / v = f(1 / [S])$ и получают прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину $1 / v_{\max}$; отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, дает величину $-1 / K_M$, а тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс равен K_M / v_{\max} (рис. 4.3). Этот график позволяет более точно определять v_{\max} .

Метод Эди – Хофсти основан на преобразовании уравнения Михаэлиса – Ментен путем умножения обеих его частей на v_{\max} :

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + v_{\max}. \quad (4.4)$$

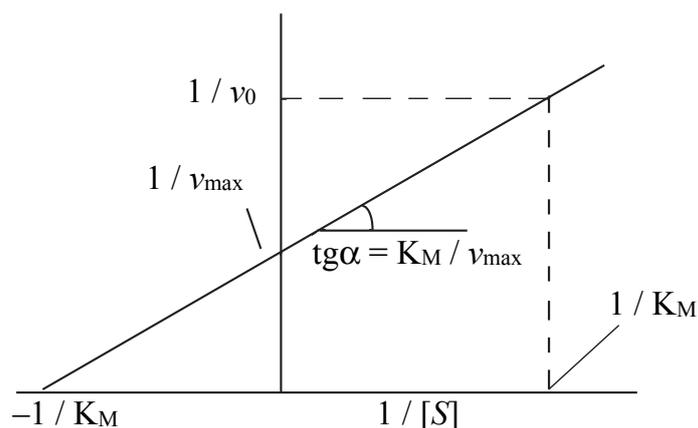


Рис. 4.3. Линеаризация уравнения Михаэлиса – Ментен по методу Лайнуивера – Бэрка

График в координатах v и $v / [S]$ представляет собой прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину v_{\max} , а отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, – величину v_{\max} / K_M (рис. 4.4). Он позволяет очень просто определять K_M и v_{\max} , а также выявлять возможные отклонения от линейности, не обнаруживаемые на предыдущем графике [9].

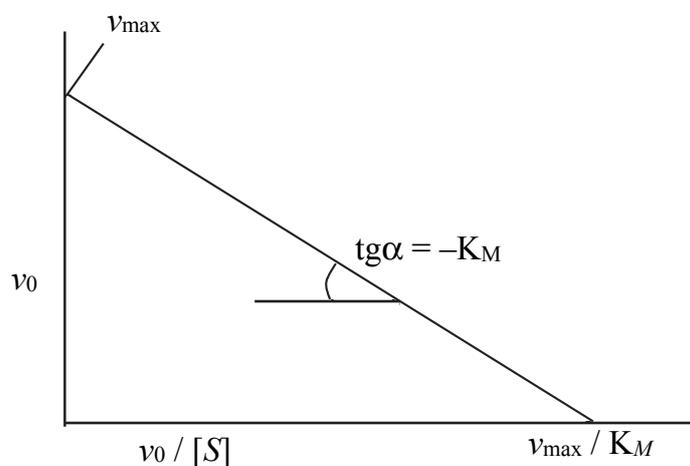


Рис. 4.4. Линеаризация уравнения Михаэлиса – Ментен по методу Эди – Хофсти

Начинать реакцию при постановке кинетических экспериментов следует внесением фермента или одного из субстратов, добавляемых в минимальном объеме при быстром перемешивании реакционной смеси. Одновременно отмечают начало реакции. Полученные экспериментальные данные обрабатывают, используя указанные графические способы. По найденным величинам также

рассчитывают активность фермента, которая может выражаться различным образом.

Согласно рекомендации комиссии по ферментам Международного биохимического союза, за *единицу активности фермента (E)* принимают то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту при заданных условиях определения. Рекомендуемая температура -30°C (или указывают фактическую температуру, при которой проводилось определение). Остальные условия (рН, концентрация субстрата, кофакторов и др.) должны быть оптимальными. При бимолекулярной реакции $A + B = B + \Gamma$ за единицу фермента принимают то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль А или Б, или 2 мкмоль А, если $B = A$, за 1 мин. Если фермент атакует более чем одну связь, например при действии на полимерную молекулу, расчет ведется на 1 мк-экв затронутых реакцией групп.

Удельная активность выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка. Молекулярная активность характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению одной молекулой фермента за 1 мин. Когда известно количество активных центров в молекуле фермента, вводится понятие **активности каталитического центра**. Она характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин при расчете на 1 каталитический центр [3].

Реактивы, материалы и оборудование: раствор миозина; бумага фильтровальная; холодильник; спектрофотометр, обеспечивающий измерение при длине волны 660 нм, укомплектованный стеклянными кюветами; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г; секундомер; рН-метр; лакмусовая бумага; ледяная баня; центрифуга; пробирки Эппендорфа; стеклянные палочки; мерные стаканы; пробирки; автоматические и стеклянные пипетки; колбы мерные вместимостью 50, 100, 200 мл; дистиллированная вода; моющая хромовая смесь; 0,05 М Трис-НСl рН 6,5 с 0,3 М КСl; 1 М раствор соляной кислоты (НСl); мерные цилиндры; конические колбы; градуировочные растворы калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4) с концентрацией 0,025, 0,050, 0,100, 0,125, 0,250 мкмоль/мл; 2%-ный раствор молибдата аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), после приготовления раствор фильтруют); 6,75 мМ раствор хлорида олова (SnCl_2 , свежеприготовленный раствор фильтруют перед использованием);

1,2 М раствор гидроксида натрия (NaOH); 0,284 мкмоль/мл раствор натриевой соли аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ, раствор готовят в день использования); 1,42 мкмоль/мл раствор хлорида магния ($MgCl_2$); 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH); 3 М натрий-ацетатный буфер рН 4,4; 1,7 М раствор хлорида калия (KCl).

Выполнение работы

В связи с тем, что молибденовая синь в растворе находится в коллоидном состоянии и легко адсорбируется поверхностно-активными веществами, посуду необходимо предварительно промыть моющей хромовой смесью.

В пробирки Эппендорфа последовательно добавляют по 270 мкл 1,7 М раствора KCl, рабочего раствора $MgCl_2$ (1,42 мкмоль/мл), рабочего раствора натриевой соли АТФ (0,284 мкмоль/мл), раствора миозина, выделенного из куриной грудки.

АТФ-азную активность определяют инкубированием раствора миозина с раствором АТФ в присутствии $MgCl_2$ на холоду. Реакцию останавливают добавлением 270 мкл 10%-ного раствора CCl_3COOH через следующие промежутки времени – 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 мин и последующей ее нейтрализацией путем добавления 135 мкл 1,2 М раствора NaOH. Значение рН контролируют с помощью лакмусовой бумаги. Выпавший в осадок белок отделяют центрифугированием при скорости 6000 об/мин в течение 15 мин.

Параллельно готовят контрольную пробу, которая содержит по 270 мкл 1,7 М раствора KCl, рабочего раствора $MgCl_2$ (1,42 мкмоль/мл), рабочего раствора натриевой соли АТФ (0,284 мкмоль/мл), буферного раствора Трис-HCl с рН 6,5, 10%-ного раствора CCl_3COOH и 135 мкл 1,2 М раствора NaOH.

К 1 мл надосадочной жидкости каждой пробы приливают дистиллированную воду до 1,6 мл, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4. К каждой пробе последовательно с интервалом 1–1,5 мин добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. Окраска развивается в течение 15 мин при 20°C.

Аналогично поступают с контрольной пробой.

Измеряют оптическую плотность каждого раствора при длине волны 660 нм в стеклянной кювете относительно контрольной пробы, используя спектрофотометр.

По градуировочному графику находят концентрацию неорганического фосфата в каждой пробе.

Построение градуировочного графика. К 1 мл градуировочного раствора с концентрацией неорганического фосфата 0,025, 0,050, 0,100, 0,125, 0,250 мкмоль/мл приливают дистиллированную воду до 1,6 мл, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4. К каждой пробе последовательно с интервалом 1–1,5 мин добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. Окраска развивается в течение 15 мин при 20°C.

Измеряют оптическую плотность каждого раствора при длине волны 660 нм в стеклянной кювете относительно контрольного раствора, используя спектрофотометр.

Приготовление контрольного раствора. В пробирку вносят 1,6 мл дистиллированной воды, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4, далее добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова.

По полученным данным строят градуировочный график, откладывая измеренные значения оптической плотности на оси ординат против соответствующих градуировочных растворов фосфата на оси абсцисс и проводя прямую линию через отложенные точки и начало ординат.

Определив концентрации неорганического фосфата в реакционной смеси, строят кинетическую кривую ферментативной реакции, откладывая измеренные значения концентраций неорганического фосфата на оси ординат против соответствующего временного промежутка реакции на оси абсцисс.

Далее определяют скорость ферментативной реакции как тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке или по формуле

$$v_0 = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1}, \quad (4.5)$$

где v_0 – скорость реакции, т. е. изменение концентрации неорганического фосфата за единицу времени, мкмоль/мл·мин; p_2 – концентрация неорганического фосфата в момент времени t_2 , мкмоль/мл; p_1 – концентрация неорганического фосфата в момент времени t_1 , мкмоль/мл; t_2 – конечная точка отсчета времени реакции, мин; t_1 – начальная точка времени отсчета реакции, мин.

Определяют удельную активность фермента (A , мкмоль/мин·мг), т. е. скорость реакции на 1 мг белка, по формуле

$$A = \frac{v_0 V}{m}, \quad (4.6)$$

где v_0 – скорость реакции, т. е. изменение концентрации неорганического фосфата за единицу времени, мкмоль/мл·мин; V – объем пробы, внесенной для реакции с молибденовокислым аммонием, мл (1 мл); m – количество миозина, внесенное в реакцию, найденное по формуле, мг:

$$m = \frac{C_1 V_{0,27}}{1000}, \quad (4.7)$$

где C_1 – концентрация миозина в супернатанте, найденная по формуле (3.2), г/мл; $V_{0,27}$ – объем раствора белка, внесенного в реакционную смесь, мл; 1000 – пересчет граммов в миллиграммы.

Сопоставляют результаты с литературными данными и делают вывод об удельной активности миозина, выделенного из куриной грудки.

? Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляет механизм мышечного сокращения?
2. В чем суть определения неорганического фосфата по методу Ратбуна и Бетлах?
3. Что собой представляют ферменты и какими свойствами они обладают?
4. Приведите классификацию ферментов. Как образуются систематические названия ферментов?
5. Что собой представляет активный центр фермента? Какую функцию он выполняет?

6. Чем обусловлена специфичность ферментов? Перечислите виды специфичности, дайте им характеристику.

7. Что понимают под активностью фермента? В каких единицах ее выражают?

8. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении температуры и pH среды?

9. Что изучает ферментативная кинетика? Как измеряют скорость ферментативной реакции?

10. Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции. Каков характер зависимости скорости ферментативной реакции от этих факторов?

11. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции? Какая модель описывает такую кинетику и в чем состоит ее суть?

12. Каков физический смысл константы Михаэлиса?

