



Г.Б. ВОЛОДИНА

**ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ
ХИМИИ**



ИЗДАТЕЛЬСТВО ТГТУ

УДК 577.1(07)
ББК Е072я73-5
В68

Рецензенты:

Кандидат химических наук, доцент кафедры химии ТГТУ
И.А. Анкудинова

Доктор технических наук, профессор МГУКИ
В.А. Сусоев

Володина Г.Б.

В68 Практикум по биологической химии: Учеб. пособие.
Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2005. 80 с.

В лабораторном практикуме приведены 6 лабораторных работ, выполнение которых будет способствовать усвоению студентами материала по курсу «Биохимия». Каждая лабораторная работа содержит краткое теоретическое введение, перечень необходимых реактивов и посуды, прописи проведения опытов и заканчивается контрольными вопросами и тестами.

Предназначено студентам специальности 200402 «Инженерное дело в медико-биологической практике».

УДК 577.1(07)
ББК Е072я73-5

ISBN 5-8265-0434-X

© Володина Г.Б., 2005
© Тамбовский государственный
технический университет (ТГТУ),
2005

Министерство образования и науки Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Тамбовский государственный технический университет"

Г.Б. ВОЛОДИНА

**ПРАКТИКУМ
ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Утверждено Ученым советом университета
в качестве учебного пособия



Тамбов
◆ Издательство ТГТУ ◆
2005

Учебное издание

ВОЛОДИНА Галина Борисовна

ПРАКТИКУМ ПО
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Учебное пособие

Редактор Е.С. Мордасова
Компьютерное макетирование М.А. Филатовой

Подписано в печать 13.12.05
Формат 60 × 84 / 16. Бумага офсетная. Печать офсетная
Гарнитура Times New Roman. Объем: 4,65 усл. печ. л.; 4,75 уч.-изд. л.
Тираж 100 экз. С. 873

Издательско-полиграфический центр
Тамбовского государственного технического университета,
392000, Тамбов, Советская, 106, к. 14

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные работы имеют целью практическое освоение студентами научно-теоретических положений биохимии, овладение ими техникой экспериментальных исследований и анализа полученных результатов, привитие навыков работы с лабораторным оборудованием, контрольно-измерительными приборами и вычислительной техникой.

При выполнении лабораторных работ студенты должны научиться безопасным приемам обращения с химическими реактивами, приборами и посудой, приобрести навыки исследования свойств аминокислот, белков, ферментов, жиров и углеводов, и приобрести навыки использования справочной и научной литературы.

Настоящий практикум составлен в соответствии со стандартом и учебной программой по биологической химии для специальности 200402 и может быть успешно использован студентами других специальностей, изучающими биологическую химию.

В лабораторном практикуме приведены правила техники безопасности при работе в лаборатории биологической химии, приведены условия и аналитические эффекты качественных реакций на важнейшие классы соединений, а также перечислен необходимый минимум лабораторного оборудования и химической посуды. Практикум знакомит студентов с основными методами обнаружения и анализа аминокислот, белков, углеводов, исследования активности ферментов и ингибирующего действия фосфорорганических соединений, исследования свойств жиров.

Для более углубленного изучения курса биологической химии в практикум включены таблицы, схемы, рисунки, углубляющие знания основ биохимии. Закреплению учебного материала способствуют приводимые после каждой темы контрольные вопросы и тесты.

Теория и навыки, полученные в ходе изучения биологической химии, позволят студентам лучше разобраться в процессах, протекающих в организме человека, увидеть не только их последствия, но и найти причины возникновения болезней и патологий.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

1 Приступая к работе в лаборатории, студенты должны ознакомиться с расположением средств пожаротушения и первой медицинской помощи.

2 При подготовке к лабораторной работе студенты должны внимательно изучить задание по выполнению опытов, обратив особое внимание на правила, обеспечивающие безопасное выполнение работы, а также познакомиться со свойствами используемых в лаборатории веществ (огнеопасность, токсичность и т.д.).

3 При работе в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, аккуратность, быть внимательным, исключить попадание веществ на кожу и одежду, не трогать руками лицо и глаза, тщательно мыть руки с мылом.

4 В лаборатории не разрешается принимать пищу, пить воду из лабораторной посуды, пробовать вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, направляя к себе пары или газ движением руки.

5 Категорически запрещается одному работать в лаборатории.

6 Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде.

7 Органические соединения в паро- и газообразном состоянии в смеси с воздухом способны взрываться. Не допускайте образования таких смесей.

8 При проведении работ по сплавлению со щелочью, металлическим натрием, концентрированными кислотами всегда следует пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками.

9 Работу с большинством органических веществ следует проводить только в вытяжных шкафах или в хорошо проветриваемом помещении.

10 Остатки реактивов следует обезвреживать и сливать в специальные емкости для отходов.

11 При проведении работы по сплавлению органического вещества с металлическим натрием следите, чтобы вблизи не было воды. Резать натрий можно только на сухой фильтровальной бумаге, защитив себя очками или маской. По окончании работы необходимо тщательно собрать все остатки непрореагировавшего натрия в банку с керосином, мелкие остатки уничтожают, растворяя их в спирте.

12 При работе с бромом следует помнить, что это очень ядовитое вещество, сильно действующее на слизистые оболочки и образующее на коже трудно заживающие ожоги. Все работы с бромом проводят в вытяжном шкафу. В случае ожога бромом обожженное место продолжительное время обрабатывают спиртом, затем направляют пострадавшего в медицинский пункт.

13 При попадании кислот на кожу нужно быстро промыть пораженное место струей воды, а затем – 2...3 %-ным раствором соды. При ожоге едкими щелочами надо также хорошо промыть пораженное место водой, а затем – 2...3 %-ным раствором уксусной кислоты. При случайном попадании кислоты или щелочи в глаза тотчас промыть их большим количеством воды, а затем обработать тампоном, смоченным в растворе соды или борной кислоты, и вновь промыть водой.

14 Концентрированные кислоты, щелочи, ядовитые и сильно пахнущие вещества обязательно хранить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу.

15 Легковоспламеняющиеся и взрывоопасные жидкости должны храниться в металлических шкафах в количестве, не превышающем ежедневной потребности.

16 В случае воспламенения одежды необходимо немедленно набросить на пострадавшего халат, одеяло, пиджак и т.д. Ни в коем случае не давать ему бежать, так как это усиливает пламя. При возникновении пожара нужно сразу отключить вентиляцию и электроэнергию и принять меры к ликвидации загорания. При необходимости вызвать пожарную команду. При воспламенении эфира, бензола, бензина нельзя применять для тушения воду. В этих случаях пламя тушат песком или асбестовым одеялом.

17 При работе со стеклом и химической посудой необходимо соблюдать правила предосторожности.

18 Запрещается беспорядочно смешивать органические вещества и проводить какие-либо опыты, не связанные с программой обучения.

19 После выполнения опытов сдать реактивы, посуду и оборудование лаборанту или преподавателю (дежурному).

СОСТАВЛЕНИЕ ОТЧЕТА ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

Каждый эксперимент, проведенный в лаборатории анализу органического соединения, должен быть запротоколирован в виде отчета. Отчет позволяет систематизировать исследования, сделать правильные выводы из экспериментов, найти ошибки и наметить пути их устранения, а также вести контроль и учет расходования реактивов, посуды и времени на постановку опыта.

Примерная форма отчета по исследованию свойств аминокислот О Т Ч Е Т

по лабораторной работе _____ (название)
студента _____ группы _____

- 1 Номер и название опыта.
- 2 Методика проведения.
- 3 Аналитический эффект.
- 4 Результаты эксперимента.
- 5 Выводы по занятию.
- 6 Подпись студента (работа выполнена).
- 7 Подпись лаборанта о сдаче реактивов, посуды и рабочего места.
- 8 Подпись руководителя занятия (после защиты работы).

СОКРАЩЕНИЯ

АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
АХАТ	– ацилхолестеролацилтрансфераза
ГАМК	– у-аминомасляная кислота
ГМГ-	– 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А

КоА	
ГМФ	– гуанозинмонофосфат
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	– диоксифенилаланин
КоА	– кофермент (коэнзим) А
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
ЛППП	– липопротеины промежуточной плотности
ЛХАТ	– лецитинхолестеролацилтрансфераза
мРНК	– матричная РНК
мяРНП	– малые ядерные рибонуклеопротеины
РНК	– рибонуклеиновая кислота
рРНК	– рибосомная РНК
тРНК	– транспортная РНК
ТДФ	– тиаминдифосфат
УДФ	– уридиндифосфат
УТФ	– уридинтрифосфат
ФИФ ₂	– фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЩУК	– щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)
FAD	– окисленный флавинаденидинуклеотид
FADH ₂	– восстановленный флавинаденидинуклеотид
FMN	– окисленный флавинмонопнуклеотид
FMNH ₂	– восстановленный флавинмонопнуклеотид
НЬ	– гемоглобин
НЬА	– нормальный гемоглобин взрослого человека
НЬF	– фетальный гемоглобин
НЬ(O ₂) ₄	– оксигемоглобин

Лабораторная работа 1

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТ

Цель работы:

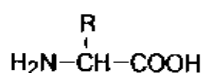
- 1) изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот;
- 2) привить навыки работы химической посудой;
- 3) закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования свойств глицина, аланина;
- 4) ознакомить с побочными процессами, проходящими при проведении качественных реакций;
- 5) привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

Общее число встречающихся в природе аминокислот достигает 300, однако некоторые из них обнаружены лишь в определенном сообществе или даже в одном организме.

Поэтому аминокислоты живых организмов можно разделить на *протеиногенные* (кодируются генетическим кодом) и *непротеиногенные* (не кодируются генетическим кодом). Протеиногенных аминокислот 20; 19 из них являются α -аминокислотами.

Аминокислоты можно рассматривать как производные карбоновых кислот, в которых один из атомов водорода замещен на группу NH₂.

А-аминокислоты содержат аминогруппу у ближайшего к карбоксильной группе атома углерода. Общая формула α-аминокислот:



Названия аминокислот образуются по международной номенклатуре (**амино + углеводород + овая кислота**), но чаще используют тривиальные названия.

$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2-Аминопропановая (α-аминопропионовая) кислота, α-аланин
$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2-Аминобутандионовая (аминоянтарная) кислота, аспарагиновая кислота
$\begin{array}{c} \text{HSCH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	2-Амино-3-меркаптопропановая кислота, цистеин

Тривиальные названия часто связаны с источниками выделения. Серин входит в состав фиброина шелка (от лат. *sericus* – шелковистый), тирозин впервые выделили из сыра (от греч. *tyros* – сыр), цистин из камней мочевого пузыря (от греч. *kystys*- пузырь) и т.д.

Значительно реже встречаются аминокислоты с β или γ-положением аминогрупп (β-аминопропионовая или γ-аминомасляная кислоты).

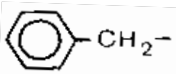
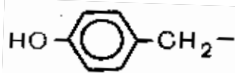
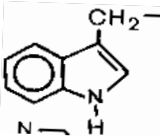
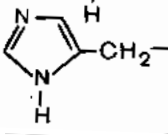
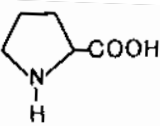
В зависимости от отдельных признаков аминокислоты классифицируют:

I По характеру углеводородного радикала:

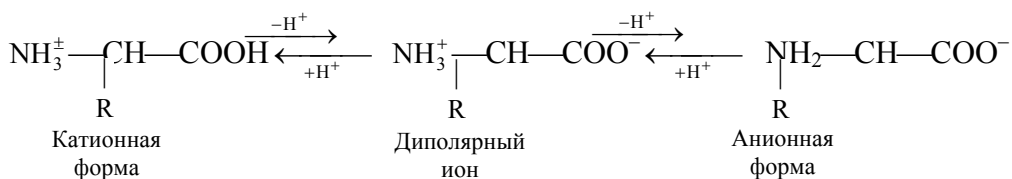
- 1 ациклические (алифатические);
- 2 циклические:
 - гомоциклические;
 - гетероциклические (табл. 1).

Таблица 1

Строение R	Название	Сокращенное название аминокислотного остатка	
Алифатические			
$\begin{array}{c} \text{H}- \\ \text{CH}_3- \\ (\text{CH}_3)_2\text{CH}- \\ (\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Глицин Аланин Валин ² Лейцин ² Изолейцин ²	Gly Ala Val Leu Ile	
Содержащие OH-группу	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2- \\ \text{CH}_3-\text{CHOH}- \end{array}$	Серин Треонин ²	Ser Thr
Содержащие COOH-группу	$\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2- \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$	Аспарагиновая Глутаминовая	Asp Glu
Содержащие NH ₂ CO-группу	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{CO}-\text{CH}_2- \\ \text{NH}_2\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$	Аспарагин Глутамин	Asn Gln
Содержащие NH ₂ -группу	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2- \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2- \\ \\ \text{NH} \end{array}$	Лизин ² Аргинин	Lys Arg

Строение R	Название	Сокращенное название аминокислотного остатка	
Серусодержащие	HS-CH ₂ - CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	Цистеин Метионин ²	Cys Met
Ароматические		Фенилаланин ²	Phe
		Тирозин	Tyr
Гетероциклические		Триптофан ²	Trp
		Гистидин	His
		Пролин	Pro

В водном растворе аминокислоты существуют в форме биполярного иона (*цвиттер-иона*):



pH7,0

pH1,0 Сильнокислая среда \longleftarrow \longrightarrow Сильнощелочная среда pH11,0

Положение равновесия определяется pH среды. Общим свойством для аминокислот является преобладание катионных форм в сильнокислой среде и анионных – в щелочной.

Диссоциация других функциональных групп протекает согласно уравнениям:



Изменяя pH раствора, можно изменять заряд молекулы аминокислот. При определенном для каждой аминокислоты значении pH наступает такое состояние, при котором заряд аминокислоты становится нейтральным. Такое значение pH получило название *изоэлектрической точки* (pI).

При значении pH, равным изоэлектрической точке, аминокислоты не перемещаются в электрическом поле. При pH ниже изоэлектрической точки (pH < pI) катион аминокислоты движется к *катоду*, а при pH выше pI (pH > pI) анион аминокислоты движется к *аноду*.

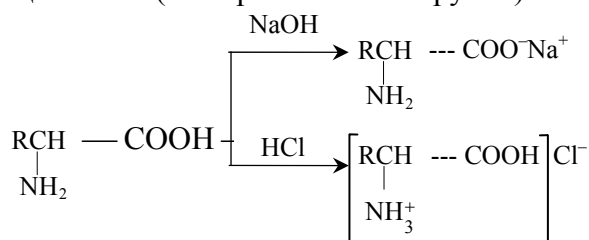
На этих свойствах аминокислот основана возможность их разделения в *электрическом поле* (*электрофорез*). Кислые аминокислоты имеют pI в слабокислой среде, основные – в слабощелочной, нейтральные – в нейтральной.

Биполярность молекул аминокислот обуславливает свойства указанных соединений: хорошую растворимость в воде и низкую растворимость в органических растворителях, высокие значения диэлектрической проницаемости, большие дипольные моменты молекул, высокие значения температур плавления (выше $200\text{ }^{\circ}\text{C}$). Высокая растворимость в воде является важным фактором обеспечения биологического функционирования аминокислот в организме: всасывание, транспорт и т.п.

II Химические свойства

1 Амфотерность

Амфотерность обусловлена наличием в молекуле двух функциональных групп, поэтому они образуют соли со щелочами (по карбоксильной группе) и с кислотами (по аминогруппе).



Аминокислоты, обладая амфотерными свойствами, могут играть роль *буферной системы*, реагируя, как слабая кислота:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{R}-\text{COO}^-]}{[\text{R}-\text{COOH}]} = K_a,$$

где K_a – константа диссоциации кислоты; или как слабое основание

$$\frac{[\text{R}-\text{NH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{R}-\text{NH}_2]} = K_b,$$

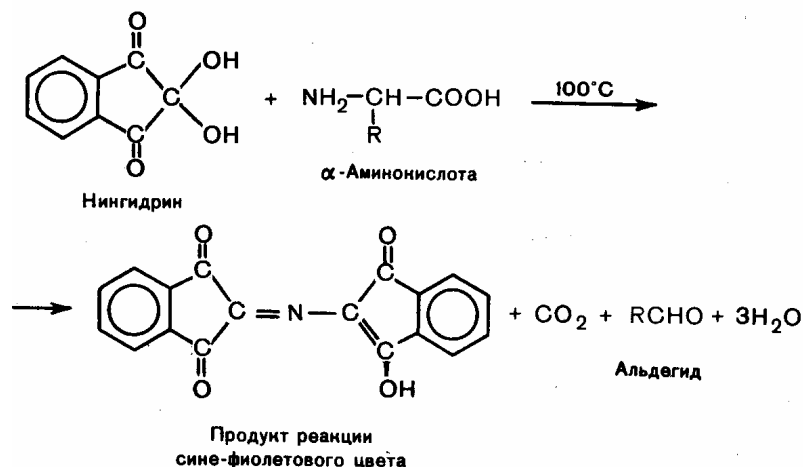
где K_b – константа диссоциации основания.

Следовательно, аминокислотная буферная система может обладать двумя областями pH с высокой буферной емкостью.

