

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Учебно-методическое пособие
для лабораторных занятий для студентов
по направлению подготовки
36.03.02 «Зоотехния»

Владикавказ, 2021

Составители: *Цогоева Ф.Н., Босиева О.И.*

Рецензент – С.А. Гревцова, ФГБОУ ВО Горский ГАУ, доцент кафедры биологической и химической технологии, кандидат биологических наук

Цогоева Ф.Н., Босиева О.И. Биологическая химия / Учебно-методическое пособие для лабораторных занятий / Ф.Н. Цогоева, О.И. Босиева. – Владикавказ: Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2021, – 72с.

Рассматриваются наиболее важные классы биологически активных веществ, их свойства, основные классы органических соединений. Учебно-методическое пособие содержит не только описание лабораторных работ, но включает также теоретическое обоснование по каждой теме. Обозначенные в пособии методические установки позволяют систематизировать знания по биологической химии. Каждая тема снабжена контрольными вопросами. Представленный теоретический и практический материал может быть использован для аудиторной и самостоятельной работы студентов бакалавриата, а также специалитета. Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Зоотехния», его можно рекомендовать и специалистам, самостоятельно изучающим вопросы биохимии. Данное издание подготовлено по дисциплине «Биологическая химия» в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования, утвержденным приказом Министерства образования и науки Российской Федерации № 962 от 22 сентября 2017 г.

Рекомендовано Центральным учебно-методическим советом ФГБОУ ВО Горский ГАУ в качестве учебно-методического пособия для лабораторных занятий от 30 июня 2021 г. протокол № 10

ВВЕДЕНИЕ

Современное производство животноводческой продукции не обходится без хорошо оснащенных лабораторий, выполняющих разнообразные биохимические исследования. Специалисты зоотехнического профиля должны быть знакомы с работой этих лабораторий.

Данное пособие содержит элементы теории и методов практической работы по биологической химии. Многие методы используются в работе промышленных комплексов животноводства и птицеводства, химических отделов ветеринарных, бактериологических лабораторий и санитарной службы.

Предназначается для студентов факультета технологического менеджмента. По своему содержанию отвечает программе курса биологической химии по направлению подготовки «Зоотехния».

Пособие преследует цель, во-первых, дать студенту возможность проверить на практике свойства некоторых биологически важных веществ, а во-вторых, ознакомить студентов с некоторыми биохимическими методами исследований.

Перед лабораторными работами каждого раздела приводится краткое теоретическое обоснование по химии и метаболизму этих веществ, что дает возможность студенту работать самостоятельно.

Учебно-методическое пособие может быть использовано не только для обязательных занятий, но и при выполнении студентами учебно-исследовательской работы, а также при проведении занятий в научных кружках.

Лабораторное занятие № 1 (2 часа)

Тема: Правила техники безопасности

Приступая к работе в химической лаборатории, студент должен внимательно изучить настоящие правила и строго их выполнять.

1. Не загружать рабочее место посторонними предметами.
2. Реактивы без этикеток с рабочего стола следует убирать.
3. Скланки с легковоспламеняющимися и горючими жидкостями не держать вблизи нагревательных приборов.
4. При нагревании жидкости в пробирке отверстие ее надо направлять в сторону от себя и от соседа во избежание ожогов, которые могут произойти в результате выбрасывания или разбрызгивания жидкости.
5. При работе с газоотводной трубкой нужно убирать горелку из-под пробирки с реакционной смесью только после того, как нижний конец газоотводной трубки удален из жидкости.
6. При проведении опытов с горючими газами нельзя их поджигать, не убедившись в отсутствии поблизости гремучих смесей.
7. При загорании водорастворимых органических веществ, например, спиртов, хорошим средством тушения является вода. При загорании жидкостей, нерастворимых в воде (бензол, толуол и др. углеводороды), воду для тушения применять нельзя, в этих случаях очаг пожара надо накрыть асбестовым полотенцем, одеялом, засыпать песком и применить огнетушитель.
8. При ожогах и порезах нужно уметь оказывать помощь:
 - при термических ожогах нужно смочить обожженные места 5% раствором танина в 40% этиловом спирте путем наложения ваты или марли, смоченной этим раствором;
 - при ожогах кислотами следует немедленно обильно промыть обожженный участок водой, а затем наложить компресс из ваты или марли, смоченной в 1% растворе соды;
 - при ожогах щелочами пораженный участок следует обильно промыть водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной 1% уксусной кислотой;

- при ожогах бромом пораженные места следует смачивать 1% раствором углекислой соды до исчезновения бурой окраски брома, а затем наложить компресс из ваты;

- при ожогах жидким фенолом пораженные места следует растереть глицерином до появления нормальной окраски кожи, а затем промыть водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной глицерином.

9. При попадании в глаз кислоты, его следует тщательно промыть водой, а затем 2% раствором бикарбоната натрия.

10. В случае попадания в глаз щелочи его следует смазать 3% спиртовым раствором йода. Если кровотечение не останавливается, то к ране прикладывается тампон, смоченный 10% раствором хлорного железа.

Лабораторное занятие № 2 (2 часа)
Тема: Качественные реакции на некоторые жирорастворимые витамины

Цель опытов: ознакомиться со свойствами некоторых жирорастворимых витаминов.

Витамины - это органические вещества различной химической природы, необходимые в малых количествах для нормальной жизнедеятельности организма. Жизненная необходимость в витаминах определяется их важной ролью в обменных процессах, происходящих в организме, многие из них входят в состав ферментов и коферментов и через них участвуют в катализе реакций. Следовательно, витамины являются биологически активными веществами, участвующими в регуляции обмена веществ.

Основным источником покрытия потребности животных в витаминах являются корма рационов. Ряд витаминов, особенно комплекса В, а также витамин К образуются в пищеварительном тракте в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Больше всего витаминов синтезируется микрофлорой преджелудков у жвачных. Следовательно, свиньи и птица должны получать витамины группы В с кормами. В период роста и развития организма, потребность в витаминах повышается, так как процессы ассимиляции протекают наиболее интенсивно. Кроме того, потребность в витаминах меняется в зависимости от выполняемой работы, окружающей среды, состояния организма (беременность, лактация), состава рациона.

Усвояемость витаминов зависит от многих факторов и прежде всего от соотношения витаминов между собой, их доступности для организма животных, сбалансированности рационов по другим элементам питания, а также от состава и структуры рационов.

Обеспеченность организма витаминами зависит также от наличия в кормах антивитаминов. Последние, как правило, представляют собой соединения, близкие по химическому строению к соответствующему витамину и вытесняющие его из ферментной системы. Или же это чуждый белок, обладающий ферментативными свойствами расщеплять витамин (тиаминаза), или прочно его связывать (авидин).

В организме животных есть много сотен точек приложения действия витаминов, поэтому их низкий уровень может привести к разным заболеваниям, даже к смерти. При недостаточном поступлении витаминов с кормами у животных возникают авитаминозные заболевания.

Наиболее часто встречаются скрытые формы витаминной недостаточности – гиповитаминозы, которые протекают в менее выраженной форме, без заметного проявления специфических симптомов.

Важнейшие витамины и их номенклатура

Номенклатура		
буквенная	по химической структуре	по физиологическому действию
1	2	3
<i>Водорастворимые</i>		
1. В ₁	тиамин	антиневритный
2. В ₂	рибофлавин	витамин роста
3. В ₃	пантотеновая кислота	антидерматитный фактор
4. В ₄ *	холин	билиневрин
5. В ₅	никотиновая кислота	антипеллагрический
6. В ₆	пиридоксин	антидерматитный
7. В ₈ *	инозит	-
8. В ₉ (В ₁₂)	фолиевая кислота	антианемический
9. В ₁₂	цианкобаламин	антианемический
10. В ₁₃ *	оротовая кислота	-
11. В ₁₄ *	пирролохинолинохинон	-
12. В ₁₅ *	пангамовая кислота	антианоксический
13. Р	биофлавоноиды	капилляроукрепляющий
14. U*	метилметионинсульфоний	противоязвенный
15. В ₇ *	карнитин	антисеборейный фактор
16. Н	биотин	-
17. С	аскорбиновая кислота	антицинготный
18. В ₁₀ *	парааминобензойная кислота	-
19. N*	липоевая кислота	-
20. К ₀ Q*	убихинон	-

Продолжение таблицы

1	2	3
<i>Жирорастворимые</i>		
1. А	ретинол	антиксерофтальмический
2. Д	кальциферол	антирахитический
3. Е	токоферол	антистерильный
4. К	филлохинон	антигеморрагический

* - витаминоподобные вещества.

Гиповитаминозное состояние проявляется главным образом в замедлении роста, нарушении воспроизводства, снижении продуктивности и плохой оплате корма. При гиповитаминозах снижается устойчивость организма животных к различным заболеваниям. Отрицательными последствиями гиповитаминозов является также снижение витаминной ценности продуктов животноводства – молока, мяса, яиц.

Гиповитаминозное состояние у животных возникает не только на почве недостатка витаминов в рационах, но и вследствие плохого их усвоения и недостаточного биосинтеза в организме. Такие явления называются эндогенными гиповитаминозами.

Скрытые формы витаминной недостаточности причиняют большой ущерб животноводству. Витаминные препараты, выпускаемые промышленностью, используются в животноводстве не только для предупреждения авитаминозных заболеваний, но и как средство повышения продуктивности животных, снижения затрат белкового корма и оплаты корма.

При изучении витаминов сначала каждому из них давали название исходя из того заболевания, которое развивается при отсутствии витамина в корме или пище. При этом к названию, соответствующей болезни добавляется приставка анти-. Позже отдельные витамины по мере их выделения условились обозначать буквами латинского алфавита: А, В, С, Д и т.д. Наконец, после исследования химической природы ряда витаминов, стали вводить их химические названия. В настоящее время используют все три вида номенклатуры.

По растворимости в воде и жировых растворителях витамины делят на две группы: водо- и жирорастворимые.

Витамин А - важнейший витамин роста, необходимый для всех млекопитающих и птиц. Его иногда называют кожным витамином, так как он необходим для восстановления тканей кожи. Ретинол содержится только в продуктах животного происхождения: в рыбьем жире, печени, сливочном масле, молоке, яйце птиц. А-витаминной активностью обладают пигменты – каротин, каротиноиды, содержащиеся в ярко окрашенных фруктах и овощах. Каротин - предшественник витамина А (провитамин), поступая в организм животных, в стенке тонких кишок, печени и крови он превращается в витамин А. Основным признаком А - авитаминоза является «куриная» слепота, а также поражение эпителиальных тканей, в том числе роговицы глаза (ксерофтальмия и кератомалация), торможение роста, общее истощение организма.

Качественные реакции на витамин А Опыт № 1. Реакция с серной кислотой

Для витамина А характерна цветная реакция с серной кислотой, в результате которой получается соединение, окрашенное в сине-фиолетовый цвет. Химизм реакции окончательно не выяснен.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Серная кислота, концентрированная. Раствор витамина А в масле (промышленный препарат).*

Ход работы. В пробирку наливают 3 капли масляного раствора витамина А и добавляют 1 каплю серной кислоты. Жидкость окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Опыт № 2. Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин А взаимодействует с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе. В результате образуется окрашенное в синий цвет соединение, природа которого не изучена.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Раствор витамина А в масле (промышленный препарат). Раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.*

Ход работы. В пробирку наливают 3 капли масляного раствора витамина А. Добавляют 3 капли треххлористой сурьмы. В пробирке появляется темно-синее окрашивание.

Качественная реакция на витамин Д Опыт № 3. Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин Д существует в виде нескольких форм. Наиболее распространенными из них являются витамин Д₂ (эргокальциферол) и Д₃ (холекальциферол).

Лучшими источниками витамина Д являются рыбий жир, печень животных, сливочное масло, молоко, яйца. Витамин Д, кроме того, синтезируется в коже из стиролов под влиянием ультрафиолетовых лучей. Следовательно, для предупреждения развития Д-авитаминоза животных необходимо подвергать естественной (солнечной) или искусственной радиации, а также давать с кормом витамин Д.

Витамин Д необходим животным для нормального метаболизма кальция и фосфора. Недостаток витамина Д у молодых животных вызывает рахит, для которого характерно нарушение процесса формирования скелета, кости становятся мягкими и пластичными, что приводит к их деформации.

У взрослых животных Д-авитаминоз приводит к остеомалации, при которой происходит размягчение костей, вызванное вымыванием кальция из уже сформировавшейся костной ткани. У кур образуются яйца с тонкой скорлупой, снижается яйценоскость, а из яиц, полученных от кур-несушек с признаками Д-гиповитаминоза, развиваются эмбрионы с уродствами конечностей.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Раствор витамина Д в масле (промышленный препарат). Треххлористая сурьма, раствор в хлороформе.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3 капли раствора витамина Д. В первую пробирку добавляют 1 каплю хлороформа, во вторую - 2 капли раствора треххлористой сурьмы.

Во второй пробирке появляется оранжево-красное окрашивание, интенсивность которого со временем возрастает.

Опыт № 3. Качественная реакция на витамин Е

Витамин Е называют токоферолом, от греческого *tokos* – потомство и *phero* – приносить. Само название говорит о том, что витамин Е играет важную роль в воспроизводительной функции организма.