13. Какие методы применяют для линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен?

14. Объясните характер действия обратимых и необратимых ингибиторов на активность ферментов.

Лабораторная работа № 5

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИХ АНАЛИЗА

Цель работы – освоение методов выделения липидов из растительного материала и их качественного анализа с помощью тонкослойной хроматографии; изучение жирнокислотного состава липидов методом газожидкостной хроматографии.

Основные сведения

Липиды (от греч. *lipos* – жир) представляют собой группу соединений растительного, животного или микробного происхождения, практически нерастворимых в воде и хорошо растворимых в неполярных органических растворителях. Особое место среди липидов занимают сложные эфиры глицерина и жирных кислот (триацилглицерины), доля которых в составе липидов масличных культур и животных жиров часто превышает 95%. В зависимости от химического состава липиды можно разделить на две группы: простые и сложные. **Простые** липиды содержат только углерод, водород и кислород, а **сложные** – кроме того азот, фосфор или серу.

К простым липидам относят прежде всего производные высших жирных кислот и спиртов. Это сложные эфиры высокомолекулярных одноатомных спиртов (воска), сложные эфиры двухатомных спиртов-диолов (диольные эфиры) и сложные эфиры трехатомного спирта глицерина (ацилглицерины, или глицериды).

К сложным липидам относят смешанные сложные эфиры многоатомных спиртов не только с жирными кислотами, но и фосфорной (фосфолипиды) или серной (сульфолипиды) кислотой.

Широко используется и другая классификация липидов, в основу которой положено отношение липидов к действию щелочи. По этой классификации липиды делят на две большие группы: омыляемые и неомыляемые.

К **омыляемым** липидам относят соединения, которые под действием щелочей гидролизуются с образованием солей жирных кислот, получивших название мыла. Омыляемыми являются, например, такие простые липиды, как воска, диольные эфиры, глицериды, сложные липиды – фосфолипиды и др.

К **неомыляемым** липидам относят соединения, не подвергающиеся щелочному гидролизу: спиртовые и карбонильные производные стероидов и терпенов, в том числе и многие жирорастворимые витамины.

В организме липиды выполняют структурную (в составе биомембран), защитную, транспортную (характерна для липопротеинов, транспортирующих липиды), энергетическую, регуляторную функции. Липиды являются компактной и энергоемкой формой хранения энергии, что обусловлено большим содержанием в их молекулах С–Н-связей, при окислении которых выделяется большее количество энергии по сравнению с другими органическими молекулами. Некоторые вещества, относимые к липидам, обладают биологической активностью – это витамины и их предшественники, некоторые гормоны. Они участвуют в реакциях биосинтеза, поддерживают оптимальную активность ферментов, регулируют рост клеток и др.

Процедура выделения липидов из биологического материала включает следующие стадии:

- измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация);
- перевод липидов в растворенное состояние (экстракция);
- освобождение липидного экстракта от нелипидных примесей;
- разделение водной и органической фаз;
- высушивание липидного экстракта.

Перед выделением липидов из биологических объектов (органов и тканей животных, клеток микроорганизмов и растений) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния (гомогенизация), т. е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры с целью высвобождения клеточного содержимого. Для разрушения клеток применяют ряд физических методов – гомогенизацию с использованием механических гомогенизаторов различных конструкций, ультразвуковую дезинтеграцию, замораживание – оттаивание и др. При выборе метода разрушения клеток следует учитывать структурные

особенности животных, растительных и микробных клеток. Наиболее простым методом является гомогенизация путем растирания клеток с оксидом алюминия или абразивным порошком в ступке при помощи пестика.

Гомогенизацию биологического материала обычно сочетают с одновременной экстракцией липидов из гомогенатов с целью перевода липидов в растворенное состояние. Для экстракции липидов используют как неполярные (хлороформ, бензин, гексан, диэтиловый эфир), так и полярные (метанол, этанол, изопропанол, ацетон) растворители. При этом принимают во внимание то, что липиды способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных (сложноэфирных, амидных, гликозидных) связей. Относительно неполярные растворители разрушают белок-липидные комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями. Полярные растворители разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума. Липиды, находящиеся в комплексах и связанные ковалентными связями с молекулами других соединений, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

При использовании для экстракции липидов смеси растворителей, содержащей спирт, в экстракт помимо липидов переходят нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т. д.). Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами (не менее 0,2 объема от объема липидного экстракта). При этом образуется двухфазная система, состоящая из органической и водной фаз. В водную фазу переходит большая часть полярных соединений. Органическую фазу, содержащую большую часть экстрагируемых липидов, отделяют от водной декантацией или центрифугированием. Окончательное удаление воды из органической фазы (высушивание) проводят путем добавления порошка безводного сульфата натрия, который является хорошим водоотнимающим средством, образуя с водой кристаллогидраты. Следует иметь в виду, что при удалении нелипидных примесей происходит частичная потеря кислых липидов.

Как указывалось выше, липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградации. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, предварительно удаляя из растворителей кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в стеклянной посуде с притертыми стеклянными пробками при -20°C и ниже в присутствии инертных газов. Иногда применяют антиоксиданты, предотвращающие окислительное расщепление ненасыщенных жирных кислот.

Хроматографический анализ липидов. Липиды, выделенные из биологического материала, представляют собой сложную смесь. Наиболее эффективными и широко применяемыми методами качественного и количественного анализа компонентного состава смесей липидов являются методы газожидкостной и тонкослойной хроматографии. Последняя применяется только для качественного анализа липидов.

Реактивы, материалы и оборудование: семена льна масличного; оксид алюминия; гексан; изопропиловый спирт; физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl); сульфат натрия (безводный); дистиллированная вода; ледяная уксусная кислота; диэтиловый эфир, йод кристаллический; маргариновая кислота; раствор 2%-ной серной кислоты в метаноле; шпатели; фильтровальная бумага; ступки; пипетки на 1, 2, 5 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; химически чистые пробирки; пробирки с притертыми стеклянными пробками; стеклянные воронки; штативы для пробирок; ампулы стеклянные; капилляр стеклянный; электронные весы; газовый хроматограф; шприцы для хроматографии; роторный испаритель; пластины для ТСХ; камера для ТСХ.

Выполнение работы

1. Качественный анализ липидов методом тонкослойной хроматографии (эксперимент 1)

Методика испытаний. Небольшое количество ($\sim 0,5$ г) семян льна масличного взвешивают, добавляют 1–2 мл смеси гексан + изопропиловый спирт (1 : 1 об.) и растирают в фарфоровой ступке с 0,5–1,0 г окиси алюминия (Al_2O_3) в течение 10 мин. Затем

приливают еще 3 мл экстрагента и снова растирают содержимое на протяжении 1–2 мин.

Полученную суспензию фильтруют через фильтровальную бумагу. Осадок на фильтре промывают 5 мл экстрагента, которым предварительно ополаскивают ступку и пестик. Для более полного удаления экстракта осадок на фильтре необходимо слегка (очень осторожно, чтобы не порвать фильтр) отжать. Затем экстракт липидов промывают физиологическим раствором (0,4 объема от объема липидного экстракта) для удаления нелипидных примесей. Смесь тщательно перемешивают встряхиванием.

После расслоения фаз верхнюю органическую фазу аккуратно при помощи пипетки переносят в отдельную пробирку и добавляют к ней 0,3–0,5 г безводного сульфата натрия до просветления экстракта. Полученный липидный экстракт сливают с осадка сульфата натрия в небольшую колбочку или пробирку с пришлифованной стеклянной пробкой (резиновые пробки использовать нельзя!) и хранят в холодильнике.

В качестве адсорбента используют пластины с мелкозернистым силикагелем. На слой адсорбента вблизи основания пластинки тонким капилляром наносят каплю образца (2–10 мкл). Предварительно отмечают на пластинке линию старта тонкозаточенным карандашом, не повреждая слой адсорбента, на расстоянии 1,5–2,0 см от основания пластинки. Расстояние между точками нанесения нескольких образцов должно быть не менее 1–2 см. Диаметр пятна не должен превышать 3 мм. Растворы наносят в виде круглых пятен или коротких узких полосок, осторожно прикасаясь капилляром к поверхности пластинки, и дают раствору впитаться в слой адсорбента.

В качестве элюента берут смесь гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1). Пластинку основанием вниз помещают в наклонном положении в герметически закрывающуюся стеклянную камеру, на дне которой находится элюент высотой 5–7 мм. Линия старта с нанесенными образцами должна находиться несколько выше уровня элюента в камере. Камеру закрывают стеклянной крышкой для лучшего насыщения ее парами элюента.

Как только растворитель дойдет до линии фронта, отстоящей от верхнего края пластинки приблизительно на 5 мм, пластинку вынимают из камеры, отмечают карандашом линию фронта и высушивают на воздухе до полного испарения подвижной фазы.

Затем проводят проявление хроматограмм парами йода. Для этого на дно стеклянной камеры помещают несколько кристаллов йода и нагревают камеру на водяной бане при 60°C. Пластины для ее обработки опускают в камеру на 30–60 с при комнатной температуре. При полном разделении каждое пятно на пластинке соответствует индивидуальному веществу. Положение пятен на пластинке фиксируют с помощью карандаша, обводя по контуру.

Положение пятна разделенного вещества определяют посредством измерения величины его подвижности R_f (*rate* – скорость; *fraction* – фракция):

$$R_f = \frac{A}{B},$$

где R_f – подвижность вещества; A – расстояние, пройденное веществом от линии старта до середины пятна, см; B – расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта до линии фронта, см.

При разделении в указанном элюенте липиды от старта к финишу располагаются в следующей последовательности: фосфолипиды, гликолипиды, моноацилглицериды, диацилглицериды, стеролы, жирные кислоты, триацилглицериды.

2. Анализ жирно-кислотного состава липидов методом газожидкостной хроматографии (эксперимент 2)

Методика испытаний. Полученный липидный экстракт упаривают на ротаторном испарителе. От остатка отбирают навеску массой 50–70 мг, помещают в стеклянные ампулы, приливают 1 см³ раствора 2%-ной серной кислоты в метаноле с внутренним стандартом – маргариновой кислотой (C17 : 0; 1,35 мг/см³). Ампулы запаивают на газовой горелке, гидролиз триацилглицеридов с одновременным метилированием образующихся жирных кислот проводят при температуре (80 ± 1)°C в течение 4 ч. Затем ампулы охлаждают до комнатной температуры, вскрывают и экстрагируют метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) гексаном (0,5 см³). МЭЖК разделяют методом газовой хроматографии на хроматографе, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,25 мм×30 м×0,25 мкм (полиэтиленгликоль). Анализ проводят при скорости потока гелия через колонку 1,36 мл/мин; температуре инжектора – 250°C,

детектора – 275°C, температуре колонки – 150°C (1 мин), затем температуру колонки повышают со скоростью 2,9 °C/мин до 250°C и выдерживают 3 мин. Объем анализируемой пробы – 1 мкл.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот производят по времени удерживания при разделении стандартных смесей этих веществ и оценивают в процентах от весового суммарного содержания по отношению к внутреннему стандарту.