2 Качественные реакции

• Реакция с нингидрином

При нагревании аминокислот с нингидрином образуется сине-фиолетовый продукт:

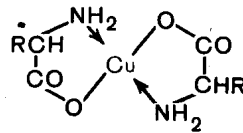


На этой реакции основано качественное и количественное определение аминокислот в лабораториях и промышленных производствах.

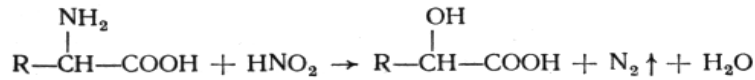
Реакция не является специфической, в нее вступают соединения (белки, аммиак), но без выделения углекислого газа.

- **Биуретовая реакция**

С катионами тяжелых металлов (солями меди) аминокислоты образуют внутрикислотные соединения. Например, со свежеприготовленным гидроксидом меди (II) в мягких условиях получают хорошо кристаллизующиеся окрашенные (синий цвет) хелатные соли меди:

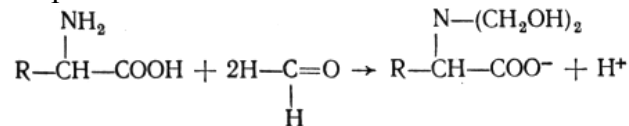


- **Аминокислоты реагируют с азотистой кислотой с выделением азота:**



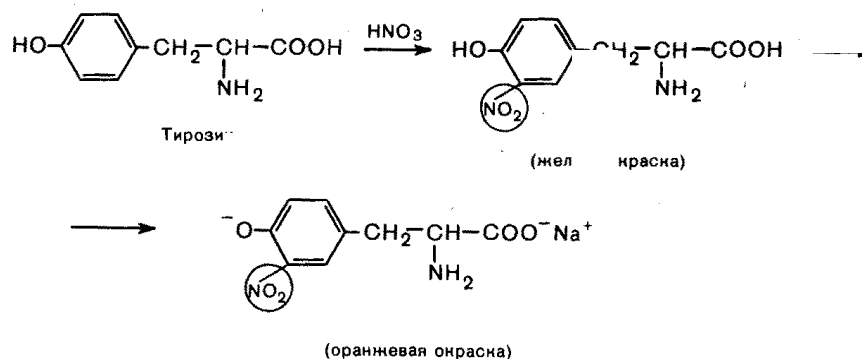
- **Формальное титрование**

Аминокислоты количественно реагируют с формальдегидом с последующим титрованием образовавшихся протонов кислоты раствором щелочи:



- **Ксантопротеиновая реакция**

Ароматические и гетероциклические аминокислоты при нагревании с концентрированной азотной кислотой образуют желтые смеси, а при добавлении раствора щелочи – оранжевые продукты:

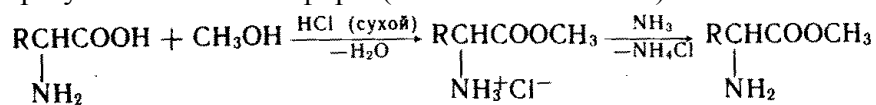


- **Реакция на отдельные аминокислоты:**

- триптофан с п-диметиламинобензальдегидом в среде концентрированной серной кислоты образует красно-фиолетовое кольцо (реакция Эрлиха)
- цистеин при нагревании с ацетатом свинца образует черный осадок

1 Образование эфиров

При этерификации соединений спиртами в присутствии кислотного катализатора (хлороводород) с хорошим выходом образуются сложные эфиры (солянокислые соли):

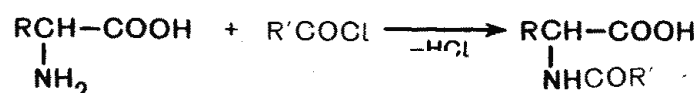


Метилловый эфир α-аминокислоты

Сложные эфиры обладают высокой летучестью и могут быть выделены в чистом виде, что позволяет разделять смесь аминокислот (эфирный метод – Э.Фишер, 1901)

2 Образование N-ацильных производных (защита аминогруппы)

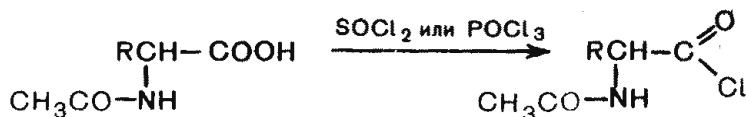
При взаимодействии с галогенангидридами или ангидридами кислот происходит замещение водорода аминогруппы на остаток кислоты.



N-ацилпроизводные легко гидролизуются с образованием исходной аминокислоты, поэтому их используют для «защиты» аминогруппы.

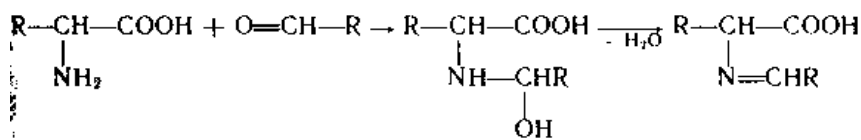
3 Образование галогенангидридов

При действии на аминокислоты (с защищенной аминогруппой) тионилхлоридом (SOCl₂) или оксид-трихлоридом фосфора POCl₃ образуются хлорангидриды:



4 Образование оснований Шиффа

При взаимодействии с альдегидами образуются замещенные имины (основания Шиффа) через стадию получения карбиноламинов:

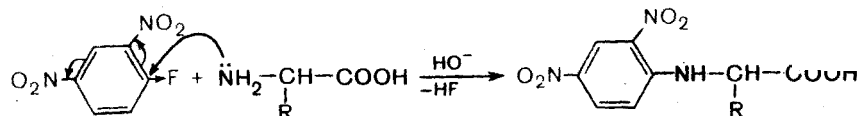


α-Аминокислота Альдегид Карбониламин Замещенный имин
(основание Шиффа)

особое значение имеет реакция взаимодействия с формальдегидом (формольное титрование).

5 Образование ДНФ-производных (реакция Сенгера)

Аминокислоты образуют с 2,4-динитрофторбензолом (ДНФ) окрашенные в желтый цвет динитрофенильные производные, растворимые в органических растворителях.

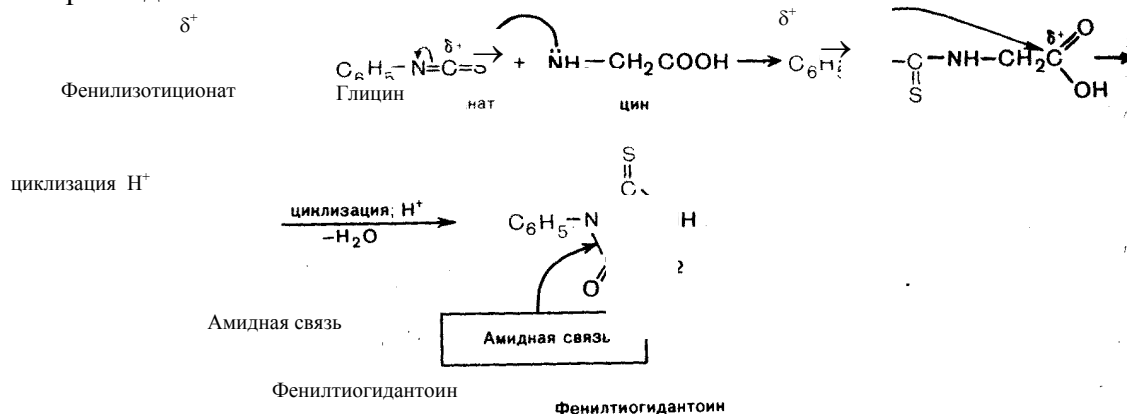


2, 4-Динитрофторбензол (ДНФБ) ДНФ-производные α-аминокислот

Реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения в бензольном кольце.

6 Образование ФТГ-производных (реакция Эдмана)

Взаимодействие аминокислот с фенилизотиоцианатом (ФТГ) протекает по механизму нуклеофильного присоединения:



Реактивы

- 1 Спирт для спиртовки
- 2 Соляная кислота (1:1)
- 3 Азотная кислота (конц.)
- 4 Серная кислота (конц.)
- 5 Уксусная кислота
- 6 Сульфат меди (р-.)
- 7 Ninhидрин

- 8 Вода дистиллированная
- 9 Гидроксид натрия (раствор)
- 10 Гидрокарбонат натрия (раствор)
- 11 Водный раствор нитрата серебра
- 12 Ацетат свинца (капельница)
- 13 ПДАБ (спирт. р-р)
- 14 Исследуемое вещество (глицин, аланин)

Посуда и приборы	
1	Пробирки
2	Спиртовка
3	Пипетка
4	Капельницы
5	Держатель
6	Фильтровальная бумага
7	Водяная баня
8	Индикаторная бумага
9	Штатив

Экспериментальная часть

Опыт 1 Физическо-химические свойства аминокислот

а) Укажите агрегатное состояние, внешний вид аминокислоты.

б) Растворимость в воде, органических растворителях.

В пробирку поместите 1 г аминокислоты и прилейте 1...3 мл воды (органического растворителя – этилового спирта, ацетона, петролейного эфира). Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Для водного раствора укажите рН среды (универсальная индикаторная бумага).

в) Отношение к кислотам и щелочам

В две пробирки поместите по 1 г аминокислоты и прилейте по 1...3 мл разбавленных соляной и уксусной кислот. Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Отметьте изменения.

В пробирку поместите 1 г аминокислоты и прилейте 1...3 мл разбавленного раствора гидроксида натрия. Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Укажите изменения.

г) Отношение к нагреванию.

В сухую пробирку поместите 0,5 г аминокислоты и осторожно нагревайте на пламени спиртовки. Укажите изменения.

Результаты оформите в виде таблицы.

Аминокис- лота	Внешний вид	Раствори- мость в во- де, рН	Раствори- мость в ор- ганических растворите- лях	Отношение к кислоте	Отношение к щелочи	Отношение к нагрева- нию	Примеча- ние

Опыт 2 Химические свойства аминокислот

а) К 1 мл раствора аминокислоты прилейте 3–4 капли раствора ацетата свинца. Аналитический эффект:

б) К 1 мл раствора аминокислоты прилейте 3–4 капли раствора нитрата серебра. Аналитический эффект:

в) К 1 мл раствора аминокислоты прилейте 3–4 капли раствора сульфата меди, а затем избыток раствора. Аналитический эффект:

Опыт 3 Качественные реакции

Биуретовая реакция

К 1 см³ раствора аминокислоты добавьте 1 см³ раствора едкого натра, затем по каплям добавляйте раствор сернокислой меди.

Аналитический эффект: раствор приобретает фиолетовый цвет.

Нингидриновая реакция

К 3 см³ раствора аминокислоты добавьте 1 см³ свежеприготовленного 0,1 % раствора нингидрина. Смесь нагрейте до кипения.

Аналитический эффект – раствор приобретает синюю окраску.

Ксантопротеиновая реакция

К 3 см³ раствора аминокислоты осторожно добавьте 1 см³ азотной кислоты (конц.). Затем нагрейте до кипения. После охлаждения добавьте по каплям концентрированной раствор щелочи.

Аналитический эффект: образование оранжево-красного окрашивания.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и приведите классификацию аминокислот.
- 3 Перечислите протеиногенные аминокислоты.
- 4 Сформулируйте правила образования названия аминокислот.
- 5 Перечислите качественные реакции на аминокислоты (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 6 Укажите реакции аминокислот по карбоксильной группе, напишите уравнения реакций.
- 7 Укажите реакции аминокислот по аминогруппе, напишите уравнения реакций.
- 8 Какие элементы можно обнаружить в составе аминокислот?
- 9 Предложите схему синтеза аланина из этилового спирта. Для аминокислоты напишите уравнения реакций взаимодействия с гидроксидом натрия и соляной кислотой.
- 10 Сколько мл раствора NaOH (10 %, ρ = 1,1 г/мл) потребуется для нейтрализации карбоксильной группы аминокислоты (глицина), полученной из 3,2 г карбида кальция?

Лабораторная работа 2

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БЕЛКОВ

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки;
- 2 закрепить представления о структурах белковых молекул;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Реактивы	
1	Спиртовой раствор α-нафтола
2	Этанол
3	Водный раствор белка 1 %
4	3 % раствор яичного белка в 1 % растворе NaCl
5	Серная кислота (конц.)
6	Соляная кислота
7	Раствор CH ₃ COOH (1 %)
8	Раствор CH ₃ COOH (10 %)
9	Азотная кислота (конц.)
10	Раствор NaOH (10 %)
11	Раствор сульфата меди(10 %)
12	Раствор йода в KI
13	Раствор нитрата серебра
14	Раствор CuSO ₄ (0,1 %)

15	Раствор едкого натра (конц.)	
16	Раствор Pb (CH ₃ COO) ₂	
17	Раствор NaNO ₂	
18	Раствор нингидрина (0,1 %)	
19	Резорцин	
20	Раствор сахарозы (10 %)	
21	Раствор формальдегида	
22	Раствор NaCl (3 %)	
23	NaCl (тв.)	
24	Раствор (NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ.)	
25	(NH ₄) ₂ SO ₄ (тв.)	
26	Раствор фенола (5 %)	
27	Мочевина (тв.)	
28	Сульфосалициловая кислота (20 % водный раствор)	
29	Трихлоруксусная кислота (10 % водный раствор)	
30	Лакмус	
31	Универсальная индикаторная бумага	

Посуда и приборы

1	Пробирка	
2	Капельница	
3	Держатель	
4	Спиртовка	
5	Водяная баня	
6	Кристаллизатор со льдом	
7	Стеклянная палочка	
8	Микрошпатель	
9	Часовое стекло	

Пептиды и белки представляют собой соединения, построенные из остатков α-аминокислот. Условно считают, что пептиды содержат в молекуле до 100 (соответствует молекулярной массе 10 000), а белки свыше 100 аминокислотных остатков (молекулярная масса от 10 000 до нескольких миллионов).

Пептиды классифицируют на:

- дипептиды, трипептиды – 2 или 3 аминокислотных остатка;
- олигопептиды (низкомолекулярные) содержат до 10 аминокислотных остатков;
- полипептиды.

Белки – это высокомолекулярные соединения, образующие при гидролизе α-аминокислоты.

Иногда их называют *протеинами* (от греч. *protos* – первый, важнейший). Для живых существ белки являются основными компонентами и по содержанию и по значению. В организме у животных их содержится до 40...50 % и более на сухую массу, а у растений – до 20...35 %.

Белки как основа всего живого были издавна в центре внимания естественных наук. Более чем двухсотлетняя история химии белка наполнена непрерывным совершенствованием экспериментальных методов и богата различными идеями.

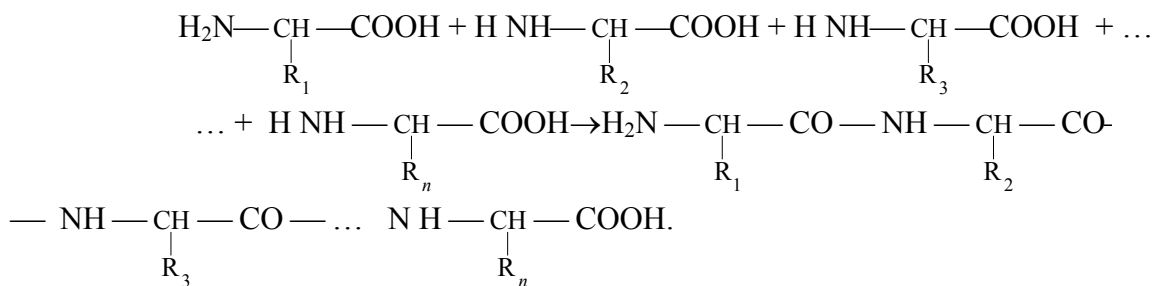
Среди ученых многих стран, внесших большой вклад в изучение белков, следует отметить Э. Фишера, Т. Курциуса, М. Бергмана, Ф. Сенгера, П. Эдмана и наших соотечественников А.Я. Данилевского, Н.Д. Зелинского, В.С. Садикова, Д.Л. Талмуда и др.

В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении структур белка, их функций, механизма участия в процессе метаболизма, понимании молекулярных основ патогенеза многих болезней.

Белки – сложные высокомолекулярные соединения, построенные из остатков α-аминокислот, соединенных пептидными связями.

Пептидную молекулу формально можно представить как продукт поликонденсации α-аминокислот, протекающий с образованием *пептидной (амидной)* связи между мономерными звеньями:





Элементный состав белков колеблется в пределах: С – 50...52 %, Н – 6,8...7,7 %; О – 19...24 %; N – 15...18 %; S – 0,5 ...2 %.

Первичная структура белков определяется последовательностью аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Первичная структура характеризует состав полипептидной цепи, количество аминокислотных остатков, связанных пептидными связями, порядок чередования этих остатков.

Вторичная структура – это упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи без учета типа и конформации боковых радикалов аминокислот. Стабилизация вторичной структуры происходит водородными связями. Атом кислорода каждой пептидной группы образует водородную связь с NH-группой. При этом формируются структуры: α-спираль, β-структура, β-изгиб. Часть полипептидной цепи не имеет упорядоченного строения, такие участки называют *аморфными* или *бесструктурными* областями.

Третичная структура характеризует пространственное расположение упорядоченных и аморфных участков полипептидной цепи, которое достигается за счет взаимодействия боковых радикалов и зависит от их типа и конформации.