Токоферолы способствуют активации процессов синтеза АТФ. Установлена тесная связь токоферолов с функцией и состоянием эн-

докринной системы, особенно половых желез, гипофиза, надпочечников и щитовидной железы. Увеличивает долголетие и функцию размножения.

Взаимодействие токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления токоферола имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом, токоферол окисляется до токоферилхинона – соединения, окрашенного в красный цвет.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Витамин Е, 0,1% спиртовой раствор. Азотная кислота концентрированная. Хлорид железа 0,1%-ый раствор.

Ход работы

1. Реакция с азотной кислотой. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

2. Реакция с хлорным железом. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора – токоферола, затем 0,5 мл 1 % хлорного железа и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдается появление красного окрашивания.

Контрольные вопросы

1. К производным холестерина относятся витамины:
- А, Д, К, В₂, В₁₂
2. Ретинол относится к числу:
- стероидов, пептидов, каротиноидов
3. Токоферол выполняет функции:
- антиоксиданта, переносчика метильных групп, антидерматитного фактора, инициатора перекисного окисления.
4. Витамин Д осуществляет следующие функции:
- переносит аминокруппы, входит в состав цитохромов, участвует в переносе кальция через мембраны, переносит метильные группы
5. Предшественником витамина А служит:
- каротин, холестерин, убихинон, эргостерин, полипептид
6. В организме животных синтезируются витамины:
- А, Д, К, В₅, В₆, С, Е

Лабораторное занятие № 3 (2 часа)

Тема: Качественные реакции на некоторые водорастворимые витамины

Опыт № 1. Осаждение витамина В₁ фосфорномолибденовой кислотой

Наличие в молекуле тиамина б-аминопиридинового кольца придает ему основные свойства. Поэтому витамин В₁ подобно алкалоидам осаждается фосфорномолибденовой кислотой.

Приборы и реактивы. Витамин В₁, 0,1%-ый раствор. Фосфорномолибденовая кислота, 1%-ый раствор в разбавленной (1:10) соляной кислоте.

Ход работы. Смешивают в микрохимической пробирке по 5 капель растворов витамина В₁ и фосфорномолибденовой кислоты. Отмечают появление хлопьевидного осадка.

Опыт № 2. Восстановление рибофлавина

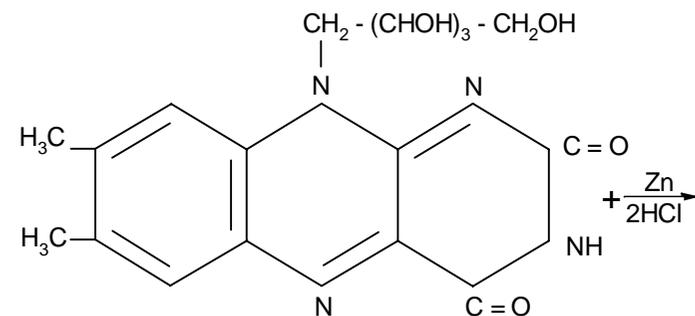
Витамин В₂ – рибофлавин, обладает способностью легко окисляться и восстанавливаться, что лежит в основе биологического действия этого витамина. При восстановлении рибофлавин теряет свойственную ему ярко желтую окраску и превращается в бесцветное лейкосоединение. Этот процесс обратим, причем обратное течение реакции может быть обеспечено воздействием молекулярного кислорода на лейкосоединение.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Взвесь рибофлавина в воде, 0,025%-ая. Соляная кислота, 2%-ый раствор. Цинк металлический. Перекись водорода, 3%-ый раствор.

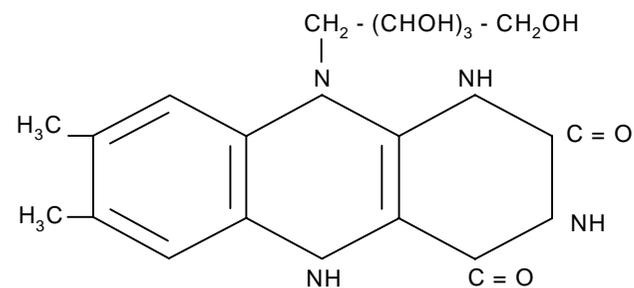
Ход работы. Для опыта берут две пробирки. В первую (опытную) пробирку помещают несколько кусочков цинка и добавляют 10 капель соляной кислоты. Во вторую пробирку (контрольную) вносят 10 капель воды. Затем в каждую пробирку добавляют по 3 капли взвеси рибофлавина.

В первой пробирке, где цинк вытесняет водород из соляной кислоты, рибофлавин постепенно восстанавливается, превращаясь в бесцветное соединение.

Восстановление рибофлавина является обратимым процессом. Для того, чтобы убедиться в этом, отливают из первой пробирки часть обесцвечивающегося раствора в пустую пробирку и, встряхивая ее, отмечают усиление желтой окраски, указывающее на окисление лейкофлавина кислородом воздуха.



Витамин В₂ (рибофлавин)



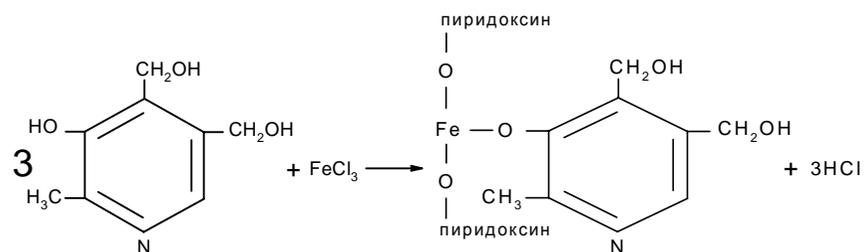
Лейкофлавин

Опыт № 3. Реакция пиридоксина с хлорным железом

Термин «витамин В₆» объединяет три соединения, являющиеся производными пиридина - пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Хлорное железо, 1%-ый раствор. Витамин В₆, 1%-ый раствор.

Ход работы. В пробирке смешивают 2 капли раствора пиридоксина и 2 капли раствора хлорного железа. Возникает красная окраска.



Комплексное соединение пиридоксола

Контрольные вопросы

- Пантотеновая кислота входит в состав следующего кофермента:
- ФАД, НАДФ, ТДФ, кофермент А
- В состав кофермента карбоксилазы входит следующий витамин:
- тиамин, рибофлавин, ниацин, пиридоксин
- Антипеллагрическим называют витамин:
- В₂, В₅, В₆, В₁₂, Н
- В составе витамина В₁₂ содержится:
- железо, медь, марганец, кобальт, селен
- В состав НАД⁺, НАДФ⁺ входит витамин:
- К, В₁, В₂, В₃, В₅

Лабораторное занятие № 4 (2 часа)

Тема: Качественная реакция на аскорбиновую кислоту

Значение витамина С для здоровья и нормального самочувствия настолько велико, что даже недостаток его вызывает значительные нарушения в организме: плохое самочувствие, снижение умственной и физической работоспособности, быструю утомляемость, повышенную чувствительность к простуде и инфекциям, нарушение функций желудочно-кишечного тракта. Аскорбиновая кислота является необходимым витамином для человека, обезьян и морских свинок.

Витамин С широко распространен в природе. Для удовлетворения потребности в аскорбиновой кислоте важное значение имеют продукты растительного происхождения. Много витамина С в болгарском перце, салате, капусте, хрене, укропе, плодах черной смородины, ягодах рябины, в незрелых грецких орехах, облепихе, особенно много в цитрусовых. Из непищевых источников витамином С богаты хвоя, листья черной смородины, грецкого ореха и шиповник. Из тканей и органов животных значительное количество аскорбиновой кислоты содержат печень, надпочечники и гипофиз.

Наиболее важное химическое свойство аскорбиновой кислоты - это способность обратимо окисляться в дегидроаскорбиновую кислоту под действием аскорбатоксидазы, образуя окислительно-восстановительную систему, связанную с переносом протонов и электронов. Окисление может быть вызвано разными причинами, в том числе и кислородом воздуха. Дегидроаскорбиновая кислота - менее стойкое соединение и в слабощелочной, или даже в нейтральной среде легко превращается в ди-кетогулоновую кислоту, лишенную биологической активности. Поэтому при термической обработке часть витамина С разрушается.

Витамин С в качестве кофактора ферментов гидроксилаз участвует в синтезе белка коллагена на стадии превращения остатков аминокислот пролина и лизина в полипептидных цепях в остатки гидроксипролина и гидроксилизина. Гидроксильированные остатки ами-

нокислот образуют ковалентные связи между молекулами коллагена, инициируя, таким образом, самосборку прочных коллагеновых фибрилл.

При отсутствии витамина С у человека начинается цинга, отмечаются потеря веса, общая слабость, одышка, боли в сердце, сердцебиение. При цинге повреждается кровеносная система: сосуды становятся хрупкими и проницаемыми, что приводит к подкожным кровоизлияниям, отмечаются также кровоизлияния и кровотечения во внутренних органах и слизистых оболочках. При глубоко зашедшем С-гиповитаминозе могут возникнуть явления (кровооточивость десен, расшатывание, разламывание и выпадение зубов), приводящие к цинге.

Характерной особенностью витамина С является его способность обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря чему он играет важную роль в процессах, протекающих в организме. При окислении аскорбиновой кислоты образуется дегидроаскорбиновая кислота.

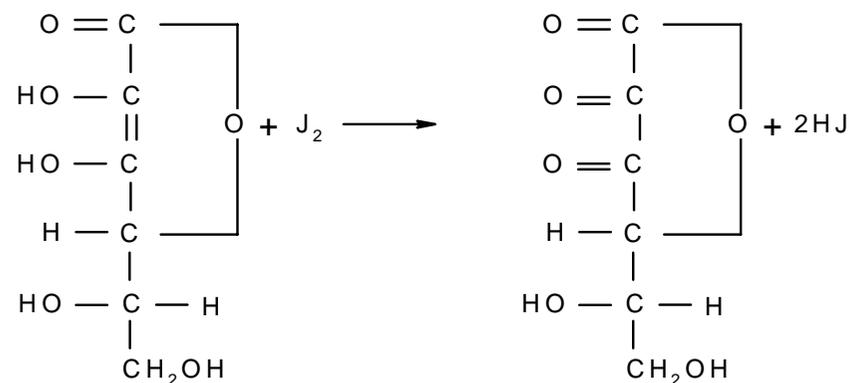
Опыт №1. Восстановительные свойства аскорбиновой кислоты

Окисляясь, аскорбиновая кислота восстанавливает многие соединения: 2,6-дихлорфенолиндофенол, метиленовую синь, йод, хлорное железо, азотнокислое серебро. Первые три из названных соединений при восстановлении обесцвечиваются, а восстановление хлорного железа в хлористое можно легко обнаружить по реакции с железистосинеродистым калием.

Реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом и йодом лежат в основе современных методов количественного определения витамина С.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Раствор Люголя. Аскорбиновая кислота, 0,05%-ный раствор.

Ход работы. Смешивают в пробирке несколько капель раствора аскорбиновой кислоты и раствора Люголя. Отмечают обесцвечивание. Зная, что йод восстанавливается до йодистоводородной кислоты, записывают уравнение реакции:



Аскорбиновая кислота

Дегидроаскорбиновая кислота

Контрольные вопросы

1. Какой микроэлемент входит в состав цианкобаламина:
- фтор, марганец, кобальт, селен
2. В состав НАД⁺, НАДФ⁺ входит витамин:
- К, В₁, В₂, В₃, В₅
3. Основным источником витамина С являются:
- зеленая масса, отруби, концентраты, жмыхи
4. НАДФ⁺ служит коферментом:
- гидролаз, дегидрогеназ, цитохрома с, декарбоксилаз.

Лабораторное занятие № 5 (2 часа)
Тема: Определение активности ферментов

Цель занятия: ознакомиться с одним из методов определения активности ферментов.

Количественное определение ферментов (их активности) производят по количеству субстрата, превращенного в единицу времени, причем измеряется либо убыль субстрата, либо прирост продукта реакции.

Таким образом, о количестве фермента косвенно судят по его активности. Активность фермента меняется при различных условиях реакции и зависит от температуры, pH среды, концентрации субстратов и кофакторов (коферментов, активаторов и др.). В опытах по определению активности фермента количество превращенного субстрата пропорционально количеству фермента и времени инкубации.

Опыт № 1. Количественное определение амилазной активности слюны по методу Вольгемута

Активность фермента определяется в данной работе по количеству субстрата, вступившего в реакцию под действием фермента. Согласно рекомендациям международного биохимического союза за единицу активности фермента принимают количество его, способное за 2 минуты превратить 1 мкмоль субстрата или (в биополимерах) 1 мкэкв затронутых реакцией групп.

Для количественного определения амилазной активности готовят ряд разведений слюны, добавляют к ним крахмал и помещают в термостат или водяную баню при 38°C на 30 минут. Затем в пробирки добавляют раствор Люголя и отмечают то максимальное разведение слюны, при котором произошло полное расщепление крахмала. Зная разведение слюны и количество добавленного крахмала, вычисляют, сколько крахмала мог бы расщепить 1 мл неразведенной слюны. Полученную величину обозначают $A_{30}^{38^{\circ}}$, где температура водяной бани - 38°C, а 30 - время инкубации в термостате.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Термостат или баня с термометром. Бюретки на 50 мл - 2 шт. Пипетки на 1 мл. Пробирка с делением на 10 мл. Воронка. Палочка стеклянная. Карандаш по стеклу. Крахмал, 1%-ый раствор. Раствор Люголя.