?

Вопросы для самоконтроля

1. Объясните принципы классификации липидов.
2. Какие биологические функции выполняют различные классы липидов?
3. Какие хроматографические методы применяются для качественного и количественного анализа липидов?
4. Объясните принцип метода газожидкостной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный и количественный анализ липидов?
5. В чем состоят особенности ГЖХ-анализа триацилглицеринов? Запишите реакцию, лежащую в основе получения МЭЖК.
6. Объясните принцип метода тонкослойной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный анализ липидов?

Лабораторная работа № 6

ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Цель работы – освоение методов выделения крахмала из картофеля и его качественного определения.

Основные сведения

Углеводы – это класс соединений, относящихся к многоатомным спиртам, с наличием альдегидной (альдозы) или кетонной группы (кетозы).

Биологическое значение углеводов для животных и растений заключается в основном в энергетической (при окислении 1 г высвобождается 4,1 ккал энергии) и структурной функциях.

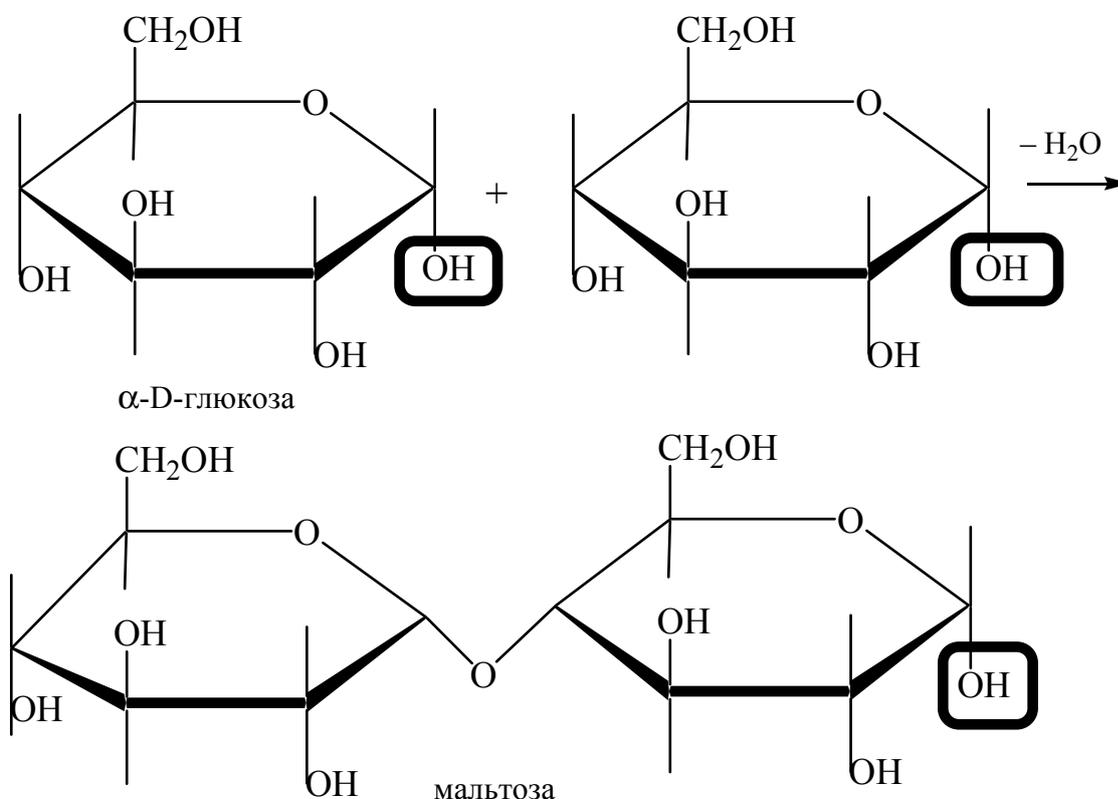
Согласно принятой в настоящее время классификации, углеводы подразделяются на три основные группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды обычно содержат от 3 до 9 атомов углерода, причем наиболее распространены пентозы и гексозы. Пентозы рибоза и дезоксирибоза входят в состав важнейших биологически активных веществ – нуклеиновых кислот, нуклеотидов и нуклеозидов. Гексозы глюкоза и фруктоза содержатся в ягодах, фруктах и меде, входят в состав важнейших олиго- и полисахаридов. Моносахариды в растворе существуют в циклической и развернутых формах, которые могут переходить друг в друга.

Олигосахариды содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Дисахариды образуются из двух молекул моносахаридов за счет отщепления молекулы воды.

В образовании связи между моносахаридами принимают участие гликозидный гидроксил от одной молекулы, а от второй – или гликозидный, или спиртовый (гликозный) гидроксилы. Если в образовании дисахарида принимает участие гликозидный и спиртовый (гликозный) гидроксилы, т. е. остатки моносахаридов соединяются гликозид-гликозной связью, образуется восстанавливающий дисахарид.

Таковыми дисахаридами являются мальтоза, целлобиоза, лактоза. Они могут вступать в окислительно-восстановительные реакции.

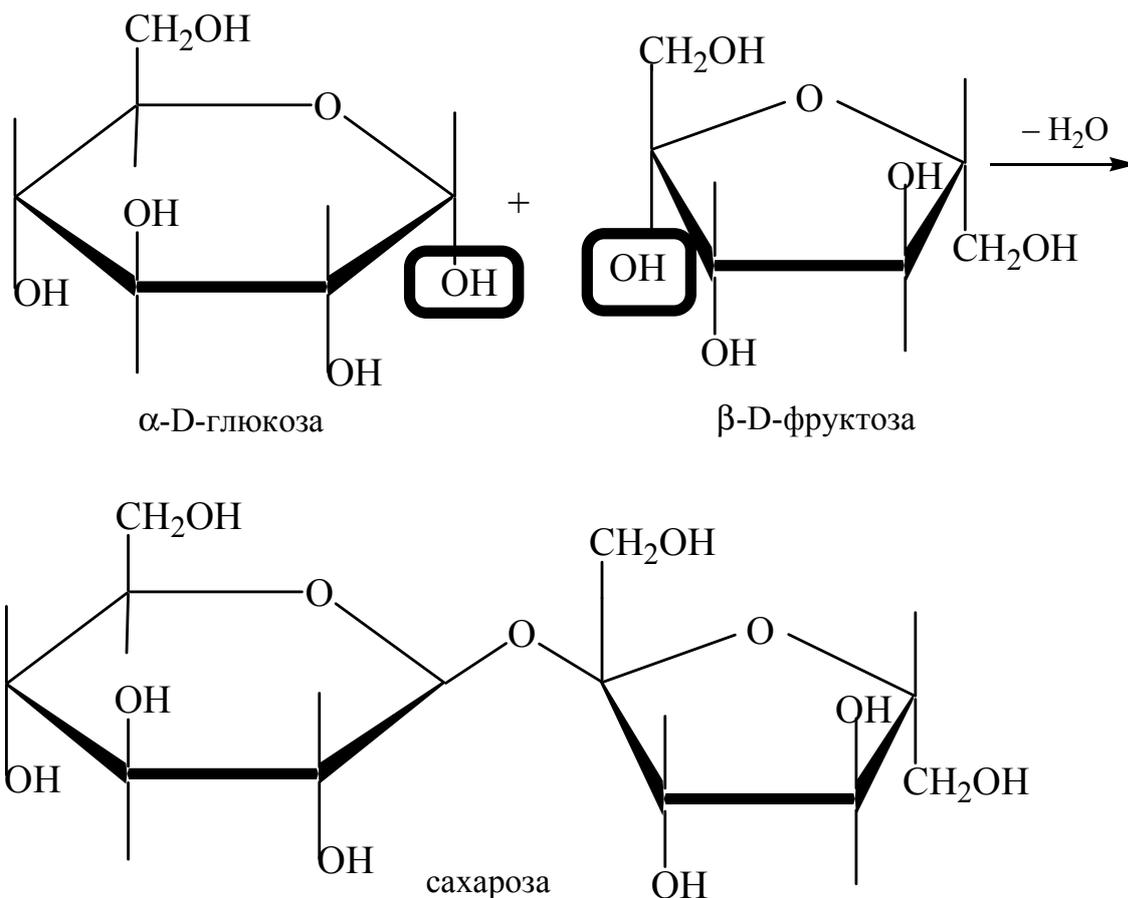


Если в образовании дисахарида принимают участие оба гликозидных гидроксильных группы, т. е. остатки моноз соединяются гликозид-гликозидной связью, образуется невосстанавливающий дисахарид. Наиболее важным невосстанавливающим дисахаридом является сахароза. В промышленности ее выделяют из сахарного тростника и свеклы.

Сахароза не может вступать в окислительно-восстановительные реакции, но может подвергаться гидролизу до глюкозы и фруктозы с образованием инвертного сахара.

Моно- и олигосахариды образуют в воде истинные растворы, из которых способны кристаллизоваться. Они обладают сладким вкусом. Высшие полисахариды относятся к высокомолекулярным веществам. В отличие от моно- и олигосахаридов их называют коллоидными или некристаллизующимися углеводами.

Из высокомолекулярных полисахаридов важнейшими являются крахмал и целлюлоза.



Крахмал является продуктом фотосинтеза и основным резервным углеводом высших растений. В клетках растений находится в виде зерен, форма и размеры которых специфичны для каждого рода растений (картофеля, пшеницы, риса, овса, ячменя и т. д.). В зависимости от содержания крахмала в картофеле выделяют сорта: с повышенным содержанием крахмала – более 25%; с высокой крахмалистостью – 14–25% и низким содержанием крахмала в клубнях – 10–13%.