Четвертичная структура характерная для белков, молекула которых состоит из двух или более полипептидных цепей, связанных нековалентно.

Под четвертичной структурой понимают способ взаимного расположения в пространстве отдельных полипептидных цепей в молекуле и характер связи между ними. Белки, обладающие четвертичной структурой, называют *олигомерными*.

Каждая отдельная полипептидная цепь в таком белке называется *протомером* или *субъединицей*.

Классификация белков

I По строению:

- 1 Простые (*протеины*) состоят только из остатков аминокислот.
- 2 Сложные (*протеиды*) при гидролизе образуют аминокислоты и другие соединения:
 - а) нуклеопротеиды: белок + нуклеиновая кислота, растворимы в щелочах, не растворимы в кислотах;
 - б) фосфопротеиды: белок + остаток фосфорной кислоты. Денатурируют при действии кислот (казеин молока);
 - в) гликопротеиды: белок + углевод. Не растворимы в воде, растворимы в щелочах, нейтральны (слизь);
 - г) хромопротеиды: белок + красящее вещество (гемоглобин).

II По растворимости

- 1 Склеропротеины – не растворимы в воде.
- 2 Альбумины – растворимы в воде.
- 3 Глобулины – растворимы в растворах солей.
- 4 Глутемины – растворимы в кислотах и щелочах.
- 5 Глиадины – растворимы в 70 %-ном этаноле.
- 6 Гистоны и протамины – растворимы в щелочах.

III По форме

- 1 Глобулярные имеют сложную конформацию: полипептидные цепи свернуты в компактные глобулы.
- 2 Фибриллярные имеют вытянутую, нитевидную форму и состоят из нескольких полипептидных цепей.

Функции белков

1 Структурные (коллаген, фиброин, кератин и т.п.).

Входят в состав мембран клеток и отличаются высокой гидрофобностью. Составляют остов многих тканей и органов, определяют их механические свойства: *коллаген* соединительных тканей, костей, суставов; эластин связок, *α-кератин* кожи, волос, ногтей, рогов, перьев, *склеротин* – наружного скелета насекомых, *фиброин* шелка. К этой группе можно отнести белковые вещества клеточных стенок бактерий, оболочек вирусов, мембранные и рибосомальные белки.

2 Двигательные (сократительные – актин, миозин).

Наиболее известны белки сократительного аппарата мышц – *актин* и *миозин*. Их разновидностью является *тубулин*, входящий в состав микротрубочек, обеспечивающих перемещение ресничек и жгутиков клеток.

3 Каталитические (ферментативные – *энзимы*).

Ежесекундно в клетке протекает множество ферментативных реакций. В настоящее время выделено около 2000 ферментов клетки. Особое значение имеют РНК- и ДНК-*полимеразы*, *липазы* и т.п. Ферменты могут быть построены из одной полипептидной цепи, нескольких цепей или даже образовывать комплексы. Ферменты увеличивают скорость реакции в миллионы и миллиарды раз. Например, уреазы при pH 8,0 и 20 °C ускоряет гидролиз мочевины в 10^{14} раз.

4 Транспортные (гемоглобин, миоглобин, цитохром и др.).

Ряд белков выполняет функции переноса веществ из одного компартмента клетки в другой или между органами целого организма. Например, гемоглобин переносит кислород от легких к тканям, а углекислый газ от тканей к легким. В крови локализованы специальные транспортные белки – *альбумины*, переносящие различные экзогенные и эндогенные вещества. Имеются также специальные белки – *пермеазы*, переносящие различные вещества через биологические мембраны.

5 Регуляторные (гормоны-гистоны, репрессоры).

В организме существует специальный класс белков, выполняющих регуляторные функции. В первую очередь к ним относятся *гормоны* белково-пептидной природы. Эти белки играют основную роль в регуляции клеточной и физиологической активности. Например, гормон *инсулин* регулируют потребление клетками глюкозы, *кальцитонин* – содержание кальция в крови и костной ткани и т.п.

6 Защитные (антитела и иммуноглобулины).

Защитные белки включают вещества, которые помогают организму преодолевать патологические состояния или бороться с возбудителями заболеваний. Антитела и иммуноглобулины синтезируются в костном мозге и предохраняют организм от чужеродных бактерий. Они обладают уникальным свойством распознавать чужеродные бактерии, вирусы и белки, связываться с ними и нейтрализовать. Сюда относятся антигены тканевой совместимости, противовирусные реагенты – *интерферон*, факторы некроза опухолей, а также *фибриноген*, *тромбин* и *фибрин*, предохраняющие организм от потери крови (обеспечивают свертываемость).

7 Рецепторные (родопсин, холинорецептор и т.п.).

Играют важную роль при передаче нервного или гормонального сигнала в клетку или ее некоторые компартменты. Рецепторы локализованы в мембранах, и механизмы передачи информации связаны в основном с изменениями конформации белка, поглощением или выделением энергии и т.п.

8 Запасные и питательные (казин молока, яичный альбумин и т.п.).

Ряд белков используется клетками в качестве резервного, питательного материала. К ним относятся *проламины* и *глутелины* – белки растений, преимущественно зерновых, *овальбумин* – питательный белок птичьих яиц.

9 Токсические (токсины ботулинический, дифтерийный).

Представлены ядами змей, скорпионов, пчел. Они характеризуются относительно низкой молярной массой. Токсины растений и микроорганизмов – дифтерийный и холерный токсины, *рицин*, *абрин* и т.п.

10 Антибиотики (актиноксантин, неокарциностагин и т.п.)

Свойства белков

Устойчивость белков в биологических жидкостях организма человека обуславливают два фактора: заряд и водная оболочка – для гидрофильных белков и только заряд – для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется *нативной конформацией белка*.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению лучей при 280 нанометрах (10^{-9} м). *Онкотическое давление крови обусловлено присутствием белков и равно 0,02...0,04 атм, т.е. 30 мм рт.ст.*

Онкотическое давление определяет распределение воды и минеральных веществ между кровью и тканями.

Белки как и аминокислоты амфотерны. Благодаря наличию свободных amino- и карбоксильных групп. В зависимости от содержания функциональных групп они имеют различных заряд в растворах, перемещаясь к катоду или аноду. На этом основана их очистка методом *электрофореза*.

Молекулы белков не в состоянии проходить через полупроницаемые искусственные мембраны (пергамент, коллодий, целлофан), а также через биомембраны.

Белки относят к высокомолекулярным соединениям, их молекулярная масса колеблется от 6000 (нижний предел) до 1 000 000 и выше.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

Денатурация – изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т.д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии возможен возврат биологической активности, т.е. *ренатурация белка* с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Область рН, в которой белки являются электронейтральными, называется *изоэлектрической точкой*. Изоэлектрическая точка большинства белков лежит в пределах 5,5...7,0. В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы и легко выпадают в осадок, обладая наименьшей растворимостью.

Устойчивость белковой молекулы определяется наличием зарядов в полипептидной цепи, а также образованием гидратной оболочки. Отсутствие заряда и снятие гидратной оболочки приводит к сближению белковых молекул, в результате чего они слипаются, увеличиваются в размерах и выпадают в осадок под действием собственной силы тяжести. Это явление называется *коагуляцией*.

Коагуляция является обратимой, если после снятия действия реагента белок возвращается в исходное состояние. Если же изменения необратимы, то и коагуляция называется *необратимой*.

Примерами обратимой коагуляции является *высаливание*, т.е. осаждение белков растворами нейтральных солей (хлорида натрия, сульфата аммония). Такие соли нейтрализуют электрический заряд белка, разрушают его гидратную оболочку, и белок выпадает в осадок. При добавлении к такому белку воды он снова переходит в растворенное состояние. Процесс, обратный коагуляции, называется *пептизацией*.

Необратимую коагуляцию (денатурацию) вызывает температура, соли тяжелых металлов, концентрированные неорганические кислоты.

При растворении белков в воде образуются *коллоидные растворы*, которые обладают низким осмотическим давлением: они непрозрачны, способны рассеивать свет (эффект Тиндаля), опалесцировать (в проходящем свете – розовые, в отраженном – голубые).

Для белков характерен ряд цветных реакций: биуретовая, ксантопротеиновая, Сакагучи и т.п.

Экспериментальная часть

Опыт 1 Растворимость в воде, органических растворителях

В пробирку поместите 0,2 мл яичного белка и прилейте 1...3 мл воды (органического растворителя – этилового спирта, ацетона, петролейного эфира). Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Для водного раствора укажите рН среды (универсальная индикаторная бумага).

Результаты оформите в виде таблицы.

Растворитель	Вода дистилли-	Этиловый спирт	Ацетон	Этилацетат	Петролейный эфир
--------------	----------------	----------------	--------	------------	------------------

	рованная				
Растворимость					

Опыт 2 Осаждение белков при нагревании

В 5 пробирок налейте по 1 см³ раствора белка:

а) 1 пробирку нагрейте;

Аналитический эффект: помутнение раствора (опалесценция)

б) во 2 добавьте 1...2 капли 1 % раствора CH₃COOH и пробирку нагрейте;

Аналитический эффект: помутнение раствора, а затем выпадение белого осадка.

(Белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии)

в) в 3 добавьте 1...2 капли 10 % раствора CH₃COOH и пробирку нагрейте;

Аналитический эффект: осадок не образуется.

(Белок изменяет заряд на положительный).

г) в 4 добавьте 1...2 капли 10 % раствора CH₃COOH, каплю насыщенного раствора NaCl и пробирку нагрейте;

Аналитический эффект: помутнение раствора, а затем выпадение белого осадка.

(Белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии).

д) в 5 добавьте 1...2 капли 10 % раствора NaOH и пробирку нагрейте.

Аналитический эффект: осадок не образуется.

(Положительный заряд на белке усиливается).

Результаты опыта оформите в виде таблицы.

№ пробирки	Среда	Изменения	Выводы
1	Нейтральная		
2	Слабокислая (Раствор (1 %) CH ₃ COOH)		
3	Кислая (Раствор (10 %) CH ₃ COOH)		
4	Кислая (Раствор (10 %) CH ₃ COOH + NaCl)		
5	Щелочная (10 % раствор NaOH)		

Опыт 3 Осаждение белков химическими агентами.

3.1 При добавлении небольших количеств солей тяжелых металлов к раствору белка наблюдается осаждение белков, связанное с образованием комплексных соединений. В избытке соли в силу адсорбции металлов и появлению заряда белка осадок растворяется. Это явление называется *адсорбционной пептизацией*.

а) к раствору белка добавьте 2...3 капли раствора нитрата серебра;

Аналитический эффект: выпадение осадка.

б) к 1 см³ раствора белка добавьте 3 капли раствора сульфата меди. Затем добавьте еще 8 капель раствора сульфата меди;

Аналитический эффект: образование осадка, который растворяется в избытке осадителя.

3.2 Минеральные кислоты вызывают дегидратацию белковых частиц и образуют комплексные соли с белками. Осадок белка растворяется в избытке кислоты, за исключением азотной кислоты. Это позволяет использовать азотную кислоту при клинических исследованиях для количественного определения белков.

а) наслаивают по стенке пробирки 10 капель азотной кислоты и 5 капель раствора белка (не перемешивать. Осторожно, кислота!)

Аналитический эффект: на границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца.

При встряхивании и добавлении избытка азотной кислоты осадок не растворяется.

б) наслаивают по стенке пробирки 10 капель серной кислоты и 5 капель раствора белка (не перемешивать. Осторожно, кислота!)

Аналитический эффект: на границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца.

При встряхивании и добавлении избытка серной кислоты осадок растворяется.

3.3 Как и неорганические, так и органические кислоты (сульфосалициловая, трихлоруксусная и др.), вызывая дегидратацию и образуя комплексные соединения, денатурируют белки.

Сульфосалициловая кислота используется для обнаружения малых количеств белков в биологических жидкостях. Она осаждает белки и пептиды.

Трихлоруксусная кислота (ТХУ) осаждает только белки и очень часто используется для отделения белков от низкомолекулярных азотсодержащих соединений (аминокислот и пептидов.)

а) в пробирку помещают 6 капель раствора белка и добавляют 2 капли раствора сульфосалициловой кислоты;

Аналитический эффект: выпадение осадка.

б) в пробирку помещают 6 капель раствора белка и добавляют 2 капли раствора трихлоруксусной кислоты.

Аналитический эффект: выпадение осадка.

3.4 Фенол и мочевины образуют комплексные соли с белками, вызывая образование осадка.

а) к 1 см³ раствора белка добавьте 3 капли водного раствора фенола;

Аналитический эффект: образование осадка.

б) к 1 см³ раствора белка добавьте несколько кристаллов мочевины;

Аналитический эффект: образование осадка.

3.5 Танин, пикриновая кислота, растворы диоксида ртути в иодиде калия, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты взаимодействуют с группой веществ, содержащих пиррольные, индольные, имидазольные гетероциклы, несущие положительный заряд в слабокислой среде. Наличие подобных группировок в белках приводит к образованию осадков, при этом растворы надо подкислить. Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

а) в пробирку поместите 5 капель раствора белка и прибавьте 1...2 капли раствора танина и 1...2 капли уксусной кислоты (1 %);

Аналитический эффект: образование серого осадка.

Опыт 4 *Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания (3 % раствор яичного белка в 1 % растворе NaCl).*

4.1 К 1 мл яичного белка прилейте 9 мл дистиллированной воды.

Аналитический эффект: помутнение раствора (выпадение глобулинов).

4.2 а) к 1 мл яичного белка добавьте поваренную соль до насыщения (пока соль перестанет растворяться).

Аналитический эффект: выпадение белого аморфного осадка глобулинов.

б) через 10 минут (время полного осаждения осадка) осадок отфильтруйте. Пробирку с фильтратом прокипятите.

Аналитический эффект: выпадение яичного альбумина.

4.3 а) к 1 мл яичного белка добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония.

Аналитический эффект: образование осадка глобулинов.

б) Осадок отфильтруйте и к фильтрату добавьте порошок сульфата аммония до насыщения.

Аналитический эффект: образование пены (яичный альбумин).

Результаты опыта запишите в виде таблицы

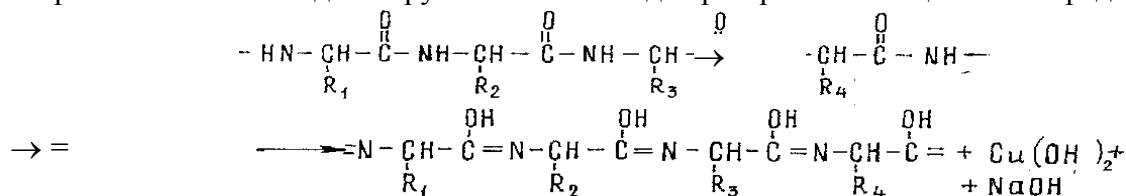
Название белка	Растворимость		
	Вода	Раствор NaCl	Раствор (NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ.)
Глобулин			
альбумин			

Опыт 5 *Биуретовая реакция.*

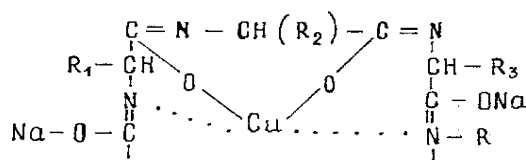
К 1 см³ раствора белка добавьте 1 см³ раствора едкого натра, затем по каплям добавляйте раствор сернистой меди.

Аналитический эффект – раствор приобретает фиолетовый цвет.

Первоначально пептидные группы полипептида претерпевают в щелочной среде енолизацию.



Енольная форма полипептида взаимодействует с гидроксидом меди и образует окрашенный в сине-фиолетовый цвет комплекс. Биуретовая реакция обусловлена наличием пептидной связи, которая образует в щелочной среде с солями меди комплексную соль

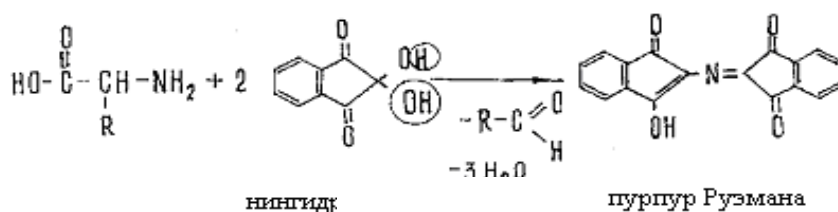


биуретовый комплекс

Опыт 6 Нингидриновая реакция.

К 3 см³ раствора белка добавьте 1 см³ свежеприготовленного 0,1% раствора нингидрина. Смесь нагрейте до кипения.

Аналитический эффект: раствор приобретает синюю окраску. Эта реакция обусловлена наличием в составе белка аминокислоты, содержащей аминогруппу, которая реагирует с нингидрином по уравнению:

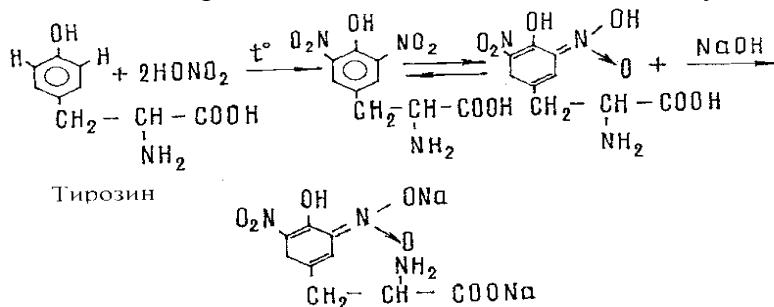


Опыт 7 Ксантопротеиновая реакция.