Ход работы. Готовят ряд из 10 пронумерованных пробирок. В каждую добавляют из бюретки по 1 мл воды. Собирают в градуированную пробирку 1 мл слюны, доводят объем жидкости в пробирке водой до 10 мл. Содержимое пробирки смешивают стеклянной палочкой. 1 мл разведенной слюны переносят в пробирку 1 и полученный раствор тщательно смешивают, после чего переносят 1 мл слюны из пробирки 1 в пробирку 2. Здесь слюну также тщательно смешивают и переносят 1 мл слюны из пробирки 2 в пробирку 3. Действуя аналогичным образом, переносят по 1 мл слюны из третьей пробирки в четвертую, из нее в пятую и так до десятой пробирки. Из десятой пробирки 1 мл слюны выливают, во все пробирки добавляют из бюретки по 2 мл раствора крахмала. Добавление крахмала рекомендуется начинать с пробирки 10.

Все пробирки помещают в термостат на 30 минут или же в водяную баню при 38°C. По истечении этого срока пробирки охлаждают под краном и добавляют в каждую по 1 капле раствора Люголя. Отмечают наибольшее разведение слюны, при котором произошло расщепление крахмала и вычисляют активность амилазы. Так, если расщепление крахмала произошло в пробирках 1-4, то можно вычислить активность, помня, что слюна перед опытом разведена в 10 раз и что в пробирке 4 она разведена еще в 16 раз (общее разведение слюны 1:160).

Таким образом, 1:160 мл слюны расщепляется 2 мл раствора крахмала, а 1 мл слюны - X мл раствора крахмала, откуда:

$$X = \frac{2 \times 160}{1} = 320 \text{ мл,}$$

т.е. активность амилазы, определенная при 38°C в течение 30 минут составляет

$$A_{30}^{38^{\circ}} = 320 \text{ ед.}$$

Протокол оформляют в виде таблицы:

№ п/п	Разведение слюны	Реакция с йодом (окраска)	Активность фермента (расчет)
1	1:20		
2	1:40		
3	1:80		
4	1:160		
5	1:320		
6	1:640		
7	1:1280		
8	1:2560		
9	1:5120		
10	1:10240		

Лабораторное занятие № 6 (2 часа)

Тема: Общие свойства ферментов

Цель занятия: установить зависимость активности ферментов от температуры, реакции среды и различных субстратов.

Ферментами называют специфические белки, выполняющие функцию биологических катализаторов. На основании их строения ферменты делят на однокомпонентные и двухкомпонентные.

Первые являются простыми белками (протеины), вторые – сложными (протеиды). Последние состоят из двух частей: белковой, называемой апоферментом, и небелковой, которую называют коферментом.

Непосредственное участие в химической реакции, катализируемой ферментом, принимает не белок, а кофермент. Апофермент определяет специфичность реакции на этапе фиксации субстрата.

Большое число ферментов для проявления своей активности нуждаются в присутствии металлов (кофермент неорганического происхождения). При этом металлы или ионы металлов входят в состав коферментов или же играют роль активаторов ферментов.

Коферментами органического происхождения являются витамины, их производные. Например, коферментом дегидрогеназ являются никотинамидадениндинуклеотид или никотинамидадениндинуклеотид-фосфат, сокращенно НАД⁺ или НАДФ⁺. В их состав входит витамин В₅ (никотинамид).

Ферменты обладают рядом свойств, из которых мы рассмотрим следующие: термолабильность, специфичность и зависимость от реакции среды (рН).

Опыт № 1. Влияние температуры на активность ферментов

Активность ферментов зависит от температуры, при которой протекает реакция. Высокая температура порядка 70°C и выше инактивирует ферменты вследствие их денатурации. При понижении тем-

температуры каталитическая активность ферментов уменьшается, а при отрицательных ее показателях (-60°C) приостанавливается. Но это явление обратимое, так как при повышении температуры их действие восстанавливается.

Оптимальной для действия ферментов является температура тела сельскохозяйственных животных ($37-40^{\circ}\text{C}$).

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Воронка. Водяная баня или термостат. Емкость со льдом. Крахмал 1%-ый раствор. Раствор Люголя.

В обычную или градуированную пробирку, снабженную воронкой, собирают слюну, разбавляют ее примерно в 8-10 раз дистиллированной водой и проводят с ней ряд опытов. Слюна в данном случае служит источником амилитического фермента амилазы.

В три пробирки вносят по 10 капель разбавленной слюны и помещают первую в кипящую воду, вторую - в водяную баню или термостат при температуре 38°C , третью ставят на лед. Через 5-7 минут во все пробирки добавляют по 10 капель раствора крахмала и замечают время. Через 10-15 минут пробирки ставят в штатив и добавляют по 1-2 капли раствора Люголя. Отмечают, где произошел гидролиз крахмала (об этом судят по отсутствию синего окрашивания). Полученные результаты (окраска при добавлении раствора Люголя) заносят в таблицу.

Фермент	Температура, $^{\circ}\text{C}$		
	0	37	100
Амилаза			

Опыт № 2. Специфичность действия ферментов

Действие ферментов характеризуется высокой специфичностью.

Они могут действовать только на один определенный субстрат, иногда на группу структурно-подобных субстратов, катализируют реакции только одного типа. Пределы специфичности у разных ферментов не одинаковые. Одни ферменты отличаются относительной специфичностью, другие абсолютной, третьи стереохимической. Последние действуют на один из стереоизомеров какого-либо вещества.

Специфичность действия фермента зависит от его белкового компонента, т.е. от апофермента.

Для изучения специфичности сахаразы и амилазы можно воспользоваться тем, что при гидролизе их субстратов (сахарозы и крахмала) образуются соединения, восстанавливающие металлы, т.е. дающие реакции Троммера, Фелинга и др. При нагревании глюкозы с реактивом Фелинга образуется кирпично-красный осадок закиси меди Cu_2O , а глюкоза окисляется в глюконовую кислоту. Крахмал и сахароза реакцию Фелинга не дают.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Водяная баня (термостат). Сахароза, 1%-ый раствор. Крахмал, 1%-ый раствор. Сахароза - 20%-ый раствор дрожжей. Реактив Фелинга.

Ход работы

А. Специфичность амилазы

Берут две пробирки и вносят в одну 10 капель раствора крахмала, во вторую - 10 капель раствора сахарозы. В обе пробирки добавляют по 5 капель разведенной слюны и помещают их в водяную баню или термостат при 38°C . Через 15 минут пробирки вынимают и добавляют в каждую по 5 капель реактива Фелинга. Нагревают пробирки в пламени горелки и отмечают результат.

Б. Специфичность сахаразы

Берут две пробирки и вносят в первую 10 капель раствора крахмала, во вторую - 10 капель раствора сахарозы. В обе пробирки добавляют по 5 капель раствора сахаразы. Помещают пробирки в термостат при $t=38^{\circ}\text{C}$ на 15 минут. По истечении времени вынимают пробирки и проводят с ними реакцию Фелинга.

Полученные результаты заносят в таблицу.

Ферменты	Субстрат	
	крахмал	сахароза
Амилаза		
Сахароза		

Опыт № 3. Влияние реакции среды на активность амилазы слюны

Каталитическая активность ферментов проявляется в максимальной степени при определенной величине рН. При этом каждый фермент наиболее активен в узком пределе значений рН. Например, оптимальное значение рН для пепсина - 1,5-2,5, для амилазы - 6,8-7,0. Смещение реакции среды выше или ниже соответствующих предельных ее показателей ведет к снижению или прекращению действия ферментов. Это связано с тем, что ферменты содержат различные ионизирующие группы, состояние которых обусловлено определенными показателями рН. Следовательно, при изменении величины рН меняется электрический заряд молекулы фермента, активность же его определяется соотношением и распределением центров электрических зарядов.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Водяная баня или термостат. Крахмал, 1%-ый раствор. Соляная кислота, 0,5 н. раствор. Едкая щелочь, 0,5 н. раствор. Дистиллированная вода.

Ход работы. В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл раствора соляной кислоты, во вторую - 1 мл раствора едкой щелочи, а в третью - 1 мл дистиллированной воды. Все пробирки помещают в термостат при $t=38^{\circ}\text{C}$. Через 5 минут к ним прибавляют по 5-10 капель разведенной слюны. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и смесь ставят в термостат. По истечении 15 минут в пробирки прибавляют по капле 1%-го раствора йода. Наблюдают, в какой из пробирок наступает гидролиз крахмала.

Лабораторное занятие № 7 (2 часа) Тема: Классификация ферментов

Цель занятия: ознакомиться с основными принципами классификации ферментов.

Современная классификация ферментов была разработана и утверждена в 1961 г. Комиссией по ферментам Международного биохимического союза. Необходимость систематики номенклатуры диктовалась, прежде всего, стремительным ростом числа вновь открываемых ферментов, которым разные исследователи присваивали названия по своему усмотрению. Более того, одному и тому же ферменту часто давали два или несколько названий, что вносило путаницу в номенклатуру. Некоторые названия ферментов вообще не отражали тип катализируемой реакции.

Комиссией были рассмотрены 3 принципа, которые могли служить основой для классификации ферментов и их обозначения. В основу принятой классификации положен третий принцип - тип катализируемой реакции в сочетании с названием субстрата (субстратов), который является специфичным для действия любого фермента. Этот принцип логично использовать в качестве основы для классификации и номенклатуры ферментов.

Согласно Международной классификации, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых несколько подклассов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы).

Международная классификация ферментов

№ п/п	Класс	Тип катализируемой реакции
1	2	3
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)

Продолжение таблицы

1	2	3
4	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6	Лигазы (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей С—С, С—О, С—S и С—N, сопряженных с разрывом пиродифосфатной связи АТФ

Оксидоредуктазы. К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие с участием двух субстратов окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза». Например, лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза для лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

Различают следующие основные оксидоредуктазы: аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород; анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород; цитохромы, катализирующие перенос только электронов. К этому классу относят также гемсодержащие ферменты каталазу и пероксидазу, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

Трансферазы. К классу трансфераз относят ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и радикалов. Наименование их составляется по форме «донор: транспортируемая группа - трансфераза».

Различают трансферазы, катализирующие перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Например: метил- и формилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминоксидотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

Гидролазы. В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их состав-

ляют по форме «субстрат-гидролаза». К ним относятся: эстеразы - ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров; гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей; фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей; амидазы, ускоряющие разрыв амидных связей, отличных от пептидных, и др.

Лиазы. К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей С—О, С—С, С—N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту разрыва двойной связи. Ферменты обозначают термином «субстратлиазы». Например, фумарат-гидратаза катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбоксилиазы), амидин-лиазы и др.

Изомеразы. К классу изомераз относят ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических и геометрических изомеров. Систематическое название их составляют с учетом типа реакции: «субстрат-цистранизомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название «мутаза».

К этому же классу относят рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты, углеводы и их производные; внутримолекулярные оксидоредуктазы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз; внутримолекулярные трансферазы, переносящие ацильные, фосфорильные и другие группы, и т.д.

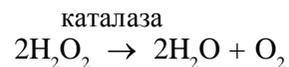
Лигазы (синтетазы). К классу лигаз относят ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ.

Как известно, значительная часть реакций окисления в организме человека и животных осуществляется путем отнятия от окисляемого вещества водорода (т.е. протонов и электронов) и передачи их на кислород (Гамаюрова В.С., 2010).

Опыт № 1. Определение активности каталазы крови

Некоторая часть водорода, передаваемого по системе окислительно-восстановительных ферментов, может непосредственно соеди-

няться с кислородом, образуя перекись водорода - ядовитого соединения для клеток. Фермент каталаза, расщепляя перекись водорода, предохраняет клетки от вредного действия этого соединения:



Особенно чувствителен к окисляющему действию перекиси водорода гемоглобин, поэтому каталаза эритроцитов имеет особое значение в организме.

Количество каталазы резко повышается у больных пернициозной анемией. Снижение активности каталазы крови наблюдается у больных, страдающих вирусным гепатитом, злокачественными новообразованиями, брюшным тифом, малярией, туберкулезом легких, а также лейкозе и тейлериозе крупного рогатого скота. Изменение активности каталазы происходит во время беременности: в начальный период - снижение, в последние месяцы - повышение.

Показателем активности фермента является выделение молекулярного кислорода, образующегося при расщеплении перекиси водорода каталазой крови.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Пипетки. Спиртовки. Реактивы. Кровь цельная цитратная. Перекиси водорода, 3%-ый раствор.*

Ход работы. Берут две пробирки и наливают в каждую по 2-3 мл дистиллированной воды, затем добавляют по 1-2 капли крови, перемешивают. Содержимое пробирки 1 (контроль) нагревают до кипения с целью разрушения фермента. В пробирке 2 (опытная) фермент активен. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора перекиси водорода. В пробирке 2 наблюдают выделение кислорода.

Опыт № 2. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Тирозиназа - фермент, окисляющий аминокислоту тирозин в темный пигмент.