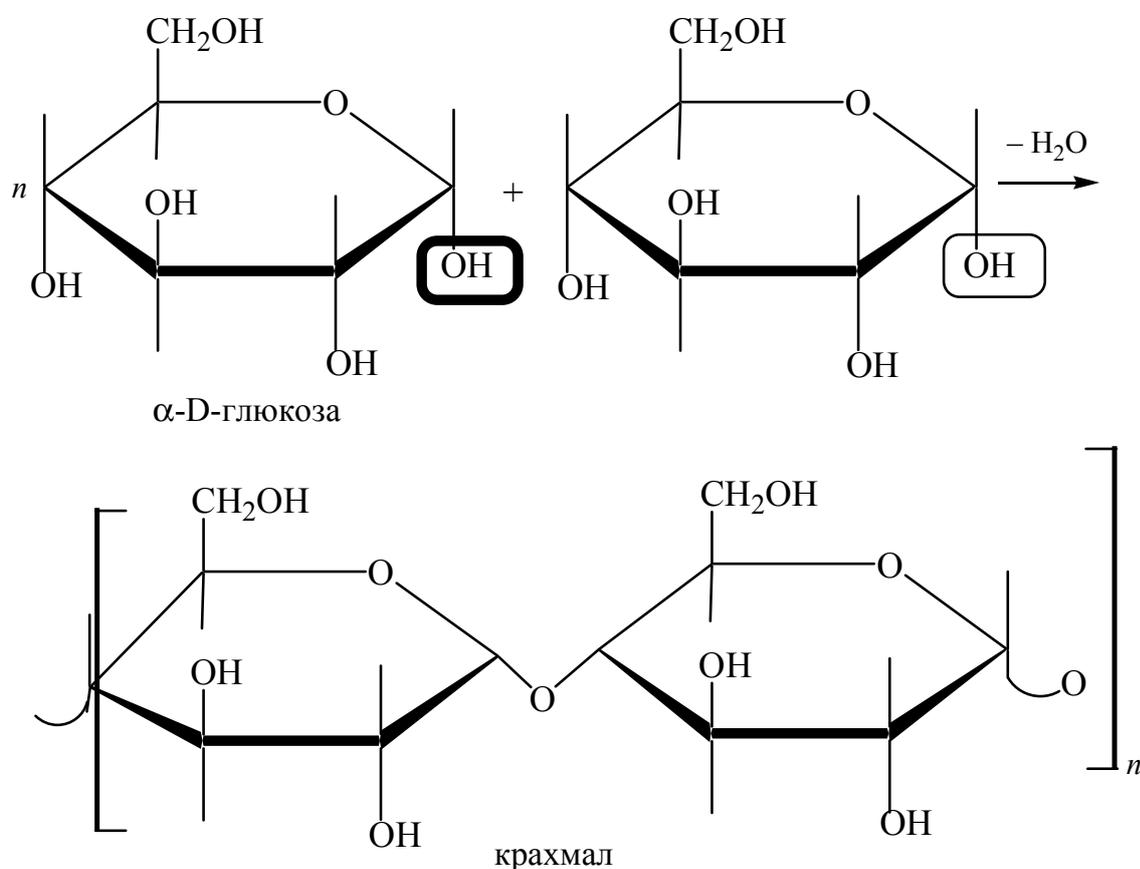
Растения, богатые крахмалом, представляют собой ценные продукты питания и сырье для производства пищевых продуктов.

Крахмал представляет собой полимерную систему, структурными звеньями которой являются остатки α -D-глюкозы.

Крахмальные зерна состоят из двух компонентов: амилозы и амилопектина. Амилоза растворяется в горячей воде, амилопектин же образует в ней клейстер [10].

Амилоза представляет собой линейный полимер α -D-глюкозы (1000–4000 звеньев), остатки которой соединены с помощью $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей. Амилопектин состоит из цепей

поли- α -D-глюкозы с $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями, образующих остов молекулы. От этих цепей отходят боковые ветви, присоединенные к основной цепи $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями. Амилоза дает с йодом синее окрашивание, амилопектин – красно-фиолетовое. Йодная реакция является единственной цветной реакцией на крахмал. Окраска обусловлена амилозой. Хотя содержание амилопектина в зернах крахмала в несколько раз превышает количество амилозы, тем не менее синее окрашивание, возникающее при действии йода на амилозу, перекрывает красно-фиолетовую окраску амилопектина. Окраска исчезает при нагревании и восстанавливается при охлаждении крахмального клейстера. Для проведения этой реакции применяется раствор Люголя. Во всех случаях смоченный крахмал окрашивается в синий, сине-фиолетовый или почти черный цвет. Оттенок зависит от состояния крахмального зерна и наличия в нем декстринов (продуктов гидролиза) либо большого количества амилопектина (например, в зерне восковидной кукурузы). При уменьшении молекулярного веса продуктов гидролиза крахмала окраска меняется так: сине-фиолетовая, темно-бурая, красная, затем исчезает.



Структурным полисахаридом является целлюлоза, которая определяет архитектуру клеточной стенки, мономерами целлюлозы являются остатки β -D-глюкозы.

Выделение полисахаридов из растительного сырья имеет большое значение, так как они доступны в природных источниках, таким образом, синтез этих соединений не является целесообразным.

Природные полисахариды очень разнообразны по своей структуре, поэтому не существует единых подходов к их выделению из биологического материала. Легче всего выделять экзогенные полисахариды, так как они находятся вне клетки. Для этого клетки осаждают, а из раствора удаляют белки и низкомолекулярные полипептиды. Затем осуществляют экстракцию полисахаридов разбавленными растворами солей или органических кислот и их осаждение этанолом или другими органическими растворителями, смешивающимися с водой.

Эндогенные полисахариды (резервные и структурные) выделяют из биологического материала после гомогенизации клеток, что усложняет методику их выделения. В остальном процедура выделения эндогенных полисахаридов аналогична таковой для экзогенных полисахаридов [9].

Реактивы, материалы и оборудование: клубни картофеля; марля; центрифуга; центрифужные пробирки на 50 мл; плитка электрическая, водяная баня; пластиковые емкости; 1%-ный раствор натрия хлорида (NaCl); 96%-ный этанол; раствор Люголя; фильтровальная бумага; дистиллированная вода; мерные колбы на 100 мл; стеклянные палочки; мерные цилиндры; стеклянные воронки, водоструйный насос, фильтр Шотта, круглодонная колба на 100 мл; стеклянные пробирки; стеклянные пипетки; насадка Вюрца; конические колбы на 250 мл; шпатели; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01.

Выполнение работы

Картофель (2 клубня) очищают от кожуры, промывают холодной водой, вытирают фильтровальной бумагой и взвешивают. Клубни измельчают на мелкой терке в пластиковую емкость, далее добавляют 50 мл 1%-ного раствора NaCl. Полученную кашу перемешивают стеклянной палочкой в течение 15 мин и фильтруют через 2 слоя марли. К осадку приливают 30 мл 1%-ного раствора NaCl и полученную суспензию снова фильтруют.

При этом в осадке находятся клеточные стенки, а в фильтрате – плохо растворимые белки, низкомолекулярные соединения и крахмальные зерна. Фильтраты объединяют и оставляют на некоторое время для осаждения зерен крахмала. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают холодной водой 2–3 раза. Осадок ресуспендируют в 20 мл 96%-ного этанола и помещают в пластиковые пробирки, уравнивают так, чтобы их масса не отличалась друг от друга на более чем на 0,02 г, подвергают центрифугированию при скорости 5000 об/мин в течение 10 мин. Осадок крахмала промывают 20–30 мл 96%-ного этанола и помещают на фильтр Шотта, соединенный с круглодонной колбой и водоструйным насосом через насадку Вюрца. Отфильтрованный крахмал высушивают и взвешивают.

В пробирки с 0,5 мл дистиллированной воды вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка выделенного крахмала. Пробирку с крахмалом нагревают на кипящей водяной бане до растворения крахмала, а затем содержимое пробирки охлаждают. Далее добавляют по несколько капель раствора Люголя и наблюдают за появлением характерного окрашивания.

Рассчитывают содержание крахмала (w , %) в клубнях картофеля в расчете на сухое вещество по формуле

$$w = \frac{m_1}{0,2m_0} \cdot 100\%,$$

где m_0 – масса сырого картофеля, г; 0,2 – коэффициент пересчета на массу сухих веществ картофеля, г; m_1 – масса сухого крахмала, г.

В соответствии с содержанием в картофеле крахмала делают вывод о его крахмалистости, а в соответствии с полученной окраской при реакции с йодом делают вывод о состоянии крахмального зерна картофеля.

? Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют моно-, олиго- и полисахариды?
2. Какие моносахариды относятся к альдозам, а какие – к кетозам? Приведите примеры.
3. Напишите реакции образования циклического полуацетала и циклического полукетала из D-глюкозы и D-фруктозы соответственно.

4. Чем обусловлено существование α - и β -изомеров моносахаридов? Какой углеродный атом циклических альдоз называется аномерным?

5. Приведите различные способы изображения циклических форм моносахаридов. Какая из этих конформаций термодинамически более устойчива и почему?

6. Напишите структурные формулы производных моносахаридов. Укажите их биохимические функции.

7. Какие функциональные группы моносахаридов принимают участие в формировании гликозидной связи и как ее обозначают? Напишите уравнение реакции.

8. Чем отличаются восстанавливающие олигосахариды от невосстанавливающих? Приведите примеры.

9. Какова роль в клетках резервных и структурных полисахаридов? Приведите примеры.

10. В чем состоят особенности выделения и анализа полисахаридов?

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА В РИСЕ

Цель работы – изучить поляриметрический метод анализа углеводов и осуществить количественное определение крахмала в рисе.

Основные сведения

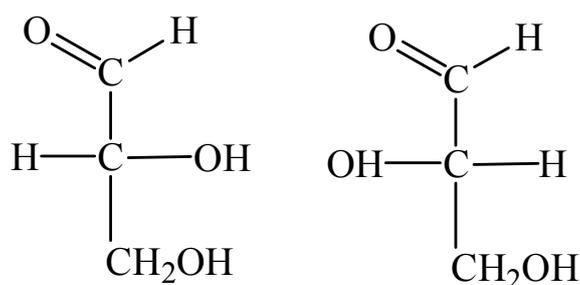
Поляриметрический метод анализа основан на измерении угла вращения плоскости поляризации света оптически активным веществом и последующем расчете концентрации вещества с использованием табличных значений удельного оптического вращения.

Удельное оптическое вращение $[\alpha]_D^{20}$ вещества в растворе представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах ($^\circ$), при длине волны линии D спектра натрия ($\lambda = 589,3$ нм), измеренный при температуре 20°C в растворе испытуемого вещества и рассчитанный для слоя 1 дм в пересчете на содержание вещества 1 г/мл в растворе. Для удельного вращения вещества в растворе всегда указывают используемый растворитель и концентрацию раствора.

Оптическая активность веществ обусловлена строением их молекулы или кристаллической решетки. Природные моносахариды обладают оптической активностью, так как содержат асимметрические атомы углерода (хиральные центры). Простейшей альдозой, имеющей один асимметрический атом углерода, является глицеральдегид, существующий в двух стереоизомерных формах – D- и L-изомерах.

Моносахариды, содержащие два и более асимметрических атома углерода, относятся к D- или L-ряду в зависимости от конфигурации асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы. Моносахарид (изображенный в проекциях Фишера) относят к D-ряду, если OH-группа асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы, находится справа, а атом водорода слева, как в D-глицеральдегиде. Если OH-группа асимметрического атома

углерода, наиболее удаленного от альдегидной или кетогруппы, находится слева, а атом водорода справа, как в L-глицеральдегиде, моносахарид относят к L-ряду. Такие соединения являются зеркальным отображением друг друга и являются энантиомерами. У них одинаковые температуры плавления и кипения, давление пара, плотность, показатель преломления, для неполяризованного света – колебательный и электронный спектры, одинаковая реакционная способность к ахиральным реагентам. Однако энантиомеры по-разному вращают плоскость поляризации линейно поляризованного света: вращающие по часовой стрелке называют правовращающими энантиомерами и обозначают знаком «+», вращающие против часовой стрелки называют левовращающими энантиомерами и обозначают их знаком «-». При этом угол вращения плоскости поляризации по абсолютной величине является одинаковым. Например, для D-глюкозы он равен $+52,7^\circ$, а L-глюкозы $-52,7^\circ$ [9, 10].



