

Министерство образования Республики Беларусь
Полесский государственный университет

И. А. ИЛЬЮЧИК, М. П. ФЕДОРЕНКО, В. Н. НИКАНДРОВ

**БИОХИМИЯ.
ВВЕДЕНИЕ: СТРУКТУРНАЯ БИОХИМИЯ**

Учебно-методическое пособие
для выполнения лабораторных работ
по дисциплине «Биохимия»
для студентов специальности
1-31 01 01 Биология (по направлениям)
направления специальности:
1-31 01 01-03 Биология (биотехнология)
1-31 01 01-01 Биология
(научно-производственная деятельность)

Пинск
ПолесГУ
2020

УДК 577.1(076.5)
ББК 28.072я72
И48

Р е ц е н з е н т ы:
заведующий кафедрой химии
УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
доктор биологических наук, доцент А. Ф. Макарчиков;
заведующий кафедрой химии
УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины»,
кандидат биологических наук, доцент В. П. Баран.

У т в е р ж д е н о
научно-методическим советом ПолесГУ

Ильючик И. А.

И48 Биохимия. Введение: структурная биохимия : учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Биохимия» / И. А. Ильючик, М. П. Федоренко, В. Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 96 с.

ISBN 978-985-516-630-7

В учебно-методическом пособии рассмотрены вопросы подготовки и выполнения лабораторных работ по разделам «Введение» и «Структурная биохимия» по курсу «Биохимия». Каждой работе предшествует краткий теоретический материал, порядок выполнения, способ учета результатов. Контроль теоретических знаний студентов проводится по контрольным вопросам и заданиям, представленным после каждой лабораторной работы.

Пособие знакомит с методами исследования в биохимии, обнаружения и количественного определения аминокислот, белков, ферментов, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и витаминов в биологических объектах и сырье для пищевой промышленности, а также приемами выделения этих соединений.

Работы подобраны с учетом доступности исследуемого материала, реактивов и оборудования. Издание предназначено для выполнения лабораторных работ для дневной и заочной формы обучения студентов по специальностям: 1-31 01 01 Биология (по направлениям).

УДК 577.1(076.5)
ББК 28.072я72

ISBN 978-985-516-630-7

© УО «Полесский государственный университет», 2020.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	5
РАЗДЕЛ I	
ВВЕДЕНИЕ	7
ТЕМА 1. Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	7
ТЕМА 2. Первая помощь при несчастных случаях	10
ТЕМА 3. Методы исследования в биохимии.....	11
ТЕМА 4. Применение физических величин и международной системы единиц (СИ) в биохимической лабораторной практике.....	13
РАЗДЕЛ II	
СТРУКТУРНАЯ БИОХИМИЯ.....	16
ТЕМА 1. Аминокислоты, пептиды и белки.....	16
Лабораторная работа № 1. Качественные реакции на аминокислоты и белки.....	16
Лабораторная работа № 2. Выделение белков из биологических объектов.....	23
Лабораторная работа № 3. Физико-химические свойства белков	27
Лабораторная работа № 4. Количественное определение содержания белка в растворе	34
Лабораторная работа № 5. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге.....	41
ТЕМА 2. Нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты..	44
Лабораторная работа № 6. Выделение и гидролиз нуклеопротеинов дрожжей, открытие продуктов гидролиза ...	44

Лабораторная работа № 7. Определение концентрации нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом	47
ТЕМА 3. Витамины	50
Лабораторная работа № 8. Качественные реакции на жирорастворимые витамины	51
Лабораторная работа № 9. Качественные реакции на водорастворимые витамины	55
ТЕМА 4. Ферменты	65
Лабораторная работа № 10. Ферменты.....	65
ТЕМА 5. Углеводы.....	73
Лабораторная работа № 11. Качественные реакции на углеводы	74
ТЕМА 6. Липиды.....	83
Лабораторная работа № 12. Ацилглицерины.....	83
Лабораторная работа № 13. Определение чисел жиров	88
ПРИЛОЖЕНИЕ	92
ЛИТЕРАТУРА.....	94
Основная литература	94
Дополнительная литература	95

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биохимия является одной из важнейших фундаментальных дисциплин в системе биологического образования. Современная биохимия тесно связана с физиологией, генетикой, микробиологией, другими биологическими дисциплинами и является методологической основой для изучения на молекулярном уровне физиологических процессов.

Учебно-методическое пособие по биохимии предназначено для обеспечения лабораторных работ по курсу «Биохимия». Пособие создано на основе учебной программы по дисциплине «Биохимия» по специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) утвержденной Министерством образования Республики Беларусь.

Целью данного пособия является закрепление теоретических знаний путем формирования практических навыков в области структурной биохимии.

Учебно-методическое пособие состоит из предисловия, оглавления, двух разделов (введение и структурная биохимия), приложения и списка литературы.

Введение включает: технику безопасности при работе в биохимической лаборатории; первую помощь при несчастных случаях; методы исследования в биохимии; применение физических величин и международной системы единиц (СИ) в биохимической лабораторной практике.

Во второй раздел «Структурная биохимия» вошли лабораторные работы по основным темам классической биохимии: аминокислоты, белки, ферменты, витамины, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты. Раздел включает лабораторные работы разной степени сложности, позволяющие студентам овладевать методами биохимических исследований, умением анализировать и сопоставлять полученные результаты.

Последовательность выполнения лабораторных работ может изменяться кафедрой в соответствии с действующим в данном учебном заведении учебным планом.

Каждая лабораторная работа имеет одинаковую структуру и содержит краткую теоретическую и практическую части, что позволяет развивать у студентов навыки самостоятельной работы и сформировать умения выполнять лабораторные исследования с использованием биохимических технологий. Краткая теоретическая часть необходима для понимания эксперимента, в ней приведены формулы для расчетов и уравнения реакций.

По каждой лабораторной работе студент должен заполнить протокол, включающий пять пунктов:

- 1) название работы;
- 2) цель работы;
- 3) краткое описание хода работы;
- 4) результаты исследования;
- 5) выводы.

Первые три пункта студент заполняет заранее в процессе самоподготовки, четвертый и пятый пункты – на занятии после выполнения опытов. Для выполнения лабораторных работ по биологической химии студенты должны обладать определенными экспериментальными навыками: уметь взвешивать на аналитических весах, измерять объемы жидкостей, проводить титрование, работать с приборами, используемыми в физико-химических исследованиях (центрифуги, спектрофотометр, водяная баня и др.). Они должны уметь строить графики и обрабатывать результаты измерений. При выполнении работ рекомендуется использовать доступный биологический материал: белок яиц, мышечную ткань свежей и мороженой рыбы или животных, овощи, фрукты.

Приложение содержит информацию об α -аминокислотах.

РАЗДЕЛ I

ВВЕДЕНИЕ

ТЕМА 1. Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории

К лабораторным занятиям допускаются учащиеся прошедшие инструктаж по технике безопасности, факт сдачи которого фиксируется в специальном журнале под личную роспись прошедшего инструктаж. При выполнении лабораторных работ необходимо соблюдать следующие правила:

1. В лаборатории категорически *запрещается* работать одному, при выполнении работы необходимо избегать лишних движений и разговоров.

2. Работу в лаборатории необходимо выполнять в халатах, в случае наличия длинных волос их необходимо подбирать, чтобы избежать контакта волос с нагревательными приборами, реактивами и т.д.

3. Категорически запрещается принимать в лаборатории пищу, пользоваться лабораторной посудой для питья.

4. С методикой проведения лабораторной работы необходимо ознакомиться заранее. *Запрещается* без разрешения преподавателя проводить опыты, не соответствующие плановой работе, или изменять их порядок.

5. Проводить опыты необходимо в чистой посуде, пользоваться веществами лишь из склянок с этикетками с разборчивой надписью.

6. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.

7. Для обеспечения чистоты внутренней стороны пробки ее кладут на стол внешней поверхностью.

8. *Запрещается* выливать избыток реактива из пробирки обратно в реактивную склянку.

9. Сухие соли необходимо набирать чистым шпателем или ложечкой.

10. *Запрещается* уносить реактивы общего пользования на свое рабочее место.

11. Концентрированные кислоты, щелочи необходимо набирать пипеткой с грушей или отмерять мерным цилиндром (только в вытяжном шкафу).

12. При попадании концентрированной кислоты или щелочи на кожу необходимо быстро их смыть водой, а затем обработать соответственно 2% раствором бикарбоната натрия или 2% раствором борной или уксусной кислоты.

13. При разбавлении концентрированных кислот (особенно серной), необходимо осторожно небольшими порциями *вливать кислоту в воду* при постоянном помешивании.

14. Правила работы со спиртовкой:

- спиртовка заправляется этанолом не более чем на 2/3 ее объема;
- диск должен плотно прикрывать отверстие резервуара спиртовки;
- фитиль в трубке должен входить не слишком плотно, но и не выпадать;
- неиспользуемая спиртовка должна быть закрыта колпачком;
- зажигают спиртовку от горячей спички, а тушат ее, накрыв колпачком.

15. При нагревании вещества в пламени спиртовки предварительно прогревают пробирку с содержимым, затем нагревают непосредственно содержимое пробирки. *Запрещается* прикасаться дном пробирки к фитилю, при этом на спиртовке допускается нагревать лишь посуду из тонкого (химического) стекла.

16. Нагревание пробирок проводят в закрепленном состоянии в лапке штатива или в пробиркодержателе отверстием, направленным от себя и окружающих.

17. Чтобы определить запах вещества, направляют струю воздуха от отверстия сосуда к себе.

18. Во избежание попадания брызг реагентов на лицо и одежду при сливании, нагревании реактивов *запрещается* наклоняться над отверстием сосуда.

19. *Запрещается* выбрасывать в раковину остатки металлов, их необходимо собирать в специально отведенную посуду.

20. С целью предупреждения выхода из строя канализации *нельзя допускать* засорения раковин и сливов в шкафах песком, бумагой, битой посудой и другими твердыми отходами, которые необходимо выбрасывать в урну.

21. Необходимо рационально расходовать реактивы, электричество и воду. Нельзя оставлять без надобности включенные электроприборы и горящие спиртовки.

22. Перед уходом из лаборатории рекомендуется убрать рабочее место, вымыв за собой посуду.

ТЕМА 2. Первая помощь при несчастных случаях

При нарушении правил техники безопасности и по причине других факторов в лаборатории могут возникать несчастные случаи, требующие неотложной медицинской помощи, эффективность которой, в свою очередь, во многом определяется знанием основных правил ее оказания:

1. В случае мелких порезов стеклом необходимо удалить осколки из раны, смыть кровь, продезинфицировать рану раствором йода и перевязать ее бинтом.

2. При ожоге горячей жидкостью или горячим предметом обожженное место необходимо промыть проточной холодной водой в течение 5–10 мин. При необходимости пострадавшего доставить в ближайшее лечебное учреждение.

3. При попадании в глаза химического вещества их необходимо обильно промыть в течение 10–15 мин струей холодной воды так, чтобы она стекала от носа к виску. Веки пораженного глаза во время промывания осторожно разворачивают. Контактные линзы перед промыванием снимают. Затем пострадавшего необходимо доставить в глазную клинику.

4. При попадании яда внутрь необходимо вызвать рвоту принятием теплого раствора поваренной соли (3–4 чайные ложки на стакан воды) и затем надавить пальцем на заднюю часть зева. Пострадавшему нужно давать пить большое количество теплой воды. В случае потери пострадавшим сознания или же при отравлении растворителем, кислотой или щелочью рвоту вызывать **запрещено**. Пострадавшего необходимо перенести на свежий воздух и оставить в спокойном положении в тепле. Немедленно вызвать бригаду скорой помощи.

5. При поражении электрическим током необходимо быстро освободить пострадавшего от действия тока путем отключения электроэнергии общим рубильником. Вынести пострадавшего на свежий воздух, при необходимости сделать ему искусственное дыхание, массаж сердца, после чего вызвать скорую помощь.

ТЕМА 3. Методы исследования в биохимии

Биохимия является и биологической и химической наукой, т.к. изучает вещества животного, растительного и микробного происхождения с целью познания их строения, свойств и выяснения механизмов функционирования.

В биохимических исследованиях основными являются методы выделения веществ из биологического материала и их очистка с целью получения индивидуальных соединений.

Они следующие:

- спектрофотометрические, основанные на измерении поглощения видимого или ультрафиолетового света;
- радиохимические, основанные на измерении радиоактивности;
- люминесцентные, основанные на флюоресценции (био- и хемилюминесценции).

Исследуя материал (биомассу), необходимо помнить, что он состоит из сотен и тысяч различных соединений, которые, выполняя различные биологические функции, построены однотипно и мало различаются по таким свойствам, как растворимость и осаждаемость или способность поглощаться определенным типом сорбентов.

Исследователю часто необходимо работать с очень малыми количествами веществ (мг или мкг), многие из которых обладают очень низкой устойчивостью. Многие задачи по разделению веществ решаются с помощью сорбции части компонентов смеси на тех или иных сорбентах (гель фосфата кальция, активированный уголь, иониты).

Разделение может проводиться по размеру частиц с использованием ситового эффекта. Молекулярные сита – это материалы с порами определенного размера.

В некоторых методах разделения применяют различные низкомолекулярные вещества (органические растворители, соли, кислоты, щелочи), создающие нужные значения ионной силы и рН, от которых на определенном этапе выделения и очистки требуется избавиться. Для этого используется диализ,

основанный на применении мембран, проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для биополимеров.

Для получения индивидуального вещества из смеси близких по строению веществ используют зональные методы разделения. Одним из этих методов является хроматография (на колонках, на пластинах – тонкослойная, на бумаге), а вторым – электрофорез, основанный на перемещении заряженных частиц в электрическом поле. Зональное разделение можно проводить с помощью седиментации органелл клеток, биополимеров в центробежном поле в ультрацентрифугах.

После выделения и очистки конкретного вещества используют методы качественного и количественного определения, методы изучения их свойств, структуры и функций (метод электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, балансовых опытов, меченых атомов и др.).

ТЕМА 4. Применение физических величин и международной системы единиц (СИ) в биохимической лабораторной практике

Масса

Массу тела в состоянии покоя определяют взвешиванием на весах. Результат взвешивания тела на весах следует называть *массой*, а не весом, и выражать результат взвешивания в единицах массы – килограммах (кг), в граммах (г), дольных от грамма – миллиграммах (мг), микрограммах (мкг), нанограммах (нг). Единицами массы следует пользоваться для выражения результатов биохимических исследований веществ, относительная молекулярная масса которых неизвестна.

Количество вещества – величина, определяемая числом структурных элементов (атомов, молекул, ионов, электронов и других частиц) в рассматриваемом веществе. За единицу количества вещества принят моль.

Моль – это количество вещества, содержащее столько структурных единиц, сколько содержится атомов в 0,012 кг изотопа углерода ^{12}C . Число частиц в моле любого вещества одно и то же. Оно равно $6,02 \times 10^{23}$ и называется *постоянной Авогадро*. Кратные и дольные единицы от моль – киломоль (кмоль), миллимоль (ммоль), микромоль (мкмоль) и др. Количество вещества предлагается применять для выражения результатов исследования веществ, относительная молекулярная масса которых известна.

Молярная масса – отношение массы вещества к количеству вещества, или иначе – масса вещества, взятого в количестве 1 моль. Её выражают в кг/моль в СИ, или в г/моль и обычно обозначают буквой М. В общем случае молярная масса вещества, выраженная в граммах, численно равна её относительной молекулярной (атомной) массе, выраженной в атомных единицах массы. В практическом плане это означает, что при необходимости взять 1 моль вещества нужно брать число граммов этого вещества, равное его относительной молекулярной (атомной) массе.

Массовая концентрация компонента – отношение массы компонента к объему смеси. Единицы в СИ – $\text{кг}/\text{м}^3$, в биохимических исследованиях г/л.

Молярная концентрация компонента (молярность компонента) – отношение количества вещества к объему смеси. Единицы в СИ – $\text{моль}/\text{м}^3$, в биохимических исследованиях – $\text{моль}/\text{л}$ (для выражения концентрации веществ с известной относительной молярной массой).

Нормальная концентрация (нормальность) выражается числом эквивалентов вещества, содержащегося в 1 л раствора. Раствор, в 1 л которого содержится 1 эквивалент растворимого вещества, называется нормальным (0,1 экв. вещества – децинормальным, 0,01 экв. – сантинормальным, 0,001 экв. – миллинормальным).

Понятие «активность фермента» применяют для количественной характеристики биологических катализаторов – ферментов. В качестве единицы СИ принимается $\text{моль}/\text{с}$ (моль в секунду) – активность фермента, катализирующего превращение 1 моль субстрата в 1 секунду при определенных условиях.

Скорость ферментативной реакции определяется по убыли субстрата или «наработке» продукта реакции за определенное время в определенном объеме исследуемого материала. В качестве единицы СИ принимается $\text{моль}/\text{с}$ (моль в секунду на кубический метр – $\text{моль}/(\text{с} \cdot \text{м}^3)$). Однако для выражения результатов биохимических исследований пользуются единицами $\text{моль}/\text{с}$ на литр – $\text{моль}/(\text{с} \cdot \text{л})$ или чаще миллимоль в час на литр – $\text{ммоль}/(\text{ч} \cdot \text{л})$. При исследовании скорости ферментативных реакций полученный результат обычно называют «активностью фермента», например: «Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови равна 0,5–1,3 $\text{ммоль}/(\text{ч} \cdot \text{л})$ ».

В связи с накоплением опыта применения единиц СИ в биохимической лабораторной практике, с совершенствованием методик исследований (и т.п.) в рекомендуемые для биохимических исследований единицы с течением времени могут быть внесены соответствующие изменения. Так,

например, для активности ферментов рекомендуется термин «каталитическая активность» и производная единица СИ – моль/с (моль в секунду). Для активности фермента, рассчитанной на определенный объем биологической жидкости, рекомендуется термин «концентрация каталитической активности», или «каталитическая концентрация», и производная единица СИ моль/(с·л) или нмоль/(с·л). Для единицы моль/(с·л) рекомендуется наименование «катал» и обозначение «кат», для нмоль/(с·л) – «нкат».

Таблица 1 – Множители и приставки, применяемые для обозначения кратных и дольных единиц

Множитель	Приставка	Обозначение приставки	Множитель	Приставка	Обозначение приставки (символ)
			10^{-1}	Деци	д
			10^{-2}	Санتي	с
10^{12}	Тера	Т	10^{-3}	Милли	м
10^9	Гига	Г	10^{-6}	Микро	мк
10^6	Мега	М	10^{-9}	Нано	н
10^3	Кило	к	10^{-12}	Пико	п
10^2	Гекто	г	10^{-15}	Фемто	ф
10^1	Дека	да	10^{-18}	Атто	а

РАЗДЕЛ II

СТРУКТУРНАЯ БИОХИМИЯ

ТЕМА 1. Аминокислоты, пептиды и белки

Лабораторная работа № 1.

Качественные реакции на аминокислоты и белки

Цель: изучить свойства аминокислот как гетерофункциональных соединений, являющихся структурными компонентами пептидов и белков; научиться проводить качественные реакции на аминокислоты и белки; определить наличие различных типов аминокислот в разных по происхождению белках.

Реактивы: 5% растворы яичного белка, пшеничного белка, желатина; 10% раствор гидроксида натрия (NaOH), 1% раствор сульфата меди (II) (CuSO₄), 0,1% водный раствор нингидрина; реактив Миллона (свежий раствор HgNO₃ в HNO₃), раствор фенола, реактив Фоля (1 мл 5% раствора ацетата свинца и 1,5–2 мл 30% раствора гидроксида натрия); концентрированные серная, азотная и уксусная кислоты.

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, спички, кусочек шерсти или шерстяных ниток, воронки, фильтровальная бумага, ножницы.

Теоретическая часть

Белки – высокомолекулярные биологические полимеры, структурными (мономерными) звеньями которых служат α-аминокислоты.

Аминокислоты в белках соединены друг с другом пептидной связью. Мономерные звенья белков называют остатками аминокислот. Молекулярная масса белков варьирует от 6 тыс. до 1 млн и более.

Химические и физические свойства белков обусловлены химической природой и физико-химическими свойствами радикалов входящих в них остатков аминокислот.

Аминокислоты – гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно амино- и карбоксильную группы. В природе встречается примерно 300 аминокислот, но только 20 из них используются организмами в биосинтезе белка (биогенные). Их общая формула: $RCH(NH_2)COOH$. Особенности строения биогенных аминокислот представлены в **ПРИЛОЖЕНИИ**.