К 3 см³ раствора белка осторожно добавьте 1 см³ азотной кислоты (конц.). Затем нагрейте до кипения. После охлаждения добавьте по каплям концентрированный раствор щелочи.

Аналитический эффект: образование оранжево-красного окрашивания. Ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан, фенилаланин) под действием азотной кислоты нитруются с образованием желтого нитросоединения.

Реакция обусловлена образованием солей таутомерных ациформ нитроединений, образующихся после нитрования азотной кислотой ароматических аминокислот с последующей обработкой щелочью.



Натриевая соль динитротирозина

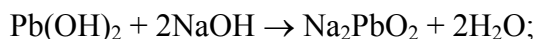
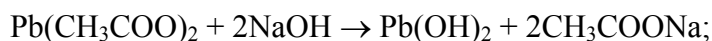
Опыт 8 Реакция с 5-оксиметилфурфуролом.

К 1 см³ раствора белка прилейте 5 капель раствора сахарозы и осторожно добавьте 5 капель концентрированной серной кислоты.

Аналитический эффект: на границе двух слоев жидкостей появляется вишнево-красное окрашивание. Окраска появляется вследствие реакции триптофана с оксиметилфурфуролом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на сахарозу.

Опыт 9 Реакция на серосодержащие аминокислоты.

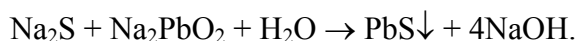
3 см³ раствора белка прокипятите с 6 см³ раствора едкого натра (обратите внимание на выделение аммиака). К 1 см³ раствора ацетата свинца прилейте раствор едкого натра до полного растворения выпавшего осадка. При этом образуется пломбит натрия:



пломбит натрия



(S-содержащая аминокислота)



Опыт 10 Реакция Вуазене.

В пробирку внесите 2 см³ раствора яичного белка и 1 каплю раствора формальдегида. К полученной смеси при охлаждении (лед) добавьте по каплям 6 см³ серной кислоты (конц.). Через 10 мин внесите 10 капель раствора нитрита натрия.

Аналитический эффект: сине-фиолетовый цвет раствора.

Содержащийся в яичном белке триптофан, конденсируясь с формальдегидом, образует окрашенный продукт конденсации бис-2-трипто-фанилметан (I), который окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола (II), образующего в кислой среде соль, окрашенную в фиолетовый цвет.

Опыт 11 Выделение казеина из молока.

В молоке содержится специфический белок казеин, содержащий фосфор. Содержание этого белка в молоке составляет 80 % от общего числа белков. Казеин обладает кислотными свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении белок выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются при фильтровании.

Ход работы

1. В стакан емкостью 50 мл приливают 3 мл молока, добавляют 7 мл дистиллированной воды и при интенсивном перемешивании вносят по каплям 1 % раствор соляной кислоты (10...15 капель) до появления рыхлого осадка. Выдерживают смесь 5 мин, затем приливают 10 мл дистиллированной воды и выдерживают еще 5 мин. Жидкость над осадком осторожно сливают и вновь приливают 10 мл дистиллированной воды. Через 5 мин фильтруют смесь через бумажный фильтр.

2. Небольшое количество осадка с фильтра переносят в колбу, приливают 6 мл 10 % раствора гидроксида натрия и кипятят на песчаной бане 1 час. Затем колбу охлаждают, приливают по каплям азотную кислоту (20...30 капель) до кислой реакции. При этом образуется осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белка. Смесь фильтруют.

3. Фильтрат делят на 4 части: 1 – приливают раствор гидроксида натрия и 2–3 капли сульфата меди (биуретовая реакция); 2 – приливают 3–4 капли пломбита натрия (см. опыт 9), 3 – 5 капель раствора

нингидрина, 4 – 10 капель молибденовой жидкости и нагревают на спиртовке (для обнаружения фосфора в составе казеина). Полученные данные оформляют в виде таблицы.

Реагент	Биуретовая реакция	Плюмбит натрия	Раствор нингидрина	Молибденовая жидкость
Аналитический эффект				

Выводы: кратко описывают условия выделения казеина и результаты качественных реакций продуктов гидролиза.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Укажите элементный состав белков и пептидов.
- 3 Охарактеризуйте свойства пептидов.
- 4 Белки как природные полипептиды.
- 5 Функции белков.
- 6 Классификация белков.
- 7 Структуры белка.
- 8 Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.
- 9 Растворимость белков.
- 10 Отношение белков к нагреванию в нейтральной, кислой и щелочных средах.
- 11 Качественные реакции на белки (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 12 Укажите общие цветные реакции на белки и аминокислоты
- 13 Укажите условия выделения казеина из молока.
- 14 Какой состав имеют продукты гидролиза казеина?

Лабораторная работа 3

УГЛЕВОДЫ

Цель работы:

1. ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы;
2. закрепить представления об особенностях строения молекул углеводов;
3. выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
4. ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
5. привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

К природным высокомолекулярным соединениям относятся углеводы, белки, нуклеиновые кислоты.

Углеводы (сахара) – обширная группа природных органических соединений, химическая структура которых часто отвечает общей формуле $C_m(H_2O)_n$, т.е. углерод + вода.

Используемый термин возник более 100 лет назад, когда так называли природные соединения, отвечающие формуле $(CH_2O)_n$, т.е. гидраты углерода. Основоположником учения о химии углеводов является немецкий ученый Э.Фишер, первым установивший во второй половине XIX в. структуру нескольких сахаров. Большой вклад в развитии химии углеводов внесли отечественные ученые А.М. Бутлеров, А.А. Колли, Н.Н. Кочетков и др.

Углеводы включают соединения, начиная с низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких миллионов.

Функции углеводов

В биосфере углеводов больше, чем других органических соединений вместе взятых. В растительном мире на их долю приходится 80...90 % в расчете на сухое вещество, в животном мире около 2 %. Однако значение углеводов велико для всех живых организмов. Функции углеводов разнообразны и важны.

Энергетическая функция. При окислении в процессе дыхания углеводы выделяют заключенную в них энергию и обеспечивают значительные потребности организма. При окислении 1 г углеводов выделяется ~16,9 кДж энергии.

Пластическая функция. Углеводы (углерод) используются при синтезе нуклеиновых кислот, аминокислот, белков и т.п.

Защитная функция. Углеводы – основные компоненты оболочек растительных тканей, участвуют в построении наружного скелета насекомых и ракообразных, в образовании клеточных мембран и т.п.

Опорная функция. Целлюлоза и другие полисахариды оболочек растительных клеток образуют прочный остов растения, его механические и опорные ткани. В комплексе с белками входят в состав хрящевых тканей, выполняющих опорные функции у человека и животных.

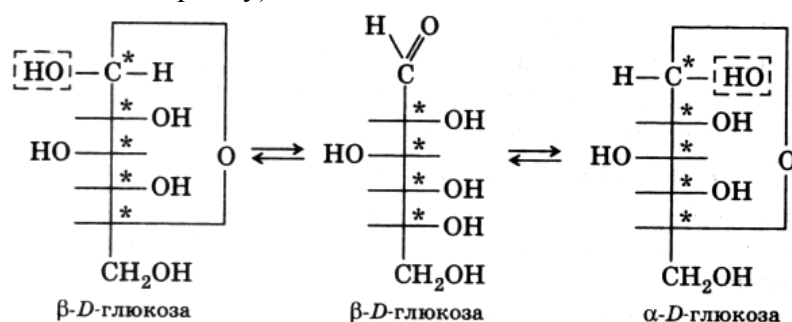
Регуляторная функция. Клетчатка, вызывая механическое раздражение стенок кишечника, способствует его перистальтике и улучшает пищеварение. Моносахариды играют существенную роль в регуляции осмотических процессов.

Моносахариды

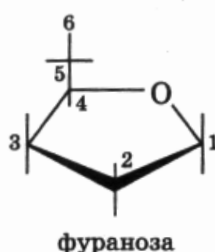
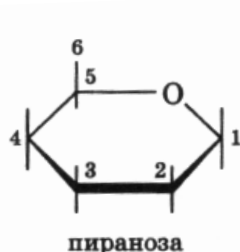
Моносахариды (монозы, простые сахара) содержат только одну структурную единицу и гидролизу не подвергаются.

По химическому строению моносахариды можно отнести к альдегидо- или кетоспиртам. Это твердые вещества, легко растворимые в воде и плохо растворимые в этиловом спирте и петролейном эфире. Водные растворы большинства моноз имеют нейтральный характер. Большинство из них обладает сладким вкусом. В свободном виде в природе встречается глюкоза, меньше фруктоза. Глюкоза является структурной единицей большинства углеводов.

Монозы могут существовать в открытой и циклической формах. Циклизация моноз происходит за счет пятого или четвертого атомов углерода: водород гидроксильной группы присоединяется к кислороду карбонильной группы, образуя новую функциональную группу – *гликозидный* (полуацетальный) гидроксил (в формулах обведен в рамку):



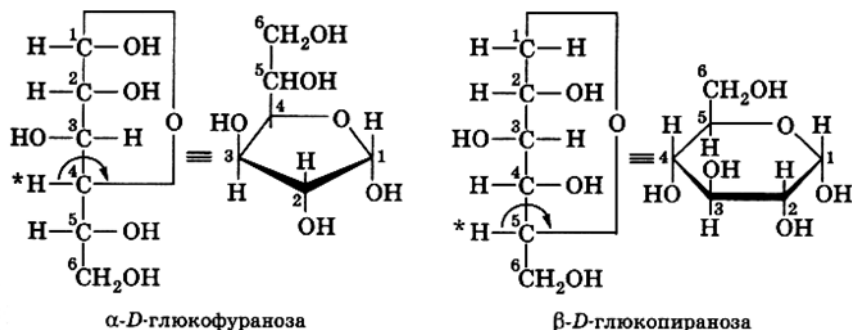
Оставшийся атом кислорода соединяется с атомом углерода альдегидной группы и входит в образующийся цикл: *пиранозный* (шестичленный) или *фуранозный* (пятичленный).



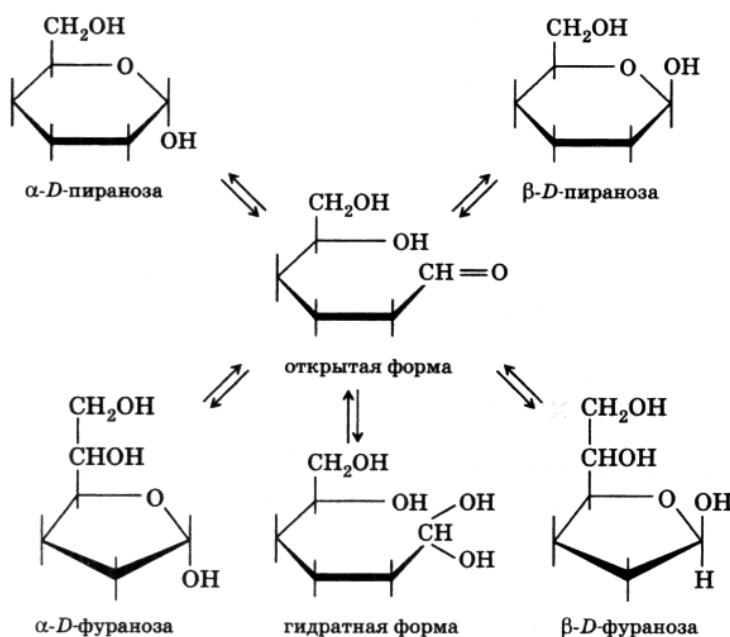
Образовавшиеся соединения относятся к циклическим полуацеталам. Та циклическая форма, у которой полуацетальный гидроксил расположен по одну сторону с гидроксильной группой, определяющей принад-

лежность к D или L-ряду, называется α -формой, если гидроксил находится в транс-положении к указанной группе, то такая форма называется β -формой.

Для написания формул моноз часто пользуются *формулами Хеуорса*. Атом кислорода всегда располагается в правом верхнем углу. Углеродные атомы нумеруются, как показано на рисунке. Через них проводят вертикальные линии, на концах которых пишут функциональные группы: группы, расположенные слева размещают над плоскостью кольца, а группы, расположенные справа – под плоскостью кольца:



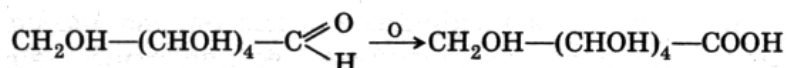
В кристаллическом состоянии и монозы имеют циклическое строение, а в растворе под влиянием растворителя могут переходить в открытую форму. В растворе таутомерия происходит непрерывно и сохраняется подвижное равновесие.



Химические свойства моноз

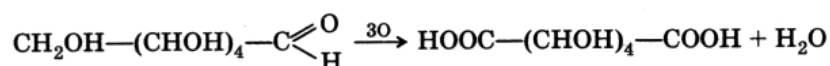
1 Реакции окисления.

При осторожном окислении (взаимодействие с бромной водой) альдоз образуются *альдоновые кислоты*:



При окислении глюкозы образуется глюконовая кислота.

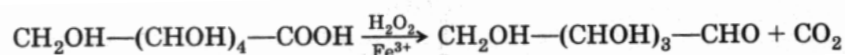
При действии более сильных окислителей (концентрированной азотной кислоты) образуются двухосновные оксикислоты (*сахарные*) кислоты:



Из глюкозы образуется глюкаровая кислота.

2 Реакции восстановления.

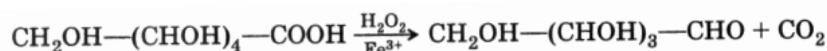
При восстановлении моносахариды переходят в многоатомные спирты:



При восстановлении D-глюкозы образуется D-сорбит.

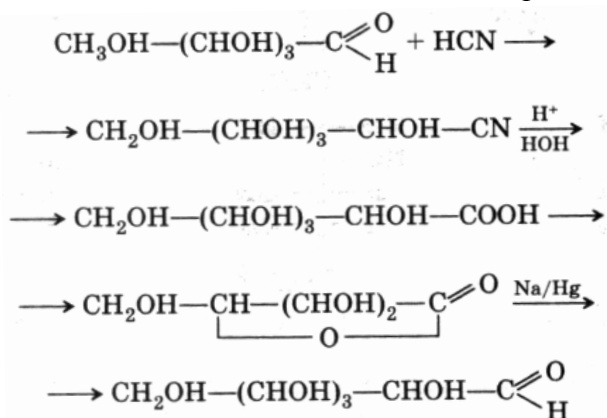
3 Укорачивание цепи альдоз.

При окислении кальциевой соли альдоновой кислоты пероксидом водорода в присутствии солей Fe^{3+} образуется альдоза с более короткой (на 1 атом C) углеродной цепью:



4 Увеличение цепи.

Реакция происходит при взаимодействии с синильной кислотой с последующим гидролизом оксинитрила до карбоновой кислоты, ее восстановления амальгамой натрия до альдегида:

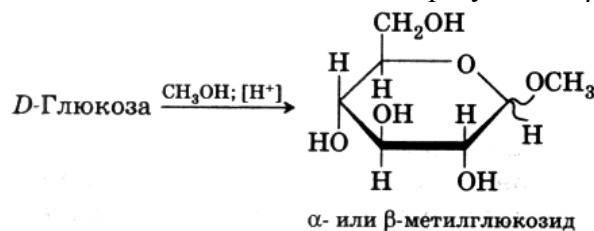


5 Образование производных.

Образование гликозидов

Исключительно важное значение имеет реакция образования производных по гликозидной гидроксильной группе.

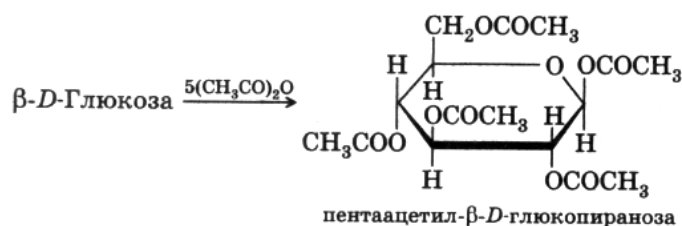
Например, при взаимодействии с метанолом глюкоза образует α - и β -D-глюкопиранозиды:



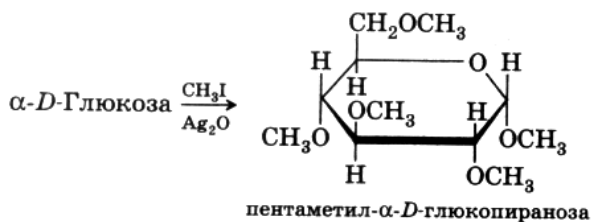
Волнистая линия в формуле указывает на то, что взаимное расположение заместителей в пространстве не определено.