D-глицеральдегид

L-глицеральдегид

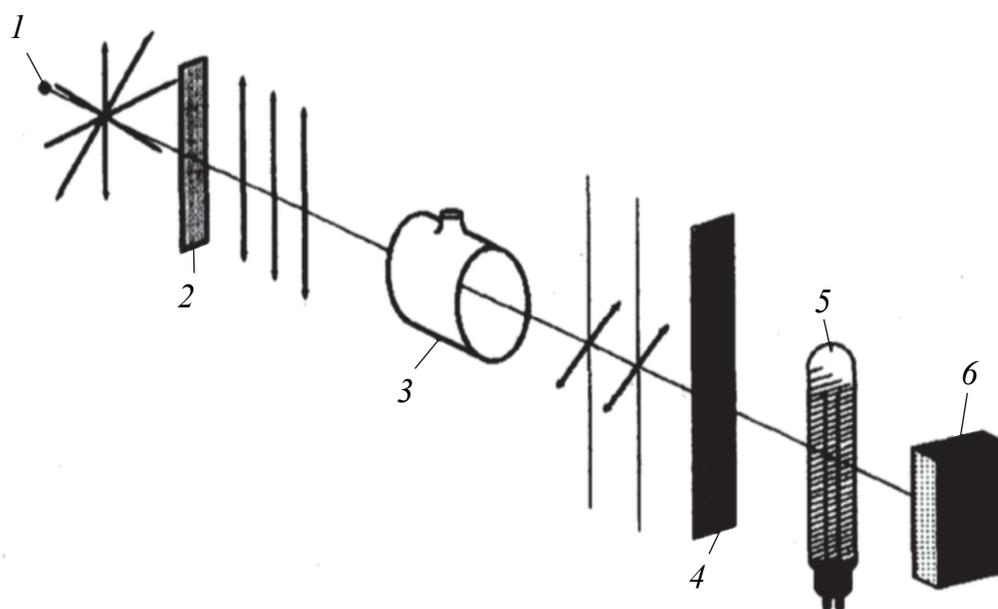
Содержание крахмала в зернах злаков, которое в среднем составляет 80%, определяют по методу Эверса. Он состоит в гидролизе крахмала слабой кислотой до декстринов и в определении угла вращения гидролизата на поляриметре. Удельное вращение гидролизатов крахмала $[\alpha]_D^{20}$ из семян различных культур в среднем принимают равным 181° [11, 12].

Структурная схема фотоэлектрического поляриметра POLAMAT A приведена на рисунке. Он представляет собой прибор, отличающийся современной и рациональной конструкцией, содержащей все элементы питания и усиления.

Принцип его работы состоит в следующем.

Свет от источника излучения *I* проходит через поляризатор 2 (обычно это призма Николя), после чего он становится линейно поляризованным. Если на пути такого света поставить второй

поляризатор 4 (который в данном случае принято называть анализатором), повернутый относительно первого на 90° , то свет через анализатор не пройдет. Поместив между поляризатором и анализатором оптически активное вещество, например гидролизат крахмала, можно зарегистрировать прохождение света через анализатор. Для того чтобы этот луч света погасить, анализатор поворачивается на дополнительный угол – угол вращения плоскости поляризации этим оптически активным веществом [13].



Принципиальная схема поляриметра POLAMAT А:

- 1 – источник света; 2 – поляризатор;
 3 – кювета с исследуемым раствором; 4 – анализатор;
 5 – детектор; 6 – регистрирующее устройство

Реактивы, материалы и оборудование: плитка электрическая; водяная баня, колбы мерные вместимостью 100 и 1000 мл; колбы конические; стеклянные воронки, фильтровальная бумага, дистиллированная вода; кофемолка электрическая; 1,124%-ный раствор соляной кислоты (HCl); 30%-ный раствор сульфата цинка ($ZnSO_4$); 15%-ный раствор железистосинеродистого калия ($K_4[Fe(CN)_6]$), диэтиловый эфир; шпатели, стеклянные палочки; поляриметр POLAMAT А, оснащенный кюветой длиной 2 дм; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01; термометр.

Выполнение работы

Навеску риса массой 5 г перемалывают в кофемолке и помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу наливают 25 мл 1,124%-ного раствора HCl и перемешивают содержимое легким встряхиванием, добиваясь полного смачивания риса. Затем, смывая частицы продукта со стенок, в колбу добавляют еще 25 мл раствора соляной кислоты. Мерную колбу при постоянном встряхивании содержимого погружают в кипящую водяную баню так, чтобы вода покрывала ее широкую часть. Необходимо следить, чтобы кипение воды в водяной бане не прекращалось из-за погружения колбы.

В течение 3 мин колбу с содержимым покачивают, не вынимая из водяной бани, затем выдерживают в водяной бане еще 12 мин без перемешивания содержимого.

По истечении 15 мин колбу извлекают из водяной бани, а к ее содержимому приливают 20 мл холодной дистиллированной воды. Охлаждают полученный раствор до температуры $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ путем помещения колбы в проточную воду.

Белковые вещества в растворе осаждают, добавляя 1 мл 30%-ного раствора ZnSO_4 и после перемешивания 1 мл 15%-ного раствора $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при энергичном встряхивании содержимого колбы [12].

Пену, образующуюся в растворе после добавления осадителей, следует погасить 1–2 каплями диэтилового эфира. Объем раствора в колбе доводят до отметки на горловине колбы дистиллированной водой. Затем содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр в сухую коническую колбу. Во избежание испарения раствора при фильтрации воронку накрывают стеклом.

Первую мутную порцию фильтрата выливают из колбы. Вторую порцию фильтрата помещают в кювету и снимают показания на поляриметре POLAMAT A. Измерение проводят при 20°C [13].

Производят расчет концентрации крахмала в растворе (C , г/100 мл) по формуле

$$C = \frac{100\alpha}{[\alpha]_D^{20}l}, \quad (7.1)$$

где C – концентрация оптически активного вещества в растворе, г/100 мл; α – наблюдаемый угол поворота плоскости поляризации,

град; $[\alpha]_D^{20}$ – удельное оптическое вращение, для крахмала в рисе 181,3 град; l – длина слоя раствора, дм.

Рассчитывают содержание крахмала в рисе (X , %) по формуле

$$X = \frac{CV}{m}100\%, \quad (7.2)$$

где C – концентрация оптически активного вещества в растворе, г/100 мл; V – объем гидролизата, мл; m – масса навески риса, г.

Делают вывод о содержании крахмала в рисе и соответствии полученных результатов литературным данным.

? Вопросы для самоконтроля

1. Назовите, какие стереоизомерные формы характерны для моносахаридов. Как определить принадлежность моносахаридов, содержащих два и более асимметрических атома углерода, к D- или L-ряду?
2. В чем состоит суть явления мутаротации?
3. Что такое эпимеры? Приведите примеры.
4. Объясните принцип работы поляриметра.
5. Что такое плоскость поляризации?
6. Что такое плоскополяризованный свет?
7. Что такое удельное оптическое вращение?
8. В чем состоит суть поляриметрического метода анализа углеводов?
9. От чего зависит угол оптического вращения?
10. Из чего состоит крахмал?
11. Назовите продукты гидролиза крахмала.

Лабораторная работа № 8

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ХВОЕ ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ЧАСТЕЙ КРОНЫ ЕЛИ

Цель работы – осуществить титриметрическое определение витамина С в верхней и нижней частях хвои кроны ели.

Основные сведения

Среди физиологически важных веществ зеленой хвои наибольшее значение имеют витамины. Например, содержание витамина С в хвое в 25 раз больше, чем в картофеле, и составляет 250–300 мг/100 г. Таким образом, это растительное сырье можно использовать для получения биологически активных продуктов лекарственного, пищевого и кормового назначения. На содержание витамина С в хвое оказывает время года, возраст дерева и освещенность. Максимум содержания витамина С наблюдается зимой и ранней весной.

Антицинготный витамин С – аскорбиновая кислота – по химическому составу является лактоном 2,3-диенол-гулоновой кислоты. Аскорбиновая кислота – это окисленное производное шестиатомного спирта сорбита, для нее характерна наличие диенольной группы, которая обуславливает способность витамина С легко подвергаться окислению с одновременным восстановлением других соединений.

Витаминной активностью обладает лишь L-аскорбиновая кислота; D-аскорбиновая кислота физиологически инертна.

L-аскорбиновая кислота – бесцветные кристаллы, легко растворимые в воде, кислого вкуса. Нерастворима в бензоле, хлороформе, диэтиловом эфире, жирах. Водные растворы аскорбиновой кислоты имеют кислую реакцию. Аскорбиновая кислота легко окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту, сохраняющую витаминную ценность.

Дегидроаскорбиновая кислота – соединение весьма неустойчивое и при восстановлении снова переходит в L-аскорбиновую

кислоту. Это свойство витамина С определяет его активное участие в окислительно-восстановительных процессах. Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты – активные компоненты процессов переноса электронов. При рН 7 (и выше) дегидроаскорбиновая кислота необратимо окисляется в L-дикетогулоновую кислоту, которая уже не обладает свойствами витамина С. Являясь активатором или ингибитором ряда энзиматических систем, витамин С принимает участие во многих ферментативных реакциях.