Ход работы. Берут 2 среза клубней картофеля - сырой и вареный, на каждый срез наносят по 1 капле гваяковой настойки и отмечают результат. Тирозиназа, содержащаяся в невареном картофеле,

окисляет гваяковую смоляную кислоту в синий озонид. В вареном клубне ферменты разрушены, поэтому на срезе вареного клубня озонид не образуется.

Контрольные вопросы

1. Дать определение ферментов и объяснить их значение для животного организма.
2. На какие классы делятся ферменты?
3. Каков механизм действия ферментов?
4. Как влияет температура на активность ферментов?
5. Как влияет pH на активность ферментов?
6. Специфичность действия ферментов.
7. Какие вещества называются активаторами и ингибиторами ферментов?

Лабораторное занятие № 8 (2 часа)

Тема: Качественные реакции на некоторые гормоны

Цель занятия: ознакомиться с качественными реакциями на некоторые гормоны.

Гормоны – биологически активные вещества, вырабатываемые железами внутренней секреции, выделяемые в кровь и оказывающие возбуждающее действие на организм. К железам внутренней секреции (они же эндокринные железы) относят щитовидную, паращитовидные железы, надпочечники, поджелудочную железу, половые железы, гипофиз. Деятельность эндокринных желез регулируется центральной нервной системой.

По своей химической природе гормоны подразделяют на следующие группы:

1. Стероидные гормоны. К этой группе относят гормоны, являющиеся производными стероидов. Они синтезируются в половых железах и корковом слое надпочечников.

2. Пептидные и белковые гормоны. Они вырабатываются гипофизом, поджелудочной железой, паращитовидными железами.

3. Гормоны - производные аминокислот. К этой группе относятся гормоны щитовидной железы, мозгового слоя надпочечников.

4. Эйкозаноиды, являющиеся производными арахидоновой кислоты.

Нарушение функции той или иной железы может служить причиной серьезных заболеваний или даже гибели животного. Недостаточное образование гормонов железой рассматривают как гипофункцию железы, а избыточное выделение гормонов – гиперфункцию. При этом следует отметить, что отдельные эндокринные железы через свои гормоны оказывают влияние не только на функцию различных органов и тканей тела, но и на деятельность других желез внутренней секреции и на нервную систему. Таким образом, нарушение функции одной из желез часто отражается на деятельности других.

Опыт № 1. Цветные реакции на адреналин

Надпочечники состоят из коркового и мозгового слоев. Последний вырабатывает гормон адреналин, являющийся по своей химической

природе производным пирокатехина. Адреналин усиливает сердечную деятельность, резко сужает периферические кровеносные сосуды, повышает артериальное давление. Этот гормон оказывает выраженное влияние на углеводный обмен, вызывая гипергликемию и глюкозурию вследствие усиленного распада гликогена.

Действие адреналина в организме является кратковременным, т.к. он разрушается под влиянием аминоксидазы.

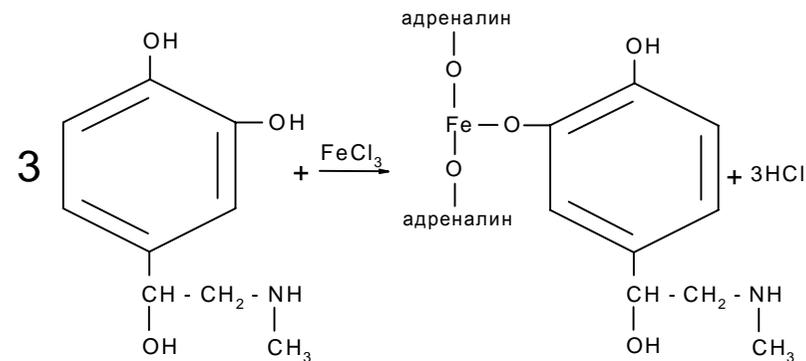
Адреналин образуется в организме из аминокислоты тирозина при участии метионина. При образовании адреналина кольцо тирозина превращается в пирокатехиновое кольцо. Последнее легко окисляется, образуя различные цветные соединения. Это свойство используется во многих цветных реакциях на адреналин.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Хлорное железо, 1%-ый раствор. Аммиак концентрированный. Калий двуххромовокислый, 2,5%-ый раствор. Адреналин, 0,01%-ый раствор (в ампулах). Йод, 0,1 н. раствор.

А. Реакция с хлорным железом

Пирокатехиновое кольцо адреналина образует с хлорным железом окрашенное комплексное соединение.

Ход работы. К 3 каплям раствора адреналина прибавляют 1 каплю 1%-го раствора хлорного железа. Содержимое пробирки окрашивается в зеленый цвет, характерный для катехинов. При добавлении 1 капли концентрированного раствора окраска переходит в красную, а затем в коричневую.



Б. Реакция с двухромовокислым калием

Ход работы. Берут две пробирки, вносят в первую (контрольная) 3 капли воды, а во вторую (опытная) - 3 капли раствора адреналина. В каждую пробирку добавляют по 1 капле раствора двухромовокислого калия – в пробирке с адреналином жидкость окрашивается в коричневый цвет.

В. Проба с йодом

Ход работы. В пробирку вносят 1 мл водного раствора адреналина и добавляют каплю 0,1 н раствора йода. Смесь нагревают над пламенем спиртовки. Наблюдают розовое и красное окрашивание содержимого пробирки в результате окисления адреналина.

Опыт № 2. Цветные реакции на инсулин

Инсулин - гормон, вырабатываемый поджелудочной железой (островками Соболева–Лангерганса).

По своей природе это белок, поэтому он дает универсальную биуретовую реакцию. А присутствие в нем серосодержащих аминокислот, в частности, цистина, подтверждается реакцией Фоля.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Раствор инсулина (в ампулах). Гидроксид натрия, 10%-ый и 30%-ый растворы. Сульфат меди, 1%-ый раствор. Свинец уксуснокислый, 5%-ый раствор.*

А. Биуретовая реакция

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель инсулина, добавляют 5 капель 10%-го раствора едкого натра и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Появляется фиолетовое окрашивание.

Б. Реакция Фоля

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель инсулина, добавляют 3 капли 30%-го раствора едкого натра и 1 каплю 5%-го раствора уксусно-кислого свинца, нагревают пробирку над спиртовкой до образования темного осадка сернистого свинца.

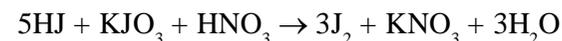
Опыт № 3. Открытие йода в тиреоидине

Для лечения гипопункции щитовидной железы применяют препараты, полученные из щитовидной железы животных. Одним из них является тиреоидин. Наличие в тиреоидине йода определяется следующим образом.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Тиреоидин (в таблетках). Азотная кислота, концентрированная. Йодновато-кислый калий, 1%-ный раствор. Хлороформ.*

Ход работы. В пробирку вносят $\frac{1}{2}$ таблетки тиреоидина и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку нагревают 1-2 минуты для проведения гидролиза. Если при этом жидкость вспенивается, нагревание прекращают. По истечении указанного времени в пробирку добавляют 20 капель йодноватокислого калия, перемешивают и охлаждают. Йодноватокислый калий окисляет освобождающуюся при гидролизе йодноватоводородную кислоту в свободный йод.

В пробирку добавляют 10-15 капель хлороформа, встряхивают. Раствор йода в хлороформе окрашивается в фиолетовый цвет.



Лабораторное занятие № 9 (2 часа)

Тема: Химия белков

Цель занятия: ознакомиться с методами обнаружения белков в биологических средах.

Белки - высокомолекулярные биологические полимеры, состоящие из остатков аминокислот. В зависимости от молекулярной массы различают пептиды и белки. Пептиды имеют меньшую молекулярную массу, чем белки. Функции белков в природе универсальны. Среди них различают ферменты, гормоны, структурные, транспортные, двигательные, запасные белки. Названию белки соответствует термин протеины. Пептиды отличаются более узким спектром функций. Наиболее характерна для пептидов регуляторная функция (гормоны, антибиотики, токсины).

Обширный класс белков разделяют на две большие группы: простые белки, или протеины, и сложные белки, или протеиды. Простыми называют те белки, которые при гидролизе распадаются только на аминокислоты. К ним относят альбумины, глобулины, гистоны, протамины, глутелины, проламины.

Многообразные пептиды и белки состоят из остатков α -аминокислот. α -аминокислоты - гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно аминогруппу и карбоксильную группу у одного и того же атома углерода.

Общее число встречающихся в природе аминокислот достигает 200. Известны 20 наиболее важных α -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках.

Основным источником α -аминокислот для живого организма служат пищевые белки. Многие α -аминокислоты синтезируются в организме, некоторые же необходимые для синтеза белков α -аминокислоты не синтезируются в организме и должны поступать извне. Такие аминокислоты называются незаменимыми.

α -аминокислоты классифицируют несколькими способами в зависимости от признака, положенного в основу их деления на группы. Одним из классификационных признаков служит химическая природа радикала R. По этому признаку α -аминокислоты делятся на алифатические и ароматические.

Реакции на белки

Все реакции на белки основаны на наличии в них определенных химических групп, связей и на физико-химических свойствах.

Реакции на белки можно разделить на две самостоятельные группы: реакции осаждения белков и цветные реакции.

Цветные реакции на белки

Качественное обнаружение белков основано на двух типах реакции: а) универсальные - по пептидным связям белковой молекулы (биуретовая, нингидриновая); б) специфические - обусловленные наличием только определенных аминокислот в молекуле белка (ксантопротеиновая, Фоля, Адамкевича и др.).

Опыт № 1. Биуретовая реакция

В щелочном растворе при добавлении сульфата меди белки, полипептиды, пептиды образуют комплексные соли, окрашенные в фиолетовый цвет. Эта реакция обусловлена наличием пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с серноокислой медью хелатные соединения.

Название «биуретовая реакция» происходит от производного мочевины - биурета, который дает эту реакцию в соответствующих условиях. Группа, образующая пептидную связь (-CO-NH-), в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме.

При избытке щелочи происходит диссоциация ОН группы, появляется отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью, возникает солеобразная связь. Кроме этого, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путем использования их неподеленных электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен.

Интенсивность окраски комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

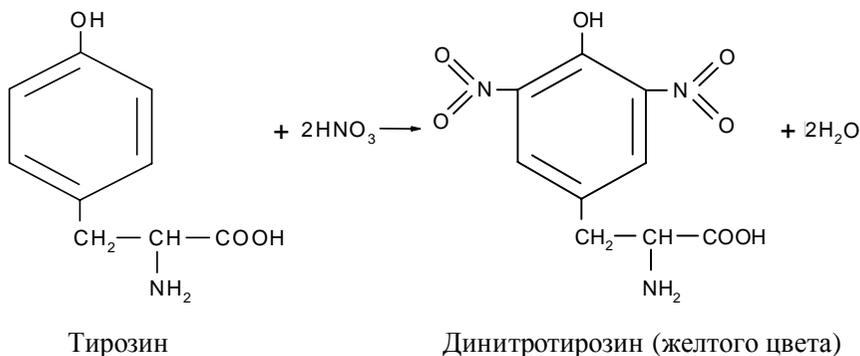
Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Яичный белок, 1%-ый раствор. Гидроксид натрия, 10%-ый раствор. Сульфат меди, 1%-ый раствор. Желатин, 1%-ый раствор.*

Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель 1% раствора яичного белка, в другую - 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 10%-го раствора едкого натра и по 1 капле 1%-го раствора сульфата меди. В той и в другой пробирке появляется красно-фиолетовое (или сине-фиолетовое окрашивание).

Опыт № 2. Ксантопротеиновая реакция

Ксантопротеиновая реакция дает возможность обнаружить присутствие в молекуле белка циклических аминокислот - фенилаланина, тирозина и триптофана. Реакцию обуславливают находящиеся в молекуле белков названные аминокислоты, ароматические кольца которых подвергаются нитрованию, в результате образуются нитропроизводные белков, окрашенные в желтый цвет (греч. «ксантос» - желтый).

При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты белок сначала выпадает в осадок, а затем при нагревании растворяется и жидкость окрашивается в желтый цвет.



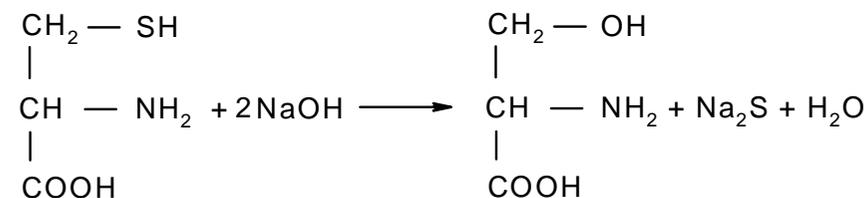
Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Спиртовка. Белок яичный, 1%-й раствор. Желатин, 1%-ый раствор. Азотная кислота, концентрированная.

Ход работы. В одну пробирку наливают 5 капель 1% раствора яичного белка, во вторую - 5 капель 1% раствора желатина. В обе пробирки добавляют по 3 капли конц. азотной кислоты и (осторожно!) нагревают. В пробирке с яичным белком жидкость окрашивает-

ся в лимонно-желтый цвет, а в пробирке с желатином появляется едва заметное бледно-желтое окрашивание (обусловленное незначительной примесью других белков), так как желатин почти не содержит ароматических аминокислот.