Действие ацилирующих агентов

При действии на монозы или сахараты ацилирующих агентов (ангидридов, хлорангидридов карбоновых кислот) образуются сложные эфиры циклических форм моноз:

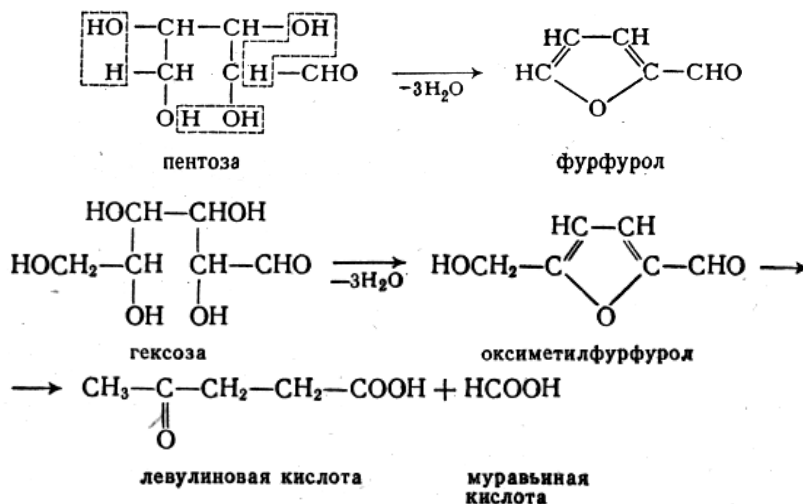


При действии алкилирующих агентов (спиртов в присутствии хлороводорода или оксида серебра) образуются соединения по типу простых эфиров:



Действие кислот

Отношение пентоз и гексоз к кислотам различное. При нагревании с минеральными кислотами пентозы образуют *фурфурол* с отщеплением воды:



Олигосахариды

Олигосахариды классифицируют:

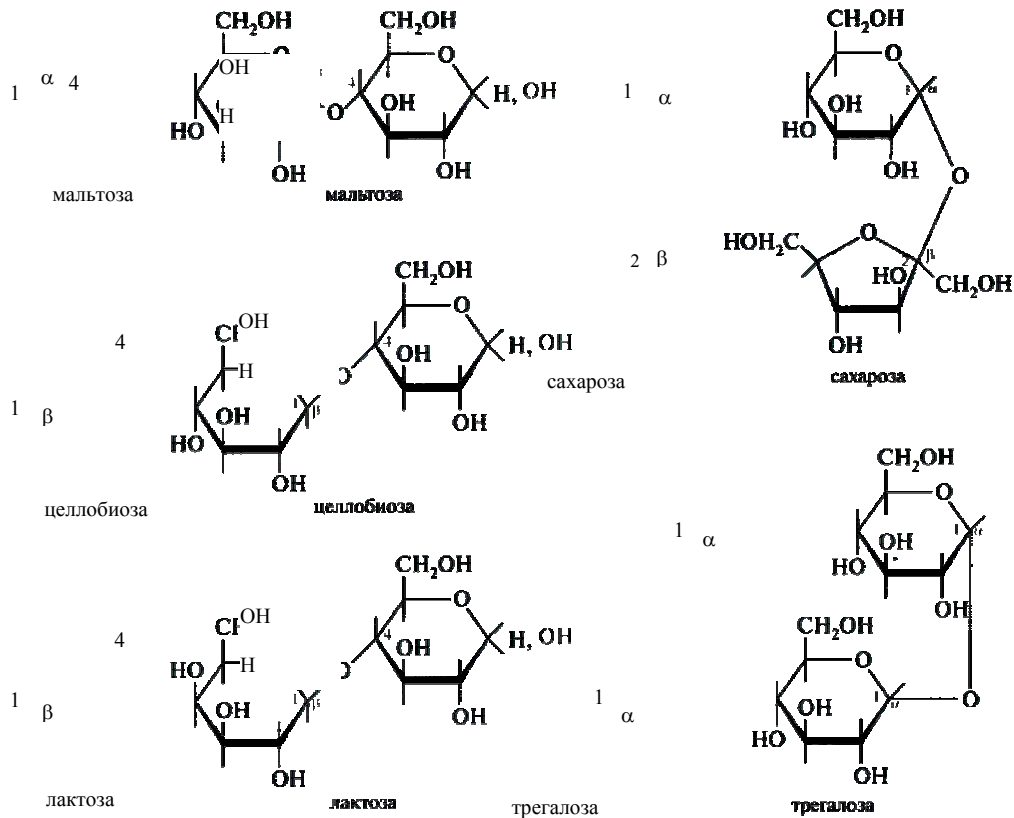
- 1 по числу остатков моноз: дисахариды, трисахариды и т.п.;
- 2 по составу моносахаридных остатков:
 - а) гомоолигосахариды состоят из остатков одного вида моноз;
 - б) гетероолигосахариды содержат остатки разных моноз
- 3 в зависимости от порядка соединения мономеров:
 - а) линейные
 - б) разветвленные
- 4 по восстановительной способности:
 - а) восстанавливающие: связь между остатками моноз осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксильных, т.е. в молекуле содержится полуацетальные гидроксильные, которые могут переходить в альдегидную форму и проявлять восстановительные свойства;
 - б) невосстанавливающие: связь между остатками моноз осуществляется только за счет полуацетальных гидроксильных, не способных переходить в альдегидную форму.

Наиболее широко распространены дисахариды: обычный свекловичный или тростниковый сахар – *сахароза*, солодовый сахар – *мальтоза*, молочный сахар – *лактоза* и *целлобиоза* (получается при неполном гидролизе крахмала).

Формулы наиболее распространенных дисахаридов:

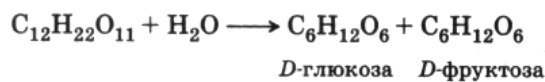
Восстанавливающие дисахариды

Невосстанавливающие дисахариды



Все перечисленные дисахариды имеют общую формулу $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Состав дисахаридов можно определить по продуктам гидролиза: сахароза состоит из остатков D-глюкозы и D-фруктозы:



Подобный процесс протекает в организме под влиянием фермента *сахаразы*, монозы легко проникают в кровотоки.

Полисахариды (гликаны)

Основная масса природных углеводов существует в виде полисахаридов.

По функциональному значению можно выделить две группы:

- 1) выполняют структурную функцию (целлюлоза);
- 2) функции питания (гликоген) и выполняют роль депо питательных веществ.

По строению полисахариды подразделяют:

- *гомополисахариды* состоят из одинаковых фрагментов моноз (крахмал);
- *гетерополисахариды* состоят из разных фрагментов моноз (гиалуроновая кислота содержит остатки аминсахаров и гексуроновых кислот).

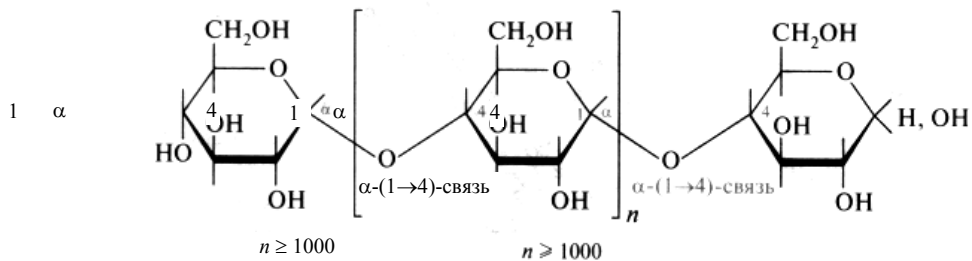
Названия гомополисахаридов образуются из названий моноз с заменой суффикса *оза* на суффикс *-ан* (глюкан, маннан, арабан и т.п.).

Разветвленный гетерополисахарид, в основной цепи которого содержатся остатки глюкозы, а в боковой – остатки маннозы, называют *манноглюканом*, а в случае обратного строения – *глюкоманнаном*.

Резервные полисахариды

Крахмал ($C_6H_{10}O_5$)_n представляет собой смесь *амилозы* и *амилопектина*.

Амилоза – линейный полимер с α (1→4) гликозидными связями между остатками D-глюкопиранозы:



Амилоза имеет кристаллическое строение, может быть получена при обработке нативного крахмала горячей водой. При этом амилоза переходит в раствор, а амилопектин не растворяется. Образует с иодом синее окрашивание. Легко гидролизуется до глюкозы и мальтозы.

Амилопектин имеет сильно разветвленные цепи, содержащие около 4000 остатков глюкозы и 0,4 % фосфорной кислоты. Остатки глюкозы связаны 1-4 и 1-6-гликозидными связями:



С иодом образует фиолетовое окрашивание. Не восстанавливает оксиды металлов.

Гликоген

Животные запасают глюкозу в виде животного крахмала гликогена, откладывающегося в основном в печени и мышцах. Его молекулы сильно разветвлены и молекулярная масса достигает от 10^2 до 10^5 kDa.



а)

б)

в)

● – Глюкозные остатки, соединенные α -1,6-связями;

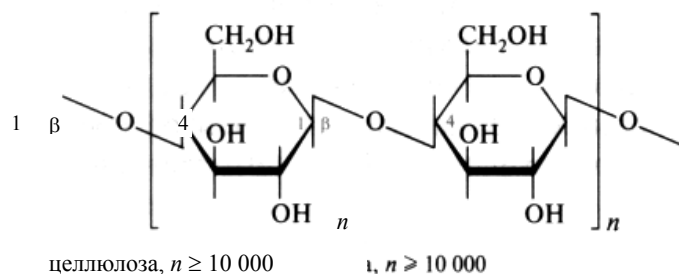
○ – Глюкозные остатки, соединенные α -1,4-связями

Структура молекул амилозы (а), амилопектина (б) и гликогена (в)

В желудочно-кишечном тракте гликоген и крахмал расщепляются α -амилазами слюны и поджелудочной железы, гидролизующими α -(1→4)-связи в расположенных снаружи ветвях гликогена и амилопектина до D-глюкозы.

Структурные полисахариды

Целлюлоза (клетчатка) – наиболее распространенный в природе гомополисахарид, состоящий из остатков β -D-глюкозы, соединенных друг с другом α -(1→4)-связью:



Цепочка целлюлозы имеет вид нити, спиралеобразно закрученной вокруг своей оси и удерживаемой в таком положении водородными связями остатков глюкозы. Отдельные нити соединяются межмолекулярными водородными связями в пучки, имеющие характер волокон. Это обеспечивает особые механические свойства целлюлозы – ее высокую прочность.

Клетчатка является главной составной частью оболочек растительных клеток, наиболее в чистом виде это хлопковое волокно (90 %), древесина хвойных деревьев содержит около 50 % целлюлозы.

Целлюлоза нерастворима в органических растворителях, в водных растворах щелочей и разбавленных минеральных кислотах. Она растворяется только в концентрированной соляной и фосфорных кислотах, 72 %-ной серной кислоте, *реактиве Швейцера* (раствор соли двухвалентной меди в аммиаке) и в растворах некоторых четвертичных органических оснований.

Легко гидролизуются кислотами: *декстрины* → *целлобиоза* → *глюкоза*.

Реактивы

1	Спиртовой раствор α -нафтола	
2	Этанол	
3	Водный раствор крахмала (1...5 %)	
4	Водный раствор глюкозы (1...2 %)	
5	Серная кислота (конц.)	
6	Соляная кислота (25...30 %)	
7	Раствор CH_3COOH (1%)	
8	Азотная кислота (конц.)	
9	Раствор NaOH (10 %)	
10	Раствор сульфата меди (10 %)	
11	Водный раствор фруктозы (1...2 %)	
12	Раствор йода в KI	
13	Раствор нитрата серебра	
14	Раствор CuSO_4 (0,1 %)	
15	Раствор едкого натра (конц.)	
16	Раствор $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	
17	Раствор NaNO_2	
18	Раствор нингидрина (0,1 %)	
19	Реактив Фелинга	
20	Реактив Барфедда	
21	Резорцин	
22	Раствор сахарозы (10 %)	
23	Раствор формальдегида	
24	Лакмус	
25	Лактоза	
26	Манноза	
27	Галактоза	

Посуда и приборы

1	Пробирка	
2	Капельница	
3	Держатель	
4	Спиртовка	
5	Водяная баня	
6	Кристаллизатор со льдом	

Проведение качественных реакций на углеводы

1 *Проба Подобедова–Молиша* (эта реакция является общей для углеводов).

К 1 см³ раствора глюкозы (лактозы, фруктозы и др.) добавьте 1...2 капли 10 % спиртового раствора α-нафтола и 4...6 капель конц. H₂SO₄ (работать очень осторожно).

Аналитический эффект: на границе раздела двух слоев образуется фиолетовое кольцо (если вместо α-нафтола взять раствор тимола, то образуется красное кольцо).

Реакция основана на том, что при действии концентрированной серной кислоты из пентоз получается фурфурол, а из гексоз – 5-оксиметилфурфурол, которые при конденсации с нафтолом образуют окрашенные соединения.

2 *Проба на образование альдегидных смол.*

5 см³ раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) (1...5 %) смешайте с 2 см³ 10 % раствора едкого натра и доведите до кипения, нагревая на спиртовке.

Аналитический эффект: содержимое пробирки желтеет или даже становится темно-бурым. Появляется запах карамели, особенно заметный при подкислении.

Реакция основана на общей склонности альдоз к образованию в щелочной среде продуктов конденсации (альдегидных смол).

3 *Проба на восстановление солей меди.*

К 2 см³ раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) добавьте 1 см³ раствора едкого натра и 3 капли раствора сульфата меди. Нагрейте до кипения.

Аналитический эффект: наблюдается образование желтого осадка Cu(OH)₂, который при дальнейшем нагревании переходит в красный осадок Cu₂O.

4 *Метод Вознесенского (количественное определение углеводов).*

К 3 см³ раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) добавьте 1 см³ реактива Фелинга и нагревайте на водяной бане в течение 5...10 минут.

Аналитический эффект: образование красного осадка Cu₂O.

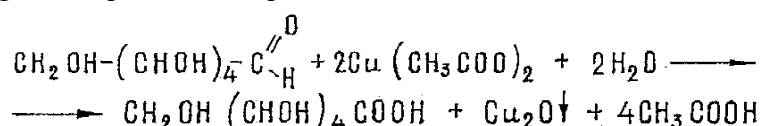
Жидкость Фелинга готовят из медного купороса, сегнетовой соли и едкого натра.

5 *Проба Барфедда.*

Реактив Барфедда – это раствор ацетата меди и ацетата натрия в разбавленной уксусной кислоте.

К 2 см³ глюкозы (маннозы, лактозы, фруктозы) добавьте 2 см³ реактива Барфедда и нагрейте до кипения.

Аналитический эффект: образование красного осадка.



Проба Барфедда отличается от других реакций восстановления тем, что рН среды в этой реакции близка к нейтральной. Восстанавливающие дисахариды в этих условиях не окисляются, поэтому эта реакция позволяет отличить моносахариды от дисахаридов.

6 Реакция Селиванова.

К 2 см³ раствора монозы добавьте 2 см³ соляной кислоты и несколько кристалликов резорцина. Нагрейте смесь.

Аналитический эффект: появление интенсивного красного окрашивания.

Реакция Селиванова позволяет отличить кетозы от альдоз. При кипячении с концентрированными минеральными кислотами монозы подвергаются дегидратации, образуя производные гетероциклического альдегида фурфурала: кетозы – фурфураль, гексозы – оксиметилфурфураль.

Полученное вещество образует окрашенный продукт конденсации с резорцином. Альдозы в этих условиях менее активны, чем кетозы, и требуют более продолжительного нагревания с кислотами.

7 Исследование свойств сахарозы.

Предварительно можно проделать с 5...10 % растворами сахарозы реакции Фелинга, Подобедова–Молиша, Селиванова:

а) 3 см³ раствора сахарозы нагрейте с двумя каплями 10 % раствора серной кислоты. После нагревания смесь охладите и содержимое пробирки разделите на 2 части;

б) 1,5 см³ полученного гидролизата раствора сахарозы нейтрализуйте разбавленным раствором щелочи и добавьте 0,5 см³ реактива Фелинга и нагрейте. Запишите результаты;

в) 1,5 см³ полученного гидролизата раствора сахарозы нейтрализуйте разбавленным раствором щелочи и добавьте 1 см³ реактива Барфедда. Отметьте изменение цвета смеси после нагревания пробирки на спиртовке.

8 Исследование свойств крахмала.

а) небольшое количество крахмала растворить в теплой воде, отфильтровать;

б) к фильтрату, осадку опыта (а) и раствору крахмала добавьте 2–3 капли раствора йода в КJ.

Аналитический эффект: окрашивание раствора в синий цвет для водного раствора крахмала.

Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой, состав которой колеблется от $nI_2 + 10n(C_6H_{10}O_5)_x$ до $nI_2 + 20n(C_6H_{10}O_5)_x$.

Полученный окрашенный раствор разделите на три части:

а) к одной части раствора добавьте 3...4 капли 10 %-ного раствора едкого натра;

б) к другой части раствора добавьте 5 см³ этанола;

в) третью часть нагрейте с окрашенным раствором крахмала на водяной бане.

Аналитический эффект: обесцвечивание растворов.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов
- 2 Дайте определение и проведите классификацию углеводов.
- 3 Функции углеводов в организме.
- 4 Классификация моносахаридов.
- 5 Строение молекулы глюкозы (доказательства строения, открытая, циклическая, проекционная формулы и формула Хеуорса)

- 6 Химические свойства глюкозы (реакции окисления, алкилирования, ацилирования, уменьшения и увеличения цепи)
- 7 Фруктоза: строение и свойства.
- 8 Сахароза: строение, свойства, гидролиз.
- 9 Крахмал: строение, амилоза, амилопектин, физические и химические свойства.
- 10 Целлюлоза: строение и свойства. Способы переработки.

