**Задание на 24.06.2020 г.**

**!!! Отчеты по выполненным заданиям присылать старостам в день занятия**

**(см. расписание).**

**1.** Студентам, у которых второе лаб. занятия 24.06.2020 г. (БЭ-2) оформить лабораторную работу по теме **«Реакции осаждения белков»** (стр. 171-176 УМК часть 1 Статическая биохимия или см. ниже текст лабораторной работы №2).

Оформить в виде таблицы (см. пример ранее при оформлении первой лаб.работы) следующие реакции:

– Осаждение белков нейтральными солями (высаливание белков);

– Осаждение белков органическими растворителями;

– Осаждение белков минеральными кислотами;

– Осаждение белков органическими кислотами;

– Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Д/з: выполнить тесты по теме «Аминокислоты и белки», стр. 202-205 УМК часть 1 или электронный УМК).

**2.** Студентам, у которых третье лаб. занятия 24.06.2020 г. (БЭ-1) оформить лабораторную работу по теме **«Исследование общих свойств ферментов»** (стр. 178-181 УМК часть 1 Статическая биохимия или см. ниже текст лабораторной работы №3).

Оформить в виде таблицы (см. пример ранее при оформлении первой лаб. работы) следующие реакции:

– Ферментативный гидролиз крахмала;

– Инактивация ферментов высокой температурой;

– Специфичность действия ферментов.

Д/з: выполнить тесты по теме «Ферменты», стр. 205-207, УМК часть 1 или электронный УМК).

*Лабораторная работа 2*

**Реакции осаждения белков**

Большинство белков относятся к высокомолекулярным соединениям, которые хорошо растворяются в воде. Растворение белков в воде связано с гидратацией его молекул и образованием вокруг частиц белка гидратной оболочки.

Любые физические и химические факторы, нарушающие гидратацию молекул белка и нейтрализующие их заряд, приводят к понижению растворимости белка и способствуют выпадению его в осадок.

Многие факторы влияют на физико-химические свойства белковых веществ, вызывают изменения структуры макромолекул. Данный про­цесс известен как денатурация. При денатурации нарушается активная конформация белковой макромолекулы. Эти изменения касаются в первую очередь вторичной и третичной структуры без нарушения при этом ковалентных (пептидных) связей.

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При ***обратимом осаждении*** макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе (например, воде). Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочноземельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.

При ***необратимом осаждении*** происходит глубокая денатурация белка, он теряет свойства гидрофильности и становится гидрофобным. Денатурированный белок неспособен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, красителей.

**1 Осаждение белков нейтральными солями (высаливание)**

Выпадение белков в осадок при действии на них растворов нейтральных солей аммония, щелочных и щелочеземельных металлов называется ***высаливанием.*** Этот процесс основан на дегидратации белков и нейтрализации зарядов белковых частиц адсорбирующими на них ионами соли. При этом белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются и выпадают в осадок. Высаливание – обратимый процесс. Осадки можно снова растворить в воде, при этом наблюдается значительная степень восстановления свойств белков.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка с хлоридом натрия;

2. Сульфат аммония (NH4)2SO4, кристаллический (тонко растертый порошок);

3. Сульфат аммония (NH4)2SO4, насыщенный раствор;

4. Гидроксид натрия (NaOH), 10 %-ный раствор;

5. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1 %-ный раствор.

*Выполнение работы*

В пробирку наливают 2–3 мл раствора белка, добавляют 2–3 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтровывают через бумажный фильтр.

К фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция соли уже не растворяется). Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтровывают.

С фильтратом проделывают биуретовую реакцию. Если произошло полное осаждение белков, она должна быть отрицательной.

**2 Осаждение белков органическими растворителями**

Органические растворители (спирт, эфир, ацетон) вызывают дегидратацию белковых макромолекул, разрушают их водные оболочки, что понижает устойчивость белков в растворе и ведёт к выпадению в осадок. Способствует осаждению присутствие электролитов (например, хлорида натрия) в растворе. Если при этом присутствует небольшое количество солей (например, NaCl), то осадок образуется полнее и быстрее. Ионы солей связываются коллоидными частицами белка и нейтрализуют их заряд. Это обстоятельство еще более снижает устойчивость раствора белка. Если осаждение проводить на холоду и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок может быть снова растворен в воде, т.е. свойства его в этом случае не изменяются, денатурация не успевает произойти и осаждение обратимо. При стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Этиловый спирт (C2H5OH);

3. Ацетон;

4. Хлорид натрия (NaCl), кристаллический.