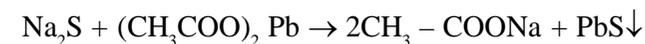
Опыт № 3. Реакция Фолля

В состав молекул большинства белков входят серосодержащие аминокислоты - цистеин, метионин, цистин. При нагревании с крепкой щелочью от этих аминокислот отщепляется сера в виде сернокислого натрия, который обнаруживают в реакции с ацетатом свинца.



Цистеин

Серин



Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Спиртовка. Гидроксид натрия, 20%-й раствор. Белок яйца, неразбавленный. Свинец уксуснокислый, 5%-ый раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 1-2 мл белка и добавляют равный объем гидроксида натрия. Нагревают до кипения и прибавляют 1-2 капли уксуснокислого свинца. Наблюдается постепенное потемнение раствора ввиду образования осадка сернистого свинца.

Лабораторное занятие № 10 (2 часа)

Тема: Реакции осаждения белков

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из раствора. Это осаждение объясняется явлениями дегидратации коллоидных частиц белка, подавлением заряда, образованием солей из белка и кислот и др. Избытком минеральных кислот (за исключением азотной), а также при их длительном воздействии выпавший осадок денатурированного белка растворяется.

Из растворов белки могут осаждаться также и органическими кислотами, при этом разные кислоты действуют на белок неодинаково. Трихлоруксусная кислота (CCl_3COOH) и сульфосалициловая кислота являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок и поэтому широко применяются в исследовательской практике для диагностики белка в биологических материалах.

Опыт № 1. Осаждение белков минеральными кислотами

Реакция осаждения белка азотной кислотой используется при клинических исследованиях мочи на присутствие и количественное содержание в ней белка.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Белок яйца, 1%-ый раствор. Соляная кислота, концентрированная. Азотная кислота, концентрированная.*

Ход работы. В две пробирки наливают по 15-20 капель конц. соляной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирки под углом 45° , осторожно по стенке пробирки наслаивают на кислоту равный объем белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде тонкой пленки. Пробирки осторожно встряхивают. В первой пробирке осадок растворяется, а в пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает.

Опыт № 2. Осаждение белков органическими кислотами

Осаждение белков с помощью ТХУ в конечной концентрации 2,5-5% применяется для полного удаления белков из биологических

жидкостей или гомогенатов тканей, так как эта кислота осаждает только белки, а продукты их распада (обмена) - мочевины, мочевая кислота, амиды аминокислот, аминокислоты, низкомолекулярные пептиды и др. - остаются в растворе. Это имеет важное значение для раздельного определения белкового и небелкового (остаточного) азота в тканях.

Механизм осаждения белков органическими кислотами связан с дегидратацией белковой молекулы и снятием заряда.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Белок яйца, 1%-ый раствор. Трихлоруксусная кислота, 5%-ый раствор. Сульфосалициловая кислота, 20%-ый раствор.*

Ход работы. В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора белка, в одну пробирку добавляют 1-2 капли 10% раствора сульфосалициловой кислоты, в другую 1-2 капли 10% раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирках образуется осадок белка.

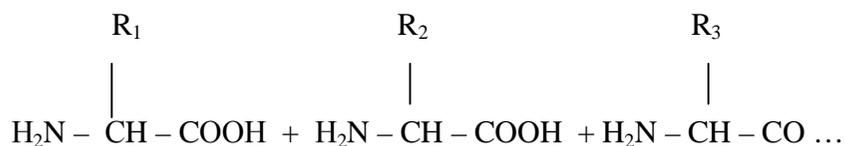
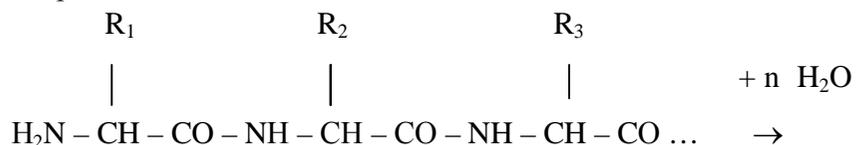
Лабораторное занятие № 11 (2 часа)

Тема: Обмен белков

Цель занятия: изучить особенности ферментативного гидролиза белков.

Белки пищи без предварительного расщепления не могут усваиваться организмом. Примерно 95-97% белков пищи всасываются в виде свободных аминокислот. Следовательно, ферментативный аппарат желудочно-кишечного тракта осуществляет поэтапное, строго избирательное расщепление пептидных связей белковой молекулы вплоть до свободных аминокислот.

Гидролиз химически сводится к разрыву пептидной связи - CO-NH - белковой молекулы с присоединением элементов воды к продуктам распада:



Ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей, относятся к классу гидролаз и часто называются пептидазами. Известны две группы пептидаз: экзопептидазы, катализирующие разрыв концевой пептидной связи, и эндопептидазы, гидролизующие пептидные связи внутри пептидной цепи.

Переваривание белков в желудке происходит под действием пепсина (эндопептидазы). Благодаря наличию в желудочном соке свободной соляной кислоты для действия пепсина создается оптимальная реакция среды - pH 1,5-2,5. Пепсин выделяется в неактивной форме в виде пепсиногена и активируется соляной кислотой. Пепсин

гидролизует преимущественно пептидные связи, образованные аминоклассами ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин). В результате его действия образуется смесь полипептидов.

Дальнейшее превращение белков пищи осуществляется в тонком кишечнике, где они подвергаются действию ферментов панкреатического и кишечного соков. В поджелудочной железе вырабатываются три белковых фермента: трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза. Трипсин и химотрипсин выделяются в виде неактивных проферментов – трипсиногена и химотрипсиногена. Трипсиноген активируется энтерокиназой (фермент кишечного сока), а химотрипсиноген – активным трипсином.

Первые два фермента относятся к эндопептидазам, а карбоксипептидаза и кишечная аминопептидаза – к экзопептидазам. Оптимум pH их действия составляет 7,2–7,8.

Экзопептидазы отщепляют по одной аминокислоте от полипептида и в конечном итоге остаются дипептиды, на которые действуют специфические дипептидазы. При этом образуются свободные аминокислоты, которые затем всасываются в кровь.

Всасавшиеся аминокислоты в первую очередь используются как строительный материал для синтеза специфических тканевых белков, ферментов и биологически активных соединений. Некоторое количество аминокислот подлежит дальнейшей деструкции в биоэнергетических целях при участии реакций дезаминирования, декарбоксилирования и др. Количество аминокислот, подвергающихся распаду, зависит как от характера питания, так и от состояния организма.

В зависимости от дальнейшего метаболизма продуктов их расщепления, аминокислоты подразделяются на: 1) гликогенные - те, из которых образуется пируват или оксалоацетат, способные давать фосфоенолпируват для гликогена; 2) кетогенные - те, которые способны превращаться в ацетил - CoA или ацетоацетил - CoA.

Опыт № 1. Переваривание белка под действием желудочного сока

В желудке под действием желудочного сока, содержащего пепсин и соляную кислоту, белки гидролитически расщепляются до альбумоз и пептонов (полипептидов), которые могут быть обнаружены с помощью биуретовой реакции. В щелочной среде и при отсутствии

пепсина расщепление белка не происходит. Действие желудочного сока на белок можно наблюдать на примере расщепления фибрина.

Ход работы. Берут 3 пробирки и в каждую наливают по 1 мл нативного желудочного сока. Затем желудочный сок в пробирке 1 кипятят на газовой горелке для инактивации пепсина и охлаждают холодной водой. В пробирку 2 добавляют 3 капли 10% раствора NaHCO_3 до слабощелочной реакции на лакмус (нейтрализация). Содержимое пробирки 3 оставляют без изменения. В каждую пробирку помещают по 100 мг фибрина и ставят в термостат при 38°C на 30 минут. После инкубации наблюдают за изменениями фибрина и обнаруживают продукты гидролиза с помощью биуретовой реакции. Переваривание фибрина произойдет только в той пробирке, где присутствуют активный пепсин и соляная кислота. Результаты работы и выводы записывают в таблицу:

Действие желудочного сока на фибрин

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Желудочный сок	NaCO_3 10%	Биуретовая реакция
1					
2					
3					

Опыт № 2. Переваривание белка под действием ферментов поджелудочной железы

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Термостат. Водяная баня или спиртовка. Пепсин. Лакмус. Яичный белок варенный. Карбонат натрия, 10%-ый раствор. Гидроксид натрия, 10%-ый раствор. Медь сернокислая, 1%-ый раствор.

Ход работы. В каждую из 3 пробирок отмеряют по 3 мл вытяжки из поджелудочной железы, которая должна обладать слабощелочной реакцией на лакмус. Содержимое 1 пробирки кипятят 2-3 минуты на газовой горелке и охлаждают, пробирку 2 подкисляют 15%-ным раствором уксусной кислоты до слабокислой реакции на лакмус, пробирку 3 оставляют без изменений. Во все три пробирки добавляют по 100 мг окрашенного фибрина и помещают в термостат

при $38-40^\circ\text{C}$ на 10-15 минут. Отмечают окрашивание жидкости в той пробирке, где ферменты активны и реакция среды близка к оптимальной.

Результаты работы записывают в таблицу:

Действие ферментов поджелудочной железы на фибрин

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция среды	Окраска жидкости
1				
2				
3				

Опыт № 3. Переаминирование

Перенос аминокислоты с аминокислоты на кетокислоту называется переаминированием. Это, происходит, например, при взаимодействии α -кетоглутаровой кислоты с аланином.

В результате этой реакции образуются глутаминовая и пировиноградная кислоты. Процессы переаминирования ускоряются ферментами трансаминазами, или аминотрансферазами. В опыте, проводимом *in vitro*-образование пировиноградной кислоты при переаминировании можно обнаружить по ее способности давать фенилгидразон при обработке раствором динитрофенилгидрозина. Фенилгидразон экстрагируют из раствора толуолом. Экстракт динитрофенилгидразина на пировиноградной кислоты окрашивается при добавлении спиртового раствора едкого кали в красный цвет.

Оборудование и реактивы. Центрифуга, центрифужные весы и центрифужные пробирки. Водяная баня с термометром. Пипетки на 1 мл. Субстратная смесь, содержащая кетоглутарат и аланин. Трихлоруксусная кислота, 50%-ый раствор. Толуол. Едкое кали, 2,5%-ный раствор в спирте. 2,4 - Динитрофенилгидразин, насыщенный в соляной кислоте.

Исследуемый материал: сыворотка крови или тканевый гомогенат.

Ход работы. В 2 каплях сыворотки крови или гомогената в качестве источника ферментов. В пробирку 1 (контрольная) прибавляют 1 каплю раствора трихлоруксусной кислоты для прекращения дей-

ствия фермента и встряхивают содержимое. После этого в каждую пробирку добавляют по 5 капель субстратной смеси и помещают пробирку в водяную баню на 15-20 минут при 37°C. Во время инкубации в пробирке 2 (без трихлоруксусной кислоты) происходит переаминирование, в результате чего образуется пировиноградная кислота. По окончании инкубации в эту пробирку добавляют 1 каплю трихлоруксусной кислоты.

Затем в обе пробирки вносят по 5 капель раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Пробирки встряхивают и оставляют стоять на 5 минут. Для экстракции образовавшегося фалингидразина пировиноградной кислоты в каждую пробирку вносят по 20 капель толуола, закрывают пробирки пробками и перемешивают содержимое. Толуольный экстракт отделяют центрифугированием в течение 5 минут при 2000 об/мин. После центрифугирования содержимое пробирок делится на слои - верхний слой представлен толуольным экстрактом. Пипеткой на 1 мл переносят по 3-4 капли толуольного экстракта из каждой пробирки в сухие микропробирки. Добавляют в каждую микропробирку по 5 капель спиртового раствора едкого кали, встряхивают и отмечают результат. Присутствие пировиноградной кислоты, образовавшейся при переаминировании узнается по красному окрашиванию. В контрольной пробирке, где аминотрансфераза была инактивирована трихлоруксусной кислотой до инкубации с субстратной смесью, окраска значительно слабее.

Лабораторное занятие № 12 (2 часа)

Тема: Химия нуклеиновых кислот

Цель занятия: изучить химический состав нуклеопротеидов.

Нуклеиновые кислоты играют главную роль в передаче наследственной информации и управлении процессом биосинтеза белка. Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых колеблется в пределах от 25 тыс. до 1 млн. и более.

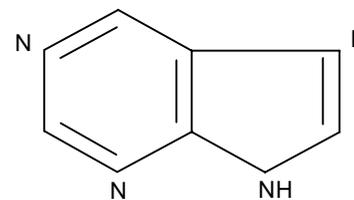
Полимерные цепи нуклеиновых кислот построены из мономерных единиц - нуклеотидов, поэтому нуклеиновые кислоты называют полинуклеотидами. Мононуклеотиды состоят из гетероциклического основания, углеводного остатка и фосфорной кислоты.

Углеводными компонентами служат пентозы - D-рибоза и 2-дезоксид-рибоза. Поэтому нуклеиновые кислоты делятся на рибонуклеиновые (РНК), содержащие рибозу, и дезоксирибонуклеиновые (ДНК), содержащие дезоксирибозу.