Лабораторная работа 4

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ (ЖИРОВ)

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды;
- 2 закрепить представления о структурах липидов;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

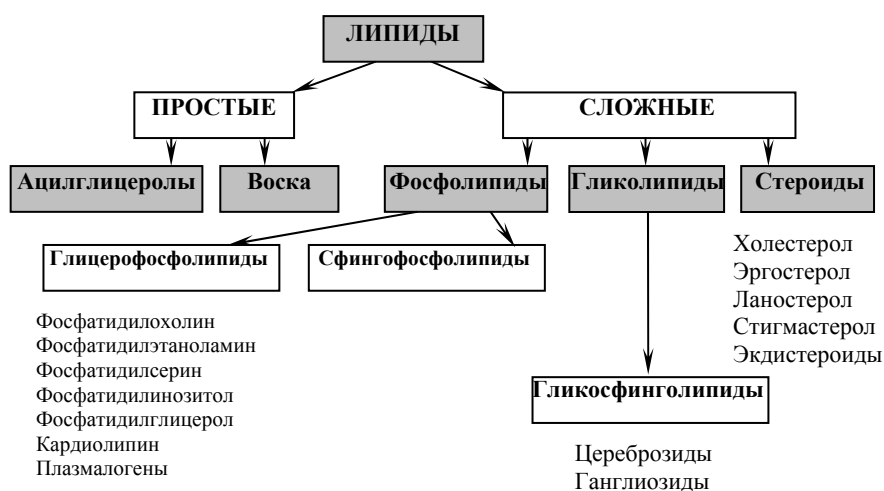
Липиды (от греч. *lipos* – жир) – низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир).

Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность).

Липиды представляют собой разнородные химические соединения (схема 1).

Схема 1

Классификация липидов по строению



I Простые липиды:

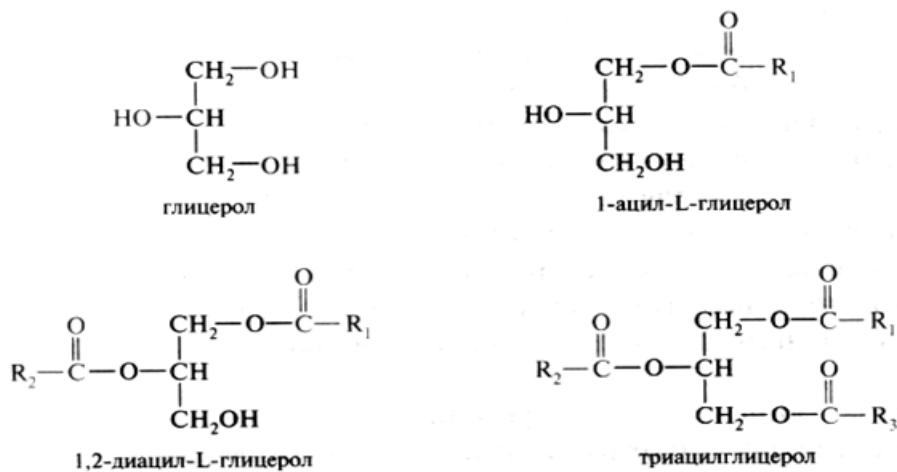
- 1 ацилглицеролы (жиры, триглицериды и т.п.);
- 2 воска.

II Сложные липиды:

- 1 фосфолипиды
 - глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);
 - сфингофосфолипиды (сфингомиелин);

- 2 стероиды (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, экидстероиды);
- 3 гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Ацилглицеролы (нейтральные жиры, глицериды) наиболее распространенная группа липидов. Эти соединения являются сложными эфирами глицерина (глицерола) и жирных кислот. Если в глицерине этерифицирована одна гидроксильная группа, то образуется *моноацилглицерол*, если две – *диацилглицерол*, три – *триацилглицерол*.



В природе наиболее часто встречаются триацилглицеролы. Поскольку в указанных соединениях не содержится ионных групп, то их относят к *нейтральным липидам*.

Если все три кислотных остатка одинаковы, то такие липиды называют простыми, если содержат разные остатки, то липид называют смешанным.

Жирные кислоты, входящие в состав таких липидов определяют их физико-химические свойства. Наиболее часто образуют жиры монокарбоновые кислоты, содержащие от 12 до 20 атомов углерода.

Насыщенные жирные кислоты

Лауриновая (C ₁₂)	CH ₃ —(CH ₂) ₁₀ —COOH
Миристиновая (C ₁₄)	CH ₃ —(CH ₂) ₁₂ —COOH
Пальмитовая (C ₁₆)	CH ₃ —(CH ₂) ₁₄ —COOH
Стеариновая (C ₁₈)	CH ₃ —(CH ₂) ₁₆ —COOH
Арахидиновая (C ₂₀)	CH ₃ —(CH ₂) ₁₈ —COOH
Бегеновая (C ₂₂)	CH ₃ —(CH ₂) ₂₀ —COOH
Лигноцериновая (C ₂₄)	CH ₃ —(CH ₂) ₂₂ —COOH
Моноеновые жирные кислоты	
Пальмитолеиновая (C ₁₆)	CH ₃ —(CH ₂) ₅ —CH=CH—(CH ₂) ₇ —COOH
Олеиновая (C ₁₈)	CH ₃ —(CH ₂) ₇ —CH=CH—(CH ₂) ₇ —COOH
Эруковая (C ₂₂)	CH ₃ —(CH ₂) ₇ —CH=CH—(CH ₂) ₁₁ —COOH
Нервоновая (C ₂₄)	CH ₃ —(CH ₂) ₇ —CH=CH—(CH ₂) ₁₃ —COOH
Полиеновые жирные кислоты	
Линолевая	

(C ₁₈)	
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ <p style="text-align: center;">(с двумя двойными связями)</p>	
Линоленовая (C ₁₈)	
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = (\text{CH}_2)_7 - \text{COOH}$ <p style="text-align: center;">(с тремя двойными связями)</p>	
Арахидоновая (C ₂₀)	
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{COOH}$ <p style="text-align: center;">(с четырьмя двойными связями)</p>	
Клупанодоновая (C ₂₂)	
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - (\text{CH}_2)_5 - \text{COOH}$ <p style="text-align: center;">(с пятью двойными связями)</p>	

Большое число неполярных C — C и C — H связей в углеводородной цепи придает неполярный характер всей молекуле. Неполярность высших жирных кислот является причиной плохой растворимости липидов в воде, а также придает гидрофобные свойства и обуславливает особую сборку липидов в биомембране.

Чем больше в составе жиров короткоцепочечных или ненасыщенных кислот, тем ниже температура плавления и выше растворимость. Животные жиры содержат значительное число насыщенных жирных кислот, поэтому они при н.у. являются твердыми. Растительные жиры, в состав которых входят ненасыщенные кислоты, являются жидкими — *масла*.

В жире человека, плавящемся при 15 °С, содержится около 70 % ненасыщенных жирных кислот, поэтому жир находится в жидком состоянии при $t = 36,6$ °С.

Для характеристики жира используют константы или *жировые числа*:

Кислотное число — масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Число омыления — это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

Йодное число — это масса иода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происходит по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т.п.

Реактивы

1	Жиры (говяжий, свиной, бараний)	10 г
---	---------------------------------	---------

2	Масло (подсолнечное, касторовое, растительное)	10 г
3	Толуол	
4	Ацетон	
5	Петролейный эфир	
6	Диэтиловый эфир	
7	Гексан	
8	Этиловый спирт	
9	Серная кислота (конц.)	
10	Соляная кислота (0,5н)	
11	Соляная кислота (разб. 1:1)	
12	Гидроксид калия (водный 0,1 н)	
13	Гидроксид калия (спиртовый раствор 0,5н)	
14	Раствор гидроксида натрия (разб.)	
15	Раствор карбоната натрия 10%	
16	Раствор осмиевой кислоты 1%	
17	Раствор судана III	
18	Гидросульфат калия (безвод.)	
19	Раствор нитрата серебра	
20	Аммиак (водный раствор)	
21	Раствор фуксинсернистой кислоты	
22	Спиртовый раствор иода (0,2н)	
23	Раствор тиосульфата натрия (0,1н)	
24	Раствор крахмала 1 %	
25	Бромная вода	
26	Раствор гидроксида натрия 35 %	

Посуда и приборы

1	Пробирки	
2	Колбочки для титрования	
3	Держатель	
4	Спиртовка	
5	Водяная баня	
6	Кристаллизатор со льдом	
7	Стеклянная палочка	
8	Микрошпатель	
9	Часовое стекло	
10	Бюретки	
11	Аналитические весы	
12	Чашечка для выпаривания	

Экспериментальная часть

Опыт 1 Растворимость жиров и масел.

а) в 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Ес-

ли масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 2 *Гидролиз жиров и масел.*

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 3 *Выделение жира из молока.*

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора Na₂CO₃, хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло – молочный жир.

Опыт 4 *Качественная реакция на жиры и масла.*

а) на часовое стекло помещают каплю исследуемого масла (жира) и добавляют 1 каплю 1 % раствора осмиевой кислоты.

Аналитический эффект: Смесь окрашивается в черный цвет.

б) на часовое стекло помещают 1 каплю масла (жира) и прибавляют 1 каплю судана III.

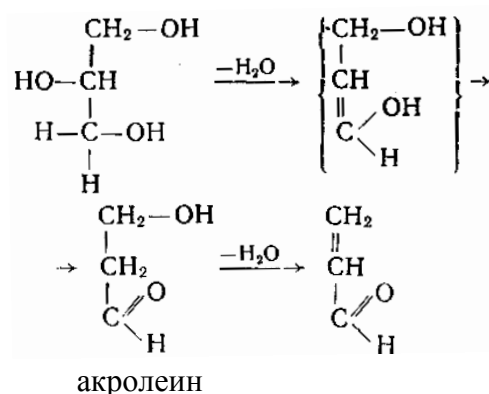
Аналитический эффект: Смесь окрашивается в красный цвет.

Опыт 4 *Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба)*

В пробирку вносят 2...3 капли масла (жира), 0,1...0,2 г безводного KHSO₄ и нагревают на спиртовке (под тягой) до появления белых густых паров. В пары вносят бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

Аналитический эффект: Бумажка с раствором солей серебра темнеет, а с раствором фуксинсернистой кислоты становится ярко-розовой.

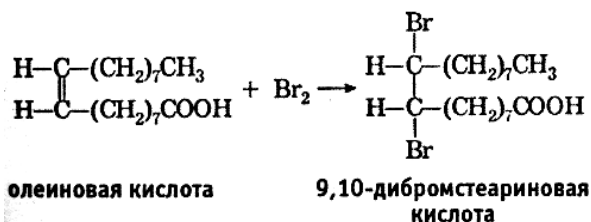
Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании в присутствии водоотнимающих средств (KHSO₄, MgSO₄, борная кислота) из глицерина образуется непредельный альдегид – акролеин (пропеналь).



Опыт 5 *Определение ненасыщенности кислот в составе жира.*

В пробирку поместите 2–3 капли масла (жира) и 8 – 10 капель бромной воды. Пробирку встряхните.

Аналитический эффект: Обесцвечивание бромной воды



Опыт 6 Определение йодного числа.

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3...4 капли масла (жира). Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В колбу добавляют 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбу вносят 12,5 мл 0,2н спиртового раствора иода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колбы титруют 0,1н раствора тиосульфата натрия до появления слабо-желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют – контроль, но без масла (жира).

Расчет иодного числа проводят по формуле:

$$\text{И.ч.} = (V_2 - V_1) \cdot 0,0127 \cdot 100 / m,$$

где V_2 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 – титр тиосульфата по иоду; m – навеска масла (г)

Опыт 7 Определение кислотного числа.

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 мл масла (жира) – 2...3 г. Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) $\approx 2...3$ г. В колбочку добавляют 10...15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1...2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5...1 мин.

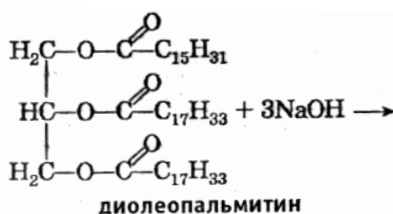
Кислотное число рассчитывают по формуле:

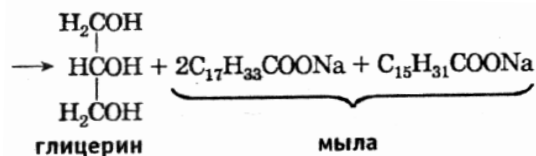
$$\text{К.ч.} = V T / m,$$

где К.ч. – кислотное число; V – объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл); T – титр 0,1 н раствора КОН; m – масса навески масла (жира), г.

Опыт 8 Омыление жиров.

В фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35 %-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню. Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.





Опыт 9 *Определение числа омыления.*

В 2 колбочки помещают: 1...0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2...0,5 мл воды. Затем в обе колбочки добавляют по 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30...40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15...20 мл воды, 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч.о.} = (V_2 - V_1) \cdot 28 / m,$$

где Ч.о. – число омыления; V_2 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла; m – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

Контрольные вопросы

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Дайте определение и проведите классификацию липидов.
3. Укажите функции липидов в организме.
4. Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.
5. Приведите примеры качественных реакций, доказывающих неопредельный характер ВЖК.
6. Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
7. Какие реакции лежат в основе омыления жира?
8. Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
9. Перечислите компоненты, участвующие в переваривании жиров.
10. Значение ВЖК, холестерина в метаболических процессах.

Лабораторная работа 5

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы;
- 2 исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции;
- 3 изучить процесс ингибирования холинэстеразы фосфорорганическими соединениями;
- 4 закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов;
- 5 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 6 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 7 привить навыки работы со справочной литературой и оформлению отчета по лабораторной работе.

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Термин *фермент* (от лат. *fermentum* — закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение.

Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Отличие ферментативного катализа от неорганического

- 1 Ферменты действуют в мягких условиях организма (p , t^0 , pH).
- 2 Белки-ферменты чувствительны к денатурирующим агентам.
- 3 Для действия ферментов характерна высокая эффективность.
- 4 Активность ферментов контролируется (генетически на уровне строения и различными биорегуляторами).

5 В организме, как правило, действуют полиферментные (т.е. поликаталитические) системы, в результате чего достигается многоэтапное направленное превращение вещества с допустимыми для организма уровнями перепада энергии.

6 Для действия ферментов характерна специфичность: а) *абсолютная* – фермент катализирует превращение строго определенного вещества (уреаза расщепляет только мочевины на CO_2 и NH_3); б) *относительная* – фермент катализирует превращения одного типа связей в ряду близких по химическому строению веществ (например липаза катализирует разрыв сложноэфирных связей независимо от типа радикала); в) *групповая относительная* – то же, но для разрыва связи важны образующие ее атомные группировки.

7 Одним из важнейших свойств ферментов как биокатализаторов является их *регулируемость*. Через регуляцию ферментативного аппарата осуществляется скоординированность всех метаболических процессов во времени и пространстве, направленная на производство живой материи, поддержание постоянства внеклеточной среды, на приспособление к меняющимся условиям.

8 При ферментативных реакциях наблюдаются лишь незначительные побочные процессы, т.е. почти 100 % выход.

Строение ферментов. По строению ферменты бывают простыми и сложными белками. Для сложных белков-ферментов используют следующие обозначения; *апофермент* – пол и пептидная часть молекулы фермента; *холофермент* – прочный природный комплекс апофермента и небелковой части; *кофактор* – небелковая часть сложного белка-фермента; *простетическая группа* – прочно связанный с апоферментом кофактор (металлы, гем и др.); *кофермент* – легко отделяемый от апофермента, например диализом; кофактор (витамины, нуклеотиды и др.) Апофермент всегда синтезируется в организме, кофакторы (витамины, металлы и др.) должны поступать с пищей.

Ферментативный катализ идет на поверхности фермента. Превращаемые вещества называются *субстратами*. Превращение субстрата происходит в области **активного центра**, который сформирован в третичной структуре большинства ферментов. У простых белков-ферментов активный центр образован сближенными в пространстве радикалами аминокислот первичной структуры. У сложных белков-ферментов здесь находятся кофакторы. В активном центре выделяют 2 части: якорная (радикалы аминокислот обеспечивают фиксацию субстрата) и каталитическая (радикалы аминокислот и (или) кофакторы обеспечивают катализ). У ряда регуляторных ферментов имеется еще один центр – **аллостерический**. Присоединение к этому центру низкомолекулярных веществ (эффеторов) индуцирует изменение третичной структуры фермента, в том числе и в области активного центра. Это и ведет к изменению каталитической активности фермента.

Белки-ферменты с четвертичной структурой могут катализировать одну и ту же реакцию, но несколько отличаться по строению (т.е. первичной структуре) субъединиц. Если это закреплено генетиче-

ски – речь идет об изоферментах. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц двух типов Н и М и существует 5 вариантов, т.е. изоферментов.

В составе как простого, так и сложного фермента выделяют *субстратный, аллостерический и каталитический центры*.