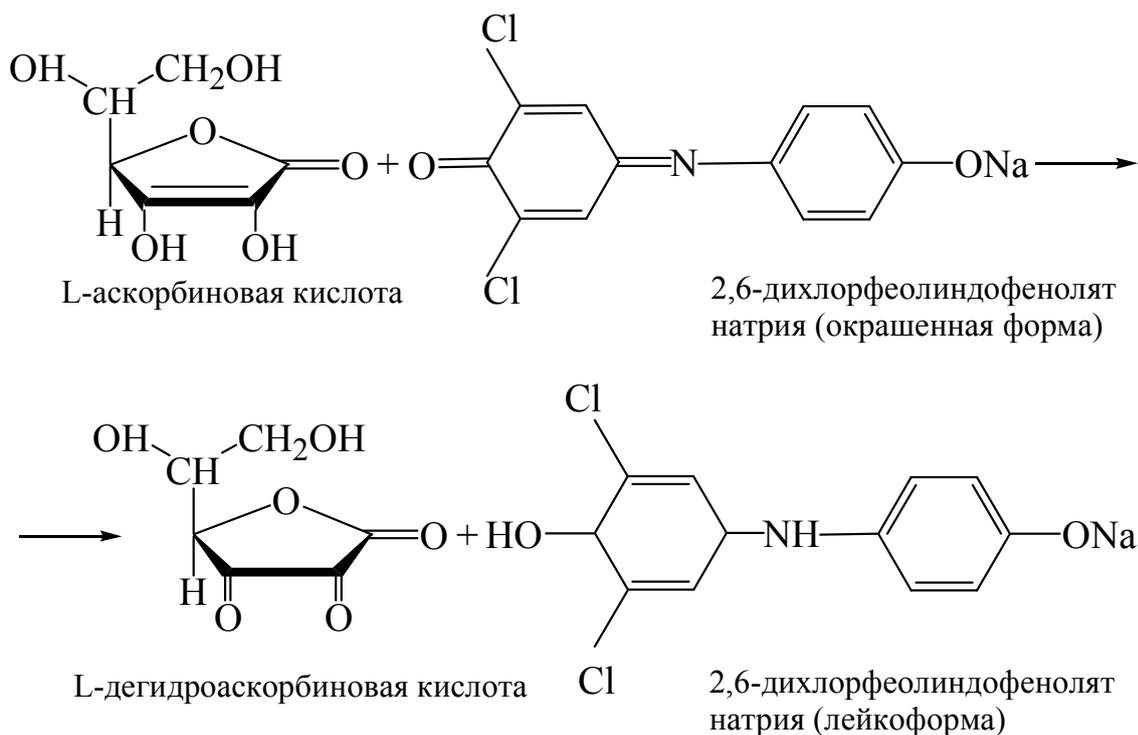
Выполняет роль регулятора окислительно-восстановительных процессов и обмена веществ, повышает сопротивляемость организма к инфекциям и свертываемость крови, нормализует проницаемость сосудов, оказывает антитоксическое действие при отравлении многими ядами и бактерицидными токсинами, ускоряет заживление ран.

Окисление аскорбиновой кислоты легко происходит в нейтральной и щелочной среде, она катализируется ионами тяжелых металлов (меди, железа, серебра), но ее стабильность возрастает в кислых растворах. Глюкоза, глютаминовая кислота, флавоноиды, креатинин, тиомочевина также стабилизируют аскорбиновую кислоту.

Суточная потребность человека в витамине С зависит от возраста, физиологического состояния и тяжести выполняемой работы и составляет 70–120 мг для взрослых и 30–70 мг для детей [11]. В медицине аскорбиновая кислота широко применяется не только для лечения цинги, но и при геморрагических диатезах, кровотечениях, в ряде инфекционных и иммунных заболеваний.

Легко вступая в окислительно-восстановительные реакции, аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, железосинеродистый калий, азотно-кислое серебро и другие вещества. Это свойство положено в основу качественных реакций на витамин С.

Количественное определение содержания витамина С основано на способности аскорбиновой кислоты к окислению в дегидроаскорбиновую. 2,6-Дихлорфенолиндофенол, окисляя аскорбиновую кислоту, восстанавливается в бесцветное соединение (лейкоформу). Раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола (реактив Тильманса) в нейтральной и щелочной среде обладает синей окраской, в кислой среде принимает розовое окрашивание.



По количеству 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, затраченного на титрование исследуемой жидкости в условиях, предохраняющих аскорбиновую кислоту от разрушения (кислая среда), определяют количество последней в исследуемом материале. По мере окисления всего количества витамина С титруемый раствор приобретает розовую окраску за счет образования в кислой среде недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия [9].

Реактивы, материалы и оборудование: хвоя ели нижней и верхней частей кроны; фарфоровые ступки; оксид алюминия (Al_2O_3), 2%-ный раствор соляной кислоты (HCl); фильтровальная бумага; стеклянные воронки, 0,001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята; бюретки; конические колбы вместимостью 100 мл; пипетки; градуированные пробирки; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г.

Выполнение работы

Хвою в количестве 2 г тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1 г оксида алюминия, добавляя порциями 2%-ный раствор соляной кислоты до консистенции густой сметаны в течение 10 мин. После этого приливают 3–5 мл 2%-ного раствора

соляной кислоты, содержимое перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Измеряют объем фильтрата, отбирают половину, разводят ее в 2 раза дистиллированной водой, помещают в коническую колбу и титруют из бюретки 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с.

Одновременно проводят контрольный опыт для проверки восстанавливающих свойств растворов соляной кислоты, которая применялась для извлечения витамина С.

Для этого отбирают объем 2%-ного раствора соляной кислоты, равный объему фильтрата, взятого для анализа, разводят его в 2 раза дистиллированной водой и титруют тем же раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания. Полученную поправку (так называемую поправку на реактивы) вычитают из результатов титрования опытного раствора. Величина ее обычно составляет 0,05–0,10 мл.

Содержание витамина С в хвое верхней и нижней частей кроны ели рассчитывают по формулам

$$C_1 = \frac{0,088(A - A_0)V_1}{V_2 m}; \quad (8.1)$$

$$C_2 = \frac{0,005(A - A_0)V_1}{V_2 m}, \quad (8.2)$$

где C_1 – содержание аскорбиновой кислоты, мг/г; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг; A – количество 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованного на титрование, мл; A_0 – количество 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; V_1 – общее количество экстракта, мл; V_2 – объем экстракта, взятый для титрования, мл; m – масса хвои, г; C_2 – содержание аскорбиновой кислоты, ммоль/г; 0,0005 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, ммоль.

Полученные значения сравнивают с литературными данными, делают вывод о содержании витамина С в зависимости от освещенности кроны ели.



Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют витамины? В чем заключается их функциональное значение?
2. По какому признаку классифицируют витамины?
3. Напишите структурную формулу витамина С и его окисленного производного. В каких биохимических процессах принимает участие витамин С?
4. Напишите структурные формулы жирорастворимых витаминов. Укажите их биохимические функции.
5. Какие жирные кислоты относятся к эссенциальным? Какова их биологическая роль?
6. Назовите, какие витамины существуют в нескольких формах. Какая из форм обладает биологической активностью? Напишите их формулы.
7. Каким витаминам присущи антиоксидантные свойства?
8. Объясните принципы методов количественного определения витамина С.
9. От чего зависит содержание витамина в хвое?

СРАВНЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В ГРЕЧКЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА

Цель работы – осуществить количественное определение рибофлавина в гречке спектрофотометрическим и флуориметрическим методами анализа, а также оценить специфичность данных методов для анализа рибофлавина в растительных объектах.

Основные сведения

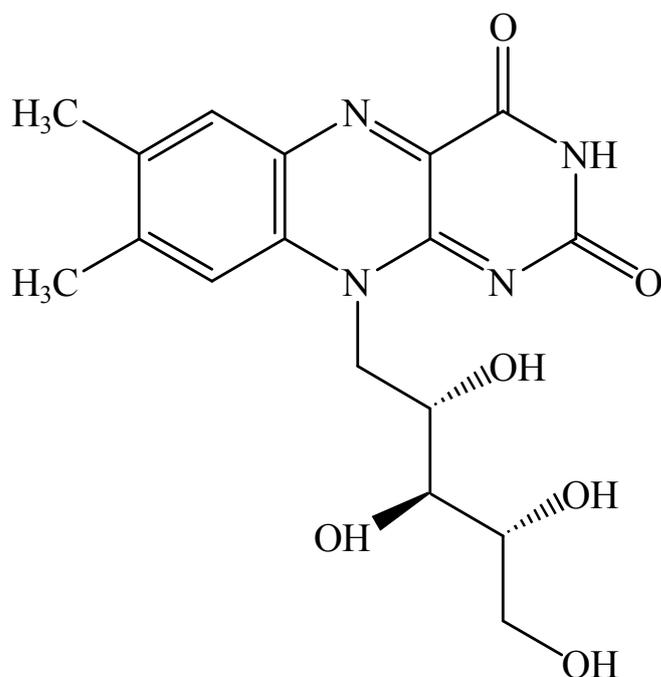
Специфичность – это способность однозначно оценивать определяемый компонент выбранным методом независимо от других присутствующих веществ (примеси, продукты распада и т. д.) в испытуемом образце (пробе).

Рибофлавин – это один из важных витаминов группы В (B_2), в коферментной форме (ФАД, ФМН), он является переносчиком двух восстановительных эквивалентов, т. е. водородов, и катализирует важнейшие биохимические окислительно-восстановительные процессы (входит в состав дегидрогеназ и оксидаз), при этом образуется восстановленная коферментная форма (ФАДН₂, ФМНН₂) [9]. Этот витамин не синтезируется в организме человека и должен поступать вместе с продуктами питания (суточная потребность человека в витамине B_2 составляет 1,8 мг). Его недостаток ведет к остановке роста, выпадению волос, поражению слизистой оболочки, быстрой утомляемости зрения, понижению работоспособности, нарушению синтеза гемоглобина, депрессии и другим расстройствам нервной системы.

Он входит в состав растительных и животных клеток. Среди растительных продуктов большое количество рибофлавина содержится в зерновых, являющихся удовлетворительным источником

этого витамина: в хлебе «Бородинский» – 0,31 мг/100 г, в гречневой крупе – 0,2 мг/100 г и многих других продуктах питания [14].

По химической структуре витамин В₂ является производным спирта рибитола и гетероцикла изоаллоксазина. Его систематическое название – 6,7-диметил-9-(1-D-рибитил)-изоаллоксазин.



Незначительные изменения структуры рибофлавина вызывают полную потерю витаминной активности.

Рибофлавин (окисленная форма) представляет собой кристаллический порошок желто-оранжевого цвета со слабым специфическим запахом и горьким вкусом. Растворимость в воде составляет 0,01 г/100 мл, нерастворим в спирте, эфире, ацетоне, бензоле, хлороформе. В растворах рибофлавин довольно стоек, на скорость его разрушения влияют свет и pH раствора: в щелочной среде рибофлавин разрушается, а в кислой среде (pH 5,5–6,0) устойчив к нагреванию.

Нейтральные водные растворы рибофлавина имеют яркую зеленовато-желтую окраску, обусловленную наличием в молекуле хромофорной (азометиновой) группировки. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) раствора рибофлавина представлены на рис. 9.1. Максимум поглощения рибофлавина наблюдается при $\lambda_{\text{возб}} = 441$ нм, а испускания $\lambda_{\text{исп}} = 525$ нм.

Процесс выделения витаминов, в том числе и В₂, включает в себя измельчение растительного материала, экстракцию и количественное определение.

Стандартными методами определения рибофлавина в растительном сырье, продуктах питания и кормах являются хроматографический и флуориметрический [15, 16]. Они специфичны при количественном определении рибофлавина в смесях, однако первый из них является дорогостоящим и требует высокой квалификации персонала, а флуориметрический метод предусматривает использование специального оборудования – флуориметра, который не является широкодоступным на предприятиях.