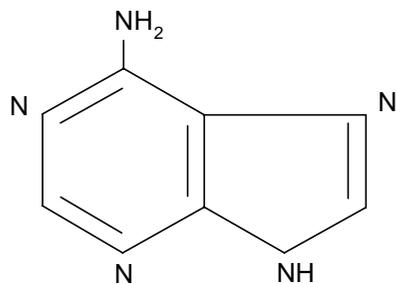
Дезоксирибонуклеиновая кислота входит в состав хромосом ядра клеток, а рибонуклеиновая кислота существует в виде трех типов (информационная, транспортная, рибосомная), которые сосредоточены как в ядре, так и цитоплазме. ДНК - двухцепочечный нуклеотид, а РНК - одноцепочечный.

Нуклеиновые основания различают пуриновые и пиримидиновые.

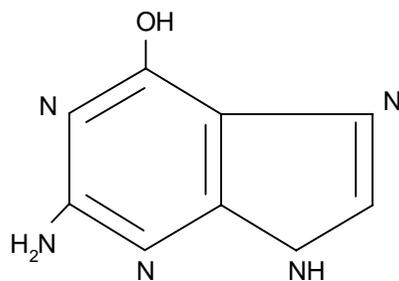
Пуриновые основания рассматривают как производные пурина. В состав нуклеиновых кислот входит два пуриновых основания - аденин и гуанин:



Пури́н



Аденин
(6 - аминопурин)



Гуанин
(2 - амино - 6 - гидроксипурин)

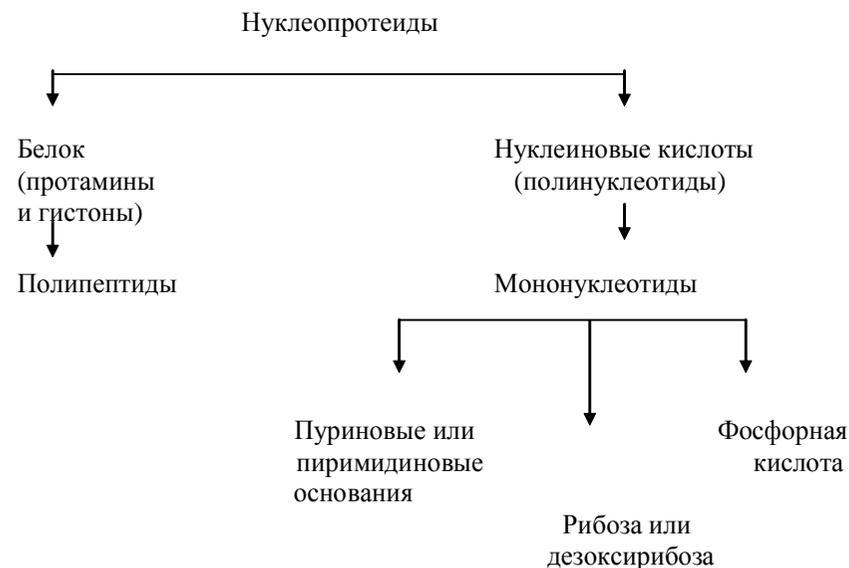
Нуклеиновые кислоты различаются входящими в них гетероциклическими основаниями. Урацил входит только в РНК, а тимин - в ДНК:

РНК	ДНК
урацил	тимин
цитозин	цитозин
аденин	аденин
гуанин	гуанин

Соединения нуклеиновых оснований с рибозой или дезоксирибозой называют нуклеозидами. Например,
 цитозин + рибоза → цитидин,
 аденин + рибоза → аденозин,
 аденин + дезоксирибоза → дезоксиаденозин.

Нуклеотидами называют фосфаты нуклеозидов. Их названия строятся путем добавления суффикса - иловая кислота к названию остатка пиримидинового основания, например, 5¹ - уридилловая кислота, или пуринового основания, например, 3¹ - аденилловая кислота. Нуклеотиды имеют большое значение не только как строительный материал для нуклеиновых кислот. Они участвуют в биохимических процессах и особенно важны в роли коферментов.

При кипячении нуклеопротеидов с разбавленными кислотами происходит их гидролитический распад: сначала отщепляется белок, а нуклеиновые кислоты деполимеризуются. Затем гидролизуются мононуклеотиды, отщепляя углевод пентозу и фосфорную кислоту. Схематично данный процесс можно представить следующим образом:



Опыт № 1. Гидролиз нуклеопротеидов дрожжей

Дрожжи богаты нуклеопротеидами рибозного типа. Для изучения химического состава нуклеопротеидов проводят гидролиз дрожжей, которые берут в качестве источника, богатого нуклеопротеидами и открывают продукты гидролиза: полипептиды, пуриновые основания, углеводный компонент (рибозу и дезоксирибозу) и фосфорную кислоту.

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Дрожжи пекарские или свежие. Серная кислота, 10%-ый раствор. Фильтр бумажный. Воронка.

Ход работы. В большую широкогорлую пробирку (15x1,5 см) помещают 0,5 г свежих или 0,1 г сухих пекарских дрожжей, приливают 4 мл 10% раствора H_2SO_4 , закрывают пробкой, в которую вставлена в качестве холодильника трубка длиной 25-30 см, взбалтывают и закрепляют.

Гидролиз проводят при нагревании около часа, считая с момента закипания. После окончания гидролиза жидкость охлаждают и затем фильтруют через складчатый фильтр.

Опыт № 2. Биуретовая реакция на полипептиды

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Гидролизат дрожжей. Гидроксид натрия, 10%-ый раствор. Сульфат меди, 1%-ый раствор.

Ход работы. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель раствора NaOH и 1-2 капли 1% раствора CuSO_4 до появления синевато-фиолетового окрашивания, что свидетельствует о присутствии в пробе полипептидов как продуктов гидролиза белковой части нуклеопротеидов.

Опыт № 3. Открытие пуриновых оснований

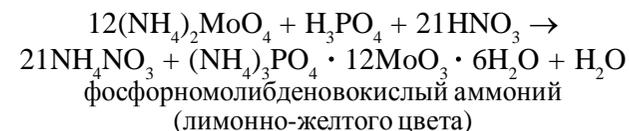
Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Гидролизат дрожжей. Аммиак, конц. раствор. Азотнокислое серебро, 1%-ый раствор.

Ход работы. К 10 каплям гидролизата добавляют 1 каплю конц. раствора аммиака для нейтрализации и 5 капель 1%-ного раствора AgNO_3 . Постепенно выпадает рыхлый осадок бурого цвета, обусловленный образованием серебряных соединений пуриновых оснований.

Опыт № 4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Гидролизат дрожжей. Молибденовый реактив.

Ход работы. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель молибденового реактива, представляющего собой раствор молибденовокилового аммония в азотной кислоте и кипятят. При охлаждении пробирки под струей холодной водопроводной воды выпадает кристаллический осадок лимонно-желтого цвета, обусловленный образованием фосфорно-молибденовокислого аммония.



Контрольные вопросы

1. Что из себя представляют белки? Их природа и классификация.
2. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте животных.
3. Пути расщепления аминокислот (дезаминирование, трансминирование, декарбоксилирование).
4. Обезвреживание аммиака в организме (синтез мочевины, глутамина, аспарагина).
5. В чем заключается отличие сложных белков от простых?

Лабораторное занятие № 13 (2 часа)

Тема: Обмен сложных белков

Цель занятия: изучение продуктов распада сложных белков.

Нуклеопротеиды

Нуклеопротеиды - сложные белки, включающие белки и нуклеиновые кислоты. Примерами нуклеопротеиновых комплексов являются рибосомы и вирусы. Последние представляют собой комплексы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и большое число белковых молекул. Важнейшими компонентами нуклеиновых кислот являются пуриновые основания. Мы изучим конечный продукт обмена пуриновых оснований - мочевую кислоту.

У большинства приматов (в том числе человека), птиц, некоторых рептилий и большинства насекомых мочевая кислота, образующаяся из аденина и гуанина, не подвергается дальнейшим изменениям и выводится с мочой.

Мочевая кислота образует труднорастворимые соли со многими катионами, в частности с катионами серебра. При добавлении к моче аммиака и азотнокислого серебра выпадает осадок мочекислового серебра. Хлориды не мешают этой реакции, так как они не осаждаются азотнокислым серебром в присутствии аммиака.

Из цветных реакций на мочевую кислоту необходимо знать мурекидную реакцию. Кристаллы мочевой кислоты превращаются при обработке их азотной кислотой и аммиаком в мурекид - соединение, окрашенное в пурпурный цвет. Название мурекид произошло от слова мурекс, так называли моллюска, из которого в древности добывали пурпурную краску.

Опыт № 1. Мурекидная реакция

Приборы и оборудование. Предметные стекла. Шпатель. Мочевая кислота, кристаллическая. Азотная кислота, конц. Аммиак конц., водный раствор.

Ход работы. На предметное стекло помещают шпателем несколько кристаллов мочевой кислоты и на них небольшую каплю азотной кислоты. Осторожно нагревают стекло над пламенем горелки в вытяжном шкафу. Азотная кислота испаряется и остается коричнево-красный осадок. Добавляют к осадку по каплям водный раствор аммиака до появления пурпурного окрашивания.

Хромопротеиды

Хромопротеиды - сложные белки, состоящие из простого белка типа глобулинов и окрашенных веществ. Простетическая группа хромопротеидов отличается по своему строению. Многие из них представляют собой металлопорфирины, содержащие в своем составе железо, медь и другие металлы.

Представителями хромопротеидов являются гемоглобин крови, миоглобин красных скелетных мышц, цитохромы митохондрий. В состав гемоглобина входит белок глобин и окрашенное вещество - гем.

Опыт № 2. Реакция получения гемина

Гемоглобин при нагревании в кислой среде распадается и под влиянием хлорида натрия гем превращается в гемин, атом железа которого связан с хлором. При этом железо из двухвалентного превращается в трехвалентное.

Приборы и реактивы. Предметное и покровное стекла. Иглы пункционные. Микроскоп. Хлорид натрия, кристаллический. Уксусная кислота, ледяная.

Ход работы. На предметное стекло наносят каплю крови и высушивают при температуре не выше 60°C. К подсушенной крови добавляют несколько кристаллов хлористого натрия и 1-2 капли ледяной уксусной кислоты, перемешивают, затем прикрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до начала кипения. По мере охлаждения выделяются кристаллы гемина в виде коричневых ромбоидальных табличек, которые рассматриваются под микроскопом и зарисовываются. Эта реакция может быть использована для исследования старых кровяных пятен с целью подтверждения наличия крови в объекте.

Гликопротеиды

Это сложные белки, состоящие из простых белков и простетической группы, в состав которой входят углеводы типа гомополисахаридов и гетерополисахаридов. Представителями гликопротеидов являются гепарин, гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты и т.д.

Опыт № 3. Выделение муцина из слюны

Муцины находятся в слюне, в слизи пищеварительного тракта и других органов. Муцин не растворим в воде, но хорошо растворим в щелочах и соляной кислоте. Из щелочного раствора муцин осаждается уксусной кислотой, избыток которой не растворяет муцин.

Приборы и реактивы. *Штатив с пробирками. Стеклянные палочки. Уксусная кислота, 1%-ый раствор. Гидроксид натрия, 10%-ый раствор. Соляная кислота, 0,1%-ый раствор. Сульфат меди, 1%-ый раствор. α -нафтол, 0,2%-ый раствор. Серная кислота, конц.*

Ход работы. В три пробирки собирают по 1-2 мл слюны и добавляют в каждую по каплям 15%-ный раствор уксусной кислоты до появления сгустков муцина. Осадок муцина в пробирках осторожно промывают водой, придерживая сгусток палочкой.

После промывания к сгустку муцина в первой пробирке добавляют 1 мл 10%-го раствора гидроксида натрия, размешивают и после растворения проводят биуретовую реакцию. Для этой цели добавляют еще 5-6 капель гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди. Пробирку встряхивают и наблюдают появление розовой или фиолетовой окраски.

Во вторую пробирку прибавляют 1 мл 0,1%-го раствора соляной кислоты и наблюдают растворение осадка.

В третью к сгустку муцина добавляют 5-6 капель α -нафтола, перемешивают и осторожно добавляют концентрированную серную кислоту. На границе двух слоев жидкости появляется фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена наличием в простетической группе муцина моносахаридов и их производных, которые под влиянием серной кислоты превращаются в фурфурол и оксиметилфурфурол, а последние с α -нафтолом дают окрашенные соединения.

Контрольные вопросы

1. Что такое нуклеопротеиды, из каких компонентов они состоят?
2. Что такое фосфопротеиды, с помощью какой реакции можно открыть фосфорную кислоту?
3. Что такое гликопротеиды, какие существуют качественные реакции на их углеводный компонент?
4. Где и в результате каких превращений образуются токсические продукты – фенол, крезол, индол, скатол и др.? Каким образом и где происходит их обезвреживание?
5. Как расщепляются нуклеиновые кислоты в желудочно-кишечном тракте животных?
6. Каковы конечные продукты распада гемоглобина у животных?

Лабораторное занятие № 14 (2 часа)

Тема: Химия углеводов

Цель занятия: изучить и проделать цветные реакции на крахмал.