Каталитический центр простого фермента представляет собой уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, расположенных на разных участках полипептидной цепи. Образование каталитического центра происходит одновременно с формированием третичной структуры белковой молекулы фермента. Чаще всего в состав каталитического центра простого фермента входят остатки серина, цистеина, тирозина, гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Субстратный центр простого фермента – это участок белковой молекулы фермента, который отвечает за связывание субстрата. Субстратный центр образно называют "якорной площадкой", где субстрат прикрепляется к ферменту за счет различных взаимодействий между определенными боковыми радикалами аминокислотных остатков и соответствующими группами молекулы субстрата. Субстрат с ферментом связывается посредством ионных взаимодействий, водородных связей; иногда субстрат и фермент связываются ковалентно. Гидрофобные взаимодействия также играют определенную роль при связывании субстрата с ферментом. В простых ферментах субстратный центр может совпадать с каталитическим; тогда говорят об **активном центре** фермента.

Ферменты обладают всеми свойствами белков, однако по сравнению с белками, выполняющими другие функции в клетке, ферменты имеют ряд специфических, присущих только им свойств.

Зависимость активности ферментов от температуры. Температура может влиять по-разному на активность фермента. При высоких значениях температуры может происходить денатурация белковой части фермента, что негативно сказывается на его активности. При определенных (оптимальных) значениях температура может влиять на скорость образования фермент-субстратного комплекса, вызывая увеличение скорости реакции. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется **температурным оптимумом** фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале 40...50 °С (рис. 1).

Зависимость активности фермента от рН-среды. Большинство ферментов проявляет максимальную активность при значениях рН, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты "работают" в сильно кислой или сильно щелочной среде. Например, активность пепсина – фермента, гидролизующего белки в желудке, – максимальна при рН 1,5...2,5. В щелочной среде "работают" ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения рН-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при изменении рН может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса. Влияние рН-среды на активность фермента показано на рис. 2.

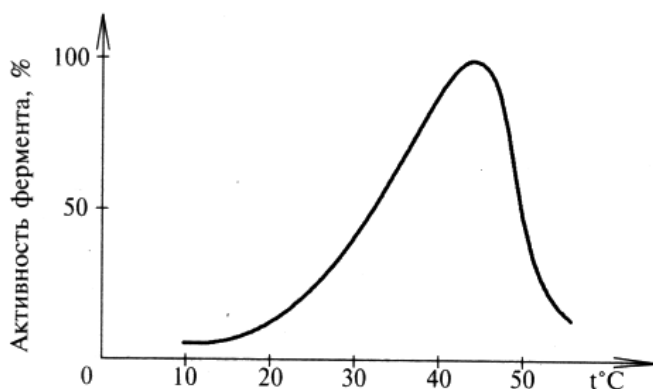


Рис. 1 Влияние температуры на активность фермента

Специфичность действия ферментов – одно из главных их свойств. *Специфичность* – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

По гипотезе Д. Кошланда, молекула фермента не жесткая, а гибкая, эластичная, поэтому информация фермента и его активного центра может изменяться при присоединении субстрата или других лигандов. В момент присоединения субстрат "вынуждает" активный центр фермента принять соответствующую форму. Это можно сравнить с "перчаткой" и "рукой".

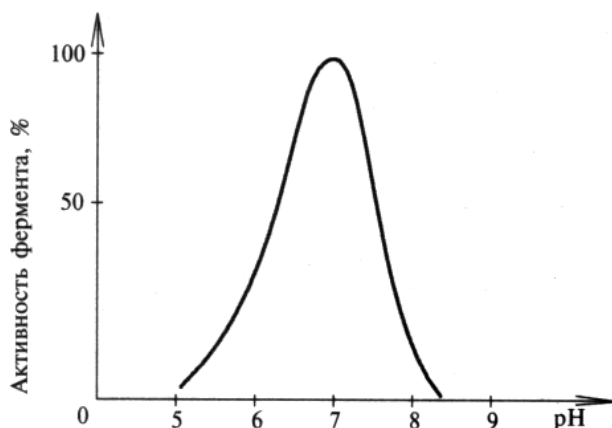


Рис. 2 Влияние pH-среды на активность фермента

Гипотеза "вынужденного соответствия" получила экспериментальное подтверждение. Эта гипотеза позволяет также объяснить причину превращения близких аналогов субстратов.

Катализируемая химическая реакция является тем признаком, по которому можно отличить один фермент от другого. Все известные ферменты подразделяют на шесть классов, охватывающих изученные в настоящее время ферментативные реакции (табл.).

Таблица

Реакции, катализируемые различными массами ферментов

Класс ферментов	Тип реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции всех типов
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов от донора к акцептору
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидратитическое расщепление двойных связей или образование этих связей
Июмеразы	Взаимопревращения различных иномеров
Лигазы	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений (с помощью энергии АТФ)

Ингибирование ферментов

Скорость ферментативных реакций может быть частично снижена или полностью заблокирована определенными веществами, так называемыми ингибиторами ферментов. Некоторые ингибиторы ферментов являются для организма животных и человека эффективными лекарственными веществами, другие – смертельными ядами.

Обратимые ингибиторы

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное,

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не

приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается (рис. 3).

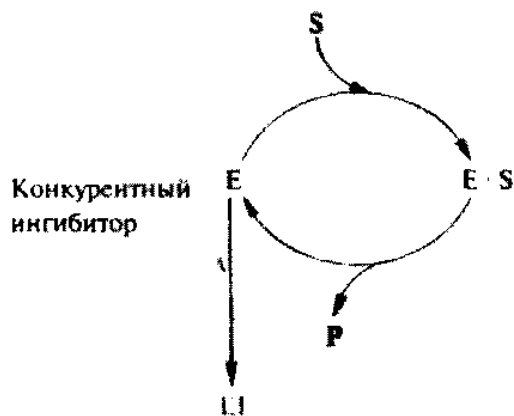


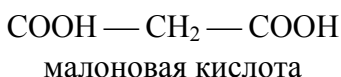
Рис. 3 Схема действия конкурентного ингибитора

При взаимодействии фермента с конкурентным ингибитором изменяется значение K_M соответствующей ферментативной реакции.

Сходство субстрата и конкурентного ингибитора достаточно для взаимодействия и образования фермент-ингибиторного комплекса, но недостаточно для ферментативной реакции. В качестве примера можно привести действие малоновой кислоты на реакцию, которая катализируется сукцинатдегидрогеназой и связана с превращением янтарной кислоты в фумаровую.

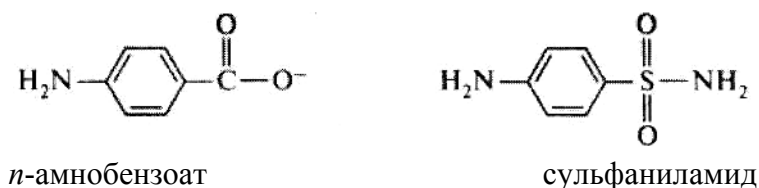
$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	$\text{COOH} - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$
янтарная кислота	фумаровая кислота

Добавление малоновой кислоты к реакционной смеси снижает или полностью останавливает ферментативную реакцию, так как она является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы.



Сходства малоновой кислоты с янтарной достаточно для образования комплекса с ферментом, однако распад этого комплекса не происходит. При увеличении концентрации янтарной кислоты она вытесняет малоновую кислоту из комплекса, в результате активность сукцинатдегидрогеназы восстанавливается.

Многие лекарственные вещества ингибируют ферменты человека и животных по конкурентному типу. Примером могут служить сульфамидные препараты, по структуре сходные с *p*-аминобензойной кислотой (ПАБК). Это соединение в микробных клетках является интермедиантом фолиевой кислоты – важного компонента нуклеинового обмена. При введении сульфамидных препаратов в организм происходит ингибирование ферментов метаболизма ПАБК, что приводит к снижению синтеза нуклеиновых кислот и гибели микроорганизма.



В данном случае сульфаниламид является конкурентным ингибитором фермента синтеза фолиевой кислоты.

В структуру пептогликана клеточной стенки бактерий включен *D*-аланин, отсутствующий в организме животных и человека. Для синтеза клеточной стенки бактерии при помощи фермента аланин-

рацемазы превращают животный L-аланин в D-форму. Аланин-рацемаза характерна для бактерий и не обнаружена у млекопитающих. Следовательно, она представляет хорошую мишень для ингибирования лекарственными препаратами. Замещение одного из протонов метильной группы на фтор дает фтораланин, с которым связывается аланин-рацемаза, что приводит к ее ингибированию.

$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{F} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
L-аланин	β-фтораланин

Таким образом, можно конструировать лекарственные вещества, ингибирующие ферменты по конкурентному типу. Чтобы быть эффективным, ингибитор должен иметь высокое сродство к ферменту. В противном случае необходимо назначать большие дозы лекарственных препаратов, чтобы активно конкурировать с эндогенным субстратом за активный центр фермента.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра. При взаимодействии фермента с неконкурентным ингибитором изменяется V_{\max} ферментативной реакции.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

Ход работы

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Доказательством белковой природы ферментов служит ряд их физико-химических свойств: образование коллоидных растворов, амфотерные свойства, денатурация при действии солей тяжелых металлов, сильных кислот, щелочей с потерей каталитических свойств.

Характерными свойствами ферментов являются наибольшая активность при определенных значениях температуры (37...40 °С), рН среды, высокая специфичность действия. На активность фермента оказывает большое влияние и концентрация субстрата: при малых концентрациях реакция протекает с незначительной скоростью, с увеличением его количества реакция ускоряется и при определенной концентрации становится постоянной (насыщение фермента субстратом). Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводит к замедлению реакции. При оптимальной концентрации вещества скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента в растворе.

На активность ферментов оказывают влияние и химические соединения. Вещества, повышающие активность ферментов, называют активаторами, а понижающие активность – ингибиторами.

Определение скоростей ферментативных реакций и исследование влияния на них различных факторов составляют содержание ферментативной кинетики. Кинетические исследования широко используются для определения сродства субстратов и ингибиторов к ферментам, для установления механизма их действия. К числу главных факторов, влияющих на скорость ферментативных реакций, относятся: концентрации фермента и субстрата, присутствие ингибиторов или активаторов, значение рН, температура среды.

Один из наиболее важных факторов – концентрация субстрата. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата выражается уравнением Михаэлис:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

где V – скорость ферментативной реакции; V_{\max} – предельное постоянное значение скорости для данной реакции; $[S]$ – концентрация субстрата; K_M – константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент – субстрат.

Экспериментальная часть

Опыт 1 Специфичность действия сахаразы дрожжей

Реактивы

- 1 Пекарские дрожжи.
- 2 Раствор крахмала 1 %.
- 3 Раствор сахарозы 1 %.
- 4 Сульфат меди (1 % водный раствор).
- 5 Гидроксид натрия (10 % водный раствор).
- 6 Дистиллированная вода.
- 7 Весы.
- 8 Стеклянная воронка.
- 9 Бумажный фильтр.

Посуда и приборы

- 1 Пробирки
- 2 Термометр – 1.
- 3 Держатель
- 4 Ступка фарфоровая с пестиком
- 5 Водяная баня – 1.
- 6 Секундомер – 1.

Фермент сахараза катализирует гидролитическое расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы.

Действие фермента можно обнаружить по появлению свободной глюкозы, дающей положительную качественную реакцию на свободный полуацетальный гидроксил (реакция "серебряного зеркала", с реактивом Фелинга и т.п.). Сахароза не содержит свободного полуацетального гидроксила, поэтому в подобные превращения не вступает.

Ход работы

1 Для получения сахаразы навеску 0,5 г высушенных пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке для разрушения дрожжевых клеток. Затем в ступку добавляют 5 мл дистиллированной воды и вновь продолжают растирать полученную массу. Через некоторое время полученную суспензию фильтруют через складчатый фильтр. В фильтрате и содержится фермент сахараза.

2 В 2 пробирки помещают по 1 мл раствора сахаразы и приливают: в 1 пробирку – 1 мл 5 % раствора сахарозы; во 2 – 1 мл 5 % раствора крахмала. Пробирки помещают в водяную баню с температурой 36...38 °С и выдерживают при этой температуре 15 мин.

3 Из каждой пробирки отбирают пробы объемом около 0,5 мл; добавляют в пробу по 10 капель 10 % раствора NaOH и по 3 капли 1 % раствора CuSO₄. Затем пробы перемешивают и нагревают до кипения. Образование красного или желтого осадка свидетельствует о наличии в пробе глюкозы.

Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

Таблица

№ пробы	Фермент (сахараза), мл	Раствор сахарозы, мл	Раствор крахмала, мл	Наличие свободной глюкозы
1	1	1		
2	1		1	

Опыт 2 Исследование свойств амилазы

Реактивы		Посуда и приборы	
1	Раствор амилазы	1	Стакан химический
2	Раствор крахмала (0,1 %)	2	Термометр
3	Раствор йода в йодиде калия	3	Пробирки
4	Кислота соляная (разб.)	4	Капельница
5	Раствор гидрофосфата натрия (0,2М)	5	Водяная баня
6	Раствор лимонной кислоты (0,1М)	6	Секундомер
		7	Весы
		8	Стеклянная воронка
		9	Бумажный фильтр

Амилаза относится к группе гидролаз, катализирующих гидролиз полисахаридов до более простых соединений (ди- и моносахаридов). Вырабатывается в слюнных железах и поджелудочной железе. Резкое увеличение активности амилазы в сыворотке крови имеет решающее значение при диагностике заболеваний поджелудочной железы.

Фермент амилаза ускоряет гидролиз α -гликозидных связей молекулы крахмала. Продукты гидролиза не образуют синего комплекса с раствором йода в йодиде калия

амилаза



1 Ферментативный гидролиз крахмала.

В две пробирки налить по 5 мл 0,1 % раствора крахмала. Затем в одну пробирку внести 1 мл раствора амилазы. Пробирки поставить в стакан с теплой водой на 10 мин (температура 37...40 °С). После охлаждения в обе пробирки добавить по 1 капле раствора йода в йодиде калия. Сделать вывод об устойчивости крахмала к гидролизу (в присутствии фермента и без фермента).

2 Влияние pH среды.

В три пробирки (1, 2, 3) налить по 5 мл 0,1 % раствора крахмала. Затем в пробирки 1 и 2 налить по 1 мл воды, в пробирку 3—1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. В пробирки 1, 3 добавить по 1 мл раствора амилазы, в пробирку 2—1 мл раствора амилазы после кипячения. Все 3 пробирки поставить в стакан с теплой водой на 20 мин. После охлаждения в каждую из пробирок добавить по 1—2 капли раствора йода в йодиде калия. Записать аналитический эффект и сделать выводы.

Сравнить полученные результаты с данными: только в пробирке 1 не наблюдается изменение цвета, так как происходит расщепление крахмала. В пробирке 2 фермент необратимо инактивирован при нагревании, в пробирке 3 реакция протекает медленно вследствие высокой кислотности раствора. Поэтому во 2-й и 3-й пробирках должно наблюдаться синее окрашивание.

3 Влияние температуры.

В пробирки 1, 2, 3, 4 поместить по 1 мл 0,1% раствора крахмала. Пробирку 1 поместить в стакан с холодной водой, 2, 3 – в стакан с теплой водой (38...40 °С), пробирку 4 – в кипящую водяную ба-

ню. Предварительно в каждую пробирку следует добавить: в 1, 2, 4 – 0,5 мл раствора амилазы, в 3 – 0,5 мл прокипяченного раствора амилазы. Периодически через каждые 5 мин следует из пробирки 2 брать небольшое количество раствора пипеткой (2–3 капли) и вносить в пробирку с 3 мл сильно разбавленного раствора йода в йодиде калия. Когда получена отрицательная проба (раствор не окрашивается), во все пробирки следует добавить по 2 мл 1н. раствора серной кислоты и охладить их. Затем во все пробирки добавить по 2–3 капли раствора йода в йодиде калия. Записать аналитический эффект и сделать выводы.

4 Определение оптимального значения рН среды.

Предварительно следует приготовить растворы буфера.

№	1	2	3	4	5	6	7
рН	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0
Объем 0,2М раствора Na ₂ HPO ₄ , мл	7,71	10,30	11,15	13,22	15,45	18,17	19,45
Объем 0,1М раствора лимонной кислоты, мл	12,29	9,70	8,85	6,78	4,55	1,83	0,55

В пробирки 1–7 поместить по 5 мл раствора соответствующего буфера. Затем в каждую пробирку налить по 4 мл 0,25 % раствора крахмала и по 1 мл раствора амилазы. Все пробирки поместить в стакан с теплой водой (37... 40 °С). Периодически через 3–5 мин проводить реакцию с раствором йода в йодиде калия, для чего 1–2 капли исследуемого раствора поместить в пробирки с разбавленными растворами йода в йодиде калия. Вначале все пробирки дают синее окрашивание, по истечении некоторого времени цвет изменяется в красно-фиолетовый (или красный), и затем окраска полностью исчезает. Для каждой пробирки отметить время (с точностью до 0,5 мин), когда проба перестает давать положительный результат (синее окрашивание). Этот момент можно считать концом амилитического расщепления. Полученные результаты изобразить графически. По оси абсцисс нанести значения рН, а по оси ординат – время гидролиза. Полученные точки соединить плавной кривой (рис. 4).