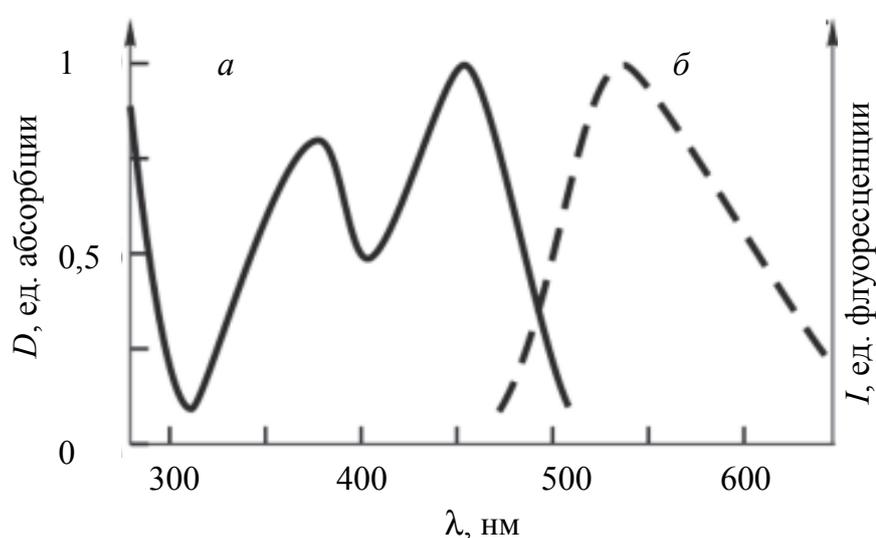


Рис. 9.1. Типичные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) раствора рибофлавина

Спектрофотометрический метод определения рибофлавина является менее специфичным, используется в основном при установлении содержания рибофлавина в таблетках и препаратах с известным составом компонентов, не поглощающих при длине волны 441 нм, однако является широкодоступным, хорошо воспроизводимым и не требует высокой квалификации персонала.

Флуориметрический метод является «обратным» спектрофотометрическому, т. е. анализу подвергается электромагнитное излучение, которое испускается молекулой при переходе электронов из возбужденного состояния в основное. Флуориметр имеет те же структурные блоки, что и спектрофотометр (см. рисунок на с. 25), отличие состоит в оптической схеме: источник излучения и детектор,

если смотреть от образца, находятся под прямым углом друг к другу для уменьшения попадания возбуждающего излучения в детектор. В оптическую схему также вводят два монохроматора для выделения определенной длины волны возбуждения и испускания (рис. 9.2).

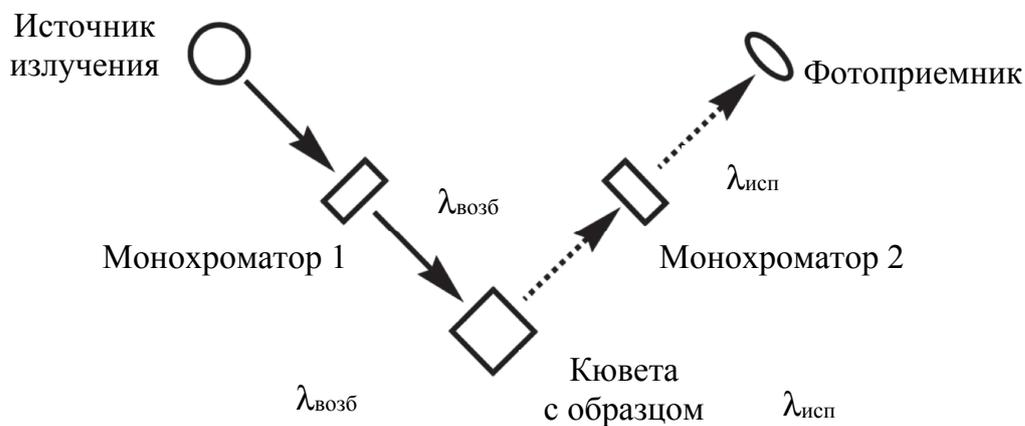


Рис. 9.2. Принципиальная схема флуориметра

Реактивы, материалы и оборудование: плитка электрическая; водяная баня, колбы мерные вместимостью 50, 100, 500, 1000 мл; колбы конические; стеклянные воронки, фильтровальная бумага, дистиллированная вода; кофемолка электрическая; 1 М раствор соляной кислоты (HCl); шпатели, стеклянные палочки; термометр; флуориметр; спектрофотометр, обеспечивающий измерение при длине волны 441 нм, укомплектованный стеклянными кюветами; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г; рН-метр; центрифуга; пластиковые пробирки для центрифугирования объемом 15 мл; рибофлавин (витамин В₂), основной и градуировочные растворы рибофлавина, приготовленные на 0,1 М растворе HCl с концентрациями 40; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 мкг/мл соответственно (срок хранения основного раствора в склянке из темного стекла в прохладном, темном месте – не более 2 мес., градуировочные растворы должны быть свежеприготовленными); дистиллированная вода.

Выполнение работы

Размалывают около 15 г гречки на электрической кофемолке, отбирают 1 г и растирают в фарфоровой ступке с добавлением

15 мл 0,1 М раствора HCl до гомогенного состояния. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и добавляют 75 мл 0,1 М раствора HCl. Затем колбу выдерживают на водяной бане до 50°C в течение 45 мин при частом помешивании. Термическая обработка в кислой среде разрушает пигменты и способствует освобождению рибофлавина. Далее содержимое колбы охлаждают, доводят 0,1 М раствора HCl до метки и отфильтровывают с помощью бумажного фильтра, фильтрат центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об/мин [17].

Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 441 нм в стеклянной кювете относительно контрольной пробы (0,1 М раствор HCl), используя спектрофотометр.

Измеряют интенсивность флуоресценции надосадочной жидкости при длине волны 525 нм в стеклянной кювете относительно контрольной пробы (0,1 М раствор HCl), используя флуориметр.

По градуировочным графикам находят концентрацию рибофлавина в растворе пробы спектрофотометрическим и флуориметрическим методами анализа.

Построение градуировочного графика на спектрофотометре. Измеряют оптическую плотность каждого градуировочного раствора рибофлавина с концентрациями 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 мкг/мл при длине волны 441 нм в стеклянной кювете относительно контрольного раствора (0,1 М раствор HCl), используя спектрофотометр.

По полученным данным строят градуировочный график, откладывая измеренные значения оптической плотности на оси ординат против соответствующих градуировочных растворов рибофлавина на оси абсцисс и проводя прямую линию через отложенные точки и начало ординат.

Построение градуировочного графика на флуориметре. Измеряют интенсивность флуоресценции каждого градуировочного раствора рибофлавина с концентрациями 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 мкг/мл при длине волны 525 нм (ширина входной щели – 2,5 нм; ширина выходной щели – 2,5 нм; длина волны возбуждения – 441 нм) в стеклянной кювете относительно контрольного раствора (0,1 М раствор HCl), используя флуориметр. Получают следующие значения интенсивности флуоресценции соответственно: 5,20; 8,15; 14,09; 27,59; 59,72.

По полученным данным строят градуировочный график, откладывая измеренные значения интенсивности флуоресценции (I) на оси ординат против соответствующих градуировочных растворов рибофлавина на оси абсцисс и проводя прямую линию через отложенные точки и начало ординат ($I = 229,96C + 2,8185$; $R^2 = 0,998$).

Количественное содержание рибофлавина в гречке (X , мг/г) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{CV10^{-3}}{m},$$

где C – концентрация рибофлавина, найденная по градуировочному графику, мкг/мл; V – объем мерной колбы, мл; m – масса гречки, г.

Сравнивают полученные значения с литературными данными, делают вывод о специфичности количественного определения рибофлавина спектрофотометрическим и флуориметрическим методами.

? Вопросы для самоконтроля

1. Что такое кофакторы ферментов? Чем отличаются коферменты и простетические группы? Приведите примеры.
2. Напишите структурные формулы витаминов группы В и их коферментных форм.
3. В каких биохимических процессах участвует коферментное производное тиамин?
4. Коферментные производные каких витаминов служат переносчиками восстановительных эквивалентов?
5. Какой витамин является металлорганическим соединением? В чем состоят особенности его структуры?
6. Назовите витамины, коферментные формы которых участвуют в процессах карбоксилирования и декарбоксилирования.
7. Что такое специфичность метода анализа?
8. В чем суть флуориметрического метода анализа?
9. Объясните принципы методов количественного определения витамина В₂.

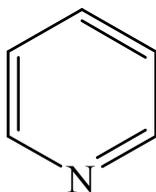
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОФЕИНА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ

Алкалоиды – это природные азотсодержащие органические соединения основного характера, имеющие сложный состав и обладающие сильным фармакологическим действием. В настоящее время известно около 5 тыс. алкалоидов, для большинства из них установлена химическая структура. Общим для всех алкалоидов свойством является то, что они представляют собой физиологически чрезвычайно активные вещества, оказывающие сильное действие на животный организм. Многие из них являются ядами.

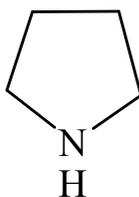
За основу классификации алкалоидов взята структура гетероцикла и положение азота в молекуле алкалоида. Большинство алкалоидов – гетероциклические соединения (с азотом в цикле) – истинные алкалоиды. Небольшое число алкалоидов содержит азот в боковой цепи или является ациклическими соединениями – протоалкалоидами.

В зависимости от химической природы азотистого гетероцикла, входящего в их состав, алкалоиды разделяются на следующие основные группы:

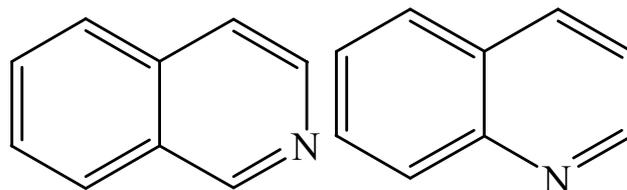
– производные пиридина (никотин):



– производные пирролидина:



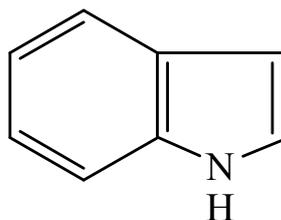
– производные хинолина и изохинолина (хинин, морфин):



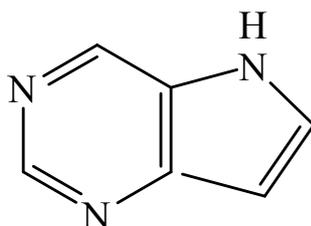
хинолин

изохинолин

– производные индола (лизергиновая кислота):



– производные пурина (кофеин, теобромин):



Обычно алкалоиды находятся в растениях в виде солей различных органических или минеральных кислот. Особенно часто встречаются они в виде солей яблочной, лимонной, щавелевой, янтарной и дубильной кислот (таннин). Реже встречаются соли уксусной, пропионовой и молочной кислот. Также могут образовываться соли минеральных кислот, таких как серная, фосфорная, роданистоводородная.