Классификация аминокислот:

- на основе химической структуре R-группы: алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин); гидроксилсодержащие (серин, треонин); серосодержащие (цистеин, метионин); ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); кислые и амиды (аспарагиновая кислота и аспарагин, глутаминовая кислота и глутамин); основные (аргинин, лизин); иминокислоты (пролин);
- на основе полярности R-групп: полярные, неполярные;
- на основе ионных свойств R-групп: кислые, основные, нейтральные;
- на основе питательной ценности для человека: незаменимые – не могут синтезироваться в организме человека (треонин, метионин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан, гистидин, лизин, аргинин) и заменимые – могут синтезироваться в организме.

Аминокислоты могут участвовать во многих реакциях с участием α -аминогрупп, α -карбоксильных групп, а также функциональных групп боковых цепей. Для идентификации и количественного определения белков и отдельных аминокислот используют цветные реакции, когда происходит взаимодействие специфических реактивов с функциональными группами радикалов аминокислот, входящих в состав белка или пептида.

Существуют 2 типа цветных реакций:

1. Универсальные: биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все аминокислоты и белки).
2. Специфические: только на определенные аминокислоты, как в молекуле белка, так и в растворах отдельных аминокислот.

Диагностическое значение и принцип реакций. Цветные реакции дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях и получить представление о его аминокислотном составе:

- *Биуретовая реакция* открывает пептидную связь в белке. Ее способны давать вещества, которые содержат не менее 2 пептидных связей. С ди- и трипептидами реакция неустойчива. При добавлении сернокислой меди к сильнощелочному раствору белка или полипептида образуются соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет, в зависимости от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты неполного его гидролиза (пептоны) – розовое или красное окрашивание. Биуретовую реакцию также могут давать небелковые вещества, содержащие не менее 2 пептидных групп, например, производное мочевины – биурет.
- *Нингидриновая реакция* характерна для α -аминогрупп. Растворы белка, α -аминокислот и пептидов при нагревании с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание. В этой реакции α -аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию с образованием аммиака, альдегида и CO_2 . Нингидрин восстанавливается и связывается со 2-й молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий цвет (комплекс Руэмманна). Нингидриновая реакция используется для количественного определения α -аминокислот в аминокислотных анализаторах.
- *Ксантопротеиновая реакция* открывает наличие в белках циклических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина). Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета.

- *Реакция Миллона* открывает в белке циклическую аминокислоту тирозин. При добавлении к раствору белка реактива Миллона образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла), окрашивающийся при нагревании в красный цвет. Реактив Миллона дает окрашивание почти со всеми фенолами, и в случае белков реакция обусловлена присутствием в них фенольной группы тирозина. Белки, не содержащие тирозина, этой реакции не дают. Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, поскольку он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.
- *Реакция Адамкевича* выявляет наличие в растворе аминокислоты триптофан. Белки, содержащие триптофан в присутствии глиоксиловой (содержится как примесь в ледяной уксусной кислоте) и серной кислот дают соединения, окрашенные в красно-фиолетовый цвет.
- *Реакция Фоля* указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина.

Метионин хотя и является содержащей серу аминокислотой, этой реакции не дает, поскольку сера в нем связана очень прочно. Суть реакции состоит в том, что при кипячении белка с реактивом Фоля под действием щелочи от цистеина или цистина легко отщепляется сера в виде сернистого натрия, который с плюмбитом натрия дает черный или бурый осадок сернистого свинца. Кроме белков, из аминокислот построены пептиды – соединения, содержащие до 20 аминокислотных остатков, и полипептиды, содержащие от 20 до 50 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 6 тыс. единиц. Массовая доля белков в биологических объектах колеблется в широких пределах: в молоке – 2,5–5 %, мышечной ткани – 18–22 %, содержимом куриного яйца – 12–14 %, семенах зерновых культур (от сухой массы) – 12–40 % (и более), картофеле – 0,7–4,6 %, свекле, моркови и других корнеплодах 0,9–1,6 %, фруктах и ягодах – 0,3–2 %, грибах – 3–4 %.

Пептиды, полипептиды и белки отличаются не только количеством, составом, но и последовательностью аминокислотных остатков, физико-химическими свойствами и функциями, выполняемыми в организме.

Практическая часть

Опыт 1. Биуретовая реакция Пиотровского

В 1-ю пробирку наливают 5 капель 5% раствора яичного белка, во 2-ю – 5 капель 5% раствора пшеничного белка, в 3-ю пробирку – 5 капель 5% раствора желатина. Во все 3 пробирки приливают по 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и по 1 капле 1% раствора сульфата меди (II). Во всех пробирках раствор приобретает устойчивую красно-фиолетовую или сине-фиолетовую окраску.

Задание: сделайте вывод об открытии пептидной связи в изученных белках. Запишите механизм реакции Пиотровского.

Опыт 2. Нингидриновая реакция (реакция Руэмманна)

В 3 пробирки, не смешивая, наливают по 5 капель раствора яичного, пшеничного белка, и желатина. В каждую пробирку прибавляют по 2–3 капли 0,1% раствора нингидрина и нагревают до кипения. Через 1–2 мин содержимое пробирок окрашивается в розовый, красный, а затем в синий цвет. При стоянии интенсивность окраски усиливается.

Задание: сделайте вывод об открытии α -аминогрупп в изученных белках.

Опыт 3. Ксантопротеиновая реакция на ароматические аминокислоты

В 3 пробирки по отдельности наливают по 5 капель раствора яичного, пшеничного белка и желатина. Во все пробирки добавляют по 2–3 капли концентрированной азотной кислоты и аккуратно нагревают. В 1-й и 2-й пробирках жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет, в 3-й наблюдается едва заметное бледно-желтое окрашивание. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по 10 капель 30% раствора гидроксида натрия. Окраска жидкости переходит в оранжевую, т.к. образуется аммонийная соль динитротирозина хиноидной структуры.

Задание: сделайте вывод об открытии ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина) в изученных белках.

Опыт 4. Реакция Миллона на тирозин

Работу проводить под тягой! В пробирку с 1 мл раствора фенола добавляют 0,5 мл реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовая окраска. В другую пробирку наливают 1–2 мл раствора яичного или растительного белка и 5–6 капель реактива Миллона, осторожно нагревают. Жидкость окрашивается в красный цвет, а затем выпадает осадок коричнево-красного цвета. То же проделывают с раствором желатина. Красного окрашивания не происходит. Если же окрашивание проявляется очень слабо, то это подтверждает, что желатин не очищен от примеси других белков. Положительная реакция белка с реактивом Миллона свидетельствует о наличии в составе белка аминокислоты тирозина. Реакция не специфична, т.к. протекает также с фенолом. Проба с желатином отрицательна, т.к. в составе этого белка нет тирозина.

Задание: сделайте вывод об открытии тирозина в изученных белках.

Опыт 5. Реакция Адамкевича на триптофан

В 1-ю пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, во 2-ю – 5 капель раствора пшеничного белка, в 3-ю – 5 капель раствора желатина. Во все пробирки добавляют по 5 капель концентрированной уксусной кислоты, слегка нагревают и затем, наклонив пробирку, добавляют по стенке 5 капель концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. Через несколько минут в первых 2 пробирках с раствором яичного и пшеничного белка на границе раздела 2 фаз появляется красно-фиолетовое кольцо, постепенно распространяющееся на всю жидкость. При нагревании на кипящей водяной бане окрашивание происходит быстрее. В пробирке с раствором желатина реакция отрицательная, т.к. в желатине нет триптофана.

Задание: сделайте вывод об открытии триптофана в изученных белках.

Опыт 6. Реакция Фоля

В 3 пробирки по отдельности наливают по 5 капель раствора яичного, пшеничного белка и желатина, в 4-ю кладут небольшой кусочек шерсти или шерстяных ниток. В 4 пробирки добавляют по 5 капель реактива Фоля, осторожно нагревают до кипения и кипятят 1–2 мин. В пробирке с яичным или растительным белком и шерстью появляется буровато-черное или черное окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации раствора белка и содержания в нем аминокислот цистеина и цистина. Раствор желатина не дает окрашивания. Результаты всех опытов оформите в виде **Таблицы 2**.

Таблица 2 – Качественная реакция на аминокислоты и белки

Название качественной реакции	Используемые реактивы	Результат реакции с яичным белком	Результат реакции с растительным белком	Результат реакции с желатином	Суть реакции

Задание: сделайте вывод об открытии цистина и цистеина в исследуемых белках. Запишите механизм реакции Фоля. Сделайте общий вывод об аминокислотном составе исследуемых белков.

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности строения аминокислот, их классификации?
2. Приведите примеры изомерных аминокислот, дайте им названия по систематической номенклатуре.
3. Охарактеризуйте физико-химические свойства аминокислот (амфотерность, растворимость, стереохимия), приводя примеры.
4. Приведите пример образования дипептида, выделив пептидную связь. Назовите полученный дипептид.
5. Дайте определения пептидов, полипептидов, белков.
6. Охарактеризуйте уровни организации белковых молекул (первичная, вторичная, третичная и четвертичная).

7. Соедините Ала, Цис, Сер. Какая реакция открывает пептидные связи?

8. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?

9. При помощи каких цветных реакций можно установить различия аминокислотного состава альбумина и желатина?

10. Если с раствором одного белка реакции Миллона и ксантопротеиновые положительные, а с раствором другого – отрицательные, тогда что можно сказать о различиях аминокислотного состава этих белков?

Лабораторная работа № 2.

Выделение белков из биологических объектов

Цель: познакомиться с лабораторными способами выделения различных белков из биологических объектов.

Реактивы: пшеничная (или ячменная) и гороховая мука; растворы с массовыми долями: хлорида натрия (NaCl) 10%, этанола (C₂H₅OH) 70%, гидроксида натрия (NaOH) 10%, сульфата меди (II) (CuSO₄) 1%, насыщенный раствор хлорида натрия, концентрированные уксусная и серная кислоты, 10% спиртовой раствор α-нафтола.

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, термостат, стеклянные палочки, центрифуга, пробирки для центрифуги.

Теоретическая часть

Процесс выделения белков включает следующие операции:

- измельчение биологического материала до однородной (гомогенной) массы (растения, органы и ткани животных, микроорганизмы);
- перевод белков в растворенное состояние (производят при одновременном измельчении биологического объекта);
- осаждение из раствора отдельных фракций (групп) белков;
- выделение индивидуального белка из смеси других белков.

Операции по выделению белков производят при температуре 4–5 °С, с применением химических реагентов, щадящих нативную конформацию молекулы белка (применение кислот

и щелочей, растворов солей тяжелых металлов для экстрагирования белков недопустимо).

Выделение простых белков. Простые белки – протеины – состоят только из остатков α -аминокислот, соединенных пептидными связями. Протеины выполняют в организме различные функции: структурную, каталитическую, регуляторную, защитную, сократительную и др.

Протеины различаются аминокислотным составом и разделены на группы по способности к растворению в различных растворителях.

Альбумины – белки, хорошо растворимые в воде и в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4–10 %, выпадают в осадок из этих растворов при насыщении их этими же солями и сульфатом аммония. Альбумины содержатся в клетках всех организмов.

Глобулины – нерастворимы в воде, хорошо растворимы в водных растворах нейтральных солей и сульфата аммония с концентрацией 4–10 %, выпадают в осадок при полунасыщении этих растворов.

Глобулины встречаются во всех видах организмов, наиболее распространены в растениях, особенно много их в семенах бобовых.

Проламины – хорошо растворимы в растворе с массовой долей этанола 60–80 %. Эта группа белков найдена только в растениях и только в семенах злаковых.

Муцины (от лат. *mucus* – слизь), мукопротеины – семейство высокомолекулярных гликопротеинов, содержащих кислые полисахариды. Имеют гелеобразную консистенцию, продуцируются эпителиальными клетками почти всех животных и человека.

Муцин осаждается концентрированной уксусной кислотой. Углеводный компонент обнаруживается реакцией с α -нафтолом (реакция Молиша), которая основана на дегидратации пентоз и образовании фурфурола при действии концентрированной серной кислоты (H_2SO_4), продукт конденсации имеет розово-фиолетовый цвет.

Практическая часть

Опыт 1. Выделение альбуминов

В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной (ячменной) муки, во 2-ю – гороховой муки. В обе пробирки наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 8–10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3 000 об./мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции (пример: **Лабораторная работа № 1 «Качественные реакции на аминокислоты и белки»**, опыт 1, с. 19). Какой цвет раствора? По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах. К 1 мл раствора альбуминов пшеничной или гороховой муки добавляют по 4 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Белки выпадают в осадок, в виде мути медленно оседающей на дно пробирки.

Опыт 2. Выделение глобулинов

В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной или ячменной муки, во 2-ю – гороховой. В обе пробирки наливают по 10 мл 10% раствора хлорида натрия, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 8–10 мин.

По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3 000 об./мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах. К 1 мл раствора глобулинов пшеничной или гороховой муки добавляют по 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Белки выпадают в осадок в виде мути, медленно оседающей на дно пробирки.

Опыт 3. Выделение проламинов

В пробирки вносят по 1 г: в 1-ю – пшеничной или ячменной муки, во 2-ю – гороховой. В обе пробирки наливают по 10 мл 70% раствора этанола, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37–38 °С на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 8–10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об./мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах. К 2 мл раствора проламинов пшеничной или гороховой муки добавляют по 2 мл воды. Белки выпадают в осадок, раствор мутнеет.

Результаты трех опытов оформите в виде **Таблицы 3**, обозначив интенсивность окраски знаками «+», «++», «+++», отсутствие окраски знаком «–».

Таблица 3 – Определение наличия простых белков

Объекты исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Мука пшеничная			
Мука гороховая			

Сделайте вывод о способах выделения различных белков из изученных объектов.

Опыт 4. Выделение муцина из слюны и открытие в нем белкового и углеводного компонентов

В ротовую полость набирают 2–3 мл раствора хлорида натрия и держат его во рту 5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку. К 2 мл слюны прибавляют 4–5 капель концентрированной уксусной кислоты (СН₃СООН), избегая избытка кислоты. Выпадает осадок муцина. Содержимое пробирки делят на 2 части и проводят реакцию Молиша и биуретовую реакцию.

Реакция Молиша: к сгустку добавляют 4–5 капель 10% спиртового раствора α -нафтола, перемешивают и по стенке наслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе 2 фаз жидкости постепенно появляется фиолетово-красное кольцо.

Биуретовая реакция: к содержимому пробирки приливают 10 капель 10% раствора гидроксида натрия, а затем 2 капли 1% раствора сульфата меди (II). Появляется розово-фиолетовая или сине-фиолетовая окраска. В лабораторную тетрадь записывают результаты опыта по выявлению в мушине белкового и небелкового компонентов, делают вывод.

Контрольные вопросы

1. Дайте классификацию белкам. Опишите особенности строения простых (протеинов) и сложных (протеидов) белков.
2. Какие функции выполняют протеины?
3. Дайте общую характеристику альбуминам, глобулинам, проламинам.
4. Перечислите основные операции выделения простых белков. Какие условия выделения обеспечивают сохранение нативной конформации молекул белка?
5. Что лежит в основе выделения, обнаружения и осаждения альбуминов, глобулинов, проламинов. Какие из выделяемых белков содержатся в пшеничной и гороховой муке?

Лабораторная работа № 3.

Физико-химические свойства белков

Цель: изучить строение и свойства белка; ознакомиться с реакциями обратимого и необратимого осаждения белка.

Реактивы: 0,2 М раствор уксусной кислоты (CH_3COOH), 0,2 М раствор уксуснокислого натрия (CH_3COONa), 1% раствор желатина или яичного белка, 96% этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), насыщенный раствор хлорида натрия (NaCl), кристаллические: хлорид натрия (NaCl), сульфат магния (MgSO_4), сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); 10% раствор гидроксида натрия (NaOH), 4% раствор яичного белка, ацетон (CH_3COCH_3), 5% раствор ацетата свинца ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$), 1% раствор сульфата меди (II) (CuSO_4), 5% рас-

твор нитрата серебра (AgNO_3), вода дистиллированная, насыщенный раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, концентрированные кислоты: соляная (HCl), серная (H_2SO_4), азотная (HNO_3); 10% раствор ТХУ (трихлоруксусная кислота – CCl_3COOH); 20% раствор сульфосалициловой кислоты ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$).

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, фильтровальная бумага, ножницы.

Теоретическая часть

Стабильность белковых растворов обусловлена 2 основными факторами: наличием заряда белковой молекулы и гидратной оболочки вокруг нее. Устранение этих факторов приводит к осаждению белка из раствора.

Реакции осаждения белков делят на 2 группы: обратимые и необратимые. При *необратимых* реакциях осаждения белки подвергаются денатурации и, утрачивая свои нативные (первоначальные, натуральные) свойства, теряют способность растворяться в первоначальном растворителе. К этим реакциям относят: осаждение белков кислотами, солями тяжелых металлов, при нагревании и др. При *обратимых* реакциях осаждения молекулы белка не подвергаются глубоким изменениям (разрушаются четвертичная и до 30 % третичной структуры), сохраняют свои нативные свойства и полученные осадки можно вновь растворить в первоначальном растворителе. К названным реакциям относят: осаждение белков этанолом и ацетоном при температуре минус 3–5 °С, высаливание (осаждение белков нейтральными солями – NaCl , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4) и др.

Реакции осаждения дают возможность:

- 1) изучить свойства белков;
- 2) освободить жидкость от присутствия белка;
- 3) установить наличие белка в биологических жидкостях, например, в моче;
- 4) высаливанием с помощью различных концентраций нейтральных солей или спиртом выделить отдельные белковые фракции.

В *изоэлектрической точке* суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен нулю, и белки не перемещаются в электрическом поле. Зная аминокислотный состав белка, можно приближенно определить изоэлектрическую точку (рН); рН является характерной константой белков. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН $\approx 5,0$). Протамины и гистоны имеют изоэлектрическую точку в щелочной среде (рН $\approx 8,0$).

Однако в природе имеются белки, у которых значения изоэлектрических точек лежат в крайних значениях рН среды. В частности, величина рН пепсина (фермент желудочного сока) равна 1, а сальмина (основной белок из молока семги) – почти 12.

Реакция высаливания – осаждение белков с помощью высоких концентраций нейтральных солей. Реакция высаливания обусловлена дегидратацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда.

Для высаливания различных белков требуется неодинаковая концентрация одних и тех же солей. Глобулины, имеющие большую молекулярную массу, легче высаливаются, чем альбумины.

Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя с ними солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих же солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но нерастворимые в воде.

Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. *денатурацию*. Растворение осадка в избытке солей называется *адсорбционной пептизацией*.

Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка. Концентрированные минеральные кислоты также вызывают денатурацию белка. Выпадение белка в виде осадка связано с денатурацией белковых частиц и образованием комплексных солей белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший в осадок белок растворяется.

Органические кислоты (чаще используют трихлоруксусную и сульфосалициловую) вызывают необратимое осаждение белков. Сульфосалициловая кислота, помимо белков, осаждает также продукты их распада – высокомолекулярные пептоны и полипептиды. Трихлоруксусная кислота способна осаждать только белки, она не осаждает продукты распада белков. В органических растворителях, как спирт, ацетон и др., белки не растворяются и выпадают в осадок. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Спирт связывает воду, вызывая дегидратацию мицелл белка и неустойчивость их в растворе. При осаждении спиртом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Реакция проходит лучше в присутствии электролита хлорида натрия вследствие снятия заряда с частиц белка. Реакция осаждения белка спиртом или кратковременным действием спирта на холоде обратима. Если осадок быстро отделить от спирта, то белок может сохранить нативное состояние.

Осаждение белков алкалоидными реактивами также относится к необратимым реакциям. К группе алкалоидных реактивов принадлежат танин, пикриновая кислота и др. Механизм осаждения белков алкалоидными реактивами связан с образованием нерастворимых соединений с основными азотосодержащими группами белка. В этом соединении белок является катионом, а алкалоидный реактив – анионом. С этой целью рекомендуется слабое подкисление раствора белка уксусной кислотой, способствующей появлению положительного заряда на мицелле белка, которая в результате этого легко взаимодействует с отрицательно заряженными частицами осадителя.