Время, мин

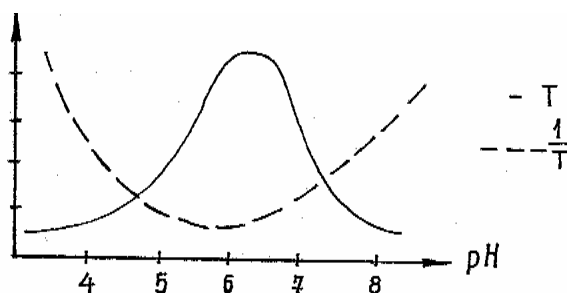


Рис. 4 Кривые прямой и обратной зависимости активности амилазы от рН среды

Полученные данные записать в таблицу.

Номер пробирки	1	2	3	4	5	6	7
Время, мин	4,0	5,0	5,4	6,2	6,8	7,4	8,0
1/время							

Опыт, в котором расщепление произошло в наиболее короткий срок, соответствует максимальной активности фермента, а рН этого опыта – оптимальное значение рН.

Опыт 3 Холинэстераза и биохимическая реакция

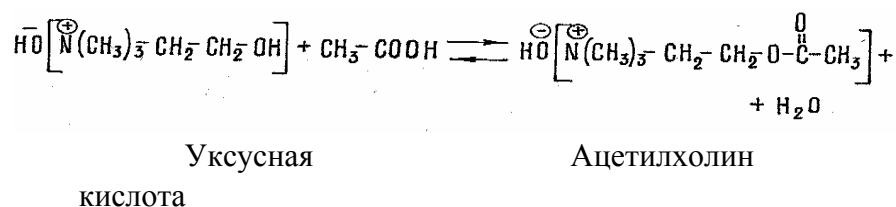
Реактивы:

- 1 Раствор холинэстеразы
- 2 Бура
- 3 Борная кислота
- 4 Раствор карбоната натрия
- 5 Раствор серной кислоты (разб.)
- 6 Раствор бутирилхолинйодида
- 7 Раствор бромтимолового синего
- 8 Раствор стандарта по цвету
- 9 Раствор хлорофоса (разб.)

Посуда и приборы:

- 1 Пробирки
- 2 Водяная баня
- 3 Термометр
- 4 Бюретки
- 5 Капельницы

Процесс передачи нервного импульса к двигательным органам осуществляется химическим передатчиком – ацетилхолином.



Ацетилхолин является эфиром уксусной кислоты и азотосодержащего спирта холина.

Биологическая активность ацетилхолина огромна.

Активный фермент, катализирующий гидролитическое расщепление ацетилхолина, – холинэстераза (ХЭ). Большие количества этого фермента обнаружены в нервной ткани, эритроцитах, сыворотке крови, печени.

Таким образом, организм располагает биохимическим механизмом для быстрого разрушения ацетилхолина и, следовательно, для снятия его возбуждающего действия на мышцы (способствует возвращению сократившейся мышцы в исходное положение).

Следует различать ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и холинэстеразу (ХЭ). Ацетилхолинэстераза – специфическая, или истинная, холинэстераза, содержится в эритроцитах, головном мозге, окончаниях нервных волокон. Холинэстераза неспецифическая, или псевдохолинэстераза, содержится в сыворотке крови.

АХЭ представляет собой фермент высокой специфичности по отношению к субстрату и гидролизует, в основном, ацетилхолин.

ХЭ – фермент, представляющий собой смесь различных эстераз, гидролизует наряду с ацетилхолином и ряд других субстратов (бутирилхолин, бутирилтиохолин).

Для определения активности холинэстеразы разработано много способов. Надежные результаты дают методы, основанные на определении количества образующегося в процессе ферментативного гид-

ролиза вещества, в которых наблюдается линейная зависимость между активностью фермента и количеством образующегося продукта. Наиболее точен потенциометрический метод.

Однако использование инструментальных методов анализа не всегда возможно, поэтому для обнаружения образующейся кислоты используют кислотно-основные индикаторы. К числу последних можно отнести бромтимоловый синий, который дает четкий интервал перехода от синего ($\text{pH} = 0,7$) до желтого ($\text{pH} = 7,2$). По времени перехода окраски индикатора можно определить активность холинэстеразы по количеству образующейся в процессе ферментативного гидролиза масляной (бутановой) кислоты.

Колориметрические методы с pH -индикатором широко используются в военно-химическом деле. По данному методу пробу, содержащую фермент, смешивают с субстратом и соответствующим индикатором и определяют время, в течение которого окраска пробы становится одинаковой с цветом эталона (стандарта).

Как и любой фермент, холинэстераза обладает различной активностью в зависимости от температуры, значения pH среды, количества реагирующих веществ и т.д.

Ход работы

1 *Влияние температуры.*

В пробирки 1–5 налить по 0,5 мл раствора холинэстеразы и 1 мл буфера. Затем пробирку 1 оставить при комнатной температуре, остальные пробирки поместить в водяную баню с температурой: 2...30 °С, 3...40 °С, 4...50 °С, 5 – на кипящую водяную баню. Выдержать в указанных условиях 7–10 мин, затем в каждую пробирку добавить по 0,5 мл раствора бутирилхолинйодида (БХИ) и по 2 капли индикатора бромтимолового синего (БТС). Пробирки вновь поместить в термостат при заданной температуре и записать время изменения цвета раствора до цвета стандарта. Сделать вывод об оптимальном значении температуры.

2 *Влияние pH среды.*

В пробирки 1–3 налить по 0,5 мл раствора холинэстеразы и 1 мл буфера. Затем добавить: в пробирку 1 – 3 капли 1% раствора карбоната натрия, в пробирку 2 – 3 капли серной кислоты (разб.). Пробирки поместить в водяную баню с теплой водой (37...40 °С) на 10 мин, затем добавить по 0,5 мл раствора БХИ и по 2 капли БТС. Пробирки вновь поместить в водяную баню и зафиксировать время изменения цвета растворов до цвета стандарта. Сделать вывод о влиянии pH среды на скорость ферментативного гидролиза, на активность холинэстеразы.

3 *Влияние количества субстрата.*

В пробирки 1–3 поместить по 0,5 мл раствора холинэстеразы и 1 мл буфера. Пробирки поместить в стакан с теплой водой (37...40 °С) на 10 мин, затем добавить: в 1 – 0,5 мл раствора БХИ, во 2 – 1 мл раствора БХИ, в 3 – 1,5 мл раствора БХИ. В каждую пробирку прилить 2 капли раствора БТС и поместить все 3 пробирки в стакан с теплой водой. Зарегистрировать время изменения цвета раствора до цвета стандарта и сделать вывод о влиянии количества субстрата на скорость реакции.

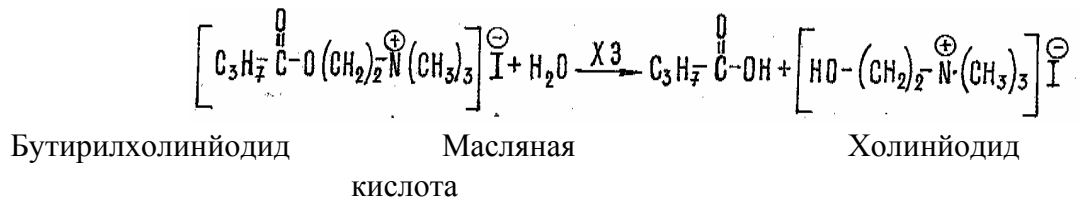
4 *Влияние количества фермента.*

В пробирки 1–3 поместить по 1 мл раствора буфера, затем в 1 прилить 0,5 мл раствора ХЭ, во 2 – 1 мл раствора ХЭ, в 3 – 1,5 мл раствора холинэстеразы. Пробирки поместить в стакан с теплой водой (37...40 °С) на 10 мин, затем в каждую добавить по 0,5 мл раствора БХИ и 2 капли раствора БТС.

Пробирки вновь поместить в стакан с теплой водой (37...40 °С) и зафиксировать время перехода окраски раствора до цвета стандарта. Сделать вывод о влиянии количества раствора холинэстеразы на скорость гидролиза.

5 Исследование ингибирующего действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.

Основная реакция, на которой основано определение ингибирующего действия фосфорорганических веществ на ХЭ, следующая:



В 1 опыте определяют активность холинэстеразы.

Определение активности холинэстеразы основано на реакции ферментативного гидролиза БХИ по обнаружению продуктов реакции бутановой (масляной) кислоты. Для определения бутановой кислоты в исследуемый раствор вводят индикатор – БТС, который изменяет цвет от синего до желтого (в слабокислотной среде).

В пробирки 1–4 приливают по 0,5 мл раствора холинэстеразы, затем в 1 пробирку добавляют 0,5 мл буфера, во 2 – 1 мл буфера, в 3 – 1,5 мл буфера, в 4 – 2 мл буфера. Пробирки закрывают пробками и помещают в стакан с теплой водой (37–40°C) на 10 мин. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора БХИ и 2 капли раствора бромтимолового синего. Пробирки вновь помещают в стакан с теплой водой нужной температуры и регистрируют время изменения цвета раствора до цвета стандарта. По результатам эксперимента заполняют таблицу.

Номер пробирки	1	2	3	4
Объем ХЭ, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Объем буфера, мл	0,5	1,0	1,5	2,0
Объем раствора БХИ	0,5	0,5	0,5	0,5
Время				

Для проведения дальнейших опытов выбирают то количество буфера (см. номер пробирки), которое позволяет проводить реакцию в течение 7 – 9 мин.

В ы в о д: в пробирке ____, содержащей 0,5 мл раствора ХЭ и x мл буфера, время изменения цвета раствора составляет ____ мин.

Во 2 опыте исследуют угнетение холинэстеразы фосфорорганическим веществом.

В две пробирки помещают по 0,5 мл ХЭ и x мл буфера. Затем в одну из пробирок (рабочую) добавляют 2 капли раствора хлорофоса. Обе пробирки помещают в водяную баню (36...39 °C) на 10 мин.

Затем в каждую добавляют по 0,5 мл БХИ и одной капле БТС. Отмечают время выравнивания цвета раствора в контрольной и рабочей пробирках (τ_k и $\tau_{\text{раб}}$).

Рассчитывают процент угнетения ХЭ по формуле

$$y(\%) = 100\% - \frac{\tau_k}{\tau_{\text{раб}}} \cdot 100\%$$

Контрольные вопросы

- 1 Правила техники безопасности при выполнении работы.
- 2 Понятие о ферментах.
- 3 Классификация ферментов.
- 4 Строение фермента.
- 5 Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
- 6 Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
- 7 Чем обусловлена специфичность ферментов?

- 8 Понятие об ингибиторах и активаторах.
- 9 Обратимое и необратимое ингибирование.
- 10 Методика исследования свойств сахаразы.
- 11 Методика исследования свойств амилазы.
- 12 Методика проведения биохимической реакции.
- 13 Особенность действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.
- 14 Уравнение реакции гидролиза: сахарозы, крахмала, бутирилхолинйодида.
- 15 Определение ингибирующего действия хлорофоса.

Лабораторная работа 6

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В ГИДРОЛИЗАТЕ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы:

- 1 провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей;
- 2 изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей;
- 3 привить навыки работы химической посудой, реагентами;
- 4 закрепить полученные знания по строению нуклеиновых кислот;
- 5 ознакомить с качественными реакциями, подтверждающими состав продуктов гидролиза;
- 6 привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

Реактивы и посуда:	
1	Пекарские дрожжи.
2	Серная кислота (10 % водный раствор).
3	Гидроксид натрия (10 % водный раствор).
4	Гидроксид натрия (30 % водный раствор).
5	Сульфат меди (1 % водный раствор).
6	Сульфат меди (7 % водный раствор).
7	Аммиак (концентрированный раствор).
8	Нитрат серебра (1 % водный раствор).
9	Молибденовая жидкость.
10	Колба.
11	Обратный холодильник.
12	Песчаная баня.
13	Воронка.
14	Бумажный фильтр.
15	Пробирки.
16	Весы.
17	Пипетка мерная на 1 мл.

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды.

В живых организмах нуклеиновые кислоты входят в состав *нуклеопротеидов*. *Нуклеопротеиды* – комплексы белка, являющиеся важнейшими составными элементами ядер живых клеток и вирусов.

Связь белка, обладающего основными свойствами, с молекулами нуклеиновой кислоты (НК) в них осуществляется за счет солеобразных и водородных связей и легко разрушается путем солевой коагуляции белка. В результате этого процесса НК могут быть выделены в свободном виде.

Нуклеотидами (в широком смысле) называют природные или синтетические соединения, в которых гидроксилы углеводного остатка нуклеозида этерифицированы одной или несколькими фосфатными группами, т.е. он является *нуклеозидфосфатом*.

Нуклеозиды – это природные или синтетические соединения, молекулы которых состоят из пуринового или пиримидинового основания, связанного N-гликозидной связью с остатком Д-рибозы или 2'-дезоксид-Д-рибозы.

Важнейшую роль в установлении строения НК сыграла реакция гидролиза, который можно осуществить ступенчато по приведенной схеме:

Нуклеопротеид → Нуклеиновая кислота (+ Белок) →

→ Нуклеотид → Нуклеозид (+H₃PO₄) →

Пурины + Пиримидины + Пентозы

Молекулы НК всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры полинуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3, 5-фосфорнодиэфирная связь, соединяющая 5-фосфат одного нуклеотида и 3'-гидроксил остаток углеводной составляющей следующей. Поэтому такая цепь является полярной. На одном ее конце остается свободной 5-О-Ф_n-группа, а на другом – 3-ОН-группа *остатка фосфорной кислоты у 5 атома углерода одного мононуклеотида с гидроксильной группой пентозы у 3 атома углерода другого*.

Данный тип связи осуществляет "*первичную структуру*" нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты классифицируют на 2 типа:

1 – *дезоксирибонуклеиновые кислоты* (ДНК), из которых при полном гидролизе можно выделить аденин, гуанин, цитозин, тимин, дезоксирибозу и фосфорную кислоту;

2 – *рибонуклеиновые кислоты* (РНК), гидролизующиеся до аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и фосфорной кислоты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Для качественного анализа химического состава нуклеопротеидов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеидами. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеинов могут быть обнаружены: полипептиды (биуретовая реакция), пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра; фосфорную кислоту обнаруживают молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – по реакции "серебряного серебра", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

Ход работы

Опыт 1 Проведение гидролиза.

В колбу помещают 0,5 г пекарских дрожжей, приливают 4 мл 10 % раствора серной кислоты и кипятят на песчаной бане 1 час. Колбу охлаждают и содержимое фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат делят на 4 части.

Опыт 2 Биуретовая реакция.

К 0,5 мл гидролизата добавляют 10 капель раствора гидроксида натрия (10 %) до щелочной реакции среды и 2 капли раствора сульфата меди.

Аналитический эффект: смесь окрашивается в фиолетовый цвет.

Опыт 3 Серебряная проба на пуриновые основания.

К 1 мл гидролизата прибавляют 1 каплю раствора аммиака и 5 капель раствора нитрата серебра.

Аналитический эффект: через 3 – 5 минут образуется бурый рыхлый осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина и гуанина).

Опыт 4 Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу.

К 0,5 мл гидролизата добавляют 10 капель раствора гидроксида натрия (30 %) и 2–3 капли раствора сульфата меди (7 %). Смесь перемешивают и нагревают.

Аналитический эффект: через 3 – 5 минут образуется желтый или оранжевый осадок соединенной меди (I).

Опыт 5 Реакция на фосфорную кислоту.

К 20 мл молибденовой жидкости добавляют 3–4 капли гидролизата и кипятят на спиртовке.

Аналитический эффект: через 3 – 5 минут смесь приобретает лимонно-желтый цвет или выпадает лимонно-желтый осадок.

Полученные результаты оформляют в виде таблицы.

Таблица

Реагент	Биуретовая реакция	Серебряная проба	Проба Троммера	Молибденовая жидкость
Аналитический эффект				

В ы в о д ы : кратко описывают условия кислотного гидролиза дрожжей и результаты качественных реакций продуктов гидролиза.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Строение нуклеопротеидов.
- 3 Продукты гидролиза нуклеиновых кислот.
- 4 Функции нуклеиновых кислот.
- 5 Классификация нуклеиновых кислот.
- 6 Структуры ДНК и РНК.
- 7 Процессы транскрипции, трансляции, репликации.
- 8 Правила Чарграффа.
- 9 Сходства и различия в строении ДНК и РНК.
- 10 Перечислите цветные реакции на продукты гидролиза нуклеиновых кислот.
- 11 Укажите условия выделения казеина из молока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. С. 565.
2. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004. С. 637.
3. Алейникова Т.Л. и др. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Под ред. Е.С. Северина. М.: Медицина, 2000. С. 126
4. Пустовалова Л.М. Практические работы по биохимии. Ростов н/Д: Феникс, 2004. С. 319.
5. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии / Под ред. А.Я. Николаева. М.: Высшая школа, 1988, С. 239.

6. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. С. 551.
7. Кухта В.К. и др. Основы биохимии. М.: Медицина, 1999. С. 416.
8. Биохимия. Тесты и задачи / Под ред. Е.С. Северина. М.: Веди, 2005. С. 366.
9. Володина Г.Б., Якунина И.В. Лабораторный практикум по органической химии: Учеб. пособие. Тамбов.: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2004. С. 80.