*Выполнение работы*

В пробирку наливают 1–2 мл раствора яичного белка, добавляют немного порошка хлорида натрия (NaCl) и взбалтывают до растворения. По каплям приливают 2 мл этилового спирта (либо ацетона) и взбалтывают. Выпадает осадок белка, который вновь растворяется при разбавлении водой.

**3 Осаждение белков минеральными кислотами**

Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Это осаждение объясняется как явлением дегидратации белковых частиц и нейтрализацией их заряда, так и рядом других причин (например, образование комплексных солей белка с кислотами и др.). Осадки, вызванные действием минеральных кислот, растворяются в избытке серной и соляной кислоты, но не растворяются в избытке азотной.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Серная кислота (H2SO4), концентрированная;

3. Азотная кислота (HNO3), концентрированная;

4. Соляная кислота (HСl), концентрированная.

*Выполнение работы*

***Реакции следует проводить под тягой!***

Втри пробирки наливают по 1 мл раствора кислот: в первую – соляной, во вторую – серной, в третью – азотной. Осторожно по стенке пробирки, чтобы жидкости не смешивались, приливают равный объем раствора белка. На границе двух жидкостей образуется осадок в виде небольшого кольца. Пробирки осторожно встряхивают, добавляют избыток соответствующих кислот. Осадки белка растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной.

**4 Осаждение белков органическими кислотами**

Органические кислоты необратимо осаждают белок из растворов. Различные кислоты отличаются по силе действия. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), сульфосалициловая кислота являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок, широко применяются с этой целью. Осаждение белков с помощью ТХУ в конечной концентрации 2,5–5 % часто применяется для полного удаления белка из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), т. к. ТХУ осаждает только белки, а продукты их распада остаются при этом в растворе. Это особенно важно, когда нужно определить отдельно содержание азота белка и азота более низкомолекулярных продуктов: аминокислот, мочевины и др. – так называемый «небелковый азот». В этом случае, если после осаждения белков требуется из фильтрата удалить ТХУ, то это достигается его кипячением, в результате чего ТХУ разлагается на хлороформ и угольный ангидрид, которые улетучиваются.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Сульфосалициловая кислота, 10 %-ый раствор;

3. Трихлоруксусная кислота, 10 %-ый раствор.

*Выполнение работы*

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую 5–8 капель раствора сульфосалициловой, а во вторую – столько же раствора трихлоруксусной кислоты. В обеих пробирках белок выпадает в осадок.

**5 Осаждение белков солями тяжелых металлов**

Белки осаждаются солями свинца, ртути, серебра, меди и других тяже­лых металлов. В этом случае денатурация белка вызывается адсорбцией ионов тяжелых металлов на поверхности белковых молекул с образованием нерастворимых комплексов.

Избыток некоторых солей (сульфата меди, ацетата свинца и других) ве­дет к растворению осадка (пептизации). Ионы металла, адсорбируясь на поверхности белковых мицелл, придают им положительные заряды. Одноименно заряженные мицеллы отталкиваются, что способствует их переходу из осадка в раствор.

*Реактивы:*

1. Раствор яичного белка;

2. Сульфат меди (CuSO4), 1 %-ный раствор;

3. Ацетат свинца (Pb(CH3COO)2), 5 %-ный раствор;

4. Нитрат серебра (AgNO3), 1 %-ный раствор;

5. Хлорид железа (FeCl3), 5 %-ный раствор.

*Выполнение работы*

В четыре пробирки наливают по 1–2 мл раствора яично­го белка и по каплям добавляют растворы солей: в первую – сульфата меди, во вторую – уксуснокислого свинца, в третью – хлорного железа, в четвертую – нитрата серебра (до выпадения осадков). Затем прибавляют избыток солей и наблюдают растворение осадков в первых трех пробирках. Осадок, образованный нитратом серебра, не растворяется в избытке соли.

*Лабораторная работа 3*

**Исследование общих свойств ферментов**

**1 Ферментативный гидролиз крахмала**

Ферментативный гидролиз крахмала протекает под влиянием ферментов амилаз, которые содержатся в слюне, соке поджелудочной железы, крови, печени, мозге. Источниками амилаз в промышленности служат проросшие зерна злаков (солод) и культуры плесневых грибов.

Известны α- и β-амилазы, которые несколько различаются по характеру действия. Под влиянием α-амилазы процесс гидролитического расщепления крахмала задерживается главным образом на стадии декстринов, а мальтозы образуется немного, тогда как под действием β-амилазы расщепление идет в сторону преимущественного образования мальтозы.

амилаза

(С6Н10О5)n + n-1 H2O → n C12H22O11

крахмал  мальтоза

Мальтоза под действием фермента мальтазы распадается на две молекулы α-D-глюкозы. Ход процесса гидролитического расщепления крахмала можно проследить с помощью реакции Троммера, характеризующей восстанавливающие свойства углеводов.

При ферментативном гидролизе крахмала увеличивается количество свободных гликозидных гидроксилов, обусловливающих восстанавливающие свойства, и поэтому мальтоза и глюкоза способны восстанавливать окись меди до закиси.

*Реакция Троммера*

**t**

COH-(HCOH)4-CH2OH + 2 CuSO4 + 5 NaOH →

COONa-(HCOH)3-CH2O-CH2OH + 2 CuOH + 2 Na2SO4 + 2 H2O

Раствор окрашивается в синий цвет. При дальнейшим нагревание выпадает вначале желтый осадок CuOH, который переходит в красный Cu2O.

*Реактивы:*

1. Слюна, разведенная в 10 раз дистиллированной водой;

2. Крахмал, 1%-ный раствор;

3. Гидроксид натрия (NaOH), 10%-ный раствор;

4. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1%-ный раствор;

5. Раствор Люголя.

*Выполнение работы*

В две пробирки наливают по 2 мл 1%-ного раствора крахмала, в одну из них (**1**) добавляют 1 мл слюны, в другую (**2**) – 1 мл воды и ставят на 10 минут в водяную баню, нагретую до 37–38ºС. После охлаждения содержимое каждой из двух пробирок делят пополам (**1а и 1б; 2а и 2б)**. Проделывают реакции: **а –** реакция Троммера; **б –** реакция с раствором Люголя.

**2 Инактивация ферментов высокой температурой**

При действии высокой температуры на ферменты, происходит денатурация их белковой части и потеря каталитической способности.

*Реактивы:*

1. Крахмал, 1%-ный раствор;

2. Слюна, разведенная в 10 раз дистиллированной водой;

2. Гидроксид натрия (NaOH), 10%-ный раствор;

3. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1%-ный раствор;

4. Раствор Люголя.

*Выполнение работы*

В две пробирки наливают по 1 мл разведенной слюны. Содержимое одной из них (**1**) нагревают до кипения и кипятят на спиртовке 2–3 минуты. Затем в обе остывшие пробирки добавляют по 1 мл крахмала и ставят на 10 минут в водяную баню, нагретую до 37–38ºС. После охлаждения содержимое каждой из двух пробирок делят пополам (**1а и 1б; 2а и 2б)**. Проделывают реакции: **а –** реакция Троммера; **б –** реакция с раствором Люголя. Убеждаемся, что в пробирке (**1**), в которой фермент был инактивирован кипячением, расщепление крахмала не произошло.

**3 Специфичность действия ферментов**

Одним из отличительных признаков ферментов является их специфичность, которая проявляется в способности катализировать одну группу реакций, а так же преобразование определенного вещества или группы веществ.

*Реактивы:*

1. Крахмал, 1%-ный раствор;

2. Сахароза, 1%-ный раствор;

3. Слюна, разведенная в 10 раз дистиллированной водой;

4. Гидроксид натрия (NaOH), 10%-ный раствор;

5. Сульфат меди (II) (CuSO4), 1%-ный раствор;

6. Раствор Люголя.

*Выполнение работы*

В две пробирки наливают по 1 мл разведенной слюны, в одну из них (**1**) добавляют 1 мл раствора сахарозы, в другую (**2**) – 1 мл раствора крахмала. Обе пробирки ставят на 10 минут в водяную баню, нагретую до 37–38ºС. После охлаждения содержимое каждой из двух пробирок делят пополам (**1а и 1б; 2а и 2б)**. Проделывают реакции: **а –** реакция Троммера; **б –** реакция с раствором Люголя. Убеждаемся, что амилаза катализировала лишь процесс гидролитического расщепления крахмала и не оказала действия на сахарозу.