Белки – протамины и гистоны, несущие положительный заряд, хорошо осаждаются алкалоидными реактивами в нейтральной среде без подкисления. Почти все белки при нагревании свертываются. Температура свертывания различна для разных белков, если одни белки коагулируют уже при 50–55 °С, то некоторые из них выдерживают даже продолжительное кипячение. При свертывании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние. Реакция дена-

турации протекает постепенно и ускоряется с повышением температуры, поэтому кратковременное нагревание может и не привести к свертыванию.

Практическая часть

Опыт 1. Определение изоэлектрической точки белка

В 5 пробирок наливают 0,2 М раствор уксусной кислоты и 0,2 М раствор уксуснокислого натрия в количествах, указанных в **Таблице 4**. В каждую пробирку к 1 мл полученной смеси приливают по 0,5 мл 1% раствора желатина или яичного белка и по 2 мл этанола. Отмечают, в какой пробирке и при каком значении рН произошло наибольшее помутнение раствора. Отсутствие мути отмечают знаком «–», а его наличие одним «+» или двумя знаками «++». Результаты фиксируют в таблице и по степени мутности делают вывод об изоэлектрической точке (рН) данного белка.

Таблица 4 – Определение изоэлектрической точки белка

№ пробирки	Раствор CH_3COONa , мл	Раствор CH_3COOH , мл	рН	Помутнение
1	0,1	0,9	3.80	
2	0,2	0,8	4.15	
3	0,5	0,5	4.75	
4	0,8	0,2	5.35	
5	0,9	0,1	5,70	

Опыт 2. Осаждение белков при нагревании

В 5 пробирок наливают по 1 мл раствора белка. Содержимое 1-й пробирки нагревают до кипения. Наблюдают помутнение раствора белка, т.к. яичный белок имеет кислые свойства и в нейтральной среде заряжен отрицательно. Во 2-ю пробирку добавляют 1 каплю 1% раствора CH_3COOH и нагревают. Осадок выпадает быстрее и полнее вследствие того, что белок находится в изоэлектрической точке. В 3-ю пробирку добавляют 1 каплю 10% раствора CH_3COOH и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в сильноокислой среде молекулы белка сохраняют устойчивость. В 4-ю пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора CH_3COOH и 3 капли насы-

щенного раствора NaCl и нагревают. Образуется осадок белка (*объясните причину*). В 5-ю пробирку добавляют 0,5 мл раствора NaOH и нагревают. Осадок не образуется даже при кипячении, т.к. в щелочной среде отрицательный заряд частицы белка увеличивается.

Задание: сделайте вывод об устойчивости белка при разных условиях.

Опыт 3. Осаждение белков спиртом и ацетоном

В пробирку наливают 1 мл раствора белка, прибавляют щепотку хлорида натрия и размешивают стеклянной палочкой. Затем постепенно приливают 2 мл этанола и сильно встряхивают, закрыв пробирку пробкой. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка. В пробирку наливают 1 мл раствора белка, по стенке осторожно добавляют 0,2 мл ацетона, на границе раздела фаз обеих жидкостей появляется белое кольцо денатурированного белка.

Задание: сделайте вывод о влиянии этанола и ацетона на осаждение белков.

Опыт 4. Осаждение белков солями тяжелых металлов

В 3 пробирки наливают по 10 капель раствора белка. В 1-ю пробирку прибавляют 3–5 капель раствора ацетата свинца, во 2-ю – 3–5 капель раствора сульфата меди, в 3-ю пробирку – 3–5 капель раствора нитрата серебра. Наблюдают образование осадков во всех пробирках. В 1-ю и 2-ю пробирки добавляют избыток соответственно $Pb(CH_3COO)_2$ и $CuSO_4$. Наблюдают растворение осадков.

Задание: сделайте вывод о влиянии солей тяжелых металлов на осаждение белков.

Опыт 5. Осаждение белков минеральными кислотами

В 3 пробирки осторожно наливают по 1 мл кислот: в 1-ю – соляной, во 2-ю – серной, в 3-ю пробирку – азотной. Осторожно приливают во все пробирки по 1 мл раствора белка. На границе 2 жидкостей наблюдается появление осадка белка в виде небольшого белого кольца. Если встряхнуть пробирки, то происходит растворение осадков в пробирках с со-

ляной и серной кислотой. В пробирке с азотной кислотой осадок при встряхивании не исчезает, т.к. в избытке азотной кислоты он не растворяется.

Задание: сделайте вывод о влиянии минеральных кислот на осаждение белков.

Опыт 6. Высаливание белков

В пробирку с 0,5 мл неразбавленного яичного белка приливают 2,5 мл воды; образуется небольшое количество белого хлопьевидного осадка глобулинов. Затем добавляют несколько капель насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, происходит растворение выпавшего осадка. К 2,5–3 мл данного раствора, содержащего альбумины и глобулины, прибавляют равный объем (2,5–3 мл) насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, выпадает осадок глобулинов, который удаляют фильтрованием. К фильтрату добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения. При этом выпадает осадок альбуминов, который также отфильтровывают. Затем проводят пробу на полноту осаждения белка в фильтрате, используя концентрированную HNO_3 .

А) Изучение обратимости высаливания. К 2 мл раствора белка приливают 2 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; выпадает осадок, который растворяется при прибавлении воды.

Б) Осаждение белка хлоридом натрия и сульфатом магния. В 2 пробирки наливают по 3 мл белка. В одну пробирку прибавляют до насыщения только измельченный хлорид натрия, а в другую только сульфат магния. Через несколько минут в обеих пробирках образуется осадок глобулинов. Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтратах остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок даже при их полном насыщении NaCl и MgSO_4 . К полученному фильтрату прибавляют 2–3 капли разбавленной CH_3COOH . В слабокислой среде альбумины выпадают в осадок. Через несколько минут альбумины отфильтровывают. Фильтрат проверяют на присутствие белка, для этого проводят биуретовую реакцию.

Задание: сделайте вывод о возможности обратимого высаливания белков.

Контрольные вопросы

1. Каково биологическое значение белков?
2. В чем отличие обратимой денатурации от необратимой?
3. Какие факторы вызывают гидролиз белков? Каковы продукты гидролиза белков?
4. Какие белки называют глобулярными? Приведите примеры.
5. Напишите структурную формулу полипептида и укажите, какой заряд несет эта молекула в нейтральной среде: H₂N-сер-тир-сер-мет-гли-вал-СООН.
6. К какой группе белков относится коллаген? Каковы его свойства?
7. От чего зависит значение изоэлектрической точки белка?
8. Какие типы связей обнаружены в молекуле белков? Приведите примеры.
9. Перечислите физико-химические свойства белков.
10. Какой процесс называют высаливанием?
11. Какими реактивами вызывается обратимое осаждение белков?
12. Какими реактивами вызывается необратимое осаждение белков?
13. Какое значение имеют реакции осаждения белков для биохимического анализа биологических жидкостей?

Лабораторная работа № 4.

Количественное определение содержания белка в растворе

Цель: изучить различные методы количественного определения белка; определить концентрацию белка в исследуемых растворах одним из методов.

Реактивы: стандартный раствор белка – 1 мг белка в 1 мл, например альбумина, содержащий 10 мг белка на 1 мл (для биуретового метода) и 2 мг белка в 1 мл (для микробиуретового метода); растворы белка неизвестных концентраций – X₁ и X₂; 3% раствор гидроксида натрия (NaOH) (для микробиуретового метода).

Биуретовый реактив. 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (медный купорос) и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) растворяют в 50 мл дистиллированной H_2O , при энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10% раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г иодида калия (KI) и доводят водой до 100 мл. Хранят в полиэтиленовой банке в течение 1 месяца.

Реактив Бенедикта. (1) Раствор-1: К 50 мл дистиллированной H_2O добавить 17,3 г цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) и 10 г карбоната натрия (Na_2CO_3). Смесь нагреть (не доводя до кипения) до полного растворения солей. (2) Раствор-2: Растворить 1,73 г сульфата меди (CuSO_4) в 10 мл дистиллированной H_2O . (3) Раствор-2 добавить к раствору-1 и довести общий объем до 100 мл дистиллированной H_2O . Перемешать. Реактив Бенедикта готов к работе.

Оборудование и материалы: спектрофотометр (СФ); аналитические весы; штативы с пробирками; автоматические пипетки переменного объема и наконечники к ним; стаканы стеклянные с носиком, кюветы шириной 1 см.

Теоретическая часть

Для количественного определения белка применяют физические, химические и биологические методы. Из физических методов простейшим кажется взвешивание чистого белка. Однако белки очень гигроскопичны, полностью удалить из их состава воду трудно. Наибольшее распространение из физических методов получил *спектрофотометрический метод* (по поглощению в ультрафиолетовой области спектра).

Самым распространенным химическим методом количественного определения белка является *колориметрический метод*. Он основан на изменении интенсивности цветных реакций. Цветные реакции применяются, чтобы установить вещество белковой природы, для идентификации белков и определения их аминокислотного состава в различных биологических жидкостях. К колориметрическим методам относят: биуретовый метод, микробиуретовый метод, метод Лоури, метод Бредфорда.

Биуретовый метод. Основан на образовании биуретового комплекса (имеет фиолетовый цвет) пептидных связей белков с 2-валентными ионами меди в щелочной среде. Полноценный комплекс образуется лишь с пептидами, состоящими более чем из 4 остатков аминокислот, и характеризуется высокой стабильностью. Оптическую плотность раствора определяют при 540–560 нм. К достоинствам метода стоит отнести его низкую чувствительность к посторонним веществам и невысокую погрешность.

Микробиуретовый метод (метод Бенедикта) аналогичен биуретовому методу, однако вместо биуретового реактива используют реактив Бенедикта (является более чувствительным и позволяет определить белок в диапазоне от 0,1 до 2 мг в пробе). Оптическую плотность раствора определяют при 330 нм.

Метод Лоури. Основан на том, что в щелочной среде ионы Cu^{+2} образуют комплекс с пептидными связями, переходя в Cu^+ . Одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина, образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь, с максимумом адсорбции при 750 нм. Увеличение адсорбции при 750 нм пропорционально концентрации белка. Метод очень чувствителен к наличию в растворе посторонних восстановителей, что затрудняет его использование при определении белка в неочищенных препаратах, чувствительность к белку 10–100 мкг/мл.

Метод Бредфорда. Метод основан на реакции красителя Кумасси с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками. Связанная форма имеет синюю окраску с максимумом поглощения при 595 нм. Метод позволяет определить белок в диапазоне концентраций от 10 до 50 мкг. Наиболее быстрым и не требующим большого количества реагентов является *спектрофотометрический метод*. Он основан на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина) поглощать УФ свет при 280 нм. Измеряя оптическую плотность раствора при этой длине волны, определяют количество белка в растворе, но поскольку белки имеют разное содержание ароматических аминокислот, их поглощение в УФ области может сильно различаться.

Практическая часть

Опыт 1. Микробиуретовый метод (метод Бенедикта) определения содержания белка в растворе

Из стандартного раствора альбумина (2 мг/мл) готовят в соответствии с **Таблицей 5** растворы, содержащие 2,0, 1,4, 1,0, 0,6, 0,4, 0,2 мг альбумина в 1 мл.

Таблица 5 – Состав проб для определения содержания белка с помощью реактива Бенедикта

Номер пробы	Раствор белка (2 мг/мл), мл	Дистиллированная вода, мл	Раствор NaOH, мл	Реактив Бенедикта, мл	Содержание белка в пробе, мг	Экстинкция, $\lambda=330$ нм
1	1,0	0	2,0	0,2	2,0	
2	0,7	0,3	2,0	0,2	1,4	
3	0,5	0,5	2,0	0,2	1,0	
4	0,3	0,7	2,0	0,2	0,6	
5	0,2	0,8	2,0	0,2	0,4	
6	0,1	0,9	2,0	0,2	0,2	
7 (контроль)	0,0	1,0	2,0	0,2	0,0	
8 (опытная)	Раствор белка концентрации X_1	0	2,0	0,2	Определить по калибровочному графику	
9 (опытная)	Раствор белка концентрации X_2	0	2,0	0,2	Определить по калибровочному графику	

Объем раствора белка соответствующего разведения во всех пробирках 1 мл. Затем добавляют в каждую пробирку по 2 мл 3% раствор NaOH и по 0,2 мл реактива Бенедикта. Смесь перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряют при 330 нм (E_{330}) в стеклянной или кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. На каждую пробу проводят 2 определения, для построения калибровочного графика используют среднее арифметическое.

При построении калибровочного графика откладывают на оси абсцисс показания содержания белка в пробе, а на оси ординат – оптической плотности (экстинкции) каждого раствора, точки пересечения соединяют и получают калибровочную кривую (**Рис. 1**).

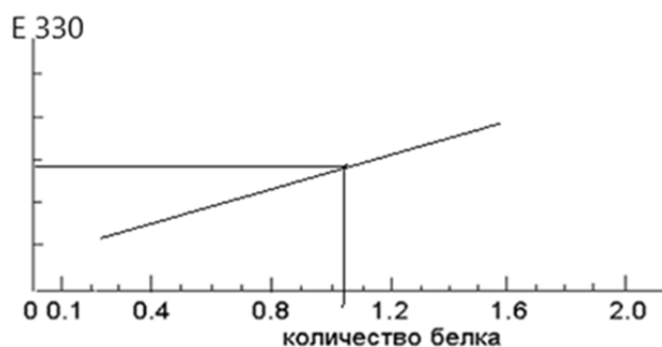


Рис. 1 – Калибровочный график зависимости оптической плотности (E) белкового раствора (длина волны 330 нм) от концентрации белка

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику, откладывают на оси ординат экстинкцию исследуемого раствора, проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, опускают перпендикуляр от точки пересечения на ось абсцисс, определяют содержание белка в исследуемом растворе.

Задание: сделайте вывод о возможности использования метода Бенедикта для определения содержания белка в растворе. В чем преимущества данного метода?

Опыт 2. Биуретовый метод определения содержания белка в растворе

Из стандартного раствора альбумина (10 мг/мл) готовят растворы в соответствии с **Таблицей 6**, содержащие 2 мг, 4 мг, 6 мг, 8 мг, 10 мг альбумина в 1 мл. Объем раствора белка соответствующего разведения во всех пробирках 1 мл. Затем добавляют в каждую пробирку по 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют на 30 мин (22 °С).

Далее измеряют оптическую плотность растворов на СФ в стеклянной или кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм (E_{540}).

Таблица 6 – Состав проб для определения содержания белка с помощью биуретового реактива

Номер пробы	Раствор белка (10 мг/мл), мл	Дистиллированная вода, мл	Биуретовый реактив, мл	Содержание белка в пробе, мг	Экстинкция, $\lambda=540$ нм
1	1,0	0	4,0	10,0	
2	0,8	0,2	4,0	8,0	
3	0,6	0,4	4,0	6,0	
4	0,4	0,6	4,0	4,0	
5	0,2	0,8	4,0	2,0	
6 (контроль)	0,0	1,0	4,0	0,0	
7 (опытная)	Раствор белка концентрации X_1	0	4,0	Определить по калибровочному графику	
8 (опытная)	Раствор белка концентрации X_2	0	4,0	Определить по калибровочному графику	

На каждую пробу проводят 2 определения, для построения калибровочного графика используют среднее арифметическое. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс содержание белка в пробе, а на оси ординат оптическую плотность (экстинкцию) каждого раствора.

Точки пересечения соединяют и получают калибровочную кривую (**Рис. 2**), по которой рассчитывают содержание белка в исследуемых растворах.

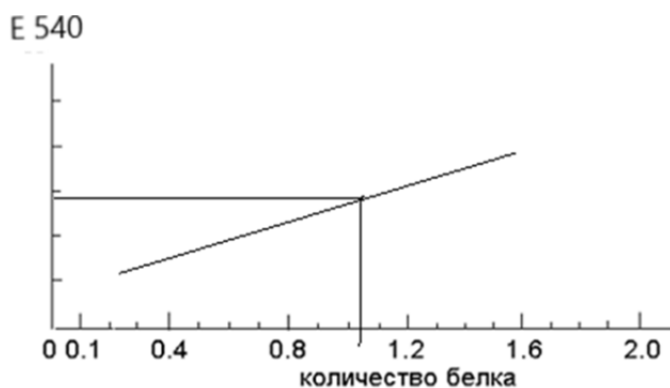


Рис. 2 – Калибровочный график зависимости оптической плотности (E) белкового раствора (длина волны 540 нм) от концентрации белка

Опыт 3. Спектрофотометрический метод определения содержания белка в растворе

Для опыта используют стандартный раствор белка. В кварцевую кювету помещают 3 мл раствора белка и измеряют величину оптической плотности раствора на СФ при длине волны 260 и 280 нм. На основании полученных данных содержание белка рассчитывают по формуле Калькара:

$$\text{Содержание белка} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \text{ (мг/мл)},$$

где A_{280} – оптическая плотности раствора белка при 280 нм;

A_{260} – оптическая плотности раствора белка при 260 нм.

Задание: на основании проведенных опытов сделать вывод о содержании белка в исследуемых растворах, сравнить методы количественного определения белка между собой.

Опыт 4. Определения содержания белка в гомогенатах клеток зеленой микроводоросли хлореллы

Для опыта используют зеленую микроводоросль хлореллу, выращенную в условиях периодической культуры. Клетки хлореллы разрушают в гомогенизаторе Поттера – Эльвейема на льду с добавлением 0,5 мл бидистиллированной воды в течение 5 мин или растирают со стеклом в фарфоровой ступке пестиком.

Экстракцию белка проводят в течение 45–50 мин при 4 °С, перемешивая гомогенат каждые 10 мин. Затем полученный гомогенат центрифугируют 10 мин при 4 °С и 8000 об./мин. Концентрацию белка в супернатантах микроводоросли хлореллы определяют колориметрическим методом. Содержание белка в исследуемых супернатантах рассчитывают по калибровочному графику (см. **Рис. 1**).

Контрольные вопросы

1. Перечислите методы определения содержания белка в растворе.

2. В чем суть биуретового, микробиуретового, спектрофотометрического методов определения содержания белка в растворе?

3. На какой реакции основано количественное определение белка биуретовым методом?

4. Каково значение определения белка в биологических жидкостях (крови, моче)?

Лабораторная работа № 5.

Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

Цель: провести идентификацию аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге.

Реактивы: смесь растворителей в соотношении (12:3:5) – н-бутанол: уксусная кислота: вода; раствор нингидрина в ацетоне, 0,2%; смесь аминокислот; растворы аминокислот-«свидетелей».

Оборудование и материалы: хроматографическая бумага, хроматографическая камера (чашка Петри), штатив с пробирками, ножницы, линейка, микропипетки, наконечники для микропипеток с подставкой.

Теоретическая часть

Метод является одним из методов распределительной хроматографии. В роли твердого носителя используют специальную хроматографическую бумагу в виде листов или полосок. Этот метод широко используется для разделения смеси аминокислот, для качественного обнаружения отдельных аминокислот. Достоинством этого метода является то, что он позволяет исследовать ничтожное количество вещества. Разделение аминокислот основано на их различной растворимости в нескольких несмешивающихся жидкостях (фазах). Одной из жидкостей служит вода, которая прочно ассоциируется с молекулами целлюлозы и образует неподвижную фазу.

Менее полярные водонасыщенные органические растворители (изобутиловый, изопропиловый, бутиловый спирт, фенол и др.) составляют подвижную фазу. Подвижный органический растворитель поднимается по полоске бумаги, растворяет нанесенные на бумагу аминокислоты и увлекает их за собой. Скорость перемещения аминокислот на бумаге зависит от степени их растворимости в подвижных и неподвиж-

ных фазах. Чем больше растворимость аминокислот в водной фазе и чем меньше ее растворимость в неводной фазе, тем медленнее движется аминокислота по сравнению с фронтом органического растворителя.

Иными словами, аминокислоты с объемными неполярными боковыми цепями (Гли, Лей, Иле, Фен, Трп, Вал, Мет, Тир) перемещаются быстрее, чем аминокислоты с более короткими боковыми цепями (Про, Ала, Гли) или с полярными боковыми цепями (Тре, Глу, Сер, Арг, Асп, Гис, Лиз, Цис).

Положение отдельных аминокислот на хроматографической бумаге обнаруживают при помощи цветной реакции с нингидрином. Идентификацию отдельных аминокислот на хроматограмме проводят путем нанесения на ту же хроматограмму «свидетелей» – растворов отдельных аминокислот.