Углеводы входят в состав клеток и тканей всех растительных, и животных организмов. В живой природе они имеют большое значение как источник энергии в метаболических процессах, структурные компоненты клеточных стенок растений (целлюлоза), бактерий (мурамин), грибов (хитин), составные компоненты жизненно важных веществ (нуклеиновые кислоты, коферменты, витамины).

По способности к гидролизу углеводы делятся на простые - моносахариды и сложные - полисахариды. Моносахариды не гидролизуются с образованием более простых углеводов. Моносахариды классифицируют с учетом двух признаков:

- природы карбонильной группы;
- длины углеродной цепи.

Моносахариды, содержащие альдегидную группу, называются альдозами, кетонную группу - кетозами. В зависимости от длины углеродной цепи (3-10 атомов) моносахариды делятся на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т.д.

Полисахариды являются высокомолекулярными соединениями, макромолекулы которых содержат сотни и тысячи моносахаридных остатков. Среди них выделяют группу олигосахаридов, имеющих относительно небольшую молекулярную массу и содержащие от 2 до 10 моносахаридных остатков.

Собственно полисахариды делят на группы:

- гомополисахариды, состоящие из остатков однородных моносахаридов;
- гетерополисахариды, состоящие из остатков разных моносахаридов.

Углеводы служат основным ингредиентом пищи млекопитающих. Общеизвестный их представитель - глюкоза - содержится в растительных соках, плодах, фруктах и особенно винограде (отсюда и название - виноградный сахар). Глюкоза является обязательным ком-

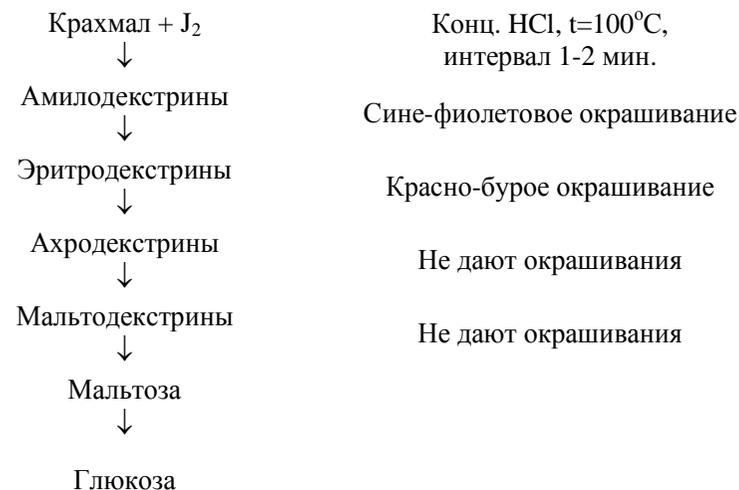
понентом крови и тканей животных и непосредственным источником энергии для клеточных реакций.

Цветные реакции на крахмал

Характерной реакцией на крахмал является появление синего окрашивания от раствора йода в иодиде калия. Йодная реакция полисахаридов, в частности крахмала – сложный процесс. Возникающая при этом окраска зависит от строения полисахаридов. В ходе реакции образуется комплексное соединение полисахарида с йодом. Этот процесс отчетливо выражен для амилозы. Для полисахаридов с разветвленными цепями, например, амилопектина и гликогена, наряду с процессом образования комплексного соединения большое значение имеет и процесс адсорбции йода по поверхности ветвистых молекул. Имеется связь между длиной боковых цепей и окраской йодной реакции.

Опыт № 1. Кислотный ступенчатый гидролиз крахмала

При нагревании крахмала с концентрированной соляной кислотой он расщепляется с образованием «обломков» разной величины – декстринов. Они различаются между собой молекулярной массой и характером окраски при действии на них раствора йода. Ниже дана схема кислотного гидролиза крахмала:



Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Пипетки. Крахмал, 1%-ый раствор. Соляная кислота, конц. Раствор Люголя. Лакмусная бумага. Гидроксид натрия, 10%-ый раствор.

Ход работы. В пробирку наливают 20 капель раствора крахмала и 2 капли конц. соляной кислоты. Тщательно перемешивают и кипятят на открытом огне. Через 1-2 минуты после начала кипения берут пробу для реакции с йодом. Для этого 5 капель раствора берут пипеткой и выливают в пробирку, в которую налито 10 капель дист. воды, затем приливают 1-2 капли раствора Люголя. Появившееся синевато-фиолетовое окрашивание указывает на наличие в растворе амилодекстринов. Пробирку с раствором крахмала кипятят еще 1-2 минуты и снова проводят такую же пробу с йодом; появляется красно-бурое окрашивание от присутствия эритродекстринов. Снова кипятят, через 2-3 минуты повторяют пробу с йодом. Крахмал через ахродекстрины, мальтодекстрины и мальтозу расщепляется до глюкозы. Реакция с йодом будет отрицательная – жидкость окрашивается в желтый цвет за счет окраски раствора Люголя.

Опыт № 2. Ферментативный гидролиз крахмала

Под влиянием фермента амилазы крахмал расщепляется с образованием дисахарида – мальтозы, которая расщепляется мальтазой до глюкозы.

Гидролиз крахмала под влиянием амилазы можно обнаружить по появлению продуктов, восстанавливающих реактив Фелинга или же по отрицательной реакции с реактивом Люголя.

Приборы и реактивы. Водяная баня с термометром. Крахмал, 0,1%-ый раствор. Хлористый натрий, насыщенный раствор. Реактив Фелинга. Раствор Люголя.

Ход работы. В 2 микрохимические пробирки вносят 10 капель разведенной 1:10 слюны. Содержимое одной пробирки кипятят на горелке и охлаждают. Затем в обе пробирки вносят по 5 капель раствора крахмала и по капле раствора хлористого натрия (активатор амилазы). Пробирки помещают на 30 минут в водяную баню при 37°C. После этого содержимое каждой пробирки делят на 2 части. С одной из частей ставят реакцию Фелинга, а с другой – реакцию с раствором Люголя, разведенным в 5 раз. Полученные результаты вносят в таблицу:

№ п/п	Субстрат	Фермент	Кипячение фермента	Результат	
				реакция на крахмал	реакция Фелинга
1	Крахмал	Амилаза	Некипяченный		
2	Крахмал	Амилаза	Кипяченный		
Выводы					

Лабораторное занятие № 15, 16 (4 часа)

Тема: Обмен углеводов

Цель опыта: изучить реакции гликолиза.

В анаэробных условиях гликолиз является основным этапом на пути использования глюкозы и других углеводов для обеспечения биоэнергетических потребностей организма.

В аэробных условиях реакции гликолиза составляют начальную фазу разложения углеводов, связанную далее с другим очень важным набором реакций, который называется циклом лимонной кислоты. В этом случае гликолиз останавливается на стадии образования пирувата – непосредственного предшественника лактата.

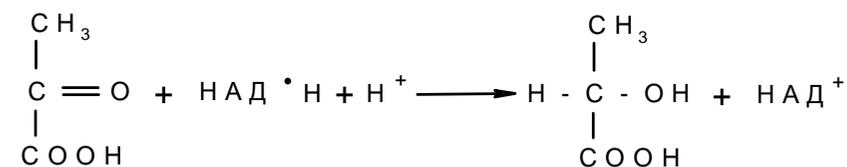
Стержневым этапом гликолиза является окислительная деструкция глюкозы до двух молекул пирувата.

Опыт № 1. Образование молочной кислоты при гликолизе

Завершающим этапом гликолиза является восстановление пировиноградной кислоты в молочную. Последнюю можно обнаружить путем превращения ее в уксусный альдегид (действуют серной кислотой).

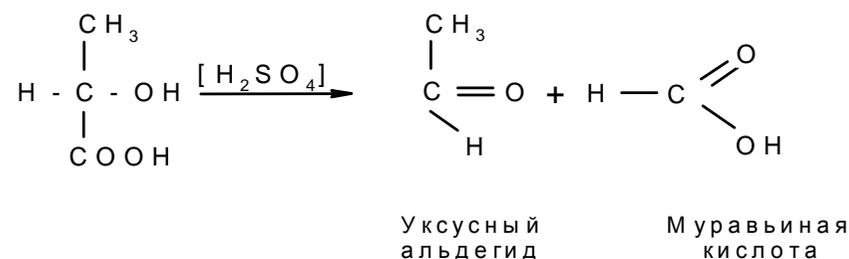
Уксусный альдегид образует с вератролом окрашенное соединение.

Для изучения образования молочной кислоты необходимо взять источник фермента, пировиноградную кислоту и восстановленный НАД. Для того, чтобы упростить опыт и избежать использования дефицитного и дорогостоящего восстановленного НАД, можно поступить следующим образом. К мышечной кашице добавить раствор крахмала, который ферментами мышцы превращается в пировиноградную кислоту. Попутно НАД⁺ мышца восстанавливается в НАДН (+Р⁺). Последний восстанавливает пировиноградную кислоту в молочную



Пировиноградная
кислота

Молочная
кислота



Уксусный
альдегид

Муравьиная
кислота

Приборы и реактивы. Водяная баня с термометром. Чашка со льдом. Шпатель. Воронка. Фильтры. Крахмал, 0,5%-ый раствор в буферном растворе. Трихлоруксусная кислота, 20%-ый раствор. Сульфат меди, 20%-ый раствор. Гидроокись кальция в порошке. Серная кислота, конц. Вератрол, 0,2%-ый раствор в этиловом спирте. Исследуемый материал. Мышечная кашица.

Ход работы. Инкубация. В 2 пробирки, обозначенные номерами 1 и 2, вносят скальпелем немного мышечной кашицы (не превышающей по объему горошины). Пробирка 2 является контрольной, в нее добавляют для инактивации фермента 5 капель раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в каждую пробирку вносят раствор крахмала (до 1/2 объема пробирки) и по 7 капель вазелинового масла для создания анаэробных условий. Пробирки помещают в водяную баню на 1 час при 37°C.

Обнаружение молочной кислоты. По истечении указанного срока в пробирку 2 добавляют 3 капли раствора трихлоруксусной

кислоты для инактивирования ферментов. Содержимое пробирок отфильтровывают в 2 пустые пронумерованные пробирки. Для осаждения углеводов, мешающих обнаружению молочной кислоты, в каждую пробирку добавляют по 0,25 г гидроокиси кальция и по 10 капель раствора сульфата меди. Оставляют пробирки стоять в течение 15 минут, периодически встряхивают их. Затем содержимое пробирок отфильтровывают в другие, также пронумерованные пробирки. Отфильтровав по 5 капель раствора, пробирки охлаждают на льду, добавляют в каждую из них по 15 капель серной кислоты и помещают на 5 минут в кипящую водяную баню для превращения молочной кислоты в уксусный альдегид.

Затем пробирки вновь охлаждают на льду и добавляют в каждую пробирку по 2 капли раствора вератрола. Постепенно в пробирке с фильтратом, полученным из мышцы, где прошел гликолиз возникает красное окрашивание. В контрольной пробирке наблюдается слабая окраска, обусловленная преобразованной молочной кислотой, содержащейся в мышце до начала опыта.

Контрольные вопросы

1. Что из себя представляют углеводы?
2. Какие моно-, ди- и полисахариды вам известны?
3. Какие пути распада полисахаридов в организме вы знаете?
4. Как превращаются всосавшиеся моносахариды в тканях животного организма?
5. Где и как синтезируется гликоген в организме?
6. Каково биологическое значение аэробного и анаэробного путей превращения углеводов?

Лабораторное занятие № 17 (2 часа)

Тема: Химия липидов

Цель занятия: изучить строение липидов.

Липиды (от греч. *lipos* - жир) – это группа структурно и функционально различных веществ, общими свойствами которых являются гидрофобность и способность растворяться в органических растворителях (эфире, бензоле, хлороформе, горячем этаноле и др.).

Липиды выполняют в живых организмах ряд важных функций. Они являются структурными компонентами клеточных мембран, выполняют роль защитных барьеров, служат формой, в виде которой запасается энергетическое «топливо», а также в некоторых случаях это – витамины и гормоны.

Липиды широко распространены в природе. Они входят в состав тканей животных и растений. Вегетативные части растений накапливают не более 5% липидов, семена - до 50% и более.

В молекулах липидов присутствуют одновременно полярные (гидрофильные) и неполярные (гидрофобные) группировки. Эта структурная особенность придает им сродство как к воде, так и к неводной фазе. Таким образом, липиды относятся к бифильным веществам, что позволяет им осуществлять в организме свои функции на границе раздела фаз.

Согласно классификации по их структуре липиды делятся на:

1. Простые (жиры и масла, воски, церамиды).
2. Сложные (фосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды).
3. Производные липидов (стероиды, каротиноиды, жирорастворимые витамины).