При выделении алкалоидов следует учитывать факт, что содержание данных соединений в растении обычно очень невелико. И при выделении алкалоидов важно отделить эти вещества от «балластного» материала, составляющего главную массу растительного сырья. В большинстве случаев для извлечения алкалоидов приходится прибегать к экстракции при помощи подходящих растворителей. Таким образом, можно разделить методики выделения алкалоидов на две главные группы: экстракция в виде солей и экстракция в виде свободных оснований.

В первом случае выделение проводят путем экстрагирования измельченного сырья 1–5%-ным раствором кислоты или подкисленным

спиртом. Для подкисления используют HCl , H_2SO_4 , винную, уксусную и другие кислоты, т. е. те, которые дают с алкалоидами соли, хорошо растворимые в воде или спирте. В органический растворитель и в воду, кроме алкалоидов, переходят сопутствующие вещества, от которых алкалоиды надо отделить.

Во втором случае соли алкалоидов, в виде которых они содержатся в растительном сырье, необходимо перевести в основания. Это достигается добавлением к измельченному сырью щелочей. При подборе щелочи учитывают свойства и строение алкалоидов. Сильные щелочи (NaOH , KOH) используют при выделении сильных оснований алкалоидов и алкалоидов, находящихся в растениях в виде прочных соединений с дубильными веществами (кора хинного дерева и др.). Их не применяют при выделении следующих алкалоидов:

- имеющих в молекуле фенольные гидроксилы, так как образуются феноляты, нерастворимые в органических растворителях;
- имеющих сложную эфирную группировку (атропин), так как сильные щелочи вызывают гидролиз алкалоидов;
- при выделении алкалоидов из семян, содержащих жирные масла, так как едкие щелочи вызывают омыление жиров. Мыла же способствуют образованию эмульсий, что затрудняет выделение алкалоидов. Для перевода солей в основания в этих случаях используют обычно раствор аммиака.

Затем основания алкалоидов извлекают органическим растворителем (дихлорэтаном, хлороформом, диэтиловым эфиром и др.).

Очистка полученных экстрактов основана на различной растворимости алкалоидов-оснований и их солей, что дает возможность поочередного перевода алкалоидов из органического растворителя в воду. Полученные из сырья алкалоиды-основания, находящиеся в органическом растворителе, помещают в делительную воронку и обрабатывают 1–5%-ным раствором кислоты. При этом алкалоиды-основания с кислотами образуют соли, вследствие чего переходят в водный слой, а сопутствующие вещества (хлорофилл, жирные масла, смолистые вещества и др.) остаются в органическом растворителе, который отбрасывают. Полученное извлечение алкалоидов из сырья в виде солей подщелачивают (для перевода солей алкалоидов в основания), затем обрабатывают его органическим растворителем. Основания алкалоидов переходят в органический растворитель, а сопутствующие

вещества (органические кислоты, дубильные вещества, сахара и др.) остаются в водном слое, который отбрасывают.

Для более полной очистки эти операции повторяют несколько раз. Разделение смеси алкалоидов на индивидуальные соединения очень сложно. Существует несколько принципов, на которых основаны методы разделения данных химических соединений. Это разделение суммы алкалоидов:

- по различной растворимости в органических растворителях;
- по различной силе основности;
- хроматографическим методом. Этот метод используется как для очистки, так и для разделения алкалоидов;
- по различной температуре кипения.

Кофеин является алкалоидом таких растений, как кофе, чай гуарана, кола и др. Основная функция указанного алкалоида в составе растений – защита от насекомых, поедающих листья, стебли и зерна, а также для привлечения опылителей.

Реактивы, материалы и оборудование: листья черного чая; MgO; дистиллированная вода; 10%-ный раствор H₂SO₄; безводный Na₂SO₄; 5%-ный раствор NaOH; хлороформ; изопропиловый спирт; йод кристаллический; кофеин, субстанция-порошок; фильтровальная бумага; химические стаканы на 100 и 250 мл; мерный цилиндр на 25 мл; колба круглодонная на 100 мл; колба грушевидная на 50 мл; стеклянная воронка; стеклянные пипетки на 1 и 5 мл; делительная воронка на 100 мл; обратный холодильник; шпатели; центры кипения; пластинки TLC Silica gel 60; стеклянные капилляры; технические весы; аналитические весы; рН-метр; электрическая плитка; хроматографическая камера; роторный испаритель.

Выполнение работы

К 5 г тонко измельченного чая приливают 25 мл дистиллированной воды и взвесь MgO (2,5 г MgO в 15 мл дистиллированной воды), перемешивают и кипятят 10–15 мин в колбе с обратным холодильником. Надосадочный раствор декантируют. Операцию повторяют еще два раза с новыми порциями дистиллированной воды по 15 мл.

Объединенную водную вытяжку подкисляют 10%-ным раствором H₂SO₄ до рН 3,0 и концентрируют на роторном испарителе при пониженном давлении до 1/3 объема. Горячий раствор фильтруют через складчатый бумажный фильтр, затем 5 раз производят

извлечение хлороформом. На каждую экстракцию затрачивают по 5 мл растворителя. Экстракцию проводят в делительной воронке.

Объединенную хлороформную вытяжку промывают сначала 5 мл 5%-ного раствора NaOH, затем таким же количеством дистиллированной воды. Экстракт сушат безводным Na₂SO₄. Хлороформ отгоняют на роторном испарителе при пониженном давлении. В остатке получают сырой кофеин, который перекристаллизовывают из 3–5 мл горячей дистиллированной воды. Кофеин кристаллизуется в виде тонких белых шелковистых игл.

Затем около 10 мг осадка растворяют в 0,5 мл хлороформа и проводят ТСХ-анализ кофеина. Принцип ТСХ представлен в лабораторной работе № 5. В качестве элюента используют смесь изопропиловый спирт : хлороформ в соотношении 1 : 1.

Идентификацию кофеина проводят на основании сравнения значения R_f анализируемого вещества со значением R_f стандартного вещества («свидетель» – кофеин, субстанция-порошок).

?

Вопросы для самоконтроля

1. Какие соединения называются алкалоидами?
2. Приведите классификации алкалоидов, опишите их биологические функции.
3. Приведите структуру кофеина, укажите природные источники.
4. Какие физико-химические методы применяют для качественного и количественного анализа алкалоидов?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ленинжер, А. Основы биохимии. В 3 т. Т. 1 / А. Ленинжер; пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 367 с.
2. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера. В 3 т. Т. 1 / Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 694 с.
3. Северин, С. Е. Практикум по биохимии / С. Е. Северин, Г. А. Соловьева. – М.: МГУ, 1989. – 509 с.
4. Racusen, R. H. Isolation of myosin and actin from chicken muscle / R. H. Racusen, K. V. Thompson // Muscle protein biochemistry. Tested studies for laboratory teaching: Proceedings of the 18th Workshop: Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). – 1996. – Vol. 18. – P. 97–111.
5. Smoller, M. Purification of mouse myosin by gel filtration / M. Smoller, R. A. Fineberg // Biochimica et Biophysica Acta. – 1964. – Vol. 86, no. 1. – P. 187–189.
6. Margossan, S. S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle / S. S. Margossan, S. Lowey // Methods in enzymology. – 1982. – Vol. 85. – P. 55–71.
7. Pollard, T. D. Assays for myosin / T. D. Pollard // Methods in enzymology. – 1982. – Vol. 85. – P. 123–130.
8. Rathbun, W. B. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate / W. B. Rathbun, M. V. Betlach // Analytical biochemistry. – 1969. – Vol. 28. – P. 436–445.
9. Леонтьев, В. Н. Биохимия. Лабораторный практикум: учеб. пособие для студентов специальностей «Биотехнология», «Биоэкология» / В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович. – Минск: БГТУ, 2008. – 216 с.
10. Рабинович, В. А. Краткий химический справочник / В. А. Рабинович, З. Я. Хавин; под ред. А. А. Потехина, А. И. Ефимова. – Л.: Химия, 1991. – 432 с.
11. Шапиро, Д. К. Практикум по биологической химии / Д. К. Шапиро. – Минск: Выш. шк., 1976. – 288 с.
12. Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала: ГОСТ 10845–98. – Введ. 01.03.2000. – Минск: Госком.

по стандартизации Респ. Беларусь: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2009. – 7 с.

13. Описание прибора POLAMAT A, Карл Цейс. – Йена, 1985.

14. Химический состав блюд и кулинарных изделий: справ. табл. содерж. основ. пищевых веществ и энергет. ценности блюд и кулинар. изделий: в 2 т. / под ред. И. М. Скурихина, М. Н. Волгарева. – М.: ВО «Агропромиздат», 1987. – Т. 1, ч. 1. – 224 с.

15. Методы определения витаминов группы В: ГОСТ 32042–2012. – Введ. 03.12.2012 / Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – М.: Стандартинформ, 2014. – 20 с.

16. Продукты пищевые. Определение витамина В₂ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии: ГОСТ EN 14152–2013. – Введ. 05.05.2013 / Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации. – М.: Стандартинформ, 2014. – 21 с.

17. Чупахина, Г. Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: практикум / Г. Н. Чупахина. – Калининград: Изд-во КГУ, 2000. – 59 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Правила техники безопасности при проведении лабораторных работ.....	4
Рекомендации по оформлению лабораторных работ.....	8
Лабораторная работа № 1. Качественное определение аминокислот	9
Лабораторная работа № 2. Методы денатурации и количественного определения белков.....	17
Лабораторная работа № 3. Выделение и количественное определение миозина в куриной грудке	31
Лабораторная работа № 4. Определение АТФ-азной активности миозина куриной грудки.....	41
Лабораторная работа № 5. Методы выделения липидов из биологического материала и хроматографические методы их анализа	53
Лабораторная работа № 6. Выделение углеводов из растительного материала.....	60
Лабораторная работа № 7. Поляриметрическое определение крахмала в рисе	67
Лабораторная работа № 8. Сравнительный анализ содержания витамина С в хвое верхней и нижней частей кроны ели	72
Лабораторная работа № 9. Сравнение специфичности количественного определения рибофлавина в гречке спектрофотометрическим и флуориметрическим методами анализа	77
Лабораторная работа № 10. Выделение и идентификация кофеина из листьев зеленого чая.....	83
Список использованной литературы	88

Учебное издание

Леонтьев Виктор Николаевич
Стасевич Ольга Викторовна
Игнатовец Ольга Степановна

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Лабораторный практикум

Учебно-методическое пособие

Редактор *Р. М. Рябая*
Компьютерная верстка *Д. С. Жих*
Дизайн обложки *П. П. Падалец*
Корректор *Р. М. Рябая*

Подписано в печать 22.09.2020. Формат 60×84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать ризографическая.
Усл. печ. л. 5,3. Уч.-изд. л. 5,5.
Тираж 100 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатной продукции
№ 1/227 от 20.04.2014.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.