Можно также идентифицировать аминокислоты по величине R_f , равной отношению пути, пройденного аминокислотой (от места нанесения) (a) к расстоянию, пройденному растворителем (от места смеси аминокислот до фронта растворителя) (b):

$$R_f = a/b.$$

Коэффициент R_f – величина, характерная для каждой аминокислоты и постоянная при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги).

Возможны разные варианты хроматографии на бумаге: нисходящая, восходящая, радиальная.

Практическая часть

1. Квадрат хроматографической бумаги размером 11×11 см делят диагоналями на 4 части. В центре пересечения диагоналей описывается окружность радиусом 10 мм, стороны квадрата нумеруют. На середину каждой из 4 дуг, ограниченных диагоналями, наносят микропипеткой пятнышко (2–3 мм в диаметре) из аминокислот «свидетелей» и анализируемую смесь аминокислот.

2. В центре квадрата иглой проделывают отверстие и в него вставляют фитиль, скатанный из небольшого треугольника фильтровальной бумаги в виде трубочки.

3. На дно чашки Петри наливают 10–15 мл смеси растворителей (бутанол, уксусная кислота, вода) так, чтобы было покрыто дно чашки. Квадрат помещают на чашку Петри так, чтобы он лежал на ее краях. Фитилек должен касаться дна чашки Петри. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют при комнатной температуре. По фитильку растворитель поднимается вверх, распределяется по бумаге от центра к периферии листа. Когда фронт растворителя дойдет до краев чашки Петри (примерно через 1 ч), хроматограмму снимают, отмечают карандашом фронт растворителя, помещают ее на крышку чашки Петри и ставят в сушильный шкаф при температуре 100–130 °С на 5 мин (до исчезновения запаха растворителя). Высушенную хроматограмму проявляют 0,2% раствором нингидрина в ацетоне и вновь помещают в сушильный шкаф. Через несколько минут на хроматограмме появляются пятна, указывающие положение аминокислот.

4. Для каждой аминокислоты рассчитывают коэффициент распределения R_f . Аминокислоты анализируемой смеси идентифицируют, сравнивая их с R_f аминокислоты-«свидетеля».

Оформление работы. В лабораторную тетрадь записывают принцип метода бумажной хроматографии. Полученную хроматограмму вклеивают в тетрадь (или зарисовывают). После расчета аминокислот смеси и «свидетелей» на хроматограмме указывают названия аминокислот, входящих в состав анализируемой смеси.

Контрольные вопросы

1. В чем суть бумажной хроматографии? Где её применяют?
2. Перечислите виды бумажной хроматографии и кратко опишите каждый из них.
3. В чем суть метода ионообменной хроматографии?
4. В чем суть метода аффинной хроматографии?
5. Какие методы разделения индивидуальных белков вам известны?

ТЕМА 2. Нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты

Лабораторная работа № 6.

Выделение и гидролиз нуклеопротеинов дрожжей, открытие продуктов гидролиза

Цель: провести гидролиз нуклеопротеинов дрожжей; доказать наличие в составе нуклеопротеинов дрожжей соединений разной природы с помощью качественных реакций.

Реактивы: растворы: 10% гидроксида натрия, 1% сульфата меди (II) (CuSO_4), 2% нитрата серебра (AgNO_3), 10% серной кислоты (H_2SO_4), дифениламинный реактив 1% раствор (1 г дифениламина растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 и доводят ледяной уксусной кислотой до 100 мл), аммиак (концентрированный раствор), молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл концентрированной HNO_3), дистиллированная вода.

Оборудование и материалы: штатив с пробирками, фарфоровая ступка с пестиком, пипетки, лакмусовая бумага, круглодонная колба с обратным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, электрическая плитка. Дрожжи.

Теоретическая часть

Нуклеиновые кислоты относятся к важнейшим и универсальным биомолекулам. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота) представляют собой полимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды. Нуклеотиды построены из азотистых (пуриновых или пиримидиновых) оснований, пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и остатка ортофосфорной кислоты. Именно особенности химической структуры азотистых оснований лежат в основе хранения, воспроизведения и передачи генетической информации. Нуклеозиды – это N-гликозиды, образованные нуклеиновыми основаниями и рибозой или дезоксирибозой. В зависимости от природы моносахаридного остатка нуклеозиды делят на *рибонуклеозиды* (содержат остаток рибозы) и *дезоксирибонуклеозиды* (содержат остаток дезоксирибозы). В большинстве

случаев нуклеиновые кислоты функционируют в биосистемах в виде комплексов с белками (протеинами). Эти комплексы, образованные благодаря высокоспецифичным взаимодействиям между соответствующими полипептидными и полинуклеотидными цепями, называют нуклеопротеинами. Для изучения химического состава нуклеопротеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей. С помощью качественных реакций обнаруживают продукты гидролиза – белки, азотистые основания, а также рибозу (дезоксирибозу) и ортофосфорную кислоту.

Практическая часть

Опыт 1. Получение гидролизата дрожжей

Для получения гидролизата в круглодонную колбу объемом 100–150 мл помещают 1–2 г свежих или 0,2–0,5 г сухих пекарских дрожжей, добавляют 20 мл 10% раствора H_2SO_4 . Затем колбу соединяют с обратным холодильником. Гидролиз дрожжей проводят при нагревании в течение 1 ч с момента закипания жидкости. После охлаждения гидролизат фильтруют и с фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

Опыт 2. Биуретовая реакция на белок и полипептиды

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% раствора $NaOH$ до отчетливой щелочной реакции (проверяем по лакмусу), затем добавляют 2 капли 1% раствора $CuSO_4$. Появляется сине-фиолетовая окраска.

Опыт 3. Серебряная проба на пуриновые основания

К 10 каплям гидролизата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции (проверяем по лакмусу), затем добавляют 10 капель 2% раствора $AgNO_3$. Через несколько минут образуется светло-коричневый осадок солей пуриновых оснований (содержимое пробирки при стоянии перемешивать не надо).

Опыт 4. Реакции на углеводный компонент

Реакция с дифениловым реактивом. Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с рибозой – зеленое. К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 1% раствора

дифениламинового реактива и кипятят на водяной бане 15 мин. Появляется сине-зеленое окрашивание.

Реакция Молиша на пентозы. К 1 мл фильтрата добавляют 2–3 капли спиртового раствора тимола и осторожно, по стенке пробирки, наслаивают 1 мл концентрированной H_2SO_4 . Жидкость окрашивается в красный цвет; окраска более выражена на границе раздела слоев.

Опыт 5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 10 каплям гидролизата прибавляют 20 капель молибденового реактива и осторожно кипятят несколько минут. В присутствии фосфорной кислоты наблюдается окрашивание раствора в лимонно-желтый цвет. Сделайте вывод о том, с помощью каких качественных реакций возможно доказать наличие в составе нуклеопротеинов дрожжей соединений разной природы.

Контрольные вопросы

1. Какова биологическая роль ДНК и РНК?
2. Какие из предложенных соединений входят в состав ДНК:
 - а) цитозин, гуанин, рибоза, урацил;
 - б) дезоксирибоза, тимин, гуанин, урацил;
 - в) аденин, дезоксирибоза, гуанин, тимин;
 - г) гуанин, цитозин, рибоза, аденин;
 - д) урацил, рибоза, тимин, аденин?
3. Какие из предложенных соединений входят в состав РНК:
 - а) рибоза, тимин, урацил, аденин;
 - б) урацил, аденин, дезоксирибоза, рибоза;
 - в) урацил, аденин, тимин, рибоза;
 - г) дезоксирибоза, тимин, рибоза, аденин;
 - д) аденин, урацил, тимин, рибоза?
4. Какие из предложенных соединений вступают во взаимодействие с дифениламиновым реактивом:
 - а) тимин, рибоза, урацил, аденин;
 - б) гуанин, дезоксирибоза, урацил, тимин;
 - в) аденин, гуанин, урацил, рибоза?

5. Какие из предложенных соединений вступают во взаимодействие со щелочным раствором нитрата серебра:
- а) тимин, урацил, аденин, дезоксирибоза;
 - б) гуанин, рибоза, дезоксирибоза, тимин;
 - в) рибоза, цитозин, гуанин, урацил?

Лабораторная работа № 7.

Определение концентрации нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом

Цель: изучить спектрофотометрический метод определения концентрации нуклеиновых кислот (НК) в биологическом материале; провести определение содержания нуклеиновых кислот в навеске мышечной ткани.

Реактивы: 0,2 н и 0,5 н растворы хлорной кислоты (HClO_4); дистиллированная вода.

Оборудование и материалы: спектрофотометр, кварцевые кюветы, центрифуга типа Т 23 D или рефрижераторная К-24, центрифужные пробирки 30–50 мл, водяная баня, цилиндры или пробирки на 25–50 мл (2 шт.), пробирки мерные – 2 шт., стаканы, реторты, микропипетки на 100 и 1000 мкл, наконечники для пипеток, стеклянные палочки, маркеры, бинт, фильтровальная бумага, штативы. Навеска мышечной ткани крупного рогатого скота (КРС).

Теоретическая часть

Принцип метода основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) хлорной кислотой (HClO_4) при нагревании с последующим определением нуклеинового фосфора (Фн) в растворе фотометрированием при длинах волн 270 и 290 нм.

Расчет проводят по формуле:

$$C \text{ (мкг/мл) } \Phi_{\text{н}} = (E_{270} - E_{290}) / 0,19,$$

где коэффициент 0,19 – это значение ΔE , где гидролизат содержит 1 мкг НК в 1 мл раствора.

По концентрации F_n вычисляют содержание нуклеиновых кислот:

$$C \text{ (мкг/мл) НК} = C \text{ (мкг/мл) } F_n \times 10,3,$$

где 10,3 – коэффициент пересчета на смесь НК.

Можно определять отдельно содержание ДНК и РНК, измеряя величину поглощения раствора при λ_{\max} 270 и 290 нм и учитывая коэффициент пересчета для ДНК ($k = 10,1$) и РНК ($k = 10,5$).

Расчет проводят по формуле:

$$C = (E_{270} - E_{290}) \times k \times V / 190,$$

- где C – концентрация нуклеиновых кислот в мг/мл;
 E – оптическая плотность при соответствующей длине волны;
 k – коэффициент пересчета по фосфору нуклеиновой кислоты (для ДНК $k = 10,1$ для РНК $k = 10,5$);
 V – объем исследуемой пробы;
190 – удельная экстинкция 1 мг фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора.

Практическая часть

Определение содержания нуклеиновых кислот в мышечной ткани

В центрифужные пробирки помещают по 10 и 500 мг гомогенизированной мышечной ткани КРС. Добавляют по 10 мл 0,2 н хлорной кислоты и перемешивают стеклянной палочкой. Осадок отделяют центрифугированием при 3 000 об./мин в течение 5 мин (20 °С). Осадок повторно отмывают. К осадкам добавляют по 10 мл 0,5 н раствора хлорной кислоты, закрывают пробирки ретортой, нагревают в течение 30 мин в кипящей водяной бане. Гидролизат охлаждают под струей холодной воды и центрифугируют при 3 000 об./мин в течение 5 мин (20 °С). Надосадочную жидкость переливают в чистые стеклянные пробирки и измеряют поглощение растворов (E_{270} и E_{290}); контроль 0,5 н раствор хлорной кислоты.

Оценка результатов. Рассчитывают концентрацию ДНК и РНК, т.к. нуклеиновые кислоты экстрагированы из ткани, делают расчет по формуле:

$$C = (E_{270} - E_{290}) \times k \times V / 190 .$$

Задание: Сделайте вывод, сравнив содержание РНК и ДНК в соматических клетках мышечной ткани.

Контрольные вопросы

1. Опишите первичную, вторичную, третичную структуры ДНК и РНК.
2. Опишите типы РНК и их функции.
3. Опишите процесс биосинтеза ДНК.
4. Опишите процесс биосинтеза РНК.
5. Опишите процесс биосинтеза белка.
6. Какие методы выделения нуклеиновых кислот, используемые в лабораторной практике, вам известны?
7. Какие методы изучения структуры нуклеиновых кислот вам известны?

ТЕМА 3. Витамины

Витамины – природные, биологически активные низкомолекулярные органические соединения, различные по строению и физико-химическим свойствам, но абсолютно необходимые для нормальной жизнедеятельности человека, животных, птиц, растений, микроорганизмов.

Витамины необходимы организму в относительно небольших количествах (от нескольких мкг до нескольких мг) и в отличие от других факторов питания, как правило, не являются материалом для биосинтезов или источником энергии.

Современная классификация витаминов не является совершенной. Она основана на физико-химических свойствах (в частности, растворимости) или на химической природе, но до сих пор сохраняются и буквенные обозначения. В зависимости от растворимости в неполярных органических растворителях или в водной среде различают водо- и жирорастворимые витамины. В приводимой классификации, помимо буквенного обозначения, приводится номенклатурное химическое название каждого витамина, а в скобках указан основной биологический эффект, иногда с приставкой «анти», указывающей на способность данного витамина предотвращать или устранять развитие какого-либо заболевания.

Витамины, растворимые в воде:

- Витамин В₁ – тиамин (антиневритный);
- Витамин В₂ – рибофлавин (витамин роста);
- Витамин В₆ – пиридоксин (антидерматитный);
- Витамин В₁₂ – цианокобаламин, кобаламин (антианамический);
- Витамин РР – никотинамид (антипелларгический, ниацин);
- Витамин В₉ – фолиевая кислота (антианамический);
- Витамин В₃ – пантотеновая кислота (антидерматитный);
- Витамин Н – биотин (антисеборейный, фактор роста бактерий дрожжей и грибов);
- Витамин С – аскорбиновая кислота (антискорбутный);
- Витамин Р – (капилляроукрепляющий, витамин проницаемости).

Витамины, растворимые в жирах:

Витамин А – ретинол (антиксерофтальмический);

Витамин D – кальциферолы (антирахитический);

Витамин E – токоферолы (антистерильный, витамин размножения);

Витамин K – нафтохиноны (антигеморрагический).

K витаминоподобным веществам относятся: липоевая, пангамовая, оротовая, парааминобензойная кислоты, холин и инозитол.

Ревитаминизация – это добавление витаминов в сырье, которое теряет их при переработке (добавление витаминов B₁, B₂, B₅ к пшеничной муке высшего сорта и обрубленному рису, а также витаминов А и D к обезжиренному молоку).

Стандартизация и обогащение витаминами применяется при производстве фруктовых соков. Во многих странах в зимнее время к молоку добавляют витамин А или каротины. Витамин А и D вносятся при изготовлении маргарина, халвы и т.д. Каротины добавляются как красящие вещества при производстве сливочного масла. Витамины С и E, обладающие свойствами антиоксидантов, используются для стабилизации продуктов: витамин С – для предотвращения окисления напитков (пива, вина, фруктовых соков), а витамин E – жиров и масел. Обнаружение витаминов в пищевых продуктах и биологических объектах преимущественно основано на их способности «давать цветные реакции» с определенными химическими веществами.

Лабораторная работа № 8.

Качественные реакции на жирорастворимые витамины

Цель: изучить качественные реакции на жирорастворимые витамины.

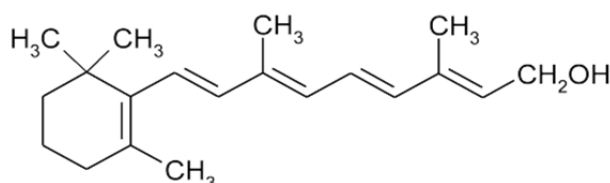
Реактивы: рыбий жир, раствор витамина А в масле; растительное масло нерафинированное; концентрат витамина D; ледяная уксусная кислота (CH₃COOH), насыщенная раствором сульфата железа (II) (FeSO₄); H₂SO₄ концентрированная, хлороформ; анилиновый реактив (15 частей анилина и 1 часть кон-

центрированной HCl); раствор брома в хлороформе (1:60 по объему); 0,1% спиртовой раствор витамина E; 1% раствор FeCl₃.

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, пипетки, часовые стекла.

Опыт 1. Качественные реакции на витамин А

Витамин А (ретинол) – ненасыщенный гидроароматический спирт, состоящий из β-иононового кольца и боковой цепи, представленной 2 остатками изопрена и первичной спиртовой группой:



Нерастворим в воде, хорошо растворяется в жирах и органических растворителях, устойчив к действию щелочей, но легко окисляется кислородом. Содержится только в животных продуктах, особенно им богаты рыбий жир, сливочное масло, печень. В растениях находятся окрашенные в желтый или оранжевый цвет пигменты – каротины, которые могут в животном организме превращаться в витамин А.

Метаболические функции: участвует в биосинтезе белков эпителиальных тканей, в виде цис-ретинала входит в состав белка сетчатки глаза – родопсина.

А) Реакция с сульфатом железа (II). К 3 каплям рыбьего жира, растительного масла или раствора витамина А (по отдельности, по выбору) добавляют 5–8 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Реакции проводят на сухих часовых стеклах или в пробирках *под тягой!* Смесь перемешивают стеклянной палочкой, появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины в этой реакции дают зеленоватое окрашивание.

Б) Реакция с серной кислотой (Реакция Друммонда). В одну пробирку вносят 1–2 капли растительного масла или рыбьего жира, в другую – 1–2 капли ретинола ацетата. В обе

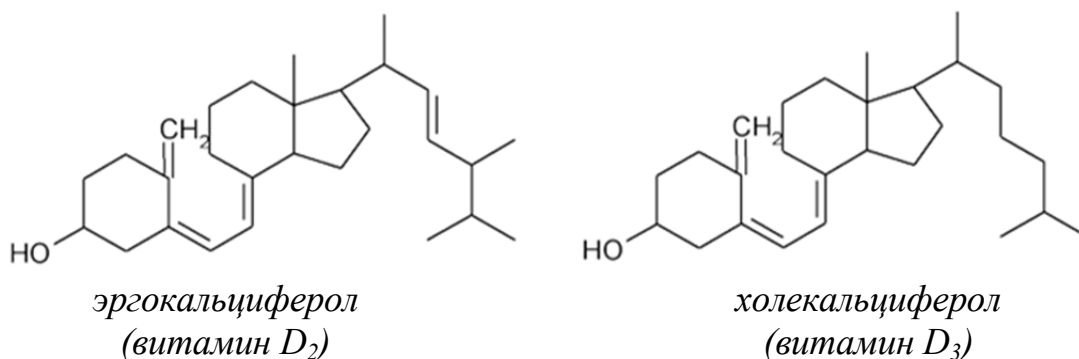
пробирки добавляют по 5 капель хлороформа и 4–5 капли концентрированной H_2SO_4 . В присутствии витамина А появляется синяя окраска, переходящая в фиолетовую, а затем в красно-бурую. Химизм реакции окончательно не выяснен.

В) Реакция с раствором хлорного железа. В раствор рыбьего жира или витамина А в масле добавляют 5 капель 1% раствора хлорного железа. Появляется ярко-зеленый цвет.

Задание: на основании проведенных опытов сделать вывод о реакциях открытия витамина А (ретинола).

Опыт 2. Качественные реакции на витамин D

Витамин D – группа соединений, принимающих участие в регуляции фосфорно-кальциевого обмена и процесса образования костей. Нерастворим в воде, растворяется в жирах и органических растворителях. Среди витаминов группы D наиболее распространены *эргокальциферол* и *холекальциферол*.



Этот витамин можно рассматривать как производное циклических спиртов – эргостерола и 7-дегидростерола, являющихся его провитаминами. Превращение названных провитаминов в витамин D происходит под действием ультрафиолетовых лучей. Источниками витамина D для человека служат: рыбий жир, печень, молоко, сливочное масло, желток яиц.

А) Реакция с анилином (анилиновая проба). В сухой пробирке смешивают 1–2 капли рыбьего жира или раствора витамина D с 5 каплями хлороформа, добавляют при помешивании 1–2 капель анилинового реактива. Пробирку ставят на кипящую водяную баню, осторожно нагревают при постоянном перемешивании до кипения и кипятят 30 с. При наличии витамина D желтая эмульсия приобретает сначала зеле-

ный, а потом красный цвет. При стоянии эмульсия через 1–2 минуты расслаивается, при этом нижний слой окрашивается в интенсивно красный цвет.

Б) Реакция с бромом (бромхлороформная проба). В сухую пробирку вносят 5 капель рыбьего жира или раствора витамина D в масле, добавляют 5 капель раствора брома в хлороформе и перемешивают. Витамин D, содержащийся в рыбьем жире, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе приобретает зеленовато-голубую окраску.

Задание: на основании проведенных опытов сделать вывод о реакциях открытия витамина D.

Опыт 3. Качественная реакция на витамин E

Группа витамина E включает несколько близких по строению соединений, являющихся производными хроматина и спирта фитола – *токоферолов*. Витамин E существует в виде нескольких изомеров: α -, β - и γ -*токоферолов*, которые отличаются друг от друга порядком расположения метильных групп в бензольном кольце. Токоферолы неустойчивы к действию щелочей и света и легко окисляются, теряя витаминную активность. Витамин E является сильным антиоксидантом.

А) Реакция α -токоферола с хлоридом железа (III). В сухую пробирку вносят 4–5 капель 0,1% спиртового раствора витамина E, прибавляют 0,5 мл 1% раствора $FeCl_3$, тщательно перемешивают и нагревают на пламени спиртовки. Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание вследствие того, что спиртовой раствор α -токоферола окисляется хлоридом железа (III) в токоферилхинон, имеющий красный цвет.

Б) Реакция α -токоферола с концентрированной азотной кислотой. В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1% спиртового раствора α -токоферола и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки встряхивают, появляется красное окрашивание. Если образовавшуюся окрашенную эмульсию поместить в водяную баню при 70 °С, она расслаивается, при этом верхний масляный слой имеет красный цвет.

Задание: на основании проведенных опытов сделать вывод о реакциях открытия витамина E.

Контрольные вопросы

1. Приведите классификацию витаминов и их номенклатуру.
2. Охарактеризуйте жирорастворимые витамины.
3. Ретинолы и их провитамины, роль в фоторецепции, регуляции проницаемости мембран.
4. Кальциферолы, роль в регуляции транспорта и метаболизма ионов кальция (Ca^{2+}) и фосфата (PO_4^{3-}).
5. Токоферолы, антиоксидантные свойства. Нарушения обмена веществ, обусловленные недостаточностью витамина Е.
6. Витамины группы К, роль в процессах свертывания крови.
7. Дайте определения: провитамины, авитамины, витаминоподобные вещества.
8. Объясните понятия: А-, гипо- и гипервитаминозы. Эндогенные и экзогенные причины гиповитаминозов.

Лабораторная работа № 9.

Качественные реакции на водорастворимые витамины

Цель: изучить качественные реакции на водорастворимые витамины; провести количественное определение витаминов Р и С в пищевых продуктах.

Реактивы: вода дистиллированная; пищевые продукты (молоко цельное свежее, вытяжка из шиповника, фруктовые соки, картофель, капуста, ягоды, фрукты; чай листовой или готовый экстракт из него); рибофлавин (порошок или таблетки); тиамин (порошок или свежий раствор с массовой долей тиамина 1–5 %); цинк в гранулах; никотиновая кислота (порошок), серная кислота концентрированная; растворы с массовыми долями: уксусной кислоты 10 %, соляной кислоты 20 % и 2 %, ацетата меди ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$) 5 %, хлорида железа (III) (FeCl_3) 5 %; нитрита натрия (NaNO_2) 5 %, карбоната натрия (Na_2CO_3) 10 %, метиленовой сини 0,01 %, гексоциано (III) феррата калия ($\text{K}_3[\text{Fe}_6]$) 5 %, витамина В₆ 1–5 %, тиомочевина 10 %, аскорбиновой кислоты 0,5–1 %; 0,05 н раствор перманганата калия (KMnO_4); индикатор индигокармин; раствор сульфаниловой кислоты (в мерную колбу

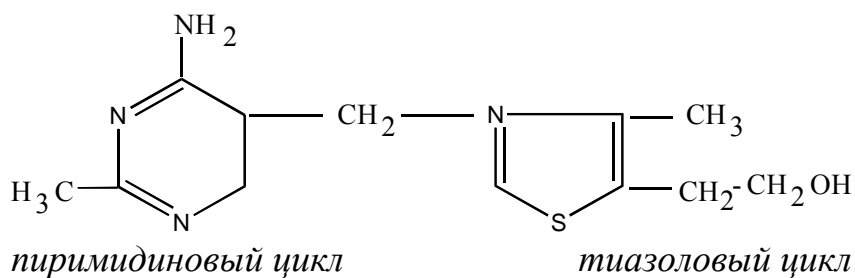
вместимостью 100 мл вносят 1 г сульфаниловой кислоты, 4,6 мл концентрированной соляной кислоты и, растворяя, добавляют воду до метки); 0,001 н (0,0005 моль/л) раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия (краска Тильманса или индофеноловый реактив): в мерную колбу на 500 мл вносят 150 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия и 200–300 мл воды, энергично встряхивают до растворения реактива, объем доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в сухую склянку из темного стекла.

Раствор хранят в холодильнике не более 3 суток. Витамин В₁₂ в ампулах (можно использовать готовый минерализат; для этого содержимое 1 ампулы переливают в пробирку, приливают 3–5 капель концентрированной серной кислоты и сжигают до обесцвечивания: по окончании минерализации осторожно добавляют в пробирку 1 мл Н₂О).

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, термостат, пипетки, фарфоровые ступки с пестиком, песок или стеклянный порошок, колбы конические, микробюретки, воронки с фильтрами, ножницы.

Опыт 1. Качественная реакция на витамин В₁

Витамин В₁ (тиамин) состоит из пиридинового и тиазолового колец, связанных метиленовой группой:



В связи с наличием в молекуле атома серы и аминогруппы этому витамину было дано химическое название *тиамин*. Тиамин в форме тиаминпирофосфата выполняет коферментные функции в реакциях декарбоксилирования α-кетокислот и в транскетолазной реакции. Источником тиамин для человека служат, главным образом, хлеб и крупы, но в тех случаях, когда в процессе переработки зерна не происходит удале-

ние зародышей и оболочек, которые в основном и содержат этот витамин. Очень много тиамин в пекарских и пивных дрожжах. В щелочной среде тиамин легко превращается в тиамин-тиол, который с диазореактивом образует сложное комплексное соединение красного или розово-оранжевого цвета.

Ход работы. В каждую из 2 пробирок вносят по 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты в разбавленной соляной кислоте и по 1 мл раствора нитрита натрия 5%. Полученная в пробирках смесь представляет собой диазореактив. Затем к содержимому одной пробирки прибавляют несколько крупинок тиамин и 1 мл воды (или 1 мл 0,1% раствора тиамин), другой – 1 мл молока. После этого в обе пробирки приливают по 1,5–2 мл 10% раствора карбоната натрия, жидкость окрашивается в розово-оранжевый цвет. Реакция не специфична, т.к. подобную окраску с диазореактивом дают вещества, имеющие в своей структуре фенольные, имидазольные, пиррольные, тиазольные группы (адреналин, карнозин, желчные пигменты, гистамин и др.).

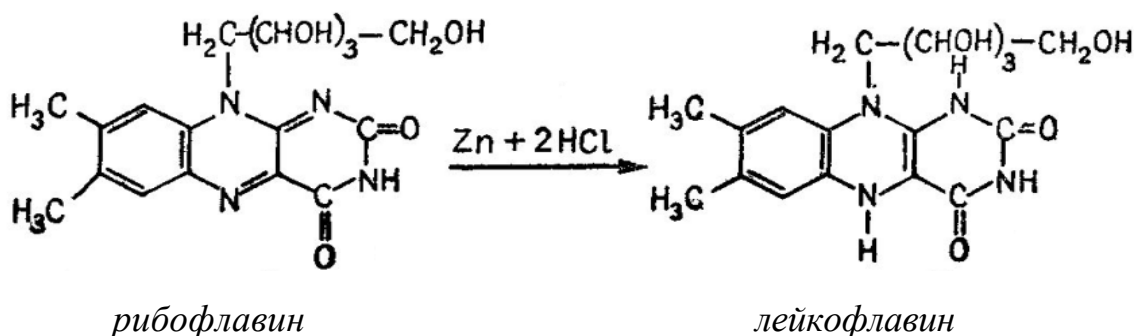
Задание: на основании проведенных опытов сделайте вывод о реакции открытия витамина В₁ (тиамин). Объясните, почему данная реакция не обладает специфичностью.

Опыт 2. Качественная реакция на витамин В₂

Витамин В₂ (рибофлавин) в химическом отношении представляет азотистое основание (6,7-диметилизоаллокса-зин), соединенное с остатком 5-атомного спирта рибитола (*flavus* – желтый). Насыщенные водные растворы рибофлавина окрашены в желто-зеленый цвет с характерной желто-зеленой флуоресценцией в видимом и ультрафиолетовом свете.

При действии восстановителей (водорода) рибофлавин (кристаллы желто-оранжевого цвета) превращается в бесцветный и нефлуоресцирующий лейкофлавин, который устойчив к высокой температуре в кислой среде, легко разрушается в нейтральной и щелочной среде, под действием света.

Рибофлавин входит в состав 2 родственных кофакторов – флавин-мононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД).



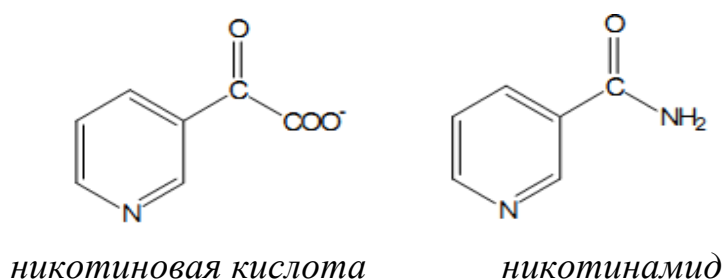
Источником рибофлавина для человека являются молоко и зеленые овощи, печень и почки животных, пивные и пекарские дрожжи.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель раствора рибофлавина добавляют 3 капли 20% соляной кислоты и опускают гранулу цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. Изменение окраски обусловлено тем, что выделяющийся водород восстанавливает рибофлавин через родофлавин (красного цвета) в бесцветный лейкофлавин. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкосоединение вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

Задание: на основании проведенного опыта сделайте вывод о реакции открытия витамина В₂ (рибофлавина).

Опыт 3. Качественная реакция на витамин РР

Витамин РР (витамин В₃, никотиновая кислота и никотинамид, ниацин) по химической природе является пиридин-карбоновой кислотой, никотинамид – амидом этой кислоты:



Биологическая роль витамина РР заключается в том, что никотинамид служит компонентом 2 близких по структуре коферментов – никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ), участвующих в окислительно-восстановительных реакциях.

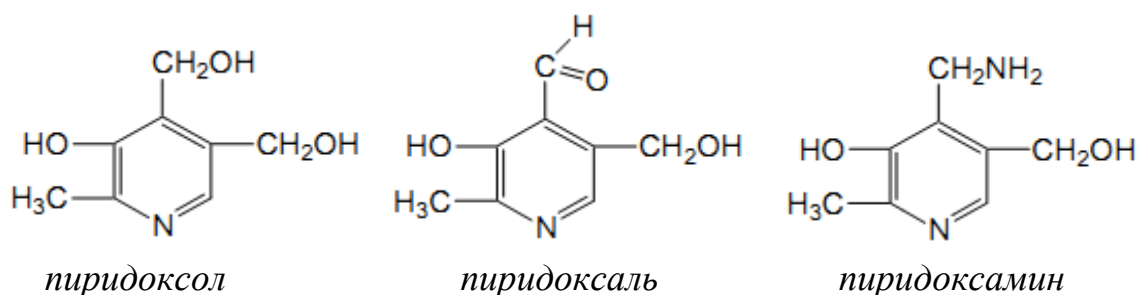
Источником витамина В₃ для человека служат: хлеб, мясо, рыба, печень и почки животных и многие другие продукты. Установлено, что некоторое количество никотиновой кислоты синтезируется в организме человека и животных из триптофана при участии витамина В₆ (пиридоксина). Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок плохо растворимой соли меди.

Ход работы. В пробирку вносят на кончике скальпеля порошок никотиновой кислоты и приливают 1 мл 10% раствора уксусной кислоты. Содержимое пробирки нагревают (никотиновая кислота должна раствориться) и к горячему раствору добавляют 1 мл 5% раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при постепенном охлаждении раствора, под струей холодной воды, выпадает синий осадок соли меди никотиновой кислоты.

Задание: на основании проведенного опыта сделайте вывод о реакции открытия витамина РР (никотиновой кислоты).

Опыт 4. Качественная реакция на витамин В₆

Группа витамина В₆: *пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин* являются производными пиридина и имеют общее название *пиридоксин*; обладают активностью витамина В₆. Витамин устойчив к высокой температуре, действию кислот, щелочей, но разрушается на свету. Как представитель фенолов, дает цветную реакцию с хлоридом железа (III):

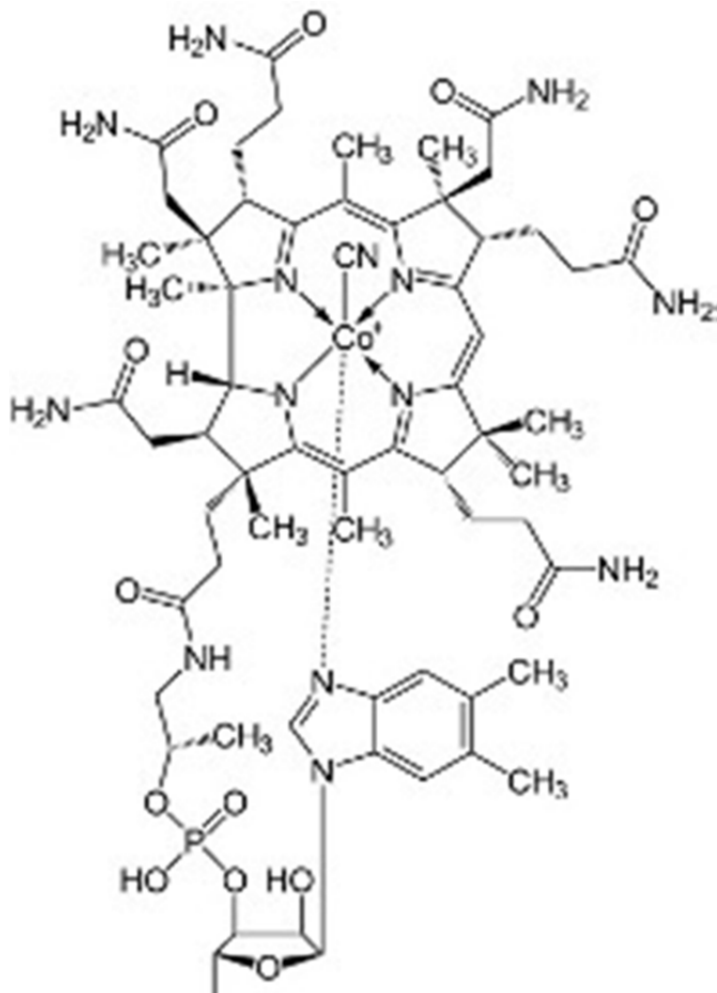


Ход работы. К 10 каплям раствора витамина В₆ добавляют 2 капли раствора FeCl₃ и перемешивают. Развивается красное окрашивание за счет возникновения комплексной соли типа фенолята железа (III).

Задание: на основании проведенного опыта сделайте вывод о реакции открытия витамина В₆ (пиридоксина).

Опыт 5. Качественная реакция на витамин В₁₂

Витамин В₁₂ (кобаламин) отличается от всех остальных не только сложностью своего строения, но и тем, что он содержит микроэлемент кобальт:



цианокобаламин

Производное данного витамина, которое обычно получают при его выделении, называется цианокобаламином, т.к. в нем содержится цианогруппа, связанная с атомом кобальта. При взаимодействии ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета. Витамин В₁₂ не вырабатывается ни растениями, ни животными; его синтезируют только некоторые виды микроорганизмов. Он содержится в большом количестве в

печени сельскохозяйственных животных и птиц, в морепродуктах, рыбе и яичном желтке; меньше в мясе, сыре и молочных продуктах.

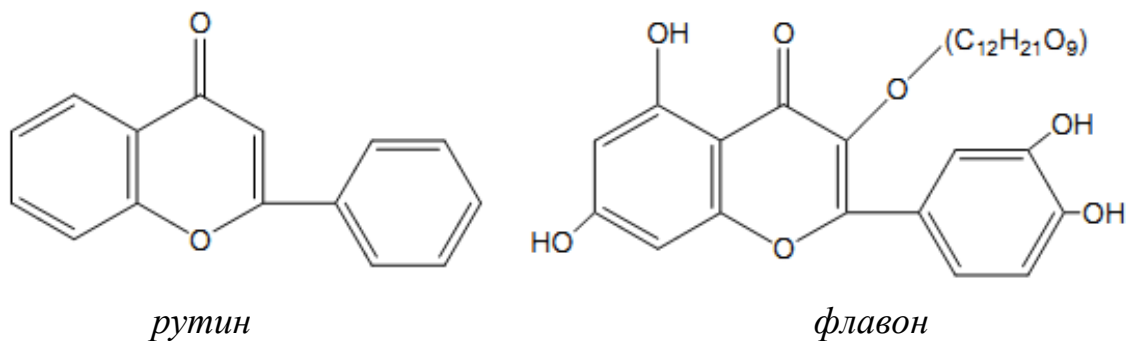
Ход работы: На беззольный фильтр наносят 2–3 капли раствора тиомочевинной и высушивают над сеткой газовой горелки. После этого наносят на фильтр 1–2 капли минерализата и снова нагревают фильтр над сеткой. На фильтрате, чаще по краю, появляется зеленое окрашивание.

Задание: на основании проведенного опыта сделайте вывод о реакции открытия витамина В₁₂ (кобаламина).

Опыт 6. Количественное определение витамина Р в чае (по Левенталю)

Известно несколько соединений, оказывающих Р-витаминное действие.

Наиболее изучены строение и свойства *рутина*, в основе строения которого лежит скелет *флавона*:



Рутин способен окисляться перманганатом калия; в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н раствора KMnO_4 окисляет 6,4 мкг рутина.

Ход работы. К 100 мг чая помещенного в стакан, приливают 40 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию при нагревании на водяной бане в течение 5 мин. Далее раствор фильтруют в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Затем в колбу объемом 100 мл для титрования отмеряют 10 мл экстракта чая, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина, при этом появляется синее окрашивание. Титруют из микробюретки раствором KMnO_4 , до появления устойчивой желтой окраски. Определяют процентное содержание рутина в чае и сравнивают с нормой содержания (норма содержания витамина Р в чае 30–50 мг/100 г).

Расчет производят по формуле:

$$X = 3,2 \times 100 \times A \times V_1 / V_2 \times P \times 1000 ,$$

где X – содержание витамина Р в препарате, мг %;
3,2 – стандартный пересчетный коэффициент, мкг/мл,

- A – объем 0,05 н раствора KMnO_4 , израсходованного на титрование, мл;
 V_1 – объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл;
 100 – коэффициент для пересчета процентного содержания;
 V_2 – объем экстракта чая, взятого для титрования, мл;
 P – навеска чая, г;
 1 000 – перевод микрограммов в миллиграммы.

Пример:

$$V_1 = 50 \text{ мл}; V_2 = 10 \text{ мл}; P = 100 \text{ мг} = 0,1 \text{ г.}$$

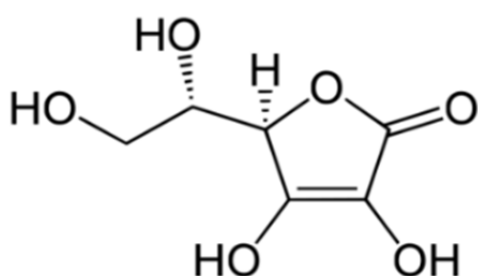
$$X = 3,2 \times 100 \times A \times 50 / 10 \times 0,1 \times 1000,$$

отсюда следует: $X = A \times 16.$

Задание: высчитайте процентное содержание рутина в используемой навеске чая.

Опыт 7. Качественная реакция на витамин С (аскорбиновая кислота)

Аскорбиновая кислота – γ -лактон гулоновой кислоты.



Витамин С существует в окисленной (L-дегидроаскорбиновая кислота) и восстановленной (L-аскорбиновая кислота) формах. Несмотря на это, его называют *аскорбиновой кислотой*.

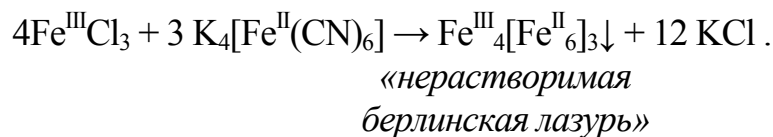
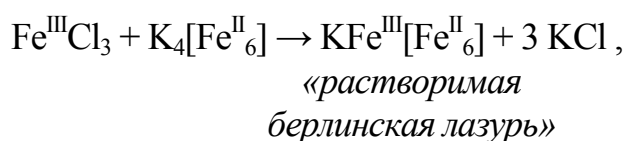
Обе формы витамина С обладают биологической активностью, участвуют в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях, в частности, в окислении молочной, лимонной и других оксикислот; восстановлении многих соединений (метиленовая синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол) при этом их окраска исчезает; в гидроксировании остатков пролина и лизина в молекуле проколлагена с образованием гидроксипролина и гидроксизина в молекулах коллагена и эластина. Витамин легко разрушается в щелочной среде кислородом, в присутствии следов ионов меди и железа; при тепловой обработке продуктов теряется 25–60 % витамина.

Синтезируется из глюкозы в печени всех млекопитающих, кроме человека, приматов и морских свинок. Все растения могут синтезировать это соединение из глюкозы. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней. Источником витамина С для человека служат самые разнообразные продукты растительного происхождения. Особенно много его содержат: черная смородина, плоды шиповника, хвоя ели и сосны, капуста, картофель, облепиха, рябина, красный перец, лимоны, черемша и др.

Определение витамина С основано на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, восстанавливать, например, метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол натрия (краску Тильманса), гексациано-(III) феррат калия, нитрат серебра, йод и др.

А) Реакция с красной кровяной солью и хлоридом железа (III). При добавлении раствора аскорбиновой кислоты или вытяжки из шиповника (капусты), содержащей аскорбиновую кислоту, к смеси растворов гексациано-(III) феррата калия ($K_3[Fe_6]$ – красная кровяная соль) и хлорида железа (III), бурая жидкость окрашивается в синий цвет.

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением гексациано-(III) феррата калия до гексациано-(II) феррата, который образует с $FeCl_3$ берлинскую лазурь:



Ход работы. В 2 пробирки вносят по 1 капле 5 % раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ и раствора $FeCl_3$. В 1-ю пробирку к зеленовато-бурой жидкости добавляют 5–10 капель вытяжки из шиповника, во 2-ю – такое же количество дистиллированной воды. Жидкость в 1-й пробирке приобретает зеленовато-синюю окраску и выпадает осадок берлинской лазури. При осторож-

ном наслаивании дистиллированной воды осадок на дне пробирки становится более выраженным. Окраска раствора во 2-й пробирке не изменяется.

Задание: объясните, почему окраска раствора во 2-й пробирке не изменяется.

Б) Взаимодействие витамина С с метиленовой синью.
К 1 мл сока (свежевыжатого или 0,002 % раствора аскорбиновой кислоты) в пробирке прибавляют 1 мл 0,01 % раствора метиленовой сини, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при 37–40 °С.

Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается за счет восстановления метиленовой сини (образуется дегидроаскорбиновая кислота). Если бесцветный раствор метиленовой сини энергично встряхнуть, не препятствуя поступлению воздуха в пробирку, то раствор вновь приобретает синий цвет.

Задание: на основании проведенного опыта сделать вывод о реакции открытия витамина С (аскорбиновой кислоты).

Контрольные вопросы

1. Перечислите витамины, синтезируемые микрофлорой кишечника.
2. Какова биологическая роль кобаламина?
3. Какова суточная потребность организма человека в витаминах?
4. В состав каких коферментов входит рибофлавин, в каком процессе участвуют эти коферменты?
5. Назовите коферментные формы никотинамида. В каких ОВР они участвуют?

ТЕМА 4. Ферменты

Лабораторная работа № 10.

Ферменты

Цель: научиться выделять ферменты (амилазу и сахаразу) и обнаруживать их действие на соответствующий субстрат, изучить специфичность действия ферментов и определить их активность.

Реактивы: растворы: 1% хлорида натрия (NaCl), 1% крахмала, Люголя, 10% соляной кислоты, 10% серной кислоты, 1% сахарозы, 10% гидроксида натрия, 5% сульфата меди (II), водный раствор йода; дистиллированная вода.

Оборудование и материалы: спиртовки, штатив с пробирками, пипетки, термостат, пророщенный ячмень или размолотый солод, слюна, дрожжи, фарфоровые ступки с пестиком, воронки, фильтры, пробки, центрифуга, пробирки центрифужные, колба, стеклянные палочки, маркеры.

Теоретическая часть

Ферментами (энзимами) называют специфические белки, обладающие каталитическим действием. Они входят в состав всех клеток и тканей живых организмов и способны катализировать реакции, как внутри организма, так и при оптимальных условиях вне его (например, свертывание молока пепсином, сычужным ферментом, гидролиз сахарозы и т.п.). Ферменты синтезируются в клетках живых организмов постоянно. Подобно неорганическим катализаторам, ферменты повышают скорость химических реакций за счет понижения энергии активации. Однако делают они это с более высокой эффективностью (в 10^5 – 10^{12} раз) при температуре 36–50 °С и рН \approx 7,0.

Практическая часть

А) Выделение ферментов и обнаружение их действия. Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы.

Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур. Выделяют ферменты при температуре, близкой к нулю.

Хранят растворы ферментов только в холодильнике, причем и в этих условиях они быстро теряют активность. В связи с тем, что процедура выделения индивидуальных ферментов чрезвычайно сложна, работу часто проводят с так называемыми ферментными препаратами, представляющими собой частично очищенные ферменты или вытяжки из биологических объектов. Вещество, превращение которого вызывает фермент, называют субстратом; выдерживание субстрата с ферментом – инкубацией. О присутствии фермента в биологическом объекте или вытяжке из него судят по превращению соответствующего субстрата.

Опыт 1. Получение амилазы слюны и определение её активности

Амилазы – ферменты, ускоряющие реакцию гидролиза крахмала. Они содержатся в тканях животных и растений, микроорганизмах, слюне, молоке, крови и др. жидкостях организма. Высокой амилазной активностью обладают слюна и солод. Слюна и другие пищеварительные соки животных и человека, являются концентрированными растворами ферментов. В слюне содержится α -амилаза – фермент, участвующий в гидролизе крахмала. Наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом.

Ход работы. В ротовую полость набирают 2–3 мл 1% раствора хлорида натрия и держат 4–5 мин. Полученный таким образом *раствор слюны* собирают в пробирку и используют как *раствор α -амилазы*.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения её активности, отливают 1 мл слюны во 2-ю чистую пробирку и приливают к ней 2 мл 1% раствора крахмала. Содержимое перемешивают путем плавного одноразового переворачивания пробирки, закрыв её пробкой.

Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37–38 °С в течение 10 мин. По истечении указанного времени в пробирку вносят 1–2 капли раствора Люголя и встряхивают.

В **Таблице 7** приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом. По окраске раствора появившейся в пробирке делают вывод о продуктах реакции (глубине гидролиза) и активности фермента.

Таблица 7 – Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3 700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1 000	Желтая
Мальтоза	342	Желтая

Опыт 2. Выделение амилазы из солода

Пророщенные зерна ячменя, пшеницы и других злаковых растений обладают высокой амилазной активностью.

Амилазы – ферменты, катализирующие гидролиз крахмала и родственных полисахаридов, относятся к классу гидролаз, подклассу гликозидаз, подподклассу D-гликозидаз. Амилазы гидролизуют как неизмененные крахмальные зерна, так и оклейстеризованный крахмал. Причем действие амилаз на оклейстеризованный крахмал значительно эффективнее, чем на неизмененные зерна, поэтому в спиртовой промышленности перед осахариванием крахмала солодом производят заваривание муки или картофеля.

По свойствам, распространению в природе и способу действия на крахмал различают: α -амилазу, β -амилазу, глюकोамилазу и амилопектин-1,6-глюканогидролазу.

α -Амилаза содержится в слюне, соке поджелудочной железы, плесневых грибах, проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя. Обнаружена активность α -амилазы в непроросших семенах ржи и сорго.

При действии α -амилазы на крахмал образуются главным образом декстрины небольшой молекулярной массы и незначительное количество мальтозы. Она чувствительна к подкислению (оптимум рН 5,6–6,3), но термостабильна (температурный оптимум 65 °С).

β -Амилаза содержится в непроросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя, соевых бобах. Она катализирует гидролиз 1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей. β -Амилаза расщепляет амилозу полностью до мальтозы. Амилопектин она гидролизует с образованием мальтозы и декстринов, дающих коричнево-красное окрашивание с йодом. β -Амилаза более активна в кислой среде (оптимум рН 4,8), но термолабильна (температурный оптимум 51 °С).

Глюкоамилаза гидролизует крахмал с образованием преимущественно глюкозы и небольшого количества декстринов. Препараты глюкоамилазы получают из плесневых грибов. С помощью этого фермента получают из крахмала глюкозную патоку и кристаллическую глюкозу. Амилопектин подвергает гидролизу 1,6- α -гликозидные связи в амилопектине, гликогене.

Ход работы. 20 г измельченного солода растирают в ступке с небольшим количеством воды (10–20 мл) до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 2 ч (можно поставить в холодильник на ночь). По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 3 000 об./мин. *Надосадочную жидкость используют в качестве источника амилазы.*

Опыт 3. Выделение сахаразы из дрожжей

Сахараза из дрожжей имеет более правильное рабочее название β -фруктофуранозидаза. Она катализирует гидролиз β -гликозидных связей в молекулах как сахарозы, так и раффинозы, при этом сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу, а раффиноза – на фруктозу и мелибиозу.

Ход работы. В фарфоровую ступку вносят 1 г прессованных пекарских дрожжей и тщательно растирают в 3 мл воды в течение 5 мин, затем добавляют еще 17 мл воды, перемешивают и ставят ступку в термостат при 37 °С на 20 мин. Через каждые 5 мин содержимое перемешивают. По истечении указанного времени смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и используют как *водный экстракт сахаразы*.

Б) Специфичность действия ферментов. Специфичность действия ферментов – это способность катализировать 1 или несколько близких реакций, преобразовывать 1 вещество или 1 вид связей. Она бывает нескольких видов: абсолютная, относительная (групповая), стереохимическая.

Ферменты отличаются от катализаторов небиологической природы высокой специфичностью, что обусловлено индивидуальными особенностями строения активных центров различных ферментов. Пространственная структура активного центра предопределяет не только комплементарность субстрату, но и природу последующих превращений субстрата в фермент-субстратном комплексе, приводящих к образованию соответствующего продукта. Будучи высокоспецифичной, ферментативная реакция протекает в 10^5 – 10^{12} раз быстрее, чем самопроизвольная (спонтанная) реакция.

Для изучения специфичности ферментов используют амилазу слюны или солода и сахаразу хлебопекарных дрожжей.

Процесс гидролиза крахмала происходит ступенчато и может быть выражен в виде схемы: крахмал → амилодекстрины → эритродекстрины → ахродекстрины → мальтодекстрины → мальтоза. Глубину гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с раствором йода (см. **Таблицу 7**). Сахароза при гидролизе расщепляется на глюкозу и фруктозу, которые обнаруживаются реакцией Троммера.

Опыт 4. Специфичность действия амилазы и сахаразы

Ход работы. Берут 6 пробирок, их нумеруют и готовят пробы для опыта в соответствии с **Таблицей 8**.

Таблица 8 – Схема изучения специфичности действия ферментов

№ пробы	Субстрат, 3 мл	Фермент, 1 мл	Проба с йодом после инкубации	Реакция Троммера
1	крахмал	вода		не делать
2	крахмал	амилаза		не делать
3	крахмал	сахараза		не делать
4	сахароза	вода	не делать	
5	сахароза	амилаза	не делать	
6	сахароза	сахараза	не делать	

Содержимое пробирок перемешивают стеклянными палочками и пробирки помещают в термостат при 37–38 °С на 20 мин. После инкубации с пробирками № 1, 2 и 3, где в качестве субстрата был крахмал, проводят пробу с йодом, с другими пробирками (№ 4, 5, 6), где в качестве субстрата была сахароза, прodelьывают реакцию Троммера.

Реакция Троммера. К содержимому пробирок № 4, 5, 6 добавляют 2 мл 10% раствора гидроксида натрия, затем по каплям при встряхивании 5% раствор сульфата меди (II) до появления не исчезающего осадка гидроксида меди (II).

Содержимое пробирок нагревают на водяной бане до изменения цвета.

Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие восстанавливающих сахаров (глюкозы и фруктозы), которые в щелочной среде восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I), сами при этом окисляются до альдоновых кислот.

Результаты опыта вносят в **Таблицу 8** и делают вывод о специфичности амилазы слюны и сахаразы из дрожжей.

Опыт 5. Определение активности амилаз по Вольгемуту

Метод основан на нахождении максимального разведения жидкости, содержащей амилазу (вытяжка из солода, слюна, молоко, сыворотка крови и др.), при котором в стандартных условиях происходит полное расщепление определенного количества крахмала.

Ход работы. В штатив устанавливают 7 пробирок, их нумеруют и в каждую вносят по 1 мл воды. Затем в 1-ю пробирку добавляют 1 мл вытяжки из солода, тщательно перемешивают. Из пробирки № 1 делают забор 1 мл смеси, которую переносят в пробирку № 2. Содержимое пробирки № 2 тщательно перемешивают. Из пробирки № 2 делают забор 1 мл смеси, которую переносят в пробирку № 3 и т.д. Из пробирки № 7 после перемешивания 1 мл смеси выливают в раковину. Получают ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей. После ряда разведений в каждую пробирку вносят по 2 мл 1% раствора крахмала и содержимое аккуратно перемешивают. Все пробирки помещают в термостат при 37–38 °С на 30 мин. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляют по 1 мл 10% раствора серной кислоты (для остановки реакции) и по 3 капли водного раствора йода. Результаты опыта вносят в **Таблицу 9**, обозначают окраску раствора.

Таблица 9 – Окраска проб с йодом после инкубации

	Номера пробирок и доля солодовой вытяжки в содержимом, мл						
	1	2	3	4	5	6	7
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Окраска раствора							

Отмечают, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала (*желтое окрашивание с йодом*) и по последней из них рассчитывают активность амилазы (амилазное число).

Пример: допустим, полный гидролиз взятого для опыта крахмала произошел в пробирках № 1, 2, 3 и 4, следовательно, активность амилазы нужно считать по пробирке № 4, в которой доля солодовой вытяжки составляет 1/16 мл. Пересчитав объем расщепленного крахмала на 1 мл солодовой вытяжки, получим число 32. Это означает, что 1 мл неразбавленной солодовой вытяжки в таких же условиях может расщепить 32 мл 1% раствора крахмала, т.е. амилазное число составляет 32.

Контрольные вопросы

1. Какова химическая природа ферментов, их строение и структура?
2. Перечислите функция ферментов, приводя примеры.
3. Какое сырье и источники используются для получения ферментов?
4. Что такое *субстрат*, *фермент*, *инкубация*?
5. Как можно обнаружить фермент в экстракте биологического материала?
6. К какому классу и подклассу относятся ферменты α -амилаза и сахараза?
7. Как определить специфичность действия ферментов?
8. Какую реакцию катализирует амилаза слюны?
9. Какую реакцию катализирует сахараза и почему её называют β -фруктофуранозидазой?
10. Как можно обнаружить продукты гидролиза крахмала? Назовите продукты и их окраску с йодом.
11. Какой реакцией можно обнаружить продукты гидролиза сахарозы? В чем суть этой реакции?
12. Объясните принцип метода определения активности амилазы по Вольгемуту.

ТЕМА 5. Углеводы

Углеводы синтезируются растениями в процессе фотосинтеза из углекислого газа и воды. Животные организмы не способны синтезировать углеводы и получают их из растительных источников. Общая формула углеводов $C_x(H_2O)_y$. По способности к гидролизу на мономеры углеводы делятся на 2 группы: простые и сложные.

Углеводы, содержащие 1 единицу, называются моносахаридами, 2 единицы – дисахаридами, от 2 до 10 единиц – олигосахаридами, а более 10 – полисахаридами. Моносахариды быстро повышают содержание сахара в крови, и обладают высоким гликемическим индексом, поэтому их ещё называют *быстрыми углеводами*. Они легко растворяются в воде и синтезируются в зелёных растениях. Углеводы, состоящие из 3 или более единиц, называются *сложными*. Продукты, богатые медленными углеводами, постепенно повышают содержание глюкозы и имеют низкий гликемический индекс, поэтому их ещё называют *медленными углеводами*. Сложные углеводы являются продуктами поликонденсации простых сахаров (моносахаридов) и в отличие от простых, в процессе гидролитического расщепления, способны распадаться на мономеры, с образованием сотни и тысячи молекул моносахаридов.

Моносахариды обычно представляют собой бесцветные, легко растворимые в воде (рН нейтральная), плохо растворимые в спирте и совсем нерастворимые в эфире, твёрдые прозрачные вещества, некоторые из них обладают сладким вкусом. Моносахариды – мономеры, из которых синтезируются дисахаридами, олигосахаридами и полисахаридами. В природе в свободном виде наиболее распространена D-глюкоза (виноградный сахар или *декстроза*, $C_6H_{12}O_6$) – 6-атомный сахар (*гексоза*), структурная единица дисахаридов: (мальтозы, сахарозы и лактозы) и полисахаридов (целлюлозы, крахмала).

Другие моносахариды в основном известны как компоненты ди-, олиго- или полисахаридов, в свободном состоянии они встречаются редко.

Лабораторная работа № 11. Качественные реакции на углеводы

Цель: изучить качественные реакции на углеводы.

Реактивы: растворы: 5 % крахмала, 1 % рибозы, 1 % арабинозы или ксилозы, 1 и 5 % глюкозы, 1 % лактозы, 1 % фруктозы, 1 и 5 % сахарозы, 5 и 10 % гидроксида натрия (NaOH), 5 % сульфата меди (II) (CuSO_4), 2 % нитрата кобальта (II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$), 25% аммиака (NH_3), 30% анилина в ледяной уксусной кислоте (CH_3COOH), 0,2 % спиртовой раствор α -нафтола, раствор Люголя (раствор I_2 в KI), раствор йода, раствор ацетата меди (13,3 г ацетата меди ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$) в 200 мл воды и 1,9 мл ледяной уксусной кислоты CH_3COOH), водный раствор хлорида железа (III) (FeCl_3), окрашенный фенолом в фиолетовый цвет; реактив Селиванова (раствор 0,05 г резорцина в 100 мл 20 % раствора HCl); концентрированные соляная (HCl) и серная (H_2SO_4) кислоты; глицерин, маннит, бромная вода (свежеприготовленная насыщенная).

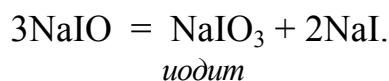
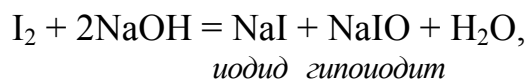
Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, пипетки, держатели для пробирок, водяная баня, фильтровальная бумага, ножницы.

Практическая часть

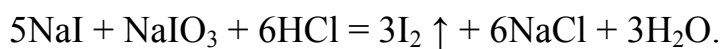
Опыт 1. Проба на полисахариды

При взаимодействии полисахаридов с йодом происходят комплексообразование, адсорбция и другие процессы. Оттенок окраски раствора зависит от строения полисахарида, в частности от степени его ветвления. Комплекс йода с линейными полисахаридами (амилозой – одним из компонентов крахмала) имеет бледно-синюю окраску, а комплекс йода с разветвленными полисахаридами (гликогеном) имеет красно-бурую окраску. Для получения сорбционного соединения крахмала необходимо наличие свободного йода. При взаимодействии с гидроксидом натрия свободный йод превращается в йодид, затем в гипойодит и йодит, который после прибавления кислоты разлагается с выделением свободного йода. Поэтому прежде чем приступить к йодной пробе, щелочные растворы надо нейтрализовать.

Реакция связывания свободного йода в щелочной среде:



В кислой среде:



Ход работы. В пробирку наливают 1 мл крахмала и добавляют 1–2 капли реактива Люголя. Темно-синее или красно-бурое окрашивание раствора свидетельствует о присутствии полисахаридов. Если появляется синее окрашивание, то присутствует крахмал или декстрин. Красно-бурое окрашивание свидетельствует о наличии в растворе гликогена или эритродекстрина. При нагревании исследуемого раствора в присутствии гликогена наблюдается *опалесценция* – рассеяние света мутной жидкой средой, обусловленное ее оптической неоднородностью, если раствор остается прозрачным, значит, присутствует эритродекстрин.

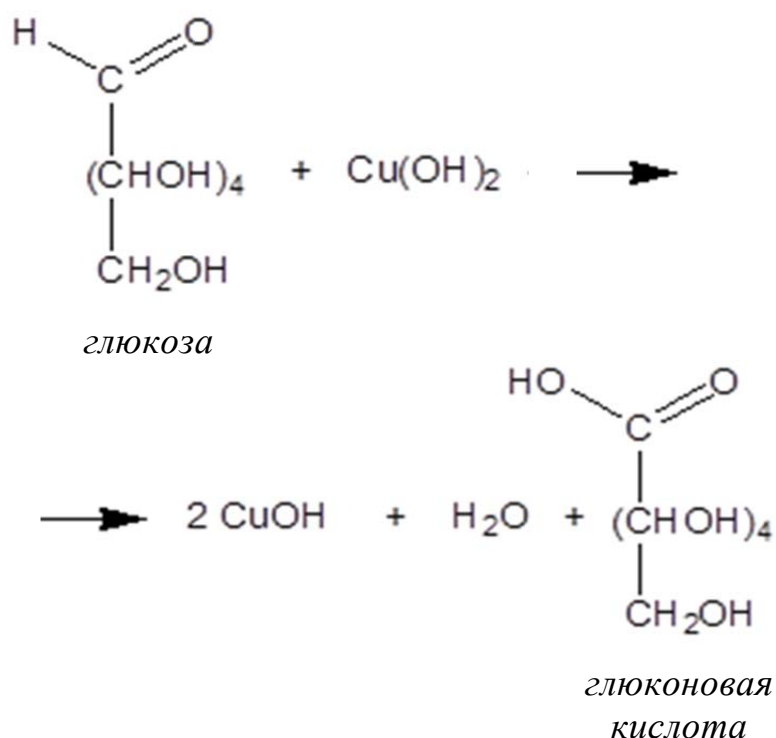
Задание: опишите наблюдаемые явления, подтвердите их уравнениями реакций.

Опыт 2. Реакция Троммера

Реакция Троммера является пробой на редуцирующие (восстанавливающие) сахара. Моносахариды, имеющие свободную карбонильную группу, которая окисляясь до карбоксильной в щелочной среде, восстанавливает ионы меди (II) до меди (I), а также соли серебра до металлического серебра. Эти реакции могут использоваться для количественного определения восстанавливающих моносахаридов. Восстанавливающими свойствами обладают также некоторые дисахариды: мальтоза, лактоза, целлобиоза.

Ход работы. В 4 пробирки (отдельно) наливают по 2 мл раствора глюкозы, лактозы, сахарозы и крахмала, добавляют в каждую по 2 мл раствора NaOH. Затем в каждую из пробирок по каплям прибавляют раствор CuSO₄ до появления осадка Cu(OH)₂ голубого цвета: $\text{CuSO}_4 + 2\text{NaOH} = \text{Cu}(\text{OH})_2 \downarrow + \text{Na}_2\text{SO}_4$.

Смеси нагревают в пламени спиртовки. При нагревании смеси сначала появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием гидроксида меди (I):

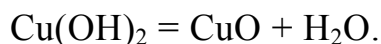


В противном случае либо будет происходить выпадение черного осадка CuO , либо раствор будет сохранять синевато-фиолетовую окраску (в случае с невосстанавливающими дисахаридами – сахарозой).

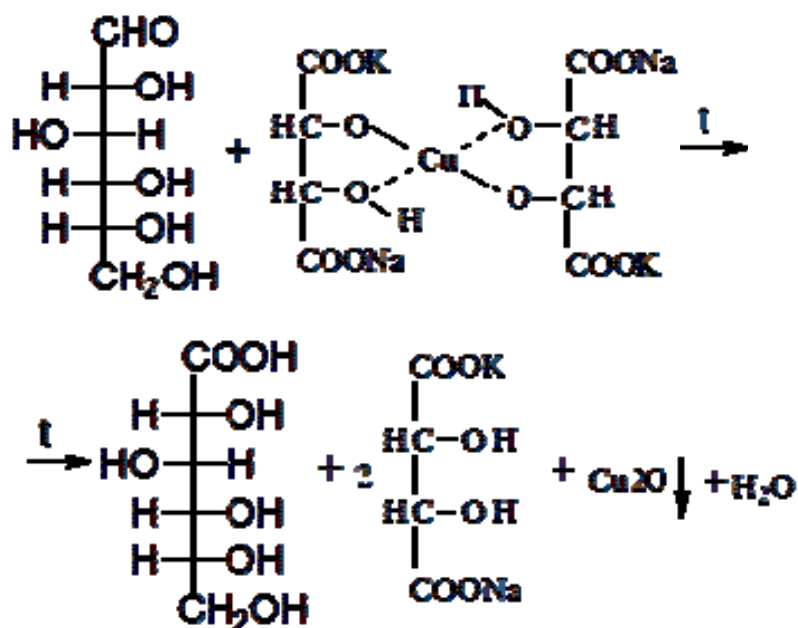
Желтая окраска раствора в присутствии восстанавливающих сахаров переходит в красную из-за образования оксида меди(I):



Избыток меди может затемнить реакцию, т.к. при нагревании $\text{Cu}(\text{OH})_2$ теряет воду и превращается в черный оксид меди (II):



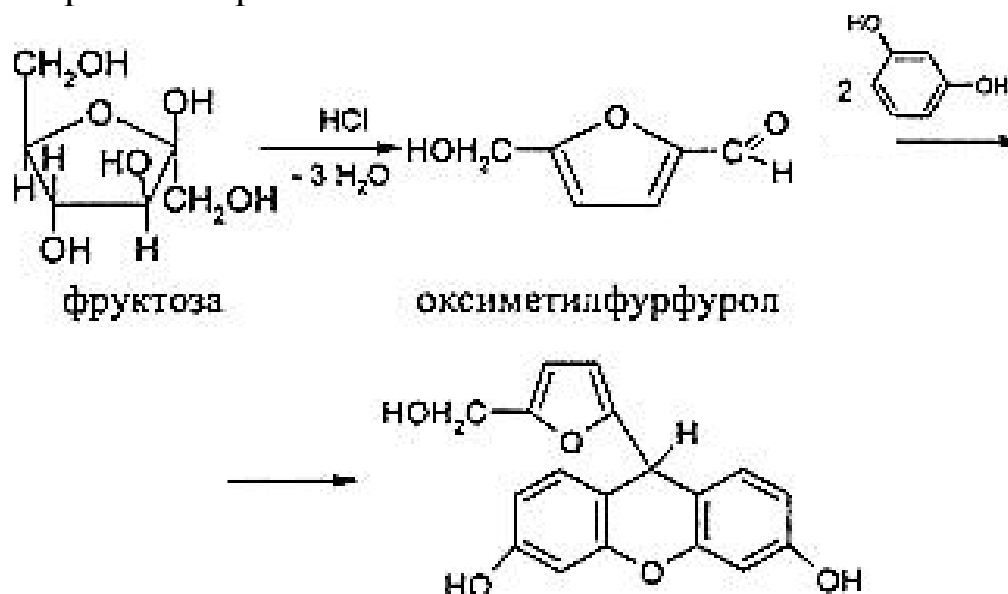
Этого можно избежать, проводя пробы на редуцирующие сахара с реактивом Фелинга (вместо раствора CuSO_4), представляющий собой хелатный комплекс меди:



Задание: опишите наблюдаемые явления, подтвердите их механизмами реакций.

Опыт 3. Реакция Селиванова

Реакция Селиванова является пробой на кетозы: 5-оксиметилфурфурол, образующийся при нагревании кетогексоз с сильными кислотами (HCl, H₂SO₄), дает с резорцином вишнево-красное окрашивание.



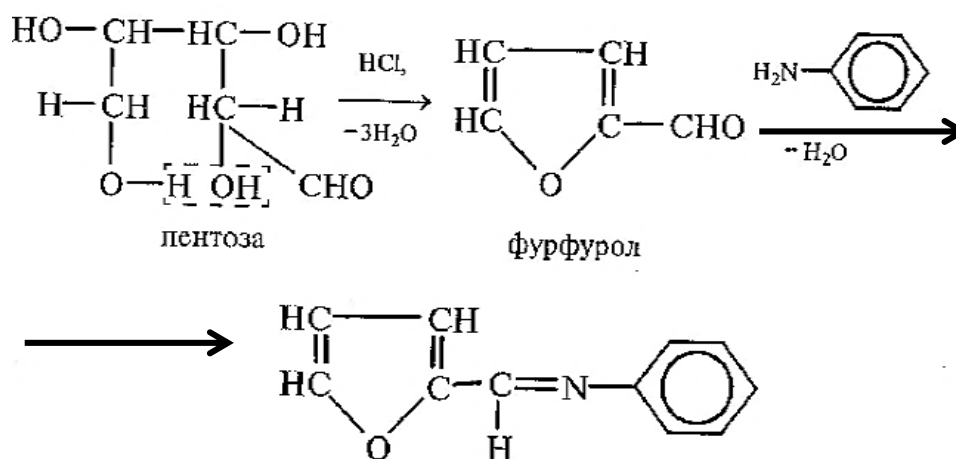
Реакцию с резорцином дают как свободные, так и отщепляющиеся от более сложных сахаров (например, сахарозы) кетогексозы. Альдозы также могут образовывать 5-оксиметилфурфурол, но при более длительном нагревании.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора фруктозы, добавляют несколько капель реактива Селиванова и нагревают до кипения.

Задание: опишите наблюдаемое явление, подтвердите его уравнениями реакций.

Опыт 4. Реакция на пентозы

При нагревании с концентрированной соляной или серной кислотой пентозы теряют 3 молекулы воды и превращаются в фурфурол. Фурфурол – бесцветная жидкость, которая с анилином образует продукт конденсации красного, с орцином – зеленого, с флороглицином – вишневого цвета.



Ход работы. В пробирку наливают 1–2 мл раствора рибозы, добавляют 1–2 мл концентрированной соляной кислоты. Кипятят содержимое пробирки, держа в парах полоску фильтровальной бумаги, смоченную свежеприготовленным уксусным раствором анилина. Появление вишнево-красного окрашивания свидетельствует о реакции фурфуrolа с анилином.

Задание: опишите наблюдаемое явление, подтвердите его механизмом реакции.

Опыт 5. Реакция Мальфатти (качественная проба на лактозу)

Ход работы. В пробирке смешивают 1 мл раствора лактозы и 0,5 мл раствора аммиака, добавляют 2 капли раствора NaOH. Пробирку помешают на 15 мин на водяную баню. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Задание: опишите наблюдаемое явление.

Опыт 6. Проба на сахарозу

(качественная реакция с солями кольбата)

В пробирку с 2 мл раствора сахарозы добавляют 1 мл раствора NaOH и несколько капель раствора $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. Появляется фиолетовое окрашивание.

Задание: объясните наблюдаемое явление.

Опыт 7. Реакция Барфедда

В отличие от реакций восстановления, окисление **сахаров** протекает не в щелочной, а в близкой к нейтральной среде. В этих условиях редуцирующие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 1,5 мл исследуемого раствора (глюкоза, лактоза или мальтоза), добавляют по 1,5 мл раствора ацетата меди и нагревают до кипения. Появление красного осадка Cu_2O свидетельствует о присутствии восстанавливающих моноз (глюкозы).

Задание: объясните наблюдаемое явление.

Опыт 8. Проба с α -нафтолом

Проба с α -нафтолом является одной из наиболее чувствительных общих реакций на углеводы и углеводные компоненты в сложных соединениях. С α -нафтолом углеводы дают фиолетовое окрашивание. Обусловлено оно тем, что при взаимодействии с концентрированной H_2SO_4 углеводы образуют фурфурол или 5-оксиметилфурфурол, которые конденсируются с α -нафтолом.

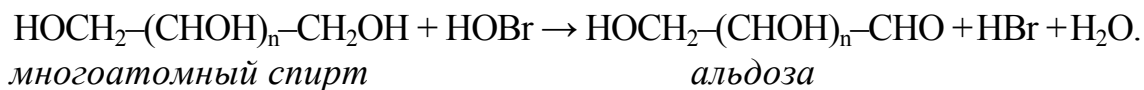
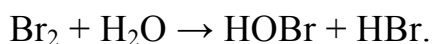
Ход работы. К 10 каплям раствора каждого углевода (глюкозы, пентозы, дисахаридов) прибавляют 3–4 капли раствора α -нафтола. Затем осторожно наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. Появляется фиолетовое окрашивание, более выраженное на границе слоев.

Задание: объясните наблюдаемое явление.

Опыт 9. Образование сахаров при окислении многоатомных спиртов

Бромная вода превращает многоатомный спирт преимущественно в альдегидоспирт (альдозу).

Одновременно образуется кетоспирт (кетоза).

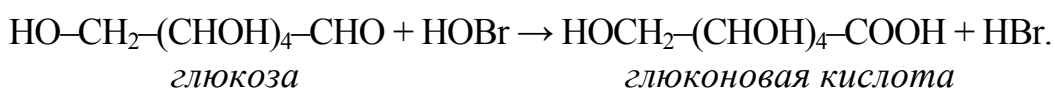


При большом избытке бромной воды альдоза частично окисляется далее до оксикислоты. Глицерин при окислении бромной водой дает смесь глицеринового альдегида и диоксиацетона, а маннит – маннозу и фруктозу. Многоатомные спирты способны растворять гидроокись меди вследствие наличия в их молекуле нескольких ОН-групп. Как показывает 1-я проба в этом опыте, 2-валентная медь в щелочном растворе является недостаточно энергичным окислителем для таких спиртов.

Ход работы. Опыт проводят одновременно с глицерином и маннитом. Растворяют 3–4 капли глицерина и 0,1–0,2 г маннита в 3 мл воды и делят каждый из растворов на 2 части. К первым половинам добавляют 1,5–2 мл 5% раствора щелочи, а затем по 2–3 капли раствора сульфата меди. Образуется голубой осадок гидроокиси меди, который при взбалтывании растворяется, раствор приобретает фиолетово-синий цвет. Затем растворы нагревают до кипения и отмечают, заметны ли в них изменения. Ко вторым половинам исходных растворов добавляют 8–10 мл бромной воды и нагревают на кипящей водяной бане до обесцвечивания раствора. Если через 10–15 мин окраска не исчезла, то кипятят его 1–2 мин на пламени горелки. Охладив бесцветную жидкость, отливают 2–3 мл в пробирку, повторяют описанную выше реакцию со щелочью и сульфатом меди с последующим нагреванием до кипения.

Задание: опишите наблюдаемые явления и подтвердите их уравнениями реакций.

Опыт 10. Окисление моносахаридов бромной водой



Глюконовая кислота имеет 5-ОН групп, в том числе одну в α-положении к группе COOH, поэтому дает характерную для α-оксикислот цветную реакцию с хлорным железом.

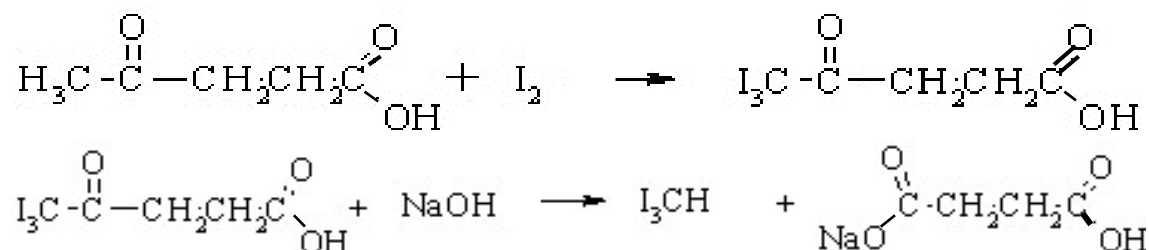
Оксикислоты образуют с ионами Fe^{3+} окрашенные комплексные соли. Раствор хлорида железа (III) окрашен в желто-коричневый цвет, поэтому для большей четкости перехода окраски применяют раствор *фенолята железа фиолетового цвета*. Оксикислота связывает ионы Fe^{3+} , разрушает фенолят, фиолетовая окраска раствора при этом переходит в зеленовато-желтую. Кетогексозы более устойчивы к действию окислителей. Фруктоза в условиях опыта почти не окисляется. При более энергичном окислении кетогексозы распадаются, образуя оксикислоты с меньшим числом атомов углерода.

Ход работы. Опыт проводят одновременно с раствором глюкозы и фруктозы. К 1 мл каждого раствора добавляют по 6 мл бромной воды, смесь нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Если за это время окраска не исчезнет, то кипятят жидкость 0,5–1 мин до полного обесцвечивания. Охладив оба раствора в воде до комнатной температуры, добавляют к каждому из них по несколько капель раствора хлорного железа и сравнивают появившуюся в них окраску.

Задание: опишите наблюдаемые явления.

Опыт 11. Образование левулиновой кислоты из гексоз

Фруктоза образует левулиновую кислоту уже при нагревании с разбавленной HCl , а при действии концентрированной HCl разрушается еще более глубоко. Глюкоза более устойчива в этих условиях: с разбавленной HCl она почти не реагирует, а с концентрированной дает левулиновую кислоту. Образование йодоформа в виде желтой мути с сильным характерным запахом доказывает присутствие в растворе соединения с группой $\text{CH}_3\text{-C(O)-}$, в данном случае левулиновой кислоты.



Исходный раствор сахарозы не дает йодоформной реакции ни при комнатной температуре, ни при нагревании.

Ход работы. К 1 мл раствора моносахарида (фруктоза, глюкоза) добавляют 2 мл концентрированной HCl и кипятят смесь над пламенем горелки 1–2 мин, при этом жидкость темнеет, и выпадают бурые хлопья. Охладив смесь, отливают 0,5 мл ее в другую пробирку и разбавляют в 10–12 раз водой до получения светло-коричневого мутного раствора. Данный раствор фильтруют через складчатый фильтр. К фильтрату добавляют 0,5–1 мл раствора йода и затем 5% раствор щелочи по каплям до исчезновения окраски. Параллельно проводят реакцию с йодом и щелочью исходного раствора сахара, не подвергшегося кипячению в соляной кислоте. Отмечают, в какой из проб уже на холоде образуется йодоформ.

Задание: опишите наблюдаемые явления и подтвердите их уравнениями реакций.

Контрольные вопросы

1. Классификация, номенклатура, биологическая роль углеводов.
2. Особенности строения, изомерия, конформация, моноз.
3. Перечислите групповые и специфические реакции на углеводы.
4. Строение, свойства, биологическая роль гомогликанов (крахмал, гликоген, целлюлоза, хитин, пектиновые вещества).
5. Строение, свойства, биологическая роль гетерогликанов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарин).
6. Производные моносахаридов: кислоты, гликозиды, аминсахара, фосфосахара.

ТЕМА 6. Липиды

Лабораторная работа № 12.

Ацилглицерины

Цель: изучить свойства ацилглицеринов.

Реактивы: Гидросульфат калия (KHSO_4) кристаллический (или сульфат магния (MgSO_4)), ацетон ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), хлороформ (CHCl_3), диэтиловый эфир ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$), этиловый спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), бензин, бензол (C_6H_6), керосин, бромная вода (Br_2).

Растворы: 5% белка; 1% гидроксида калия (KOH), 2% гидрокарбоната натрия (NaHCO_3), 2% и насыщенный раствор хозяйственного мыла, 10% серная кислота (H_2SO_4), 10% соляная кислота (HCl), 10% хлорида кальция (CaCl_2), 10% ацетата свинца(II) ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$), 10% сульфата меди (II) (CuSO_4), аммиачный раствор нитрата серебра (AgNO_3); водно-спиртовой раствор NaOH ; насыщенный раствор хлорида натрия (NaCl); спиртовой раствор лецитина (к 1/2 желтка куриного яйца приливают 40 мл горячего спирта, помешивая палочкой. Раствор охлаждают и фильтруют. Если фильтрат мутнеет, то фильтрование повторяют до получения совершенно прозрачного раствора (реактив готовят перед проведением опыта)).

Оборудование и материалы: спиртовки, набор пробирок в штативе, держатели для пробирок, водяная баня, стеклянные палочки, пробки, полоски фильтровальной бумаги, ножницы. Твердый жир (свиной или говяжий, сливочное масло), жидкий жир (растительное масло), желток куриного яйца, воск.

Теоретическая часть

К липидам относится большая группа довольно разнообразных соединений, нерастворимых в воде и хорошо растворимых в органических растворителях.

Ацилглицерины или *нейтральные жиры* представляют собой сложные эфиры 2-атомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Основная масса нейтральных жиров состоит из триацилглицеринов. У большинства живых организмов в составе ацилглицеринов преобладают жирные кислоты с четным числом атомов углерода.

Наиболее распространенные жирные кислоты – стеариновая, пальмитиновая (насыщенные), олеиновая, линолевая и линоленовая (ненасыщенные).

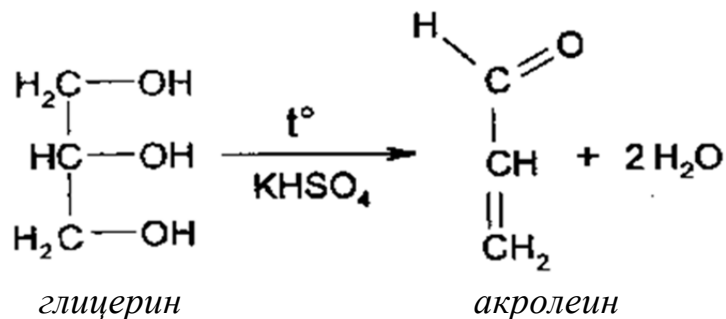
От соотношения входящих в состав ацилглицеринов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот зависит ряд их свойств: температура плавления, йодное число, растворимость, способность образовывать эмульсии и др.

Практическая часть

Опыт 1. Акролеиновая проба

Акролеиновая проба используется для открытия в жирах образующегося при нагревании свободного глицерина. Глицерин теряет воду и образует ненасыщенный альдегид – акролеин (пропеналь), легко обнаруживаемый по специфическому резкому, раздражающему запаху.

Акролеин может образовываться при пережаривании пищи (удушливый запах кухонного чада). Акролеиновую пробу проводят, нагревая жир в присутствии KHSO_4 или NaHSO_4 (в качестве водоотнимающего средства):



Липиды, не содержащие глицерина (воск, жирные кислоты, стерины и др.), акролеиновой пробы не дают.

Ход работы. Помещают в сухую пробирку 2–3 капли жира, добавляют щепотку сухого KHSO_4 и нагревают на спиртовке (под тягой!) до появления белых густых паров.

Резкий раздражающий запах (**осторожно!**) свидетельствует об образовании акролеина.

В пары вносят бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра, бумажка темнеет. Проводят ту же реакцию с кусочком воска. Наблюдается ли потемнение бумажки?

Задание: опишите наблюдаемые явления, объясните их.

Опыт 2. Обнаружение лецитина в желтке куриного яйца

Лецитины (фосфатидилхолины) относятся к группе фосфолипидов, не растворяются в воде и ацетоне, но хорошо растворяются в спирте, хлороформе, эфире. При добавлении к раствору лецитинов ацетона они легко осаждаются.

Ход работы

А) Осаждение фосфатидилхолинов. В сухую пробирку приливают 10 капель ацетона и по каплям добавляют спиртовой раствор лецитина. Отмечают появление мути.

Б) Эмульгирование фосфатидилхолинов. В сухую пробирку приливают 20 капель спиртового раствора лецитина и по каплям добавляют дистиллированную воду до образования устойчивой эмульсии фосфатидилхолинов.

Задание: опишите наблюдаемые явления, объясните их.

Опыт 3. Растворимость жиров

Обычно липиды извлекают из высушенных тканей органическими растворителями. Для разделения липидов пользуются неодинаковой их растворимостью в различных растворителях: одни из них хорошо растворимы в диэтиловом эфире, но плохо – в ацетоне (например, фосфолипиды), другие (например, холестерол) растворимы в бензоле, но нерастворимы в этаноле.

Ход работы. Помещают в 5 сухих пронумерованных пробирок по 3–4 капли исследуемого жира, в 1-ю пробирку добавляют 2 мл бензина или керосина (бензола), во 2-ю – 2 мл хлороформа, в 3-ю – 2 мл этанола, в 4-ю – 2 мл ацетона, в 5-ю – 2 мл диэтилового эфира. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и наблюдают за растворением жира в различных растворителях.

Задание: опишите наблюдаемые явления и объясните, с чем связана различная степень растворимости жиров в органических растворителях.

Опыт 4. Эмульгирование жиров

Из-за плохой растворимости в воде липиды образуют эмульсии с дифильными молекулами – белками, детергентами, желчью.

Ход работы. В 5 пронумерованных пробирок помещают по 3 капли растительного масла или твердого жира и 2–3 мл дистиллированной воды. В 1-ю пробирку добавляют 5 капель раствора белка, во 2-ю – 5 капель раствора КОН, в 3-ю – 5 капель раствора NaHCO_3 , в 4-ю – 5 капель раствора мыла, в 5-ю – ничего не добавляют. Все пробирки помещают на 5 мин на горячую водяную баню для плавления жира; если жир жидкий, то нагревание излишне. Содержимое всех пробирок взбалтывают, ставят по порядку в штатив и в пробирках № 1–4 наблюдают образование относительно устойчивой эмульсии, а в 5-й – расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду.

Задание: опишите наблюдаемые явления и объясните, с чем связано образование устойчивых эмульсий.

Опыт 5. Гидролиз жира в водно-спиртовом растворе (омыление)

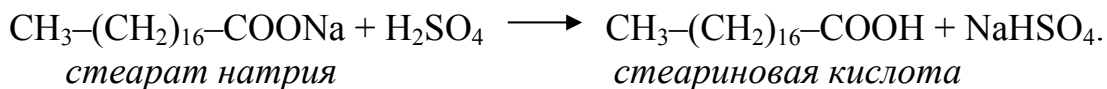
Ход работы. В пробирку помещают немного твердого жира и 3 мл спиртового раствора гидроксида натрия. Смесь перемешивают стеклянной палочкой, помещают в кипящую водяную баню и нагревают в течение 4–5 мин до образования однородной жидкости. Реакцию можно считать законченной, если взятая стеклянной палочкой капля реакционной массы полностью растворится в 5 мл воды (на поверхности не появляются капельки жира) с образованием обильной пены при встряхивании. После этого к полученной густой жидкости добавляют 3–4 мл насыщенного раствора хлорида натрия для выделения (высаливания) карбоновых кислот. После расслоения жидкости смесь охлаждают и отделяют затвердевший кусочек мыла.

Задание: опишите наблюдаемые явления. Напишите реакцию получения мыла из жира. Объясните, почему необходимо использовать именно спиртовой раствор щелочи?

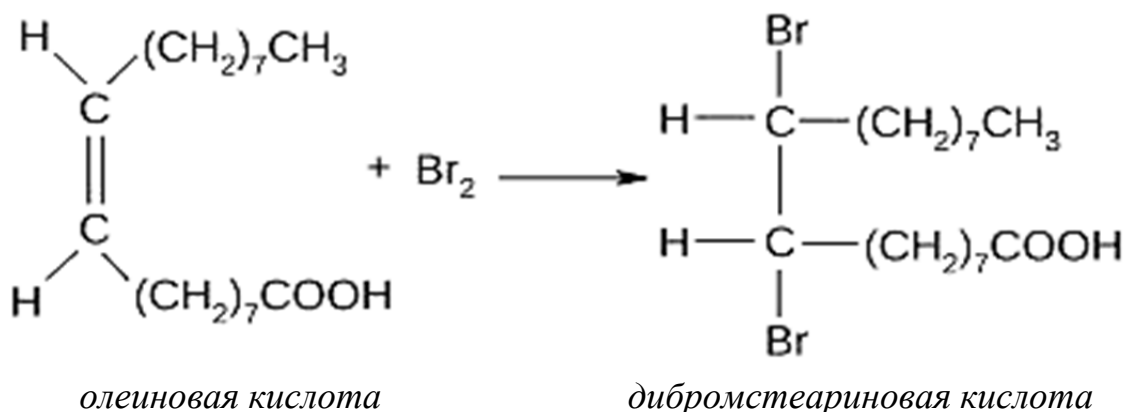
Опыт 6. Выделение свободных жирных кислот из мыла и изучение их свойств

Ход работы. В 4 пробирки наливают по 0,5 мл насыщенного раствора мыла. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли 10% раствора серной кислоты, полученную смесь нагревают в пламени спиртовки почти до кипения. Расплавившиеся жир-

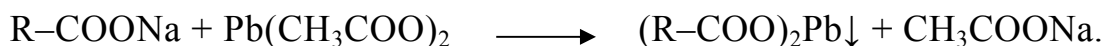
ные кислоты всплывают в виде белого слоя, который затвердевает при охлаждении:



К полученной смеси прибавляют 2–3 капли бромной воды и встряхивают пробирку. Бромная вода обесцвечивается.



Во 2-ю и 3-ю пробирки добавляют соответственно по 2–3 капли раствора хлорида кальция и ацетата свинца. Выпадают белые осадки нерастворимых в воде солей высших жирных кислот (кальциевое и свинцовое мыло). К осадкам приливают по 0,5 мл 10% соляной кислоты. При этом осадки растворяются.



В 4-ю пробирку приливают 1 мл раствора сульфата меди (II). Раствор с голубовато-зеленоватым осадком (медное мыло) нагревают до кипения. Осадок расплавляется и всплывает в виде изумрудно-зеленого кольца. Если кольцо не образуется, то следует добавить еще несколько капель раствора сульфата меди (II), а затем снова нагреть смесь.

Задание: опишите и объясните наблюдаемые явления, используя соответствующие уравнения реакций.

Контрольные вопросы

1. Строение, свойства и роль липидов в организме.
2. Классификация, номенклатура, строение, свойства жирных кислот.

3. Простые липиды: строение, свойства, биологическая роль.

4. Фосфолипиды, гликолипиды, стероиды: особенности строения и свойств.

5. Приведите формулу триацилглицерина, в состав которого входят олеиновая, стеариновая и пальмитиновая кислоты. Дайте его название по рациональной номенклатуре.

Лабораторная работа № 13.

Определение чисел жиров

Цель: изучить методы и провести определение чисел жиров.

Реактивы: этанол (C_2H_5OH), 0,1 н раствор йода в этаноле, 0,1 н раствор гипосульфита натрия ($Na_2S_2O_3$), 0,5% раствор крахмала, хлороформ, 0,5 н спиртовой раствор и 0,1 н водный раствор гидроксида калия (KOH), 0,5 н. раствор соляной кислоты (HCl), 0,1% раствор фенолфталеина, смесь этанола с диэтиловым эфиром.

Оборудование и материалы: конические колбы и пробки для них; весы; пипетки; микробюретки; воронки для микробюреток. Твердые жиры и масла.

Опыт 1. Определение йодного числа

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют по 2 атома галогена по месту каждой двойной связи. Обычно степень ненасыщенности определяется йодным числом.

Йодное число определяется массой йода, который присоединяется к 100 г жира. Йодное число позволяет судить о степени ненасыщенности жира, о склонности его к «высыханию» и прогорклости.

Ход работы. В одну коническую колбочку на 50 мл вносят 0,1 г жира и 10 мл хлороформа (опыт). В другую наливают 10 мл хлороформа (контроль). В обе колбочки приливают по 25 мл спиртового раствора йода. Закрывают колбы пробками, тщательно перемешивают и оставляют в темноте на 1,5 ч. Не вступивший в реакцию йод титруют раствором гипосульфита

натрия сначала до слабо-желтой окраски, а затем в присутствии крахмала (добавить несколько капель крахмала в колбочку) до обесцвечивания раствора, потом так же титруют контроль.

Расчет йодного числа. 1 мл 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 1 мл 0,1 н раствора йода, или 0,0127 г йода. Зная объем 0,1 н раствора гипосульфита натрия, который пошел на титрование контроля и опыта, вычисляют йодное число (X):

$$X = 100 \times 0,0127 \times f \times (A - B) / m ,$$

где A, B – объем 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ на титрование соответственно контроля и опыта, мл;

f – коэффициент поправки (указан на банке с раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$);

m – навеска жира, г.

Задание: опишите опыт и произведите расчет йодного числа исследуемого жира.

Опыт 2. Определение числа омыления жира

Число омыления – это масса (в миллиграммах) КОН, необходимого для нейтрализации всех свободных и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Ход работы. В колбочку на 50 мл вносят 0,5 г жира, прибавляют 15 мл спиртового раствора КОН (опыт), кипятят на водяной бане 50 мин с обратным холодильником, иногда перемешивая содержимое колбы. Одновременно ставят контрольный опыт: вместо жира берут 0,5 мл дистиллированной воды. Окончание омыления определяется по образованию однородной прозрачной жидкости, которую охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл дистиллированной воды и титруют 0,5 н раствором НС1 по фенолфталеину (берут 2 капли).

Расчет числа омыления. 1 мл 0,5 н раствора КОН содержит 28 мг КОН. Масса КОН для нейтрализации всех жирных кислот в 1 г жира, т.е. число омыления (Y) равно:

$$Y = 28 \times f \times (B - A) / m ,$$

где B, A – объем 0,5 н раствора НС1 на титрование соответственно контроля и опыта, мл;

- m – навеска жира, г;
 f – коэффициент поправки (указан на банке с раствором НС1).

Задание: опишите опыт и произведите расчет числа омыления исследуемого жира.

Опыт 3. Определение кислотного числа

Кислотное число – это масса (в миллиграммах) КОН, необходимого для нейтрализации всех свободных жирных кислот в 1 г жира. Кислотное число разных сортов свежего жира обычно не превышает 1,2–3,5. При хранении происходит гидролиз ацилглицеролов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот и снижению, вследствие этого, качества жира.

Ход работы. Взвешивают 1 г жира, помещают его в колбочку на 50 мл, добавляют 10 мл смеси этанола с диэтиловым эфиром и 2 капли фенолфталеина. Раствор жира титруют 0,1 н раствором КОН до нежно-розового цвета.

Расчет кислотного числа. 1 мл 0,1 н раствора КОН содержит 5,6 мг КОН. Кислотное число жира (Z) определяют по формуле:

$$Z = 5,6 \times A \times f / m ,$$

где A – объем 0,1 н раствора КОН на титрование раствора жира;

f – коэффициент поправки (указывают на банке с раствором КОН);

m – навеска жира, г.

Задание: опишите опыт и произведите расчет кислотного числа исследуемого жира.

Опыт 4. Определение эфирного числа жира

Эфирное число – это масса КОН, необходимого для нейтрализации жирных кислот, которые образуются при омылении 1 г жира. Эфирное число рассчитывают как разность между числом омыления и кислотным числом данного жира.

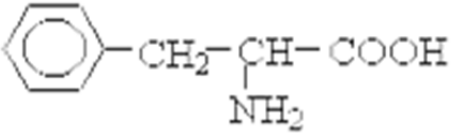
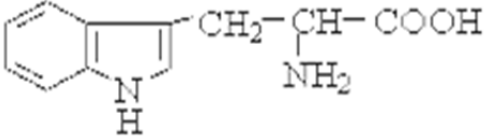
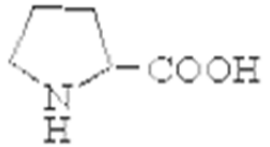
Задание: произведите расчет эфирного числа исследуемого жира.

Контрольные вопросы

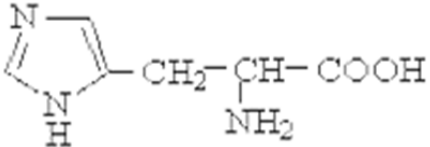
1. Приведите примеры ненасыщенных жирных кислот. Какова их биологическая роль?
2. Опишите β -окисление жирных кислот. Какова их биологическая роль?
3. Охарактеризуйте липопротеины крови.
4. Что вам известно о нарушении метаболизма липидов (сахарный диабет, истощение, ожирение, атеросклероз)?
5. Опишите процесс метаболизма и биологическую роль холестерина в нем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Протеиногенные α-аминокислоты: RCH(NH₂)COOH

Формула	Название	Обозначение	
		русское	международное
<i>Аминокислоты, содержащие неполярный радикал R</i>			
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Глицин	Гли	Gly
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Аланин	Ала	Ala
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Валин	Вал	Val
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Лейцин	Лей	Leu
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Изолейцин	Иле	Ile
	Фенилаланин	Фен	Phe
	Триптофан	Три	Trp
	Пролин	Про	Pro
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Метионин	Мет	Met

Окончание ПРИЛОЖЕНИЯ

<i>Аминокислоты, содержащие полярный неионогенный радикал R</i>			
$\text{HO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Серин	Сер	Ser
$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Треонин	Тре	Thr
$\text{H}_2\text{NCO}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Аспаргин	Асн	Asn
$\text{H}_2\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Глутамин	Глн	Gln
<i>Аминокислоты, содержащие полярный положительно заряженный радикал R</i>			
$\text{H}_2\text{NCH}_2\underset{\text{OH}}{\text{CH}}(\text{CH}_2)_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{COOH}$	Лизин	Лиз	Lys
$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\text{C}}=\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Аргинин	Арг	Arg
	Гистидин	Гис	His
<i>Аминокислоты, содержащие полярный отрицательно заряженный радикал R</i>			
$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Аспаргиновая кислота	Асп	Asp
$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Глутаминовая кислота	Глу	Glu
$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Тирозин	Тир	Tyr
$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Цистеин	Цис	Cys

ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Беляева, Л. А. Биохимия : учебно-методический комплекс : в 2 ч. / Л. А. Беляева. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2008. – 116 с. – Ч. 1.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия : учебник / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд. – М. : Медицина, 2004. – 704 с.
3. Северин, Е. С. Биохимия : учебник / Е. С. Северин [и др.] ; под общ. ред. Е. С. Северина. – 5-е изд. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
4. Гидранович, В. И. Биохимия : учеб. пособие / В. И. Гидранович, А. В. Гидранович. – Минск : ТетраСистемс, 2010. – 528 с.
5. Ленинджер, А. Основы биохимии : в 3 т. / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1985. – Т. 3.
6. Основы биохимии : учебник / под ред. А. А. Анисимова. – М., Высшая школа, 1986. – 551 с.
7. Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина и Г. А. Соловьевой. – М. : МГУ, 1989. – 509 с.
8. Сенчук, В. В. Биохимия : курс лекций : в 2 ч. / В. В. Сенчук. – Минск : БГУ, 2005. – 179 с. – Ч. 1. : Биомолекулы.
9. Сенчук, В. В. Биохимия : лабораторный практикум / В. В. Сенчук [и др.]. – Минск : БГУ, 2005. – 80 с.
10. Филиппович, Ю. Б. Биохимические основы жизнедеятельности человека : учебное пособие / Ю. Б. Филиппович [и др.] ; под общ. ред. Т. Д. Гамбурцева. – М. : Владос, 2005. – 407 с.
11. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. – М., 1999. – 512 с.

Дополнительная литература

1. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный дом, 2004. – 416 с.
2. Биохимия: задачи и упражнения для самостоятельной работы студентов : учебное пособие / под ред. А. С. Коничева. – М. : Колос С, 2007. – 140 с.
3. Дмитриев, А. Д. Биохимия : учебное пособие / А. Д. Дмитриев, Е. Д. Амбросьева. – М. : Дашков и К^о, 2010. – 168 с.
4. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. Г. Рем. – М. : Мир, 2000. – 474 с.
5. Коничев, А. С. Биохимия и молекулярная биология. Словарь терминов / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М. : Дрофа, 2008. – 368 с.
6. Рогожин, В. В. Практикум по биологической химии : учебно-методическое пособие / В. В. Рогожин. – СПб. : Лань, 2006. – 256 с.
7. Уайт, А. Основы биохимии : в 3-х т. / А. Уайт [и др.]. – М. : Мир, 1981. – Т. 3.
8. Цыганов, А. Р. Биохимия : практикум / А. Р. Цыганов, И. В. Сучкова, И. В. Ковалева. – Минск : ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
9. Чиркин, А. А. Практикум по биохимии : учеб. пособие / А. А. Чиркин. – Минск : Новое знание, 2002. – 512 с.
10. Проскурина, И. К. Биохимия : учебник / И. К. Проскурина. – М. : Академия, 2012. – 336 с.

Учебное издание

Ильючик Ирина Анатольевна
Федоренко Марта Петровна
Никандров Виталий Николаевич

Биохимия.
Введение: структурная биохимия

Учебно-методическое пособие
для выполнения лабораторных работ

Ответственный за выпуск *П. Б. Пигаль*

Редактор *Т. И. Андросюк*
Корректор *Ю. В. Цвикевич*

Подписано в печать 01.06.2020 г. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 3,53.
Тираж 112 экз. Заказ № 147.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе
Полесского государственного университета.
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.