Опыт № 1. Гидролиз лецитина

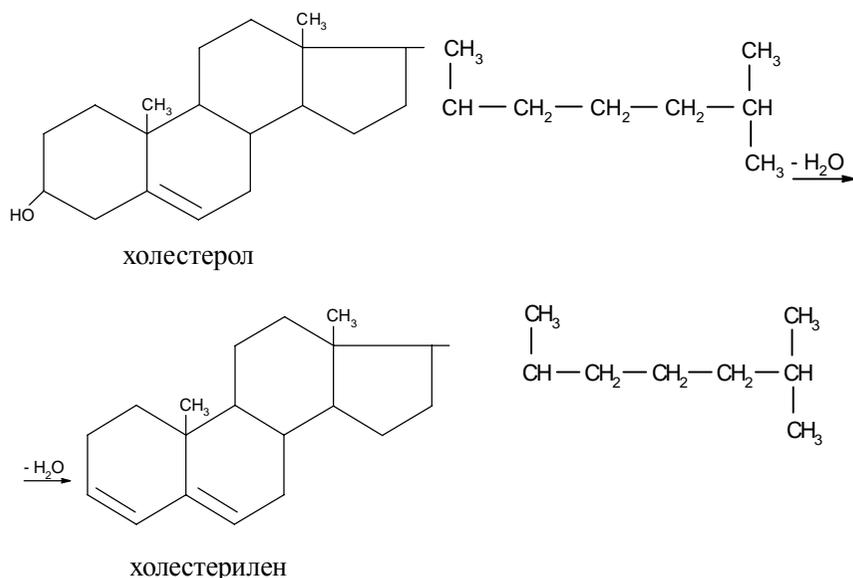
При гидролизе лецитин распадается на глицерин, высшие жирные кислоты, фосфорную кислоту и холин. Реакция протекает по уравнению:

Приборы и реактивы. Штатив с пробирками. Горелка газовая или спиртовка. Жир растительный или животный. Воск. Гидросульфат калия (натрия) кристаллический.

Ход работы. Опыт следует проводить в вытяжном шкафу. В одну пробирку наливают 8-10 капель масла, а в другую помещают 0,3-0,5 г воска. В обе пробирки добавляют около 1 г гидросульфата меди. Смесь в пробирках осторожно, но сильно нагревают и обнаруживают образование акролеина в пробирке с жиром по появлению характерного, очень едкого запаха. Во второй пробирке акролеин не образуется.

Опыт № 3. Цветные реакции на холестерол

Холестерол является циклическим спиртом. Как и другие спирты в присутствии водоотнимающих средств - серной кислоты и уксусного ангидрида он теряет молекулу воды, образуя холестерилен, имеющий две двойные связи:



Образование холестерилена легко обнаружить, так как он так же, как и некоторые его производные, является окрашенным соединением. Окраска, возникающая при обработке холестерола водоотнима-

ющими веществами, может быть использована для обнаружения холестерола и для его количественного определения.

В настоящее время для количественного определения холестерола используется реакция, основанная на образовании им цветного комплекса с железом.

Приборы и реактивы. Холестерол, 1%-ый раствор в хлороформе. Холестерол, раствор в уксусной кислоте. Серная кислота, конц. Уксусный ангидрид (под тягой). Железо хлорное, раствор в ледяной уксусной кислоте.

Ход работы. Реакция Сальковского. В сухой микрохимической пробирке к 7 каплям раствора холестерола в хлороформе добавляют 5 капель серной кислоты. На границе слоев хлороформа и кислоты возникает оранжевое кольцо. Верхний слой (хлороформенный) постепенно окрашивается в фиолетовый цвет. При стоянии фиолетовая окраска переходит в красную.

Реакция Либермана-Бурхарда. В сухой пробирке к 5 каплям хлороформенного раствора холестерола добавляют 2 капли уксусного ангидрида и 1 каплю серной кислоты. После встряхивания раствор приобретает красно-фиолетовое окрашивание, переходящее в синее и затем в зеленое. Окраску дает сульфокислота холестерилена.

Образование железного комплекса. В микрохимическую пробирку вносят каплю раствора хлорного железа и 5-8 капель серной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают встряхиванием и добавляют 5 капель раствора холестерола в уксусной кислоте. При взбалтывании содержимого пробирки возникает красно-фиолетовое окрашивание, вызванное образованием комплекса холестерола с железом.

Опыт № 4. Выделение лецитинов из яичного желтка

Приборы и реактивы. Химический стакан. Штатив с пробирками. Воронки, фильтры бумажные. Палочка стеклянная. Яичный желток. Спирт этиловый, 96%-ый. Ацетон.

Ход работы. В стакан помещают половину яичного желтка, добавляют 20 мл горячего спирта и перемешивают стеклянной палочкой. Смесь охлаждают и фильтруют в сухую пробирку. Если фильтрат непрозрачный, фильтрование повторяют.

Для выявления в фильтрате лецитина в сухую пробирку добавляют 5 мл ацетона и к нему каплями добавляют полученный фильтрат. Появление мути свидетельствует об осаждении лецитина.

В другую сухую пробирку наливают 3 мл фильтрата и добавляют к нему по каплям воду. Образуется стойкая эмульсия. Остальной фильтрат используется для других реакций на лецитины.

Лабораторное занятие № 18 (2 часа)

Тема: Обмен липидов

Цель занятия: ознакомиться с особенностями ассимиляции липидов в организме животных.

Переваривание липидов происходит главным образом в кишечнике. Здесь под действием желчных кислот - холевой, дезоксихолевой, гликохолевой, таурохолевой - они переходят в состояние тонкой эмульсии. Эмульгирование увеличивает площадь соприкосновения жиров с ферментами, что ускоряет их гидролитическое расщепление.

Главными ферментами являются липаза панкреатического и кишечного сока. Под их действием жир распадается на глицерин и жирные кислоты. Глицерин растворим в воде и быстро всасывается.

А жирные кислоты для перевода в легкоусвояемое организмом состояние реагируют с желчными кислотами, образуя холеиновые комплексы.

В клетках эпителия кишечника из глицерина и жирных кислот образуются жиры. Они поступают в лимфатическую систему, затем в кровь в виде хиломикронов и откладываются в подкожной клетчатке и сальниках.

Внутриклеточный обмен липидов включает процессы биосинтеза липидов из углеводов и других предшественников, перераспределения липидов в тканях и их депонирования, преимущественно за счет мобилизации липопротеидов крови и тканей и вновь синтезированных липидов печени, а также окислительного расщепления глицерина и жирных кислот в тканях, сопровождающегося освобождением энергии и использованием ее для нужд организма.

Опыт № 1. Эмульгирование жиров

Помимо желчи эмульгированию жиров и сохранению стойкости эмульсии способствуют белки, фосфатиды (лецитин), карбонаты высших жирных кислот, т.е. растворимые мыла. Эмульгирование жиров может быть воспроизведено.

Приборы и реактивы. Желчь разведенная. Яичный белок, 10%-ый раствор. Мыло, 1%-ый раствор. Углекислый натрий, 10%-ый раствор. Лецитин. Растительное масло.

Ход работы. Берут 6 микрохимических пробирок. Наливают в первую и во вторую 10 капель воды, в третью - 10 капель желчи, в четвертую – 10 капель раствора белка, в пятую - 10 капель мыла, а в шестую столько же капель раствора углекислого натрия. Во вторую пробирку вносят кусочек лецитина. В каждую пробирку добавляют по 3 капли растительного масла. Встряхивают пробирки и отмечают, где произошло образование эмульсии.

Исследуемый жир	Вода	Желчь	Белок	Мыло	Сода
Растительное масло					

Выводы:

Опыт № 2. Гидролиз глицеридов липазой

Об активности данного фермента судят по приросту в инкубационной среде свободных жирных кислот, освобождающихся в результате расщепления жира поджелудочной липазой. Если к молоку добавить немного липазы и подщелочить полученную смесь до розовой окраски по фенолфталеину, то при инкубации при 37°C жидкость постепенно обесцвечивается. Это объясняется тем, что под действием липазы освобождаются высшие жирные кислоты и рН смещается в сторону более низких значений. При добавлении желчи обесцвечивание фенолфталеина ускоряется, так как липаза активизируется солями желчных кислот.

Приборы и реактивы. Водяная баня с термометром. Молоко кипяченое, разведенное водой. Углекислый натрий, 10%-ый раствор. Фенолфталеин, 0,5%-ый раствор. Желчь. Вытяжка из поджелудочной железы.

Ход работы. В 2 микрохимические пробирки вносят по 8 капель молока и по капле раствора фенолфталеина. В каждую пробирку добавляют по каплям раствор углекислого натра до слабо-розовой окраски по фенолфталеину. В каждую пробирку вносят по 2 капли вы-

тяжки липазы, а в пробирку 1 кроме того и каплю желчи. Помещают пробирки в водяную баню при 37°C и отмечают время обесцвечивания фенолфталеина в опыте с желчью и без нее.

Время взятия проб для титрования	Количество 0,01 н. NaOH, мл			
	проба без желчи		проба с желчью	
	израсходовано на титрование	нейтрализовано жирными кислотами	израсходовано на титрование	нейтрализовано жирными кислотами

Опыт № 3. Влияние желчи на поверхностное натяжение воды

Важнейшим условием эмульгирования является понижение поверхностного натяжения жидкой фазы. В содержимом кишечника понижение поверхностного натяжения достигается за счет действия желчи, точнее желчных кислот.

Как известно, поверхностное натяжение жидкости можно определить по количеству капель, соответствующих определенному объему жидкости. Для того, чтобы сравнить поверхностное натяжение воды и желчи, необходимо подсчитать, сколько капель образуется при вытекании равных объемов воды и желчи. Для проведения подобных исследований пользуются специальными приборами - стагмометрами - полуколичественное определение можно выполнить с помощью градуированной пипетки на 1-2 мл.

Приборы и оборудование. Пипетка градуированная на 2 мл. Желчь.

Ход работы. В чистую пробирку набирают желчь до метки 0,6 мл и держа пипетку вертикально, дают желчи вытекать, отсчитывая капли. Когда уровень желчи в пипетке опустится до метки 0,2 мл выливание желчи прекращается. Опыт повторяют еще дважды и вычисляют среднее количество капель желчи, содержащееся в

0,4 мл. Пипетку тщательно промывают водой и повторяют опыт, взяв вместо желчи воду. Сделав три определения с водой, вычисляют, сколько капель воды содержится в 0,1 мл. Важно отметить, что опыт с водой и с желчью должен делаться одной и той же пипеткой.

Зная, что поверхностное натяжение воды при 20°C составляет 73 дин/см, вычисляют поверхностное натяжение желчи по формуле:

$$\sigma_{ж} = \frac{\sigma_{H_2O} \cdot n_{H_2O}}{n_{ж}}$$

где $\sigma_{ж}$ - поверхностное натяжение желчи;

σ_{H_2O} - поверхностное натяжение воды;

$n_{ж}$ - количество капель желчи (среднее из трех определений);

n_{H_2O} - количество капель воды (среднее из трех определений).

Контрольные вопросы

1. Что из себя представляют липиды и липоиды?
2. Напишите строение триацилглицерида. Напишите реакцию гидролиза лецитина. С помощью каких реакций можно определить его составные части?
3. Какова химическая природа холестерина и холестерида?
4. В чем заключается роль желчи в переваривании и всасывании жиров и какова химическая природа желчных кислот?
5. Как, согласно теории Кнопа, протекает окисление жирных кислот?
6. Как осуществляется процесс синтеза жирных кислот в тканях организма?

Список использованной литературы

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин // М.: Изд.-во «Медицина», 2007. - 704 с.
2. Калоев, Б.С. Учебно-методическое пособие к лабораторным занятиям по биологической химии с основами физической и коллоидной химии / Б.С. Калоев, Ф.Ц. Цогоева, Л.Х. Албегова // Владикавказ: Изд.-во ФГБОУ ВПО «Горский госагроуниверситет», 2012. - 88 с.
3. Комов, В.П. Биохимия / В.П. Комов, В.Н. Шведова // М.: Изд.-во Юрайт, 2015.-640 с.
4. Цогоева, Ф.Н. Методические рекомендации к лабораторным занятиям по биохимии / Ф.Н. Цогоева, Е.А. Плиева, О.И. Босиева // Владикавказ: Изд.-во. ФГБОУ ВПО «Горский госагроуниверситет», 2015. - 80 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Лабораторное занятие №1. Правила техники безопасности	4
Лабораторное занятие № 2. Качественные реакции на некоторые жирорастворимые витамины	6
Лабораторное занятие №3. Качественные реакции на некоторые водорастворимые витамины	12
Лабораторное занятие № 4. Качественная реакция на аскорбиновую кислоту	15
Лабораторное занятие № 5. Определение активности ферментов ...	18
Лабораторное занятие № 6. Общие свойства ферментов	21
Лабораторное занятие № 7. Классификация ферментов	25
Лабораторное занятие № 8. Качественные реакции на некоторые гормоны	30
Лабораторное занятие № 9. Химия белков	34
Лабораторное занятие № 10. Реакции осаждения белков	38
Лабораторное занятие № 11. Обмен белков	40
Лабораторное занятие № 12. Химия нуклеиновых кислот	45
Лабораторное занятие № 13. Обмен сложных белков	50
Лабораторное занятие № 14. Химия углеводов	54
Лабораторное занятие № 15, 16. Обмен углеводов	58
Лабораторное занятие № 17. Химия липидов	61
Лабораторное занятие № 18. Обмен липидов	67
Список использованной литературы	71

Лицензия: ЛР. № 020574 от 6 мая 1998 г.

Подписано в печать 20.12.2021 г. Бумага писчая. Печать трафаретная.
Бумага 60x84 1/16. Усл. печ. л. 4,5. Тираж 35. Заказ 163.

362040, Владикавказ, ул. Кирова, 37.

Типография ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет»