

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
БУХАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ОРГАНИЧЕСКАЯ И ФИЗКОЛЛОИДНАЯ
ХИМИЯ**

**Ф.М. Нурутдинова
Х.Т. Авезов
Б.Ш. Ганиев**

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

**Лабораторный практикум для студентов направления
«Химия»**

**Издательство «Дурдона»
Бухара – 2021**

УДК 577.1(075.1)

28.072я73

Н 87

Нурутдинова, Ф.М., Авезов, Х.Т., Ганиев, Б.Ш.

Лабораторные работы по биоорганической химии [Текст] : учебное пособие / Ф. М. Нурутдинова, Х. Т. Авезов, Б. Ш. Ганиев. - Бухара :

"Sadriiddin Salim Buxoriy" Durdona, 2021. – 124 с.

ББК 28.072я73

Авторы:

Феруза Муидиновна

Нурутдинова

– д.ф.т.н. (PhD), доц. кафедры
Органической и физколлоидной
химии Бухарского
государственного университета

Хасан Тиллаевич Авезов

– к.х.н., доц. кафедры Органической
и физколлоидной химии Бухарского
государственного университета

Бахтиёр Шукруллаевич

Ганиев

– старшей преподаватель кафедры
Органической и физколлоидной
химии Бухарского
государственного университета

Рецензенты:

Р.А. Ташкараев

– д.т.н., проф. Университет дружбы
народов им. акад. А. Куатбекова

М.Я. Эргашов

– к.х.н., проф. кафедры Органической и
физколлоидной химии Бухарского
государственного университета

**Учебное пособие разрешено к изданию приказом
Министерства высшего и среднего специального образование
Республики Узбекистан от 23 ноября 2021 года № 500. Номер
регистрации 500-046.**

ISBN 978-9943-7793-5-8

Учебное пособие знакомит студентов с методами обнаружения и количественного определения белков, нуклеиновых кислот и углеводов в биологических объектах, а также приемами выделения этих соединений. Работы подобраны с учетом доступности исследуемого материала, реактивов и оборудования, возможности выполнения в отведенное для занятий время и использования методов анализа для различных биологических объектов. Каждая работа содержит теоретическое обоснование, порядок выполнения, способ учета результатов, указание по технике безопасности, контрольные вопросы для самопроверки. Предназначено для студентов, обучающихся по направлению Химия.

O'quv qo'llanma talabalarni biologik ob'ektlardagi oqsillar, nuklein kislotslar uglevadlarni sifat-miqdor analizi, shuningdek bu birikmalarni ajratish usullari bilan tanishtiradi. Laboratoriya ishlari sinov materiallari, reaktivlar va asbob-uskunalarining mavjudligi, darslarga ajratilgan vaqtda bajarish imkoniyati va turli biologik o'bektlar uchun tahlil usullaridan foydalanishni hisobga olgan holda tanlangan. Har bir ishda nazariy ma'lumot, xavfsizlik texnologiyasi, bajarilish tartibi, hisobot usuli va o'zini tekshirish uchun savollar keltirilgan. Kimyo ta'lim yo'nalishida tahsil olayotgan talabalar uchun mo'jallangan.

The manual acquaints students with methods of detecting and quantifying proteins, nucleic acids and carbohydrates in biological objects, as well as techniques for isolating these compounds. The works were selected taking into account the availability of the test material, reagents and equipment, the possibility of performing in the time allotted for classes and the use of analysis methods for various biological objects. Each work contains a theoretical justification, the order of implementation, a methods of accounting for results, an instruction on safety precautions, control questions for self-examination Designed for students studying in the field of Chemistry.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Необходимость познания процессов жизнедеятельности на молекулярном уровне объяснима, «ибо живая клетка - настоящее царство больших и малых молекул, непрерывно взаимодействующих, возникающих и исчезающих». Поскольку биоорганическая химия изучает биологически значимые вещества, она может служить «молекулярным инструментом» при разностороннем исследовании компонентов живой материи.

Биоорганическая химия изучает строение и химические свойства органических веществ, участвующих в процессах жизнедеятельности, в непосредственной связи с их биологическими функциями.

Как самостоятельная наука биоорганическая химия возникла во второй половине XX века. Основными объектами ее изучения служат биологические полимеры.

Биополимеры – высокомолекулярные природные соединения, являющиеся структурной основой всех живых организмов и играющие определенную роль в процессах жизнедеятельности. К биополимерам относят пептиды и белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды (углеводы). В эту группу включают и липиды, которые сами по себе не являются высокомолекулярными, но в организме обычно связаны с другими биополимерами.

Биоорганическая химия неразрывна связана с органической химией, которая возникла как наука, изучающая вещества живой природы.

Целью методического пособия является ознакомить студентов с основными классами соединений, составляющими структурную основу и основу жизнедеятельности живого организма, сформировать у студентов правильное представление об основных химических компонентах клетки, молекулярных основах биокатализа, современном состоянии вопросов взаимосвязи структуры и свойств важнейших типов биомолекул с их биологической функцией.

При создании лабораторного практикума использована современная концепция преподавания биоорганической химии,

основанная на представлении учебного материала в виде завершенных по содержанию разделов. Обязательным является выполнение всех работ студентами.

Пособие является учебно–методическим руководством к лабораторным занятиям по «Биоорганической химии» и предназначено для подготовки студентов по направлению – Химия.

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные (практические) занятия – одна из важнейших звеньев учебно-педагогического процесса: студенты получают навыки экспериментальной работы, умение обращаться с приборами, самостоятельно делать выводы из полученных данных и тем самым более глубоко и полно усваивать теоритический материал изучаемой дистициплины.

Предлагаемое учебное пособие составлено в соответствии с программой курса “Биоорганической химии”, также включает 52 лабораторных работ. В некоторых случаях приводится 2-3 варианта работ, с тем чтобы преподаватель мог выбрать один из них, исходя из наличия лабораторного оборудования. Почти в каждой работе обращается внимание на практическое значение полученных в опыте результатов. Для выполнения каждой лабораторной работы необходимо:

- 1) Ознакомиться по учебнику с тем разделом биоорганической химии, к которому относится данная работа;
- 2) Внимательно прочитать и понять содержание теоретического введения к выполняемой лабораторной работе, в катором рассматриваются основные закономерности изучаемых биохимических процессов, биологический смысл размерности величин, используемых при решение практических задач, а также формируется цель работы;
- 3) Ознакомиться со схемой и описанием прибора, перечнем необходимой посуды и реактивов и порядком составления отчета;
- 4) Выполнить опыт;
- 5) Составить отчет о работе;

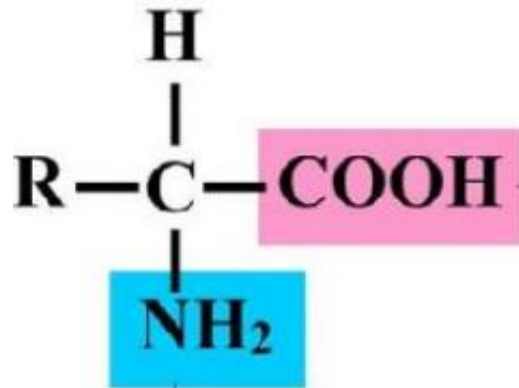
б) Ответить на контрольные вопросы.

Составление отчета:

По окончании каждой лабораторной работы необходимо составить отчет. В отчете указать номер работы, ее название и дату выполнения. Затем записать основные уравнения и формулы, используемые при выполнении расчетов. Полученные данные опыта занести в таблицу, подсчитать средние величины и произвести расчеты с указанием размерности полученных величин.

ГЛАВА I. АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

Аминокислоты по строению они являются органическими карбоновыми кислотами, у которых, как минимум, один атом водорода замещен на аминогруппу. Таким образом, в аминокислотах обязательно присутствует карбоксильная группа (COOH), аминогруппа (NH₂), асимметричный атом углерода и боковая цепь (радикал R).



Общая формула α -аминокислот; четвертый (R) заместитель у тетраэдрического атома углерода обеспечивает разнообразие этих мономерных единиц.

Строением боковой цепи аминокислоты и отличаются друг от друга. Именно радикал придает аминокислотам большое разнообразие строения и свойств. Аминокислоты являются строительными блоками белковых молекул, но необходимость их изучения кроется не только в данной функции. Несколько аминокислот являются источником для образования нейромедиаторов в ЦНС (гистамин, серотонин, гамма-аминомасляная кислота, дофамин, норадреналин), другие сами являются нейромедиаторами (глицин, глутаминовая кислота).

Те или иные аминокислоты необходимы для синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований без которых нет нуклеиновых кислот, используются для синтеза низкомолекулярных биологически важных соединений (креатин, карнитин, карнозин, ансерин и др.).

Аминокислота тирозин целиком входит в состав гормонов щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин) и мозгового вещества надпочечников (адреналин, норадреналин).

С нарушением обмена аминокислот связан ряд наследственных и приобретенных заболеваний, сопровождающихся серьезными проблемами в развитии

организма (цистиноз, гомоцистеинемия, лейциноз, тирозинемия и др). Самым известным примером является фенилкетонурия.

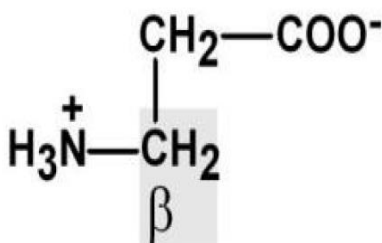
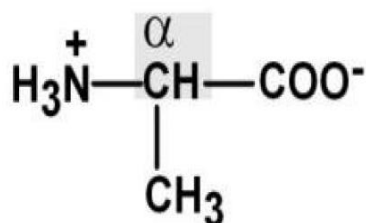
КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Из-за разнообразного строения и свойств классификация аминокислот может быть различной, в зависимости от выбранного качества аминокислот. Аминокислоты делятся:

1. В зависимости от положения аминогруппы.
2. По абсолютной конфигурации молекулы.
3. По оптической активности.
4. По участию аминокислот в синтезе белков.
5. По строению бокового радикала.
6. По кислотно-основным свойствам.
7. По необходимости для организма.

В зависимости от положения аминогруппы

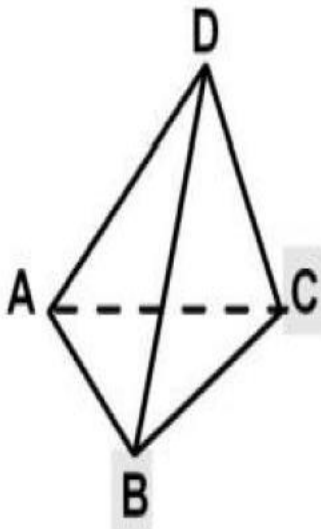
Выделяют α , β , γ и другие аминокислоты. Для организма млекопитающих наиболее характерны α -аминокислоты.



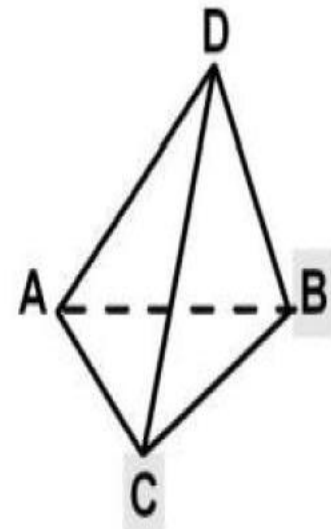
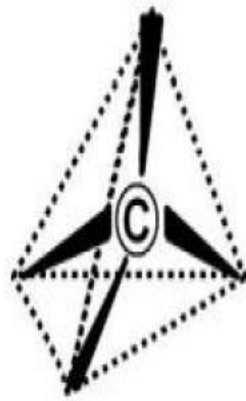
Строение
 α - и β -изомеров
аланина

По абсолютной конфигурации молекулы

По абсолютной конфигурации молекулы выделяют D- и L-формы. Различия между изомерами связаны с взаимным расположением четырех замещающих групп, находящихся в вершинах воображаемого тетраэдра, центром которого является атом углерода в α -положении.

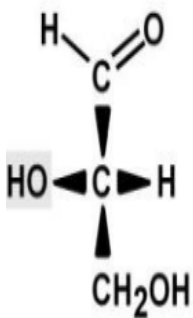


1 конформация
конформация

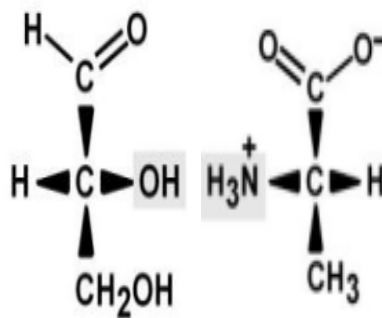


2

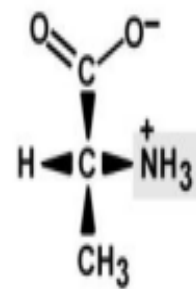
Две конформации тетраэдра



L-Глицеральдегид
Глицеральдегид



D- L-Аланин
D-Аланин



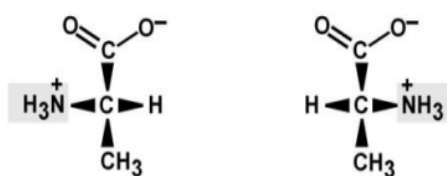
L- и D- формы аланина

L- и D- формы
глицеральдегида

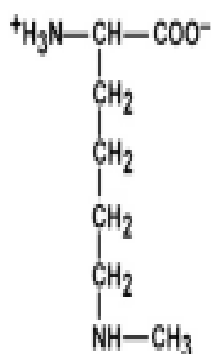
В белке любого организма содержится только один изомер, для млекопитающих это L-аминокислоты. Однако оптические изомеры претерпевают самопроизвольную неферментативную рацемизацию, т.е. L-форма переходит в D-форму.

По оптической активности

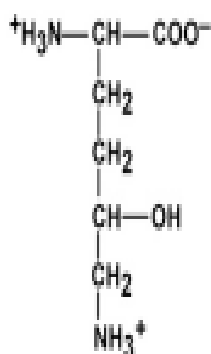
По оптической активности аминокислоты делятся на право- и левовращающие. Наличие



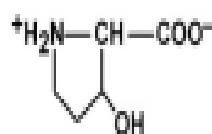
ассиметричного атома Правовращающий Левовращающий
 углерода (хирального аланин (+) аланин (-)
 центра) делает Право- и левовращающие формы
 возможным только два аланин
 расположения химических Деление на L- и D-формы не
 групп вокруг него. Это соответствует делению на право- и
 приводит к особому левовращающие. Для одних
 отличию веществ друг от аминокислот L-формы (или D-
 друга, а именно – формы) являются
 изменению направления правовращающими, для других –
 вращения плоскости левовращающими. Например, L-
 поляризованного света, аланин – правовращающий, а L-
 проходящего через фенилаланин – левовращающий.
 раствор. В соответствии с При смешивании L- и D-форм одной
 углом поворота выделяют аминокислоты образуется
 правовращающие (+) и рацемическая смесь, не обладающая
 левовращающие (-) оптической активностью.
 изомеры.



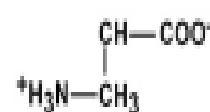
N-Метиллизин



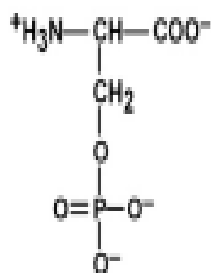
5-Гидроксилизин



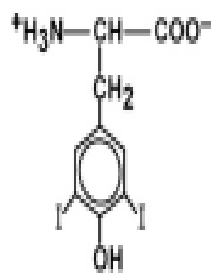
4-Гидроксипролин



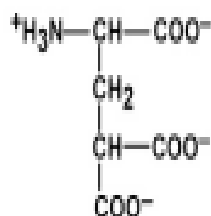
β-Аланин



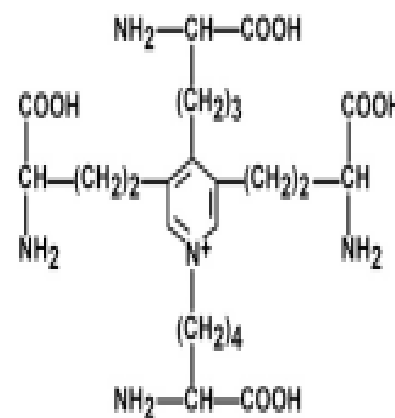
Фосфосерин



Дийодтирозин



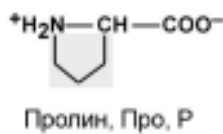
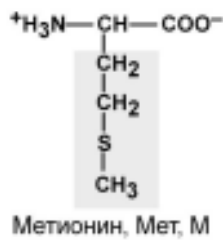
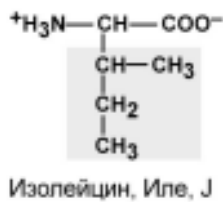
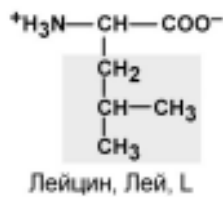
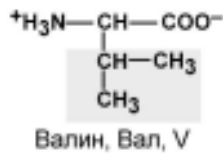
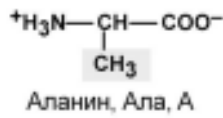
γ-Карбоксиглутаминовая кислота



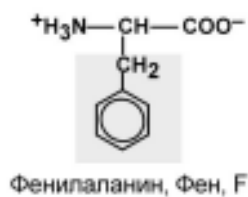
Десмосин

Строение не стандартных кислот

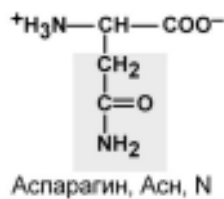
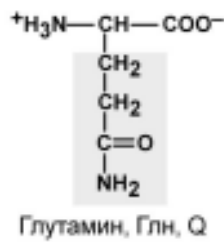
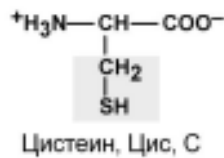
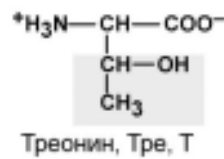
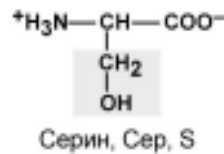
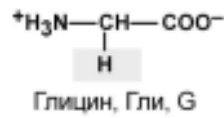
Неполярные
Алифатические



Ароматические

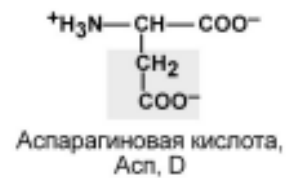
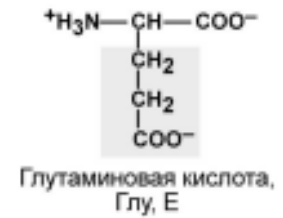


Незаряженные

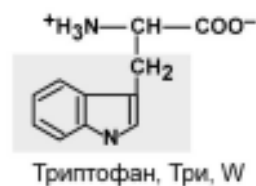
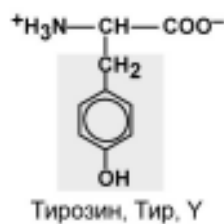
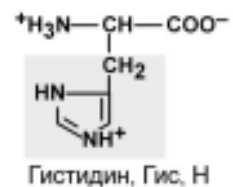
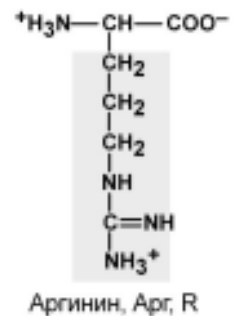
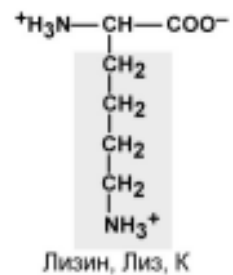


Полярные

Отрицательно заряженные



Положительно заряженные



Строение протеиногенных аминокислот (также указаны сокращенные названия и буквенные обозначения)

По участию аминокислот в синтезе белков

Выделяют протеиногенные (20 АК) и непротеиногенные (около 40 АК). Все протеиногенные аминокислоты являются α -аминокислотами.

На примере протеиногенных аминокислот можно показать дополнительные способы классификации:

– по строению бокового радикала – неполярные (алифатические, ароматические) и полярные (незаряженные, отрицательно и положительно заряженные),

– электрохимическая – по кислотно-основным свойствам подразделяют нейтральные (большинство), кислые (Асп, Глу) и основные (Лиз, Арг, Гис) аминокислоты,

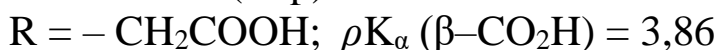
– физиологическая классификация – по необходимости для организма выделяют незаменимые (Лей, Иле, Вал, Фен, Три, Тре, Лиз, Мет) и заменимые. Две аминокислоты являются условно незаменимыми (Арг, Гис), т.е. их синтез происходит в недостаточном количестве.

ФИЗИКО – ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

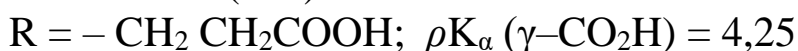
Поскольку в аминокислотах заместители R, т.е. боковые цепи, различны, можно выделить три группы аминокислот в соответствии с их полярностью.

Кислые аминокислоты можно узнать, например, по способности образовывать в спирте нерастворимые кальцевые или бариевые соли. Боковые группы таких аминокислот несут карбоксильную группу, что обуславливает кислые свойства. К таким аминокислотам относятся две:

I. Аспарагиновая кислота (Asp)

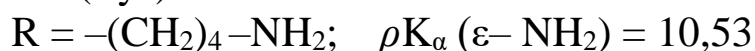


II. Глутаминовая кислота (Glu)



Основные аминокислоты можно отличить, например, по их способности образовывать осадки с определенными кислотами. В эту группу входят:

I. Лизин (Lys)



Можно предположить, что четыре метиленовые группы придают подвижность аминогруппе в белковой молекуле.

II. Оксилизин (Hyls)



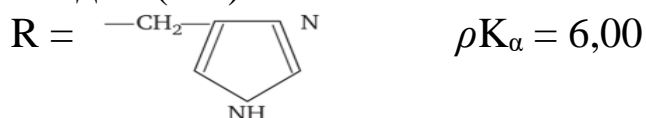
Эта аминокислота обнаружена только в структурном белке соединительных тканей – коллагене.

III. Аргинин (Arg)



Гуанидиновая группировка этой аминокислоты придает ей сильноосновные свойства. Действительно, гуанидин – одно из самых сильных известных органических оснований, он сравним по силе с гидроксидом натрия. Следовательно, при физиологических условиях (рН 7,35) эта группировка всегда ионизована. Очень вероятно, что ее присутствие в аминокислотах обусловлено способностью специфически взаимодействовать с фосфатными группами.

IV. Гистидин (His)



Эта аминокислота содержит гетероциклическое имидазольное кольцо и обладает уникальными химическими свойствами. Гистидин проявляет и слабокислые и слабоосновные свойства; он также хороший нуклеофил и единственная аминокислота ρK_α которой близко к физическим значениям рН (7,35). Следовательно, она может служить и как донор, и как акцептор протонов в химической реакции, связывая протон одним атомом азота и отдавая протон от другого атома азота. Гистидин способен выполнять роль *протонпереносящей* системы.

Нейтральные аминокислоты содержат органические радикалы, не способные ни принимать, ни отдавать протон. Некоторые нейтральные аминокислоты проявляют гидрофобные свойства, обусловленные углеводородными боковыми цепями. Боковые цепи в гидрофобных аминокислотах особым образом взаимодействуют с окружающими молекулами воды, такие

соединения проявляют очень близкие свойства, которые лишь слабо зависят от строения боковых цепей.

Кроме этих обычных аминокислот, из которых построены белки, существуют и другие аминокислоты, не входящие в состав белков, однако играющие важную биохимическую роль. Они могут вести заместители по α -, β -, γ - или δ -положениям.

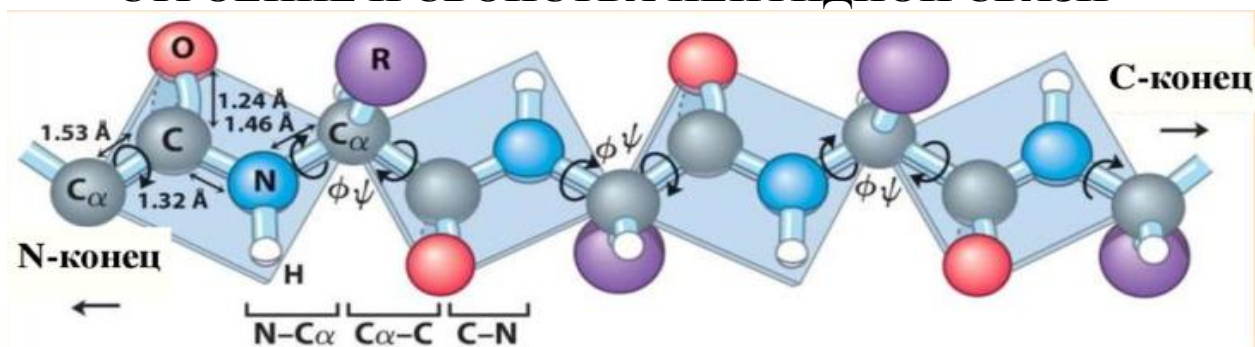
Аминокислоты относятся к гетерофункциональным соединениям, т.е. вещества, проявляющим свойства двух классов соединений. По физическим свойствам аминокислоты резко отличаются от соответствующих кислот и оснований. Все они кристаллические вещества, лучше растворяются в воде, чем в органических растворителях, имеют достаточно высокие температуры плавления; многие из них имеют сладкий вкус. Эти свойства отчётливо указывают на солеобразный характер этих соединений.

Особенности физических и химических свойств аминокислот обусловлены их строением — присутствием одновременно двух противоположных по свойствам функциональных групп: кислотной и основной. Аминокислоты являются амфотерными электролитами. Имея как минимум две диссоциирующие и противоположно заряженные группировки, аминокислоты в растворах с нейтральным значением pH практически всегда находятся в виде биполярных ионов, или *цвиттер-ионов*, в которых противоположные заряды пространственно разделены.

Именно амфотерность аминокислот обуславливает их наиболее характерные свойства.

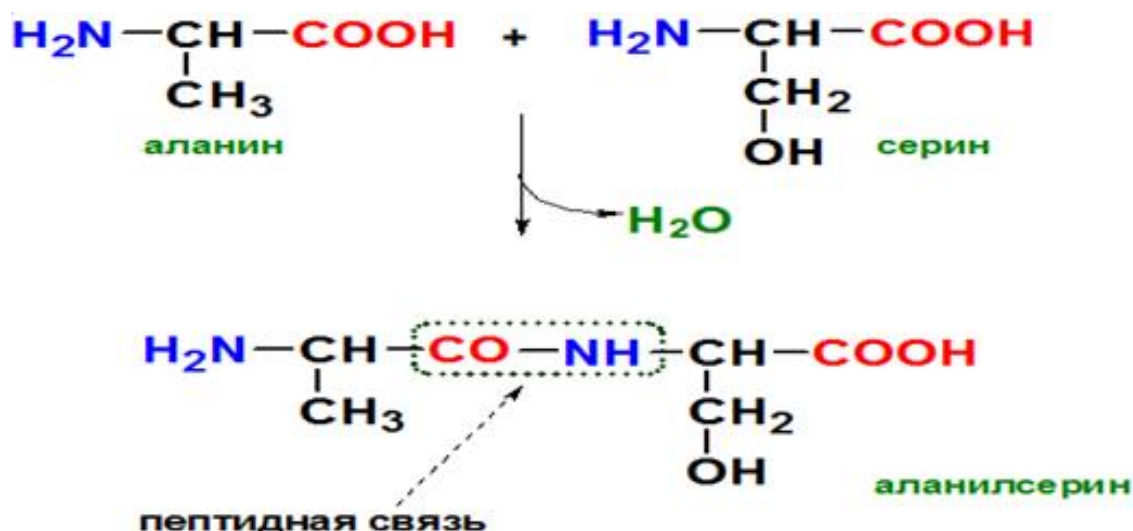
Аминокислоты различаются друг от друга природой радикала. Это разнообразие дает возможность обнаружения большинства аминокислот с помощью цветных реакций. Многие из них весьма чувствительны и высокоспецифичны, что позволяет открывать ничтожные количества той или иной индивидуальной аминокислоты в составе сложных смесей, биологических жидкостях, гидролизатах белков и т. п. некоторые цветные реакции находят применение для количественного определения аминокислот.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ



Аминокислоты способны соединяться между собой связями, которые называются **пептидными**, при этом образуется полимерная молекула.

Пептидная связь – это связь между α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты.

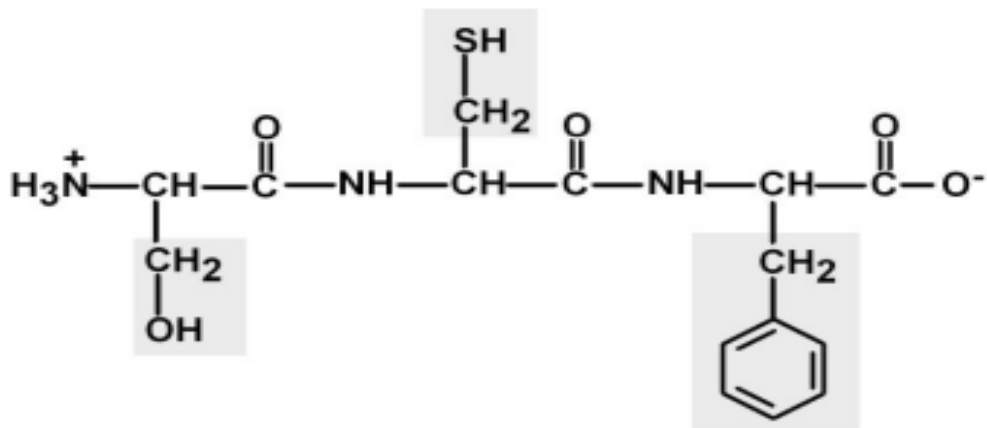


При необходимости назвать пептид ко всем названиям аминокислот добавляют суффикс "-ил", только последняя аминокислота сохраняет свое название неизменным.

Например, **аланил-серил-триптофан** или γ -глутаминил-цистеинил-глицин (по-другому называемый глутатион).

К свойствам пептидной связи относятся:

1. Трансположение заместителей (радикалов) аминокислот по отношению к C-N связи.

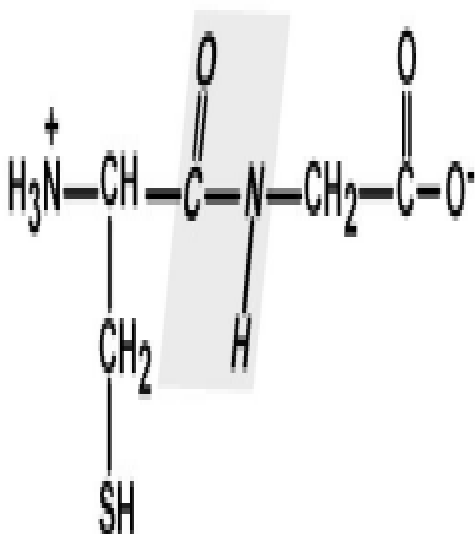


Транс-положение радикалов аминокислот

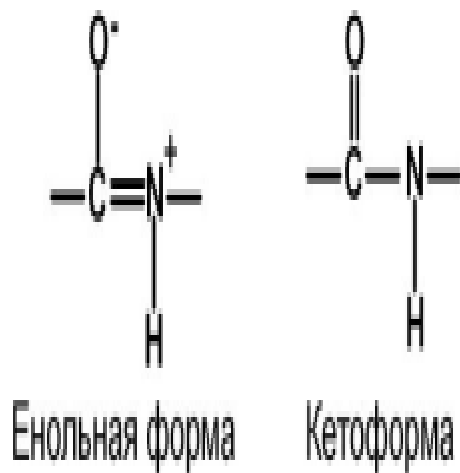
2. Копланарность

Все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости, при этом атомы "Н" и "О" расположены по разные стороны от пептидной связи.

3. Наличие кетоформы и енольной формы.



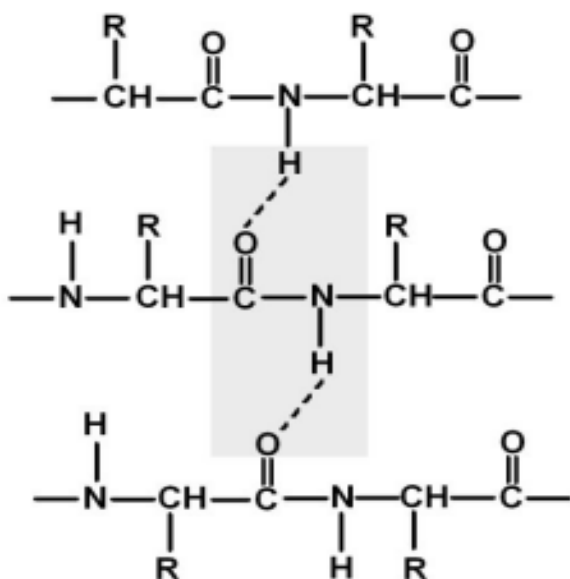
Копланарность атомов пептидной группы



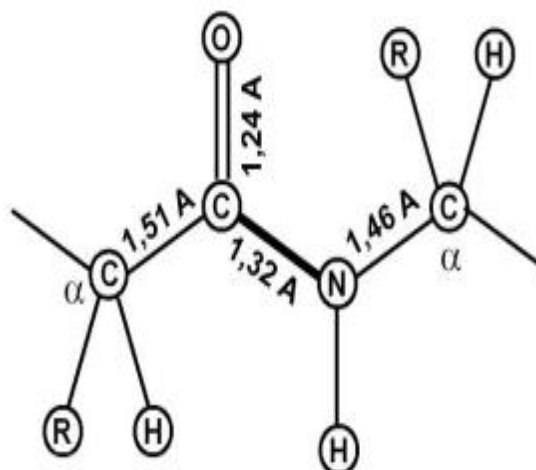
Две формы пептидной связи

4. Способность к образованию двух водородных связей.

Атомы кислорода и водорода, входящие в пептидную группу, обладают способностью образовывать водородные связи с атомами кислорода и водорода других пептидных групп.



Образование водородных связей между даленными пептидными группами



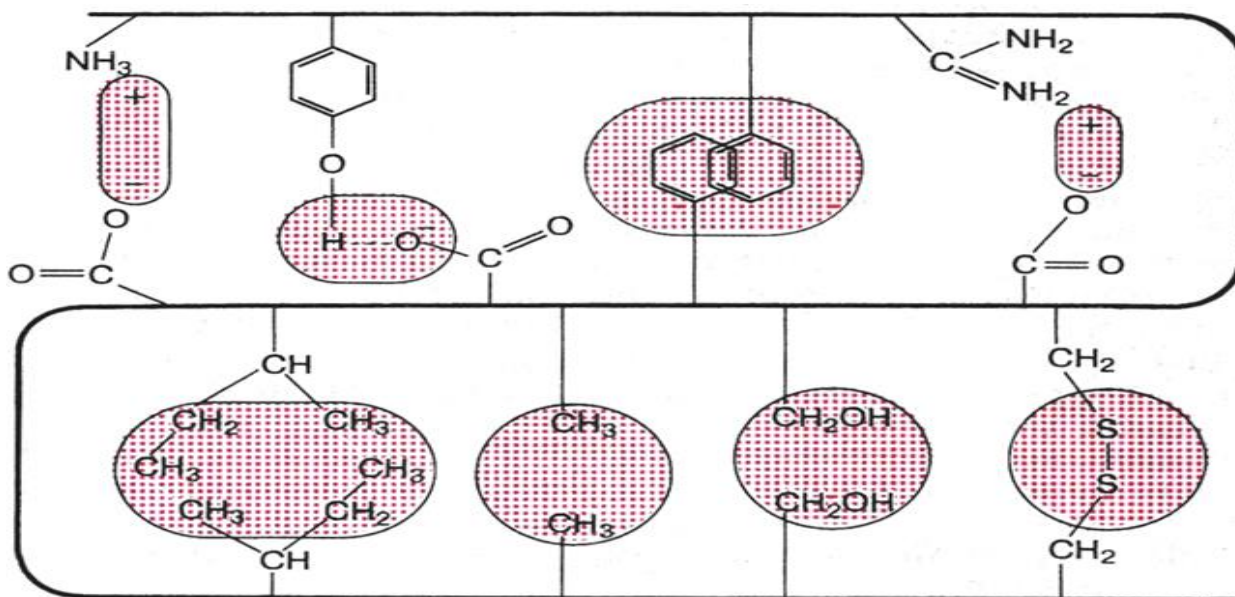
Длина пептидной и других связей в белке

5. Пептидная связь имеет частично характер двойной связи. Ее длина меньше, чем одинарной связи, она является жесткой структурой, и вращение вокруг нее затруднено.

Но так как, кроме пептидной, в белке есть и другие связи, цепочка аминокислот способна вращаться вокруг основной оси, что придает белкам различную конформацию (пространственное расположение атомов).

БЕЛКИ

Белки представляют собой высокомолекулярные полимерные органические соединения, построенные из аминокислот. В природе известно более 500 различных аминокислот, однако белки формируются всего лишь из 20, при этом аминокислоты белков представляют собой α -аминокислоты. Это кислоты, аминированные в α -положении, амина – и карбоксильная группа присоединены к одному и тому же атому углерода, который называют α -углеродом. Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями. Соединение, образованное сравнительно небольшим числом аминокислот, называют пептидом или полипептидом. Если молекулярный вес полипептида достигает или превышает 5000, то говорят собственно о белке.



Химия белка – особая область, которая никогда не была только «химической», а всегда соединяла в себе идеи и методы биологии, медицины, химии и физики. Белки составляют материальную основу химической деятельности клетки. Функции белков в природе универсальны. Среди них различают ферменты, гормоны, структурные (креатин, фиброин, коллаген), транспортные (гемоглобин, миоглобин), двигательные (актин, миозин), защитные (иммуноглобулины), запасные (казеин, яичный альбумин) белки, токсины (змеиные яды, дифтерийный токсин). Названию белки соответствует термин протеины (от греч. *proteios* – первый).

В зависимости от величины молекулярной массы различают пептиды и белки. Пептиды имеют меньшую молекулярную массу, чем белки. В биологическом плане пептиды отличаются от белков более узким спектром функций. Наиболее характерна для пептидов регуляторная функция (гормоны, антибиотики, токсины, ингибиторы и активаторы ферментов, переносчики ионов через мембраны и т.д.). долгое время пептиды считали «осколками» белков, образующимися в организме. Начиная с середины XX в., когда было расшифровано строение, а затем синтезирован первый пептидный гормон – окситоцин, химия пептидов приобрела самостоятельное значение. Большой интерес вызывает недавно открытая группа пептидов головного мозга – нейропептидов. Они влияют на процессы обучения и запоминают, регулируют сон, обладают обезболивающей

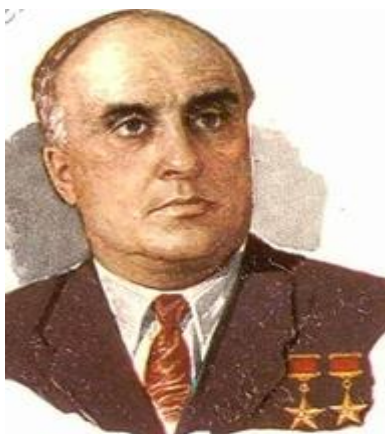
функцией; прослеживается связь некоторых нервно–психических заболеваний, например шизофрении, с содержанием тех или иных пептидов в мозге.

В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении проблемы соотношения структуры и функций белков, механизма их участия в важнейших процессах жизнедеятельности организма, понимании молекулярных основ патогенеза многих болезней.

К числу актуальных проблем современности относится химический синтез белка. Получение синтетическим путем аналогов природных пептидов и белков призвано способствовать решению таких вопросов, как выяснение механизма действия этих соединений в клетке, установление взаимосвязи их активности с пространственным строением, создание новых лекарственных средств, а также позволяет подойти к моделированию процессов, протекающих в организме.

Проблема синтеза белка, кроме того, тесно связана с задачей синтеза полноценных продуктов питания. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), питание более половины населения нашей планеты не может быть признано удовлетворительным из–за недостатка белков. Темпы развития сельскохозяйственного производства не позволяют полностью удовлетворить потребность человечества в белках. Один из путей решения этой проблемы – создание искусственного пищевого белка. В этой области ведутся производство кормовых дрожжей на основе углеводов нефти и отходов промышленности. Полученная белковая масса используется как корм в животноводстве. В решение задачи создания искусственной белковой пищи для человека большой вклад внес академик А.Н. Несмеянов.

Александр Николаевич Несмеянов (1899–1980) – выдающийся советский химик–ограник, основатель новой области химии – элементоорганической химии, президент АН СССР, Герой Социалистического Труда, лауреат Ленинской и Государственной премий СССР, инициатор исследований в области искусственной пищи. Он выполнил ряд основополагающих работ по теории строения и реакционной



способности органических соединений и создал новую дисциплину, лежащую на границе неорганической и органической химии, которая, по его предложению, получила название «химия элементоорганических соединений».

Молекула белка – высокомолекулярное соединение, или биополимер, в котором мономерные единицы – аминокислоты. Эти

мономерные единицы содержат аминогруппу, карбоксильную группу и атом водорода, присоединенные к одному и тому же атому углерода. Однако в различных аминокислотах образующий четвертую связь с центральным атомом углерода атом (или группа атомов) неодинаковы. Из этого следует, что мономерные единицы белка различны, а сами белки – сложные сополимеры. Напомним, что в состав большинства полимеров, созданных человеком, входят мономерные единицы лишь одного вида. Существует около двадцати аминокислот, из которых построены в природе все белковые макромалекулы. Две из них не содержат первичной аминогруппы и представляют собой, таким образом, α -аминокислоты. Эти аминокислоты – пролин и оксипролин – содержат вторичные аминогруппы.

Белок – это последовательность аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Если количество аминокислот не превышает 10, то новое соединение называется пептид; если от 10 до 40 аминокислот – **полипептид**, если более 40 аминокислот – **белок**.

Линейная молекула белка, образующаяся при соединении аминокислот в цепь при помощи пептидных связей, является **первичной структурой**. Образно ее можно сравнить с обычной нитью, на которую навешено до нескольких сотен бусинок двадцати различных цветов (по числу аминокислот). Строение аминокислот, их последовательность и соотношение в **первичной** структуре определяет дальнейшее поведение молекулы: ее способность изгибаться, сворачиваться, формировать те или иные связи внутри себя.

Формы молекулы, создаваемые при свертывании, последовательно могут принимать **вторичный, третичный и четвертичный** уровень организации.

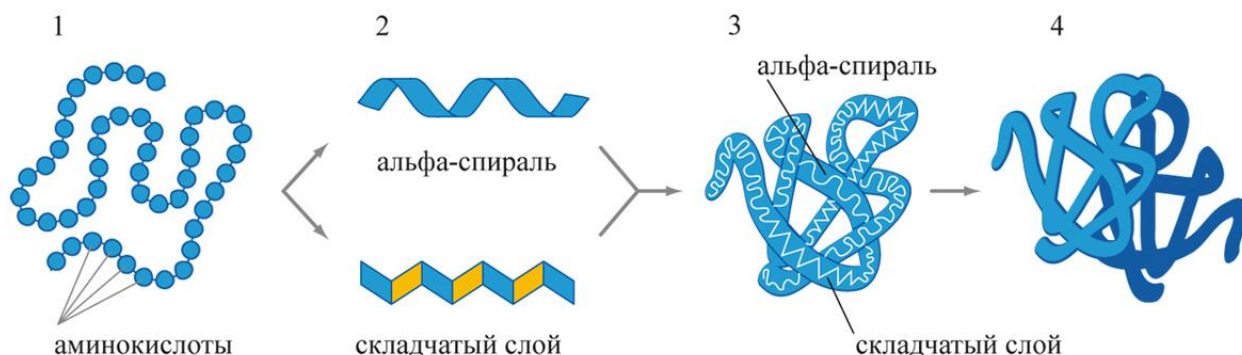


Схема последовательности укладки белков в четвертичную структуру

На уровне вторичной структуры белковые "бусы" способны укладываться в виде спирали (подобно дверной пружине) и в виде складчатого слоя, когда "бусы" уложены змейкой и удаленные части "бус" оказываются рядом.

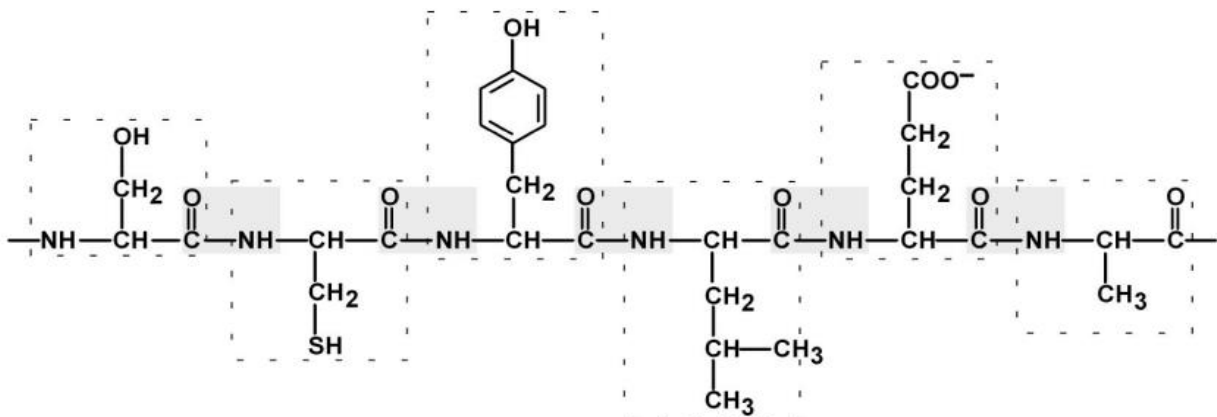
Укладка белка во вторичную структуру плавно переходит в формирование третичной структуры. Третичная структура – это отдельные глобулы, в которых белок уложен компактно, в виде трехмерного клубка.

Некоторые белковые глобулы существуют и выполняют свою функцию не поодиночке, а группами по две, три и более штук. Такие группы образуют четвертичную структуру белка.

Первичная структура

Это последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Учитывая, что в синтезе белков принимает участие 20 аминокислот и средний белок содержит 500 аминокислотных остатков, то можно говорить о невообразимом количестве потенциально возможных белков. В организме человека обнаружено около 100 тысяч различных белков.

Первичная структура белков задается последовательностью нуклеотидов в ДНК. Выпадение, вставка, замена нуклеотида приводит к изменению аминокислотного состава и, следовательно, структуры синтезируемого белка.



Расположение аминокислот в первичной структуре белка

Например, при серповидноклеточной анемии в 6 положении β -цепи гемоглобина происходит замена Глу на Вал. Это приводит к синтезу HbS – такого гемоглобина, который в дезоксиформе полимеризуется и образует кристаллы. В результате эритроциты деформируются, приобретают форму серпа (банана), теряют эластичность и при прохождении через капилляры разрушаются. Это в итоге приводит к анемии, снижению оксигенации тканей и их некрозу.

Если изменение последовательности аминокислот носит не летальный характер, а приспособительный или хотя бы нейтральный, то такой белок может передаваться по наследству и остаться в популяции. В результате возникают новые белки и новые качества организма. Такое явление называется полиморфизм белков.

Последовательность и соотношение аминокислот в первичной структуре определяет формирование вторичной, третичной и четвертичной структур.

Вторичная структура

Вторичная структура – это способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру, при которой аминокислоты взаимодействуют через пептидные группы.

Формирование вторичной структуры вызвано стремлением пептида принять конформацию с наибольшим количеством водородных связей между пептидными группами. Вторичная структура определяется:

- устойчивостью пептидной связи,
- подвижностью С-С связи,
- размером аминокислотного радикала.

Все это вкупе с аминокислотной последовательностью приводит к строго определенной конфигурации белка.

Можно выделить два возможных варианта вторичной структуры: α -спираль (α -структура) и β -структура (β -складчатый слой). Вторичная структура образуется при участии только водородных связей между пептидными группами: атом кислорода одной группы реагирует с атомом водорода следующей, одновременно кислород этой пептидной группы связывается с водородом еще одной и т.д. В одном белке, как правило, одновременно присутствуют α -спираль и β -структура. В глобулярных белках преобладает α -спираль, в фибриллярных – β -складчатый слой.

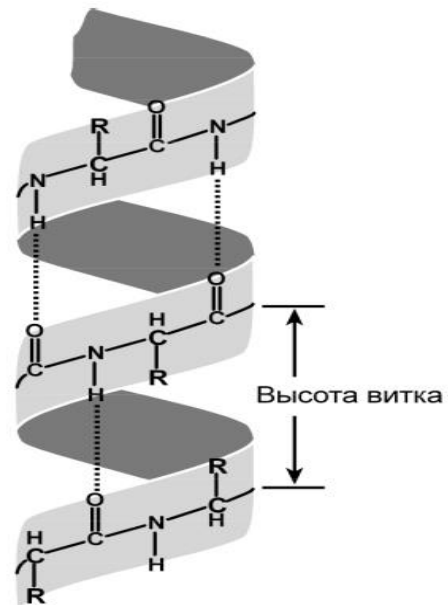
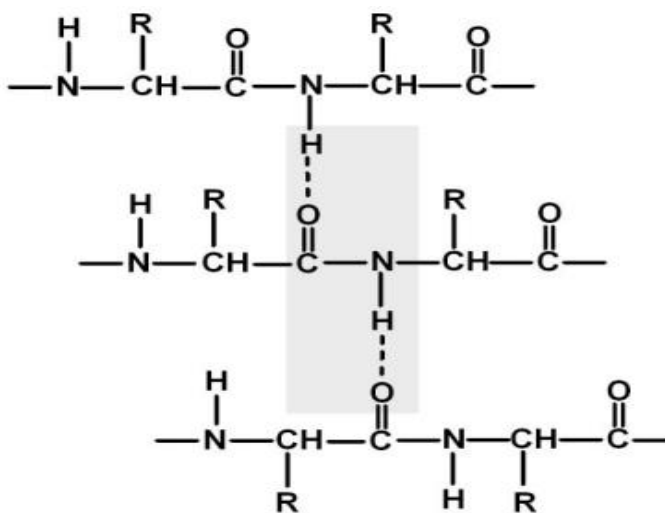
α -Спираль

Правозакрученная спираль, образуется при помощи водородных связей между пептидными группами 1-го и 4-го, 4-го и 7-го, 7-го и 10-го и так далее аминокислотных остатков.

Формированию спирали препятствуют пролин и гидроксипролин, которые обуславливают “перелом” цепи, ее резкий изгиб. Высота витка составляет 0,54 нм и соответствует 3,6 аминокислотных остатков, 5 полных витков соответствуют 18 аминокислотам и занимают 2,7 нм.

β -Складчатый слой

При формировании β -структуры аминокислоты одной белковой цепи взаимодействуют друг с другом при помощи водородных связей между пептидными группами. В этом способе укладки белковая молекула лежит “змейкой”, удаленные отрезки цепи оказываются поблизости друг от друга. В результате пептидные группы ранее удаленных аминокислот белковой цепи оказываются рядом и способны взаимодействовать при помощи водородных связей.

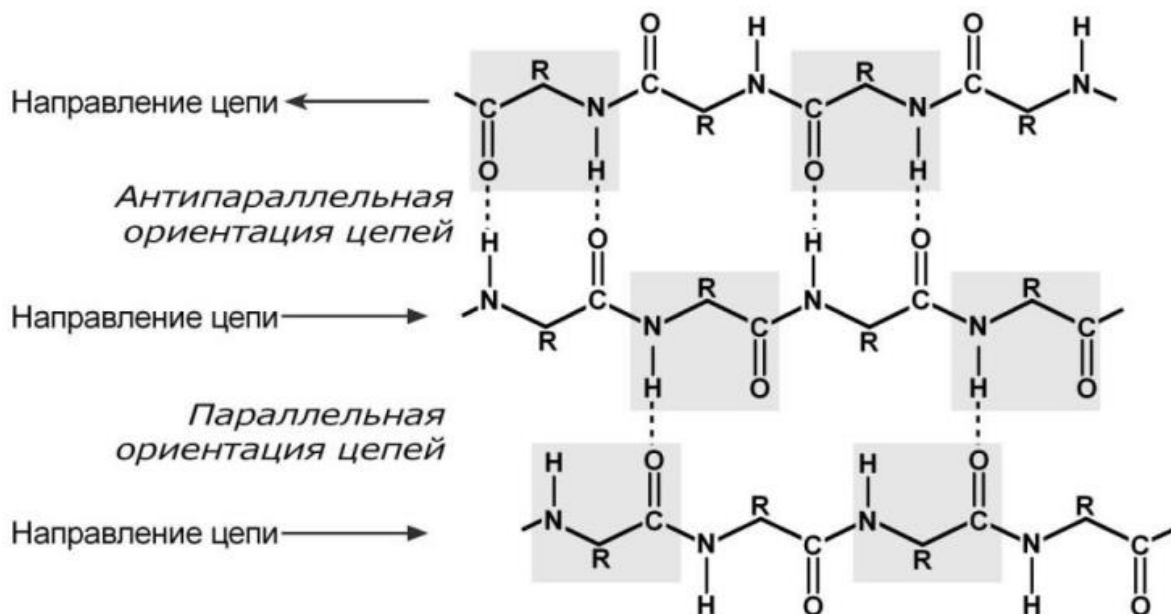


Образование водородных связей между даленными пептидными группами

Укладка белка в виде α -спираль

Ориентация реагирующих участков может быть параллельна (когда соседние цепи идут в одном направлении) или антипараллельна (цепи идут в противоположном направлении).

Таких взаимодействующих друг с другом участков одного белка может быть от двух до пяти.



Укладка белка в виде β -складчатого слоя

Третичная структура

Третичная структура – это укладка полипептидной цепи в глобулу ("клубок"). Четкой границы между вторичной и третичной структурами провести нельзя, в основе третичной структуры лежат стерические взаимосвязи между аминокислотами, отстоящими далеко друг от друга в цепи. Благодаря третичной структуре происходит еще более компактное формирование цепи.

Наряду с α -спиралью и β -структурой в третичной структуре обнаруживается так называемая неупорядоченная конформация, которая может занимать значительную часть молекулы. В разных белках наблюдается разное соотношение типов структур. Например, инсулин содержит 52% α -спирали и 6% β -структуры, трипсин – 14% α -спирали и 45% β -структуры.

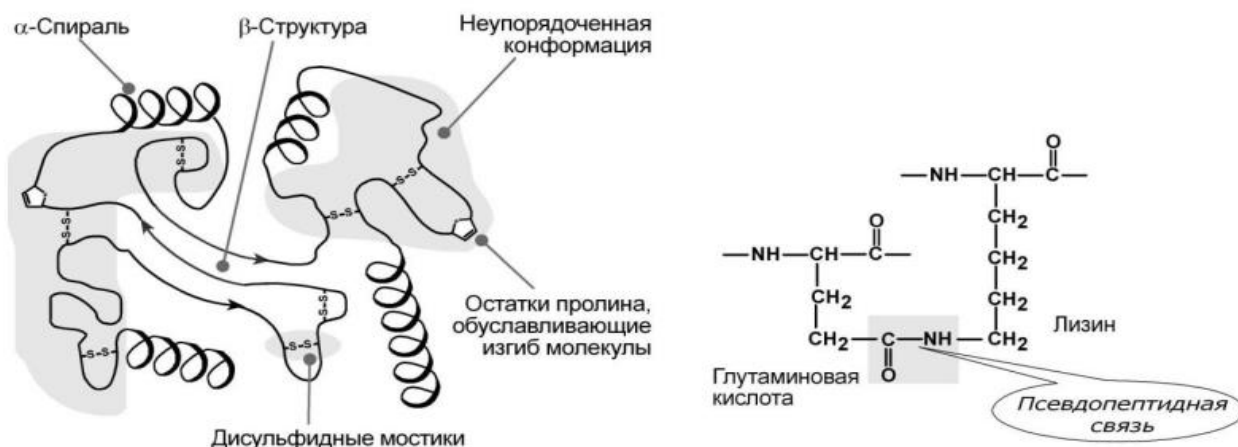


Схема строения третичной структуры белка Образование псевдопептидной связи

Аминокислоты принимают участие в формировании третичной структуры, образуя связи между своими функциональными группами (радикалами):

- водородные – между OH-, COOH-, NH₂-группами радикалов аминокислот,
- дисульфидные – между остатками цистеина,
- гидрофобные – между остатками алифатических и ароматических аминокислот,

- ионные – между COOH-группами глутамата и аспартата и NH₂-группами лизина и аргинина,
- псевдопептидные – между дополнительными COOH-группами глутамата и аспартата и дополнительными NH₂-группами лизина и аргинина.

Четвертичная структура

Если белки состоят из двух и более полипептидных цепей, связанных между собой нековалентными (не пептидными и не дисульфидными) связями, то говорят, что они обладают четвертичной структурой. Такие агрегаты стабилизируются водородными связями, ионными и электростатическими взаимодействиями между остатками аминокислот, находящихся на поверхности глобулы.

Подобные белки называются олигомерами, а их индивидуальные цепи – протомерами (мономерами, субъединицами). Если белки содержат 2 протомера, то они называются димерами, если 4, то тетрамерами и т.д. Например, гемоглобин – белок эритроцитов, переносящий кислород, состоит из 4 гемсодержащих субъединиц – 2 α-субъединицы и 2 β-субъединицы в гемоглобине взрослых, 2 α-субъединицы и 2 γ-субъединицы в фетальном гемоглобине.

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ



ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

В настоящее время основным методом определения содержания белка в пищевых объектах является *метод Кьельдаля*. Он основан на сжигании органических компонентов пищи в колбе Кьельдаля в присутствии серной кислоты. Освобождающийся при этом азот определяют титрованием и по его количеству, используя соответствующий коэффициент, вычисляют содержание белка.

Йохан Кьелдаль родился 16 августа 1849 года в городе Егерсприс. С 1875 года работал в Карлбергской высшей сельскохозяйственной школе и Карлсбергской лаборатории. Изучал ферменты, в частности, инвертин. В 1883 году предложил метод определения содержания азота в органических соединениях. Скончался 18 июля 1900 года в городе Тисвильде. Так же ему принадлежит изобретение колбы Кьельдаля и аппарата Кьельдаля.



Колба Кьельдаля — это стеклянный сосуд грушевидной формы с удлиненной шейкой и цилиндрической горловиной или горловиной со шлифом. Используется в лабораторных работах как приемник при перегонке, всевозможных синтезов органических веществ и анализов, также колба с цилиндрической горловиной применяется для ручного определения азота по Кьельдалю. Принцип действия определения азота по Кьельдалю основан на разложении органического вещества воздействием концентрированной серной кислоты.

При этом азот переходит в аммиак, который взаимодействует с избытком серной кислоты и образует сульфат аммония. Сульфат аммония разлагают действием щелочи, а выделяющийся при этом аммиак титруют серной кислотой. По расходу серной кислоты при титровании вычисляется содержание азота во взятой





навеске. Удлиненное горло колбы Кьельдаля служит воздушным конденсатором, где оседают капли жидкости на этапе разложения исследуемого вещества серной кислотой, также такая форма горловины способствует эффективному процессу дистилляции, на этапе получения аммиака из сульфата аммония.

Метод по Кьельдалю применяется при возникновении разногласий и является самым надежным. Однако многоэтапность и длительность анализа затрудняет его использование для экспресс-анализа, особенно при работе с большим числом проб.

Среди других методов определения белка большое распространение получили *колориметрические методы*. Они основаны на измерении оптической плотности растворов, в которых предварительно проведены цветные реакции с белком. Массовая доля белка пропорциональна интенсивности окраски раствора. Для проведения цветных реакций используют биуретовый метод, с применением реактивов Несслера, Лоури и др. Для определения белка, например в молоке, используют, кроме перечисленных, рефрактометрический метод, метод формольного титрования и другие.

Рефрактометрический метод основан на измерении показателей преломления молока и безбелковой молочной сыворотки, полученной из того же образца молока, разность между которыми прямо пропорциональна массовой доле белка в молоке.

Метод формольного титрования основан на нейтрализации карбоксильных групп моноаминодикарбоновых кислот белков раствором гидроксида натрия, количество которого, затраченное на нейтрализацию, пропорционально массовой доле белка в молоке.

При изучении *физико-химических свойств* белков и их превращений в пищевых системах широко используют методы фракционирования и очистки от небелковых соединений. Они основаны на различиях таких свойств, как размер молекул,

растворимость, заряд и сродство к специфическим химическим группам.

В практике выделения и очистки белков используются различные типы *хроматографии и электрофореза*.

Гомогенность белка определяется на последнем этапе выделения и очистки с применением, по меньшей мере, двух методов, оценивающих то или иное физико–химическое свойство. Наиболее достоверными являются ультрацентрифугирование в градиенте плоскости, диск–электрофорез в полиакриламидном геле, иммунохимические методы и растворимость. Если белок при электрофорезе представлен только одной полосой и обладает при этом максимальной биологической активностью, то он считается гомогенным. Для гомогенного белка на кривой растворимости (зависимости растворённого белка от общего его количества в постоянном объёме растворителя) имеется только один перегиб, тогда как для гетерогенного – столько, сколько в нём индивидуальных компонентов.

Для определения питательной ценности белков используют биологические, химические и ферментативные методы.

Биологические методы дороги в исполнении, требуют длительного времени и большого количества материалов для анализа. Поступивший в организм азот расходуется по двум направлениям: всасывается в пищеварительном тракте, поступает в кровеносную систему (перевариваемый азот) или выбрасывается с фекалиями. Исходя из азотных фракций можно установить различные соотношения, позволяющие охарактеризовать превращение белков в организме.

Для определения степени употребления белков в питании используется несколько критериев:

- *коэффициент переваримости* (КП) характеризует главным образом способность белка распадаться под действием протеолитических ферментов пищеварительного тракта и всасываться через слизистую кишечника;
- *биологическая ценность* (БЦ) учитывает ту часть азота, которая фактически используется; она зависит от сбалансированности изучаемых белков по аминокислотному составу и от

одновременности введения этих метаболитов в кровеносную систему;

– *коэффициент утилитарности белка* (КУБ) – это отношение удержанного азота к азоту, потреблённому с пищей (кормами), т.е. суммарная оценка принимаемой в расчёт биологической ценности и переваримости;

– *коэффициент эффективности белка* (КЭБ) – это отношение прироста массы тела к потреблённому белку.

Химические методы имеют существенные преимущества перед биологическими. Наиболее известные подходы основаны на определении аминокислотного состава, когда выделяются лимитирующие аминокислоты, а затем проводят сравнения со стандартным белком. Далее подсчитывают сумму лимитирующих аминокислот и выражают их в процентах от суммы всех аминокислот либо сравнивают соотношение незаменимых аминокислот с тем же показателем в «идеальном белке».

Ферментативные методы очень популярны, поскольку позволяют искусственно создать условия, максимально приближенные к условиям живого организма.

Известны методы, сочетающие определение состава незаменимых аминокислот гидролизата белка, полученного при его гидролизе пепсином, и осадка, оставшегося нерастворённым после обработки белка пепсином.

Более точными являются методы, использующие сразу несколько ферментов, например, пепсин и трипсин, с аналогичным анализом продуктов гидролиза. Метод заключается в последовательном воздействии на белки вещества исследуемой пробы пищеварительным ферментом *in vitro*. Накопление продуктов гидролиза по какой-либо цветной реакции с последующим колориметрированием, например, по Лоури, выражают в условных единицах (в данном случае микрограммах тирозина в 1 см³ пробы).

Значения переваримости можно также получить взвешиванием остатков переваривания.

Методы осаждения белков

Так как растворимость белков зависит от заряда и наличия гидратной оболочки, то исчезновение одного или обоих этих факторов ведет к осаждению белка.

Денатурация

Денатурация – необратимое осаждение белка из-за разрыва связей, стабилизирующих четвертичную, третичную, вторичную структуры белка, сопровождаемое изменением растворимости, вязкости, химической активности, снижением или полной потерей биологической функции.

1. Физическая денатурация – повышение температуры, ультрафиолетовое и микроволновое излучение, механические воздействия, ионизация заряженными частицами.

2. Химическая:

– кислоты и щелочи образуют водородные связи с пептидными группами,

– органические растворители образуют водородные связи и вызывают дегидратацию,

– алкалоиды образуют связи с полярными группами и разрывают систему водородных и ионных связей,

– тяжелые металлы взаимодействуют с заряженными радикалами, нейтрализуют отрицательные заряды и разрывают систему водородных и ионных связей.

Обратимое осаждение

Обратимость осаждения белков обусловлена сохранением первичной структуры белка. Восстановление физико-химических и биологических свойств белка называется ренативация (ренатурация). Иногда для ренативации достаточно просто удалить денатурирующий объект.

Высаливание

Высаливание – это добавление растворов нейтральных солей (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Анионы (SO_4^{2-}) и катионы (Na^+ , NH_4^+) взаимодействуют с зарядами белка (группы NH_4^+ и COO^-). В результате заряд исчезает, и соответственно, исчезает взаимоотталкивание молекул. Одновременно резко уменьшается гидратная оболочка. Это ведет к "слипанию" молекул и осаждению.

Так как белки плазмы крови отличаются по размерам, заряду, строению, то можно подобрать такие количества соли, которые вызовут осаждение менее устойчивых белков, пока другие еще будут растворены.

Например, подобным образом раньше определяли соотношение альбумины/глобулины в плазме крови. Альбумины, как более полярные молекулы, остаются в растворенном состоянии при 50% насыщении раствора нейтральными солями, в то время как глобулины в этих условиях уже осаждаются. В норме соотношение альбумины/глобулины в плазме крови равно 1,2-1,8.

Осаждение водоотнимающими средствами

При добавлении водоотнимающих средств (ацетон, этанол) происходит отнятие у белка гидратной оболочки, но не заряда. Растворимость несколько снижается, но денатурации не наступает. Например, антисептическое действие этанола.

Изменение рН

Мягкое изменение рН до изоэлектрической точки белка ведет к исчезновению заряда, уменьшению гидратной оболочки и снижению растворимости молекулы.

Свойства белковых растворов

Свойства белковых растворов определяются большими размерами молекул, т.е. белки являются коллоидными частицами и образуют коллоидные растворы. К свойствам коллоидных растворов относятся:

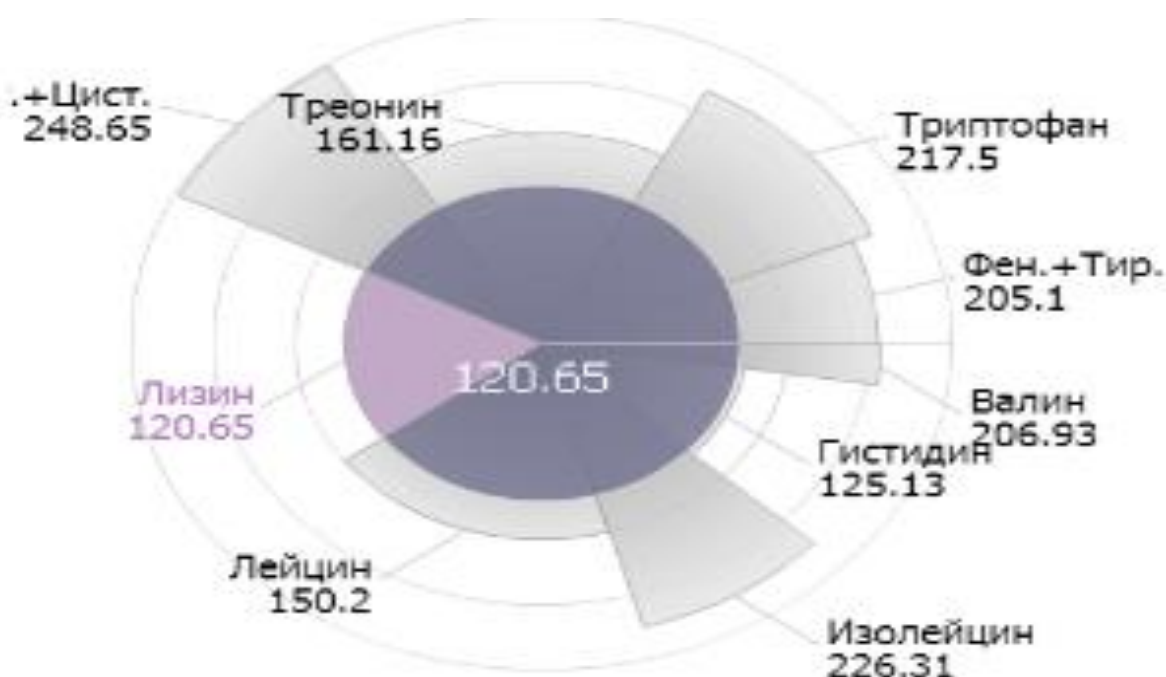
1. Рассеивание луча света, проходящего через белковый раствор, и образование светящегося конуса – эффект Тиндаля.
2. Малая скорость диффузии.
3. Неспособность белковых частиц проникать через полунепроницаемые мембраны (целлофан), т.к. их поры меньше диаметра белков. Это используется в диализе – очистка белковых препаратов от посторонних примесей и лежит в основе работы "искусственной почки" для лечения острой почечной недостаточности.
4. Создание онкотического давления, то есть перемещение воды в сторону более высокой концентрации белка, что проявляется, например, как формирование отеков при повышении проницаемости сосудистой стенки.
5. Высокая вязкость в результате сил сцепления между крупными молекулами, что проявляется, например, при образовании гелей и студней.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ



Качественные цветные реакции можно подразделить на два типа: **универсальные** и **специфические**. К универсальным реакциям относятся те, которые дают окрашивание в присутствии любых белков. Специфические реакции доказывают наличие какой-то определенной аминокислоты.

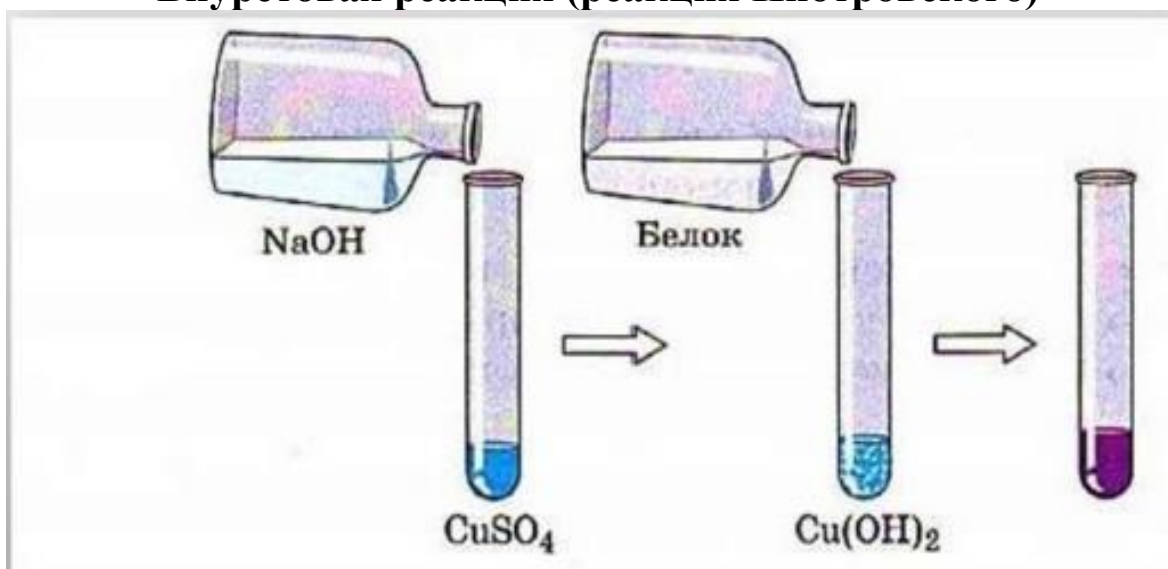
Все качественные реакции можно наблюдать на примере раствора яичного белка, представляющего собой многокомпонентную смесь аминокислот:



Оборудование, реактивы: Встряхиватель, баня водяная, термометр лабораторный, фильтры бумажные, марля, колбы конические на 250 мл, набор пробирок стеклянных химических, пипетки, цилиндры, стаканы стеклянные лабораторные с носиком

на 100 и 250 мл, воронки стеклянные, лакмусовая бумага, свежее яйцо, свежее говяжье мясо, молоко, пшеничная мука, хлорид натрия (10%-ный), сульфат аммония (насыщ.), гидроксид натрия (10%-ный и 30%-ный), сульфат меди (1%-ный), нингидрин (0,5 и 1%-ный) в этаноле (95%-ном), α -нафтол (0,1 и 0,2%-ный спиртовой раствор), ледяная уксусная кислота, серная, соляная и азотная кислоты (конц.), желатина (раствор 1%), формальдегид (2,5%-ный), нитрит натрия (0,05%-ный и 0,5%-ный), сульфаниловая кислота (1%-ная), карбонат натрия (10%-ный), соляная кислота (5%-ная).

Обнаружение в молекулах белков пептидных связей Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)



В щелочной среде в присутствии солей меди растворы белка приобретают фиолетовый цвет с красным или синим оттенком, зависящим от количества пептидных связей в молекуле белка. Такую реакцию дают все белки, а также продукты их неполного гидролиза — пептоны и полипептиды, содержащие не менее двух пептидных связей. Биуретовая реакция обусловлена наличием в белке пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с сернокислой медью окрашенные комплексы.

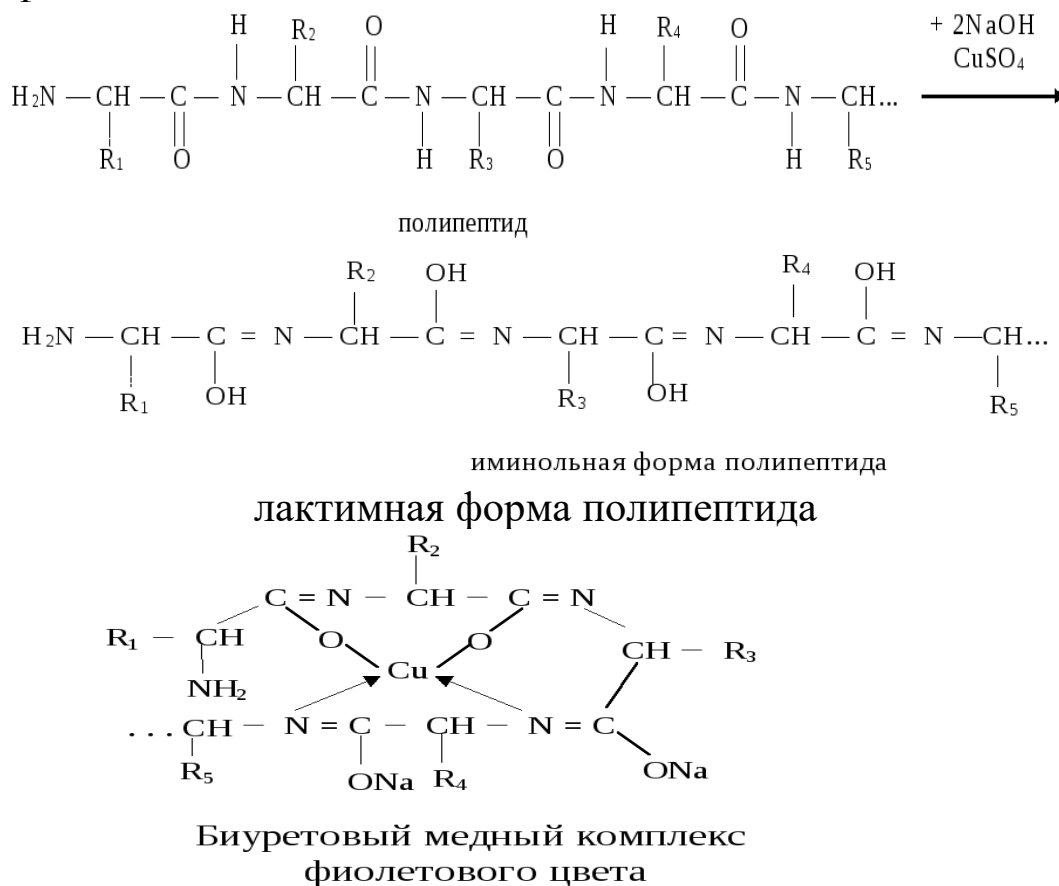
Группа, образующая пептидную связь ($-\text{CO}-\text{NH}-$), в щелочной среде присутствует в своей таутомерией енольной форме.

При избытке щелочи происходит диссоциация OH -группы, появляется отрицательный заряд, с помощью которого кислород

взаимодействует с медью, возникает солеобразная связь, кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путем использования их неподеленных электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен. Интенсивность окраски комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе. Биуретовую реакцию дают также некоторые небелковые вещества, например, биурет ($\text{NH}_2\text{—CO—NH—CO—NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2\text{—CO—CO—NH}_2$), ряд аминокислот (гистидин, серии, треонин, а также аспарагин).

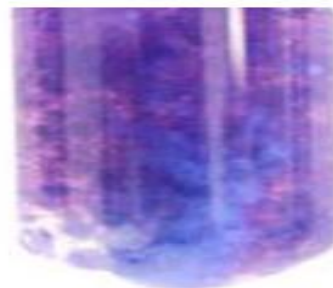
Ход работы.

В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель приготовленных растворов. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 10% раствора едкого натра и по 1 капле 1% раствора сульфата меди.



При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи 1 мл 1%–

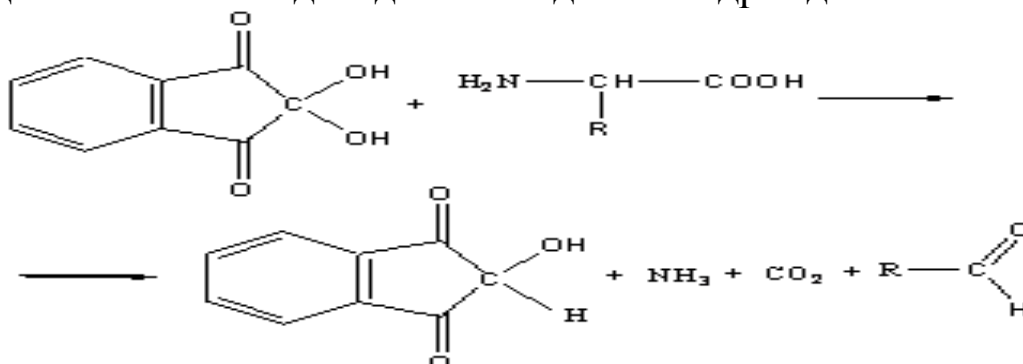
ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.



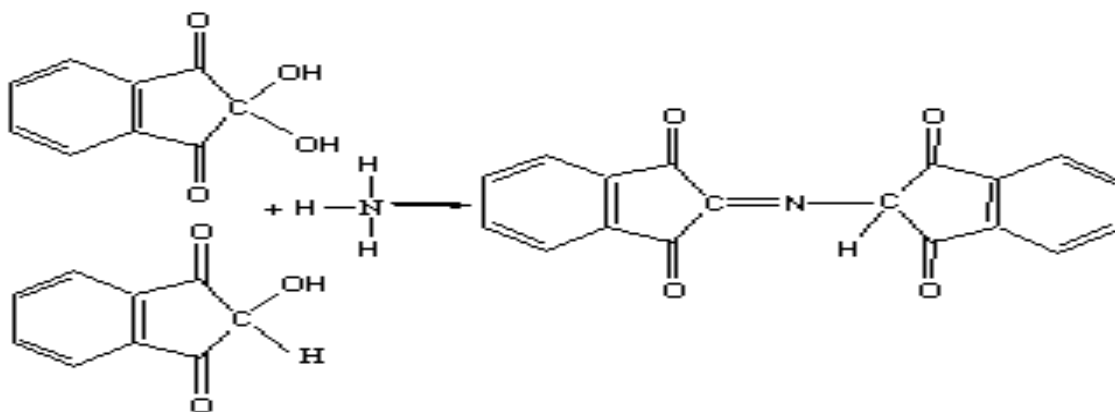
Нингидриновая реакция на α -аминогруппу

Белки, полипептиды, а также свободные α -аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином (трикетогидринденгидратом). Реакция характерна для аминогрупп в α -положении и обусловлена наличием α -аминокислот в молекуле белка.

Сначала в результате взаимодействия аминокислоты с нингидрином возникает Шиффово основание. Затем оно претерпевает перегруппировку, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден.



Аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина, и образовавшееся соединение, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, получившую название «Сине-фиолетовый Руэмана», по имени исследователя, впервые в 1910 г изучившего эту реакцию.



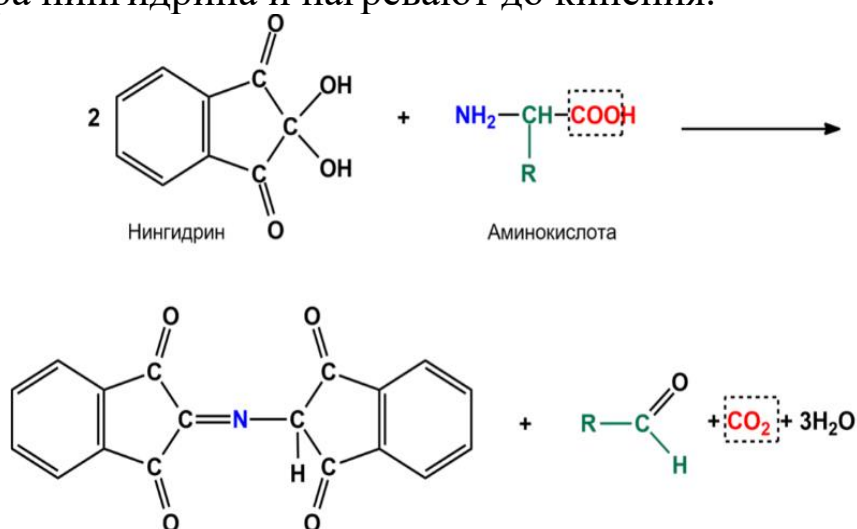
В присутствии органических растворителей (аcetона, этанола, пиридина и др.), на которых обычно готовят раствор нингидрина, протекает реакция.

Продукт этой реакции содержит в своем составе радикал (R) исходной аминокислоты, который обуславливает различную окраску (голубую, красную и т. п.) соединений, возникших при реакции аминокислот с нингидрином.

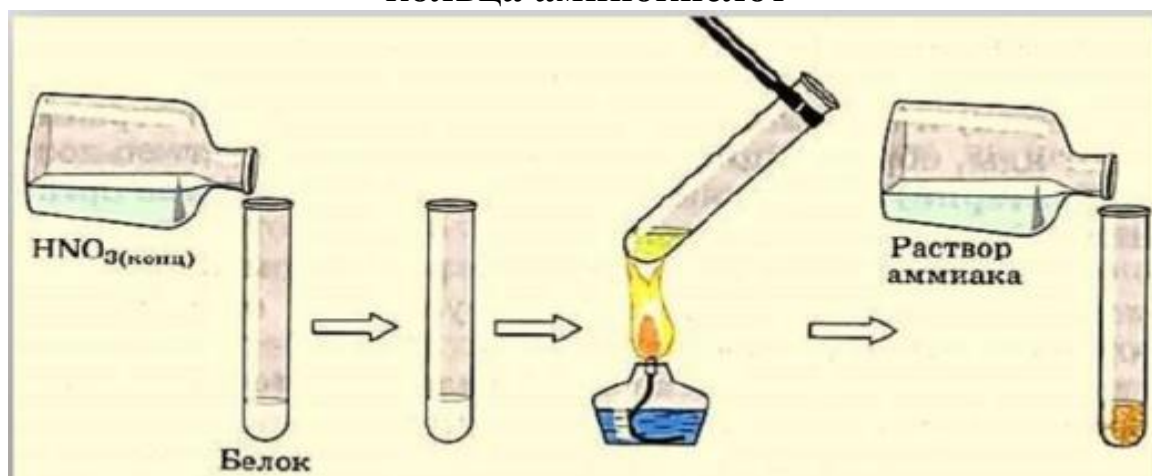
Нингидриновую реакцию широко используют в хроматографии для выявления аминокислот. Их количественное определение в автоматических анализаторах проводят путем измерения окраски, возникающей при взаимодействии последовательно вкделяющуихся с хроматографической колонки аминокислот с нингидрином

Ход работы.

В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель приготовленных растворов. В каждую пробирку добавляют по 3 капли 0,5% раствора нингидрина и нагревают до кипения.

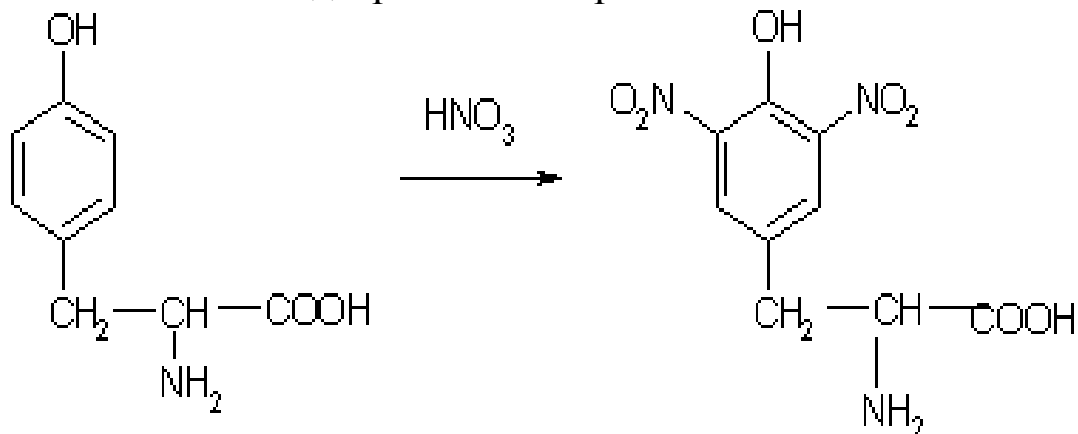


Ксантопротеиновая реакция на ароматическое кольцо аминокислот



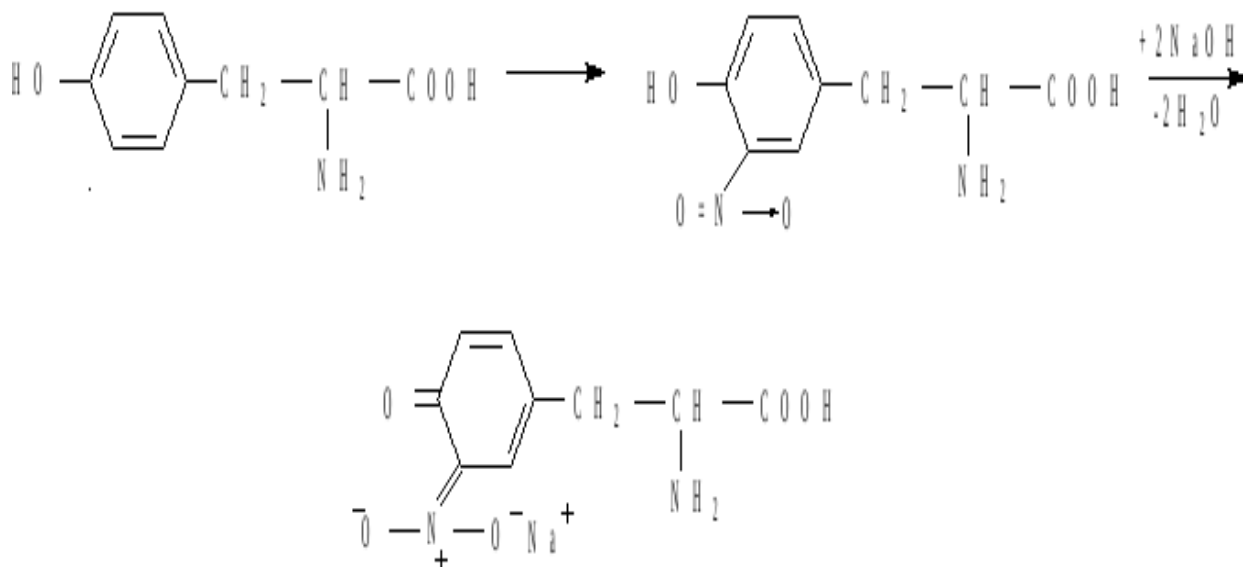
При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты белок сначала выпадает в осадок, а затем при нагревании растворяется и жидкость окрашивается в желтый цвет. Эта реакция называется ксантопротеиновой, она указывает на присутствие в белке ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана) и основана на образовании нитропроизводных этих аминокислот.

Реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот, которые при обработке концентрированной азотной кислотой подвергаются нитрованию:



Желтое окрашивание можно наблюдать при попадании крепкой азотной кислоты на кожу, ногти, шерсть и т. д.

Нитропроизводные аминокислот в щелочной среде образуют соли хиноидной (хромофорной) структуры,

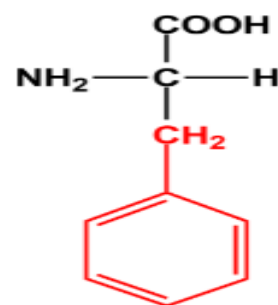


окрашенные в оранжевый цвет.

Аналогично протекает реакция нитрования триптофана и фенилаланина (последний нитруется труднее).

Ход работы.

В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель приготовленных растворов. В каждую пробирку добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка, и (осторожно!) нагревают. При нагревании раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет, при этом осадок почти полностью растворяется. Пробирки охлаждают, после этого в них осторожно добавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака или 30% раствора едкого натра.



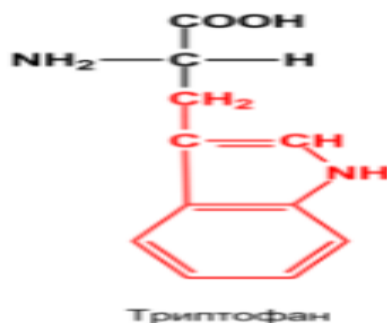
Фенилаланин

Реакция Шульца–Распайли на триптофан

Реакция Шульца–Распайли (аналогично проводится реакция Адамкевича, только с добавлением глиоксиловой кислоты) – является специфической реакцией на аминокислоту триптофан – взаимодействие раствора яичного белка с 10% раствором сахарозы и равным объемом концентрированной . На границе двух жидкостей образуется *красно–фиолетовое кольцо* (при нагревании на водяной бане реакция идет быстрее – главное не смешивать жидкости).

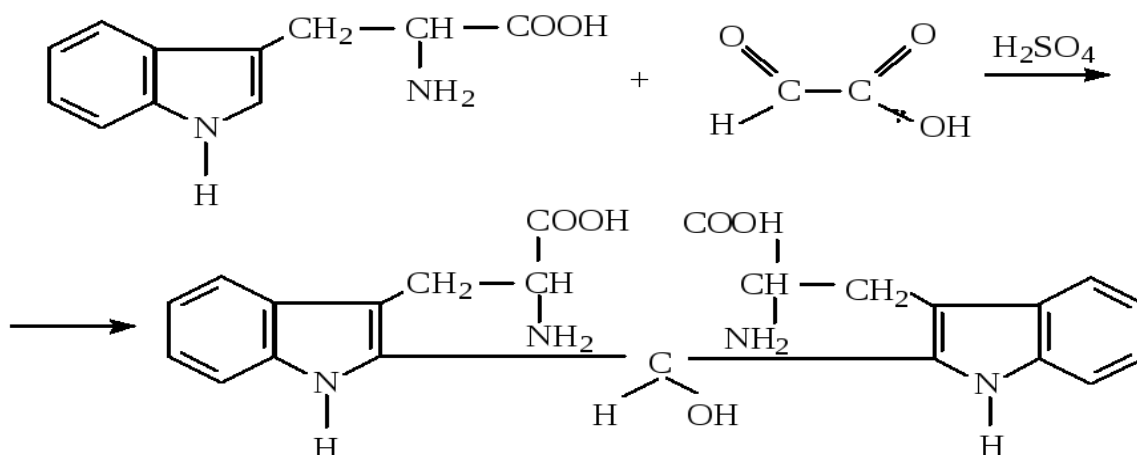
Ход работы.

К 1–2 мл раствора белка добавляют 6 капель раствора сахарозы и по стенкам пробирки осторожно наслаивают 1 мл концентрированной H_2SO_4 . На границе раздела жидкостей появляются кольца темно–красного цвета.



Реакция Адамкевича на триптофан

При добавлении к раствору белка незначительных количеств глиоксиловой кислоты в присутствии крепкой серной кислоты получается красно–фиолетовое окрашивание. Эта реакция связана с присутствием в молекуле белка аминокислоты триптофана и основана на способности триптофана в кислой среде вступать в реакцию с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.



Глиоксиловая кислота всегда присутствует в небольших количествах в ледяной уксусной кислоте, поэтому последнюю используют в реакции как источник глиоксиловой кислоты. Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты. Продукт конденсации окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли.

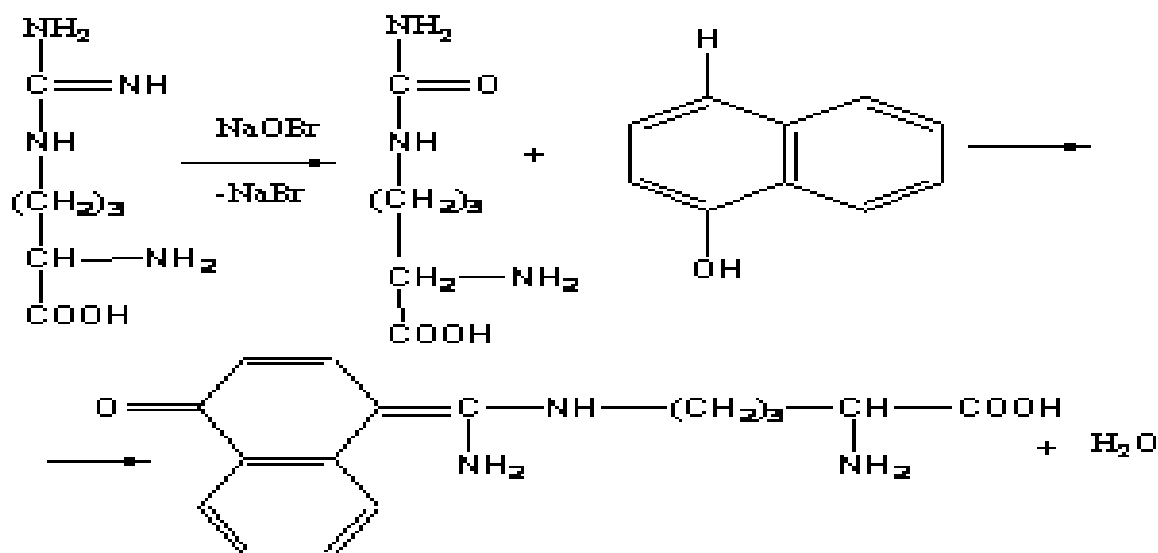
Ход работы.

В пробирку с двумя каплями свежего неразбавленного яичного белка добавляют 10 капель концентрированной уксусной кислоты и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего содержимое пробирки охлаждают. Очень аккуратно по стенке, наклонив пробирку, подслаивают (следя чтобы жидкости не смешивались) концентрированную H_2SO_4 . На границе двух слоев возникает характерное окрашенное кольцо.

Реакция Сакагучи на аргинин

Эта реакция обнаруживает в белке аминокислоту аргинин, которая в присутствии гипобромита ($NaBrO$) теряет аминогруппу, а продукт окисления конденсируется α -нафтолом, образуя вещество красного цвета.

Происходящие при этом реакции можно представить следующей схемой:

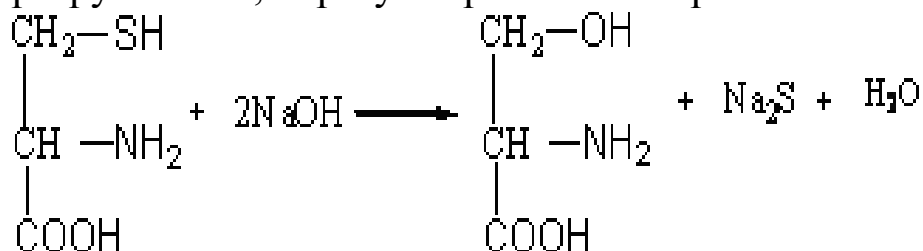


Ход работы.

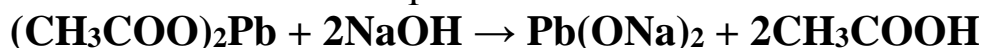
К 1 мл раствора белка добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора едкого натра, 0,5 мл 0,1%-ного раствора α -нафтола и содержимое пробирки перемешивают. Добавляют 0,5 мл раствора гипобромита натрия и наблюдают появление продукта конденсации красного цвета.

Реакция Фоля на серосодержащие аминокислоты

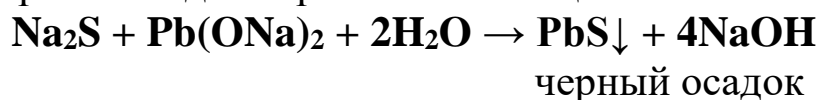
При добавлении к раствору белка крепкой едкой щелочи, уксуснокислого свинца и последующем кипячении раствор начинает темнеть. Реакция обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот: цистина, цистеина и метионина. Эти аминокислоты при нагревании в присутствии крепкой щелочи разрушаются, образуя сернистый натрий:



Уксуснокислый свинец реагирует со щелочью с образованием плюмбита натрия:

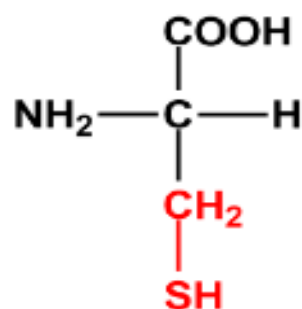


Сернистый натрий при взаимодействии с плюмбитом образует черный осадок сернистого свинца.



Ход работы.

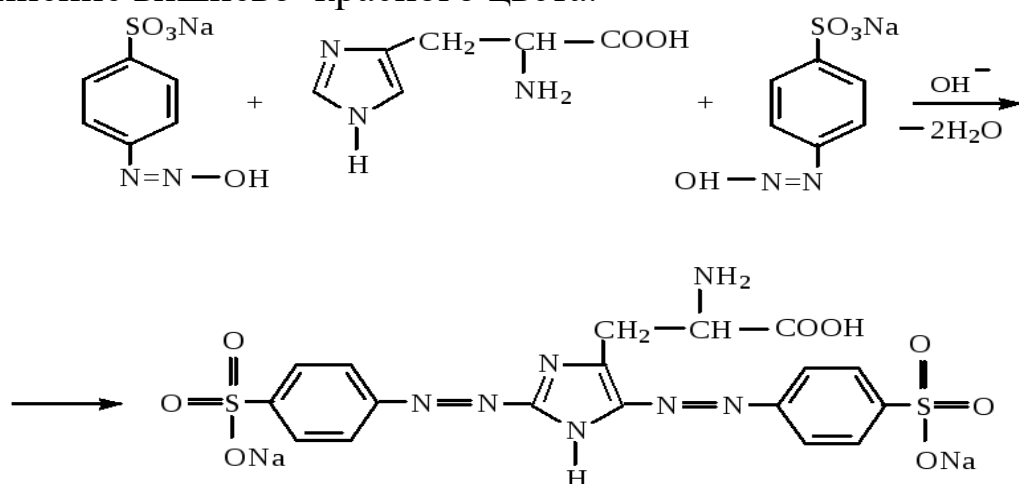
В пронумерованные пробирки наливают по 5 капель приготовленных растворов. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30% раствора едкого натра и по 1 капле 5% раствора уксуснокислого свинца. При интенсивном кипячении жидкость, содержащая серосодержащие аминокислоты, темнеет, образуя черный осадок сернистого свинца.



Цистеин

Реакция Паули на гистидин и тирозин

При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия осуществляется реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота. При реакции последней с гистидином образуется соединение вишнево-красного цвета.



Ход работы.

К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты приливают 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита натрия, сильно встряхивают и немедленно добавляют сначала 2 мл разбавленного раствора белка, а затем, после перемешивания содержимого, пробирки, 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После смешивания растворов развивается вишнево-красное окрашивание.

Реакция Вуазене

Реакция Вуазене протекает только с теми белками, которые содержат в своем составе триптофан. Химизм ее аналогичен химизму реакции Адамкевича (Гопкинса – Коле), и в том, и в другом случае в конденсацию с триптофаном вступает формальдегид.

Ход работы.

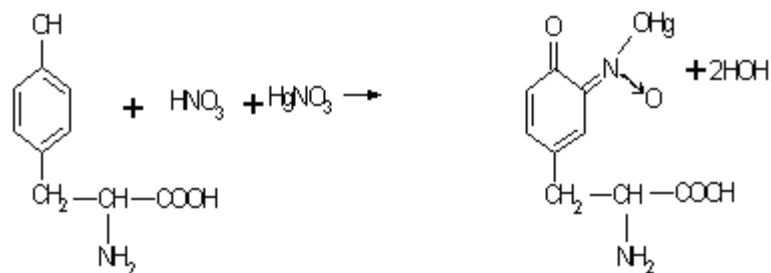
К 2 мл разбавленного раствора белка в пробирке добавляют одну каплю 2,5%-ного раствора формальдегида. Смешивают и прибавляют 6 мл чистой концентрированной соляной кислоты (плотность не менее 1,175), после чего снова перемешивают. Через 10 мин прибавляют при взбалтывании 10 капель 0,5%-ного раствора нитрита натрия. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание.

Реакция Миллона

Реакция Миллона характерна для белков, содержащих ароматическую аминокислоту тирозин.

При взаимодействии раствора белка с реактивом Миллона (p-p азотнокислой ртути в концентрированной HNO₃) образуется белковый осадок, который при нагревании окрашивается в красно-коричневый цвет.

Реакция вызвана присутствием в белке фенольной группы тирозина, после взаимодействия с реактивом Миллона образуется ртутная соль нитропроизводного.



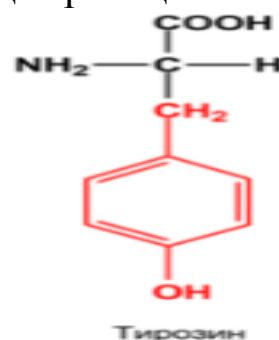
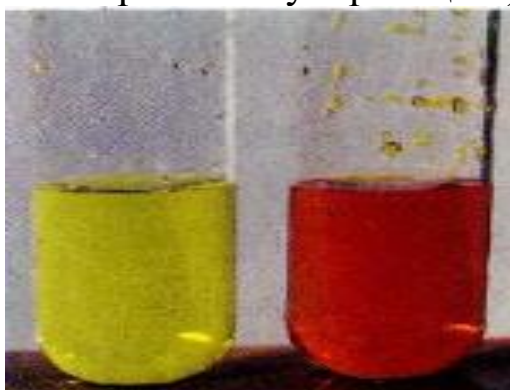
Тирозин Ртутная соль нитротирозина

Реакцию Миллона дают все белки, за исключением тех, молекулы которых не содержат тирозина (желатин, клупеин и др.).

Реактив Миллона дает окрашивание почти со всеми фенолами.

Ход работы.

К раствору белка 1–2 мл прилить 5–6 капель реактива Миллона. Осадок белка при нагревании окрашивается в красно–коричневый цвет, вследствие образования ртутной соли нитротирозина. Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, поскольку он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.



Результаты работы оформляют в виде таблицы 1.

Таблица 1. Цветные реакции на аминокислоты и белки

Название реакции	Исследуемый материал	Употребляемые реактивы	Наблюдаемая окраска	Чем обусловлена реакция?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Наиболее характерными физико–химическими свойствами белков являются высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, способность к поглощению УФ–лучей при 280 нм (обусловленное наличием в белках ароматических аминокислот).

Белки — высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых колеблется от 6 000 до 1 000 000 Дальтон и выше.

Современные методы исследования позволили установить существование в природе глобулярных (шарообразных) и фибриллярных (нитевидных) белков. Благодаря применению методов сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (0,2–0,3 нм) удалось расшифровать не только полную пространственную структуру, соответственно форму, но и степень асимметричности белковых молекул. Оказалось, что даже глобулярные белки крови (гемоглобин, альбумины, глобулины) являются асимметричными.

Физико–химические свойства белков зависят главным образом от свойств радикалов аминокислот, входящих в его состав, а также от количества свободных функциональных групп. Белки являются амфотерными электролитами, так как в их молекуле присутствуют как кислые, так и основные группы. Кислотноосновные свойства белков определяются главным образом боковыми радикалами аминокислот, способными к ионизации. Вклад концевых амина– и карбоксильных групп крайне незначителен. Величины pK боковых радикалов аминокислот в составе белков несколько отличаются от таковых в свободных аминокислотах, поскольку степень ионизации групп в белках зависит от природы соседних боковых радикалов, т. е. от электростатического окружения. Присутствие диссоциирующих группировок в белках обуславливает определенный суммарный заряд молекулы, зависящий от pH среды. Большинство природных белков относится к кислым благодаря значительному содержанию дикарбоновых кислот и поэтому при pH , близких к нейтральным, имеют отрицательный заряд (как и цитоплазма).

Для каждого белка существует такое значение активной реакции среды, при котором положительные и отрицательные заряды в молекуле скомпенсированы. Значение рН, при котором белок не несет суммарного заряда и не движется в электрическом поле, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ) и обозначают как pI . Величины ИЭТ определяют при кислотно–основном титровании белкового раствора, а также при изоэлектрофокусировании белка. Для большинства глобулярных белков ИЭТ лежат в кислой области (4,5–6,5). Однако есть и исключения, например, пепсин имеет pI около 1, лизоцим — pI около 11.

Поскольку в ИЭТ молекула белка не имеет суммарного заряда и между соседними молекулами отсутствует электростатическое отталкивание, белки легко осаждаются из растворов при рН, равном их pI .

Изоэлектрическую точку белка следует отличать от изоионной точки, так как эти величины не всегда совпадают. *Изоионной точкой белка* называют то значение рН, при котором число протонов, связанных с основными группами, равно числу протонов, отданных диссоциированными кислотными группами в белковой молекуле. Таким образом, изоионной точке соответствует значение рН, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен нулю в условиях полного отсутствия электролитов в растворе.

подавляющее большинство белков — гидрофильные вещества, хорошо растворяющиеся в водных растворах. Растворимость белков определяется природой тех групп, которые оказываются на поверхности молекулы при ее пространственной укладке в нативную конформацию. Большая часть поверхности белковой молекулы образована гидрофильными группами ($-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-NH_2$). Растворимость белков в воде возрастает при добавлении небольших концентраций нейтральных солей. Нейтральные соли в малых концентрациях увеличивают степень диссоциации ионизированных групп белка, экранируют заряженные группы белковых молекул и тем самым уменьшают белок–белковое взаимодействие. Высокие концентрации нейтральных солей осаждают (высаливают) белки из водных растворов, наиболее активно это происходит в ИЭТ белка.

Растворимость белка также зависит от рН растворителя, его состава, температуры.

В растворах белки проявляют коллоидные свойства: они медленно диффундируют, не проходят через полупроницаемую мембрану, рассеивают свет, характеризуются высокой вязкостью. Однако следует иметь в виду, что белковые растворы не являются типичными коллоидными растворами, т.к. белки диспергированы до единичных молекул и образуют гомогенный раствор. Растворы белков, как и типичные коллоидные растворы, могут при определенных условиях терять свою текучесть и образовывать гели. Полагают, что в ряде растительных и животных тканей белки находятся в виде гелей (в протоплазме клеток, хрусталике глаза, соединительных тканях и др.). При подготовке растений к зиме происходит переход части белков из растворенного состояния в гелеобразное.

Благодаря гидрофильным и гидрофобным группировкам белки могут влиять на растворимость других веществ, выступая в роли эмульгаторов. В организме человека в эмульгированном состоянии находятся жиры в крови и лимфе. Белок образует на поверхности капелек жира тонкую пленку, которая притягивает воду и препятствует слипанию жировых частичек.

Характерным свойством белков является их способность к денатурации. Под денатурацией белка понимают любые вызванные физическими и химическими воздействиями изменения, которые при сохранении первичной структуры сопровождаются большей или меньшей потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белков. Таким образом, под денатурацией следует понимать нарушение уникальной структуры нативной молекулы белка, вызванной ослаблением гидрофобных взаимодействий, разрывом водородных связей, а в присутствии восстановителей и разрушением дисульфидных связей. Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости особенно в изоэлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных HS-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря его биологической

активности (каталитической, гормональной, защитной и других). Физически денатурация может быть вызвана механическими (сильное перемешивание, встряхивание) или физическими воздействиями (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское, радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и абсорбция на границе раздела). Химическая денатурация достигается прежде всего с помощью соединений, разрывающих водородные связи (6–8 М раствор мочевины, 4 М раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами ($3 < \text{pH}$).

Реактивы: яичный белок, вода дистиллированная, насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, концентрированный HNO_3 , NaCl , спирт этиловый, ацетон, 5 % раствор ацетата свинца, 1 % раствор сульфида меди, 5 % раствор нитрата серебра, конц. HCl , конц. H_2SO_4 , конц. HNO_3 , 1 % раствор уксусной кислоты, насыщенный раствор танина, 5 % раствор железосинеродистого калия, формалин, водный раствор, содержащий 37–40% формальдегида и 6–15% метилового спирта (стабилизатор), формальдегид (муравьиный альдегид, метаналь) HCHO .

Высаливание белков

Белки как высокомолекулярные вещества образуют коллоидные растворы. Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных групп (несущих заряд или незаряженных) в аминокислотах, входящих в состав белка. Также имеет значение у молекул одноименного суммарного заряда и форма молекул (отношение их длинной и короткой осей). Воздействия, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют и ее растворимость.

Высаливание – обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью концентрированных растворов солей: NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 .

При высаливании происходит дегидратация макромалекул белка и устранения их заряда. На процесс высаливания влияет гидрофильность, относительная молекулярная масса и заряд белка, поэтому для высаливания различных белков требуется

разная концентрация одних и тех же солей. Альбумины осаждаются в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а глобулины – в полунасыщенном $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, так как относительная молекулярная масса глобулинов больше, чем альбуминов.

Высаливание белков является обратимой реакцией, так как осадок белка может вновь растворяться после уменьшения концентрации солей путем диализа или деления водой.

Ход работы.

К 0,5 мл неразбавленного яичного белка прибавляют 2,5 мл воды. При этом образуется небольшое количество белого хлопьевидного осадка глобулинов. В пробирку наливают несколько капель насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, выпадает осадок глобулинов, который удаляется фильтрованием. К фильтрату добавляют кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, до полного насыщения. При этом выпадает осадок альбуминов. Он также отфильтровывается. С фильтратом следует сделать пробу на полноту осаждения белка с помощью конц. HNO_3 .

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

Осаждение хлористым натрием и серноокислым магнием

В две пробирки наливают приблизительно по 3 мл белка. Прибавляют до полного насыщения в одну пробирку только измельченный хлористый натрий, в другую – серноокислый магний. Через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтратах остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок даже при полном насыщении NaCl и MgCl_2 . К фильтрату прибавляют несколько минут альбумины отфильтровывают. Проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

Осаждение белков

Денатурация белков (необратимое осаждение) сводится к разрушению структуры белка и потере им биологических свойств. При необратимых реакциях осаждения белки

претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворены в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков спиртом, ацетоном

Продолжительный контакт белка со спиртом ведет к необратимому осаждению, денатурации, в результате этого выпадает хлопьевидный осадок белка вследствие дегидратации белковых молекул при добавлении спирта.

Под денатурацией понимают утрату трехмерной конформации, присущей данной белковой молекуле. Это изменение может носить временный или постоянный характер, но и в том, и в другом случае аминокислотная последовательность белка остается неизменной. При денатурации молекула разворачивается и теряет способность выполнять свою обычную биологическую функцию.

Реакция осаждения белка спиртом или кратковременным действием спирта обратима при охлаждении. Если осадок быстро отделить от спирта, то белок может сохранить нативное состояние.

Ход работы.

а) В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют немного кристаллического хлорида натрия, приливают туда же постепенно 3–4 мл этилового спирта и сильно взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка.

б) В пробирку наливают 1 мл раствора белка, по стенке осторожно добавляют 0,5 мл ацетона, на границе соприкосновения обеих жидкостей появляется белое кольцо денатурированного белка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Осаждение белков солями тяжелых металлов в отличие от высаливания происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке

этих солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но нерастворимые в воде. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка. Если при разбавлении осадок не растворяется, значит, реакция практически необратимая. Ионы металлов, способные образовывать нерастворимые соединения с белками, для нас являются токсичными.

Таким образом, соли тяжелых металлов: Hg, Ag, Cu, Pb и т.д. вызывают необратимое осаждение белков, образуя с ними нерастворимые в воде соединения.

Однако при избытке некоторых солей наблюдается растворение первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле.

Способность белка прочно связывать ионы тяжелого металла в виде нерастворимых осадков в воде используется как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и др. Сразу после отравления обычно применяют белки молока или яиц, пока еще эти соли находятся в желудке и не успели всосаться. Вслед за дачей белка у больного вызывают рвоту, чтобы удалить яд из организма.

Положительно заряженные ионы тяжелых металлов (катионы) образуют прочные связи с отрицательно заряженными карбоксил-анионами R-групп белка и часто вызывают разрывы ионных связей. Они также снижают электрическую поляризацию белка, уменьшая его растворимость. Вследствие этого находящийся в растворе белок выпадает в осадок.

Ход работы.

В 3 пробирки наливают по 1 мл раствора белка и медленно по каплям при встряхивании прибавляют в первую пробирку 2–3 капли раствора уксуснокислого свинца, во вторую – раствор сернокислой меди, в третью – раствор азотнокислого серебра. Наблюдают образование осадков во всех пробирках. В пробирки с осадками от уксуснокислого свинца и сернокислой меди добавляют избыток этих солей. Наблюдают растворение осадков,

другую ацетата свинца. В обеих пробирках выпадает хлопьевидный осадок.

Осаждение белков минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимые осаждения белков. Это связано как с дегидратацией белковых молекул, так и с денатурацией белка.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка за счёт удаления факторов устойчивости белка в растворе (заряд и гидратная оболочка), и образуют комплексные соли белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает.

В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший осадок белка растворяется. По-видимому, это происходит в результате перезарядки молекул белка и частичного их гидролиза.

При добавлении избытка азотной кислоты растворения осадка не происходит. Вот почему для определения малых количеств белка в моче при клинических исследованиях применяется азотная кислота (метод Робертса – Стольниковой – Брендберга).

Ход работы.

В 3 пробирки наливают по 1мл. минеральных кислот: азотной, серной и соляной. Затем осторожно по стенке пробирки пипеткой наливают по 0,5 мл. раствора белка, так, чтобы он не смешивался с кислотой. В месте соприкосновения двух жидкостей появляется белый аморфный осадок белка.

При встряхивании в пробирке с азотной кислотой осадок увеличивается, в двух других пробирках осадок растворяется в избытке кислот.

Осаждение белков алкалоидными реактивами

Осаждение белковых веществ общими реактивами на алкалоиды обусловлено тем, что в состав аминокислот и алкалоидов входят сходные гетероциклические группировки (индольные, имидазольные, пирролидиновые и др.). Алкалоиды являются азотистыми основаниями, содержащими в молекуле различные гетероциклы с атомами азота. В белковых молекулах также содержатся некоторые гетероциклы – имидазольные,

пиролидиновые и другие, входящие в состав отдельных аминокислот. Поэтому белки обнаруживают некоторые реакции, характерные для алкалоидов.

Алкалоидные реактивы образуют нерастворимые соединения с белками. Слабое подкисление органической кислотой (например, уксусной) благоприятствует реакции и, наоборот, добавление сильных минеральных кислот затормаживает этот процесс. Осадки растворяются в щелочной среде.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора белка, по 4–5 капель 1%-го раствора уксусной кислоты и по 2–3 капли: в первую пробирку – 10%-го раствора пикриновой кислоты, во вторую – насыщенного раствора танина, в третью – 5%-го раствора железосинеродистого калия $K_4Fe(CN)_6$. Наблюдают выпадение осадка.

Осаждение белков фенолом и формалином.

Принцип метода. Фенол и формалин вызывают необратимую денатурацию белка: образуются малорастворимые продукты конденсации, уплотняется его консистенция, резко снижается растворимость и т. д. На этом основано применение фенола и формалина для дезинфекции, так как эти вещества вызывают денатурацию белков живых клеток и, следовательно, их отмирание.

Фенол (*гидроксибензол, устаревшее карболовая кислота*)
 C_6H_5OH .

Ход работы.

В две пробирки наливают по 1 мл. белка, добавляют в 1-ю столько же насыщенного водного раствора фенола, а во 2-ю – равный объем формалина. В обеих пробирках выпадает осадок белка. От действия фенола осадок выпадает быстрее.

Осаждение белков при нагревании

Выпадение белков в осадок при нагревании характерно почти для всех белков (исключение составляет желатин). Особенно легко и более полно происходит осаждение белка в

слабокислой среде, вблизи от ИЭТ. В нейтральной и сильнокислой среде осаждение белков идет значительно хуже, а в щелочной среде вовсе не наблюдается. Тепловая денатурация в начальной стадии ведет к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть обратимыми. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведет к образованию неупорядоченного клубка.

Ход работы.

В пять пронумерованных пробирок наливают по 2 мл 1% раствора яичного белка. Первую пробирку нагревают до кипения. Наблюдают образование осадка.

Во вторую пробирку добавляют 0,1 мл 1% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает хлопьевидный осадок. Осаждение идет полнее и быстрее, чем в первом случае, вследствие того, что частицы белка теряют заряд, потому что рН раствора приближается к изоэлектрическому состоянию.

В третью пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадок не образуется даже при кипячении, т.к. молекулы белка приобретают положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты. 0,5 мл насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Наблюдают появление осадка. Его образование обусловлено тем, что белок при взаимодействии с ионами хлорида натрия теряет свой заряд.

В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия. При кипячении осадок не образуется, т.к. в щелочной среде увеличивается отрицательный заряд белка.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ И КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКИ БЕЛКОВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Цель работы: освоить методы определения общего количества белковых веществ в пищевых продуктах. Освоить методику расчёта биологической ценности белков пищевых продуктов.

Объекты исследования: цельное молоко, молочные продукты.

Задание для выполнения: 1) определить общее количество белка методом формольного титрования; 2) определить общее количество белка рефрактометрическим методом; 3) выполнить расчёт биологической ценности белков пищевых продуктов, используя метод химического (аминокислотного) сора. Выявить лимитирующие аминокислоты.

Определение общего количества белка методом формольного титрования

Реактивы: 1%–ный спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1н раствор гидроксида натрия (NaOH), 37–40%–ный раствор формалина.

Оборудование: коническая колба вместимостью 250 см³, титровальная установка.

Ход работы.

К 10 см³ свежего цельного молока прибавить 10–12 капель 1%–ного раствора фенолфталеина и титровать 0,1н раствором NaOH до слабо–розового окрашивания, не исчезающего при взбалтывании. Записать показания бюретки.

После этого в эту пробу прилить 2 см³ нейтрализованного гидроксидом натрия 37–40%–ного формалина. Содержимое колбы перемешать, молоко обесцвечивается. Записать показания бюретки и продолжать титровать до окраски, соответствующей окраске молока до прибавления формалина. Показания бюретки записать и установить количество (мл) гидроксида натрия, пошедшее на второе титрование.

Умножая полученное количество гидроксида натрия на коэффициент 1,92, находят процентное содержание белков в молоке. Основным условием более точного определения белка является одинаковая интенсивность окраски раствора при первом и втором титрованиях.

Определение общего количества белка на рефрактометре ирф–464

Реактивы: дистиллированная вода, 4%–ный раствор хлористого кальция.

Оборудование: пенициллиновые флаконы вместимостью 10 см³ – 10 шт, резиновая пробка – 10 шт, металлический бачок с крышкой, стеклянная палочка с опаянным концом, пипетка, салфетка или вата, часы, термометр, анализатор рефрактометрического типа ИРФ–464.

Сущность метода заключается в том, что по круговой шкале для белка определяется разность показаний преломления светового луча, проходящего через молоко и выделенную из него сыворотку.

Ход работы.

Установить прибор на ровной поверхности стола. Пролить дистиллированной водой плоскости призмы, после чего их вытереть насухо чистой салфеткой.

Стеклянной палочкой с опаянным концом на нижнюю призму нанести 2–4 капли цельного молока. Нижнюю призму закрыть верхней. Наблюдая через окуляр, вращать рукоятку до тех пор, пока в поле зрения не будет установлена чёткая граница между тёмными и светлыми полями зрения. Три пунктирные линии должны находиться напротив линии, отделяющей тёмную часть шкалы от светлой. По шкале «Белок» производят отсчёт показаний (*Бм*). Измерение повторить 4–5 раз и подсчитать среднеарифметическое значение *Бм*.

Приготовление сыворотки. Для этого во флакон отмерить 5 см³ молока, добавить 5–6 капель 4%–ного раствора хлористого кальция. Закрывать флакон резиновой пробкой, встряхнуть и поместить в кипящую водяную баню на 10 мин. Одновременно готовят 2–3 параллельные пробы (флаконы нумеровать). Уровень воды в бачке должен достигать половины высоты флакона. Закрыв бачок с флаконами крышкой, провести нагревание. Затем горячую воду заменить холодной и охлаждение флаконов провести в течение 2–3 мин. Флаконы достать из бачка, встряхнуть, чтобы конденсат на стенках смешался с сывороткой. Открыть флакон, пипеткой (кончик обернуть ватой) отобрать

сыворотку. После этого, удалив вату, нанести 1–2 капли прозрачной сыворотки на нижнюю призму прибора и закрыть верхней.

Далее поступают так же, как и при анализе молока. По шкале «Белок» снимают показания для сыворотки (B_c). Измерения повторить 3–4 раза и подсчитать среднеарифметическое значение B_c . Призмы промыть и насухо протереть салфеткой или ватой. Определение белка (B) в молоке ведут путём следующего расчёта:

$$B = (B_m - B_c) \times k,$$

где $k = 1,0855$.

Результаты анализа цельного молока на содержание белка по двум методам исследования представить в виде таблицы 2.

Таблица 2. Результаты количественной оценки белков молока

Наименование исследуемого материала	Общее количество белка	
	метод формольного титрования	рефрактометрический метод
Молоко цельное		

Расчёт биологической ценности белков пищевых продуктов

Задание для выполнения: выполнить расчёт биологической ценности белков пищевых продуктов, используя метод химического (аминокислотного) сора. Выявить лимитирующие аминокислоты.

Биологическая ценность пищевого продукта отражает его способность удовлетворять потребность организма в незаменимых аминокислотах. Для определения биологической ценности белков используют химические методы, а также биологические методы с использованием микроорганизмов и животных.

Среди химических методов наиболее распространен метод **аминокислотного сора** (scor – счёт, подсчёт). Он основан

на сравнении аминокислотного состава белка оцениваемого продукта с аминокислотными показателями стандартного («идеального») белка (белок куриного яйца). Химический скор аминокислот (AC , %) для каждой из них определяют по формуле

$$AC = \frac{AK_{np}}{AK_{уб}} \cdot 100,$$

где AK_{np} – содержание любой незаменимой аминокислоты в 1 г белка исследуемого продукта, мг;

$AK_{уб}$ – содержание любой незаменимой аминокислоты в 1 г стандартного (эталонного, «идеального») белка, мг.

Одновременно с определением аминокислотного сора выявляют незаменимую аминокислоту лимитирующую биологическую ценность для данного белка, то есть ту, для которой скор является наименьшим. Аминокислотная шкала стандартного («идеального») белка для взрослого человека (мужчины) для расчёта сора была рекомендована Комитетом ФАО/ВОЗ (ФАО – продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН, ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения) (таблица 3).

Белковый состав реальных продуктов может существенно отличаться от идеальной шкалы.

Для расчёта биологической ценности белков пищевых продуктов использовать данные, представленные в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Аминокислотный состав и химический скор стандартного белка, рекомендуемый ФАО/ВОЗ

Аминокислоты	Аминокислотный образец ФАО/ВОЗ	
	A^*	AC^{**}
Изолейцин	40	100
Лейцин	70	100
Лизин	55	100
Метионин цистин***	35	100

Фенилаланин тирозин***	60	100
Треонин	40	100
Триптофан	10	100
Валин	50	100

* *A* – содержание аминокислоты в 1 г белка, мг.

** *АС* – аминокислотный скор относительно образца ФАО/ВОЗ, %.

*** Потребность организма человека в метионине удовлетворяется на 80–89 % заменимой аминокислотой цистином, а в фенилаланине на 70–75 % заменимой аминокислотой тирозином, поэтому обе названные пары аминокислот оцениваются в сумме

Пример: 1 г белка коровьего молока содержит (в мг): валина – 59,7; изолейцина – 59,0; лейцина – 101,2; лизина – 91,5 и т.д. Содержание этих же аминокислот в «идеальном» белке берём по таблице 3.

Химический (аминокислотный) скор для валина, %:

$$AC = 59,7/50 \times 100 = 119,4.$$

Химический скор для изолейцина, %:

$$AC = 59,0/40 \times 100 = 147,5$$

и т.д.

Таблица 4. Содержание незаменимых аминокислот в пищевых продуктах, мг в 1 г белка

№	Наименование продукта	Валин	Изолейцин	Лейцин	Лизин	Метионин цистин	Треонин	Триптофан	Фенилаланин
		3	4	5	6	7	8	9	10
1	Молоко стерилизованное	56,2	55,5	95,1	76,5	25,5	44,8	14,8	50,3
2	Сливки (массовая доля жира 10 %)	70,3	64,3	99,0	77,6	24,3	45,6	14,3	48,3

3	Кефир жирный	48,2	57,1	99,0	82,1	29,0	39,3	15,3	50,3
4	Простокваша	56,0	55,7	95,3	76,4	25,3	45,0	14,6	50,0
5	Йогурт	64,6	60,0	90,0	77,4	23,0	43,2	14,4	45,0
6	Сметана (массовая доля жира 30 %)	63,7	58,0	88,0	71,0	25,0	41,6	13,0	44,0
7	Творог нежирный	55,0	55,5	102,7	80,5	26,6	44,4	10,0	51,6
8	Творог жирный	60,0	49,3	91,6	72,0	27,4	46,3	15,1	54,4
9	Масло крестьянское несоленое	32,3	31,5	58,5	34,6	13,0	36,0	33,0	32,3
10	Сыр советский	59,0	39,5	67,2	57,7	29,6	39,5	31,6	41,5
11	Сыр голландский брусковый	58,6	43,6	85,8	59,0	21,0	35,4	26,1	50,0
12	Плавленый сыр «Российский»	54,7	37,7	82,7	50,4	22,7	37,7	22,7	37,7
13	Молоко сухое цельное	46,4	51,0	94,0	56,5	24,4	44,5	13,5	47,0
14	Молоко сухое обезжиренное	46,4	51,0	94,0	59,6	21,3	44,5	11,4	47,2
15	Молоко сгущенное стерилизованное	58,0	61,0	91,4	60,7	23,0	43,3	13,0	41,6
16	Молоко сгущенное с сахаром	63,0	58,0	74,7	75,0	23,0	42,2	13,2	44,4
17	Хлеб пшеничный 2-го сорта	34,8	31,8	59,4	18,9	11,4	23,1	7,4	36,8
18	Хлеб ржаной	32,2	24,8	42,7	22,3	9,3	19,8	8,0	37,1
19	Картофель	12,2	8,6	12,8	13,5	2,6	9,7	2,8	9,8
20	Капуста белокочанная	5,8	5,0	6,4	6,1	2,2	4,5	1,0	5,6
21	Морковь красная	4,3	3,5	4,4	3,8	0,9	3,2	0,8	3,1

22	Говядина 1 кат.	103,5	78,2	147,8	159	44,5	80,3	21,0	79,5
23	Баранина 1 кат.	82,0	75,4	11,6	123	35,6	68,8	19,8	61,1
24	Свинина мясная	83,1	70,8	107,4	124	34,2	65,4	19,1	58,0
25	Куры 1 кат.	87,7	69,3	141,2	159	47,1	88,5	29,3	74,4
26	Яйцо куриное целое	77,2	59,7	108,1	90,3	42,4	61	20,4	65,2
27	Минтай морож.	90,0	110	130,0	180	60,0	90,0	20,0	70,0
28	Треска морож.	90,0	70,0	130,0	150	50,0	90,0	21,0	80,0
29	Кальмар	78,1	39,2	192,0	190	49,2	54,8	30,1	31,6

Результаты расчётов занести в таблицу, подготовленную по форме таблицы 5.

Провести анализ полученных результатов, указать 1–3 лимитирующие аминокислоты (скор которых меньше 100 %) по каждому молочному продукту и сделать выводы о биологической ценности каждого из них.

Численные значения химического сора (выраженные в процентах) характеризуют «качество» белков.

Таблица 5. Биологическая ценность (химический скор) пищевых продуктов

№	Наименование продукта	Валин	Изолейцин	Лейцин	Лизин	Метионин цистин	Треонин	Триптофан	Фенилалан ин
1	Молоко стерилизованное								
2	Сливки (массовая доля жира 10 %)								
3	Кефир жирный								
4	Простокваша								
5	Йогурт								
6	Сметана (массовая доля жира 30 %)								
7	и т.д.								

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ОТ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ



Основными источниками белка в питании являются мясные, рыбные, молочные и зернобобовые продукты.

Больше всего белка содержится в сое – 35%, в сырах — около 25%, в горохе и фасоли — 22–23%. В разных видах мяса, рыбы и птицы содержится 16–20% белка, в нежирном твороге – 18%, в жирном твороге – 14%, яйцах – 13%, в гречневой крупе – 13%, овсяной крупе и пшене – 12%, макаронах – 10%, в хлебе пшеничном — около 8%, ржаном — 6%, молоке — около 3%.

В большинстве овощей содержится не более 2% белка. Еще меньше его во фруктах и ягодах.

Основным источником животного белка в питании является мясо, молоко, яйца, рыба.

Основными поставщиками растительного белка являются хлеб и крупы.

Прежде всего, любой источник белка, будь то курица или арахис, содержит разное количество аминокислот — строительного материала для белков. Из 20 возможных аминокислот девять просто необходимы организму. Эти аминокислоты вы можете получить только из пищи.

Продукты животного происхождения (мясо, яйца, молочные продукты) включают все необходимые аминокислоты в том или ином количестве, но большинство продуктов растительного происхождения содержат только фракции девяти необходимых аминокислот.

Белок, получаемый из яиц, имеет самую высокую усвояемость и помогает формировать ткани организма. Кроме того, яйца богаты холином и витаминами В₁₂ и D — веществами, важными для поддержания общего уровня энергии и её запаса в клетках организма.

Бобовые содержат много белка и клетчатки, полезной для работы сердца. Кроме того, это отличный источник витамина В. Отдавайте предпочтение фасоли, чечевице, сое и гороху. В 100 г гороха содержится 23 г белка, в фасоли — 22 г, а в сое — 34 г белка.

Разные виды зелени и зелёных листовых овощей богаты белком. Например, в 100 г шпината содержится всего 22 ккал и около 3 г белка, а в петрушке — 47 ккал и 3,7 г белка.

Оборудование, реактивы: Встряхиватель, баня водяная, термометр лабораторный, фильтры бумажные, марля, колбы конические на 250 мл, набор пробирок стеклянных химических, пипетки, цилиндры, стаканы стеклянные лабораторные с носиком на 100 и 250 мл, воронки стеклянные, лакмусовая бумага, свежее яйцо, свежее говяжье мясо, молоко, пшеничная мука, хлорид натрия (10%-ный), сульфат аммония (насыщ.), гидроксид натрия (10%-ный и 30%-ный), сульфат меди (1%-ный), нингидрин (0,5 и 1%-ный) в этаноле (95%-ном), α-нафтол (0,1 и 0,2%-ный спиртовой раствор), ледяная уксусная кислота, серная, соляная и азотная кислоты (конц.), желатина (раствор 1%), формальдегид (2,5%-ный), нитрит натрия (0,05%-ный и 0,5%-ный), сульфаниловая кислота (1%-ная), карбонат натрия (10%-ный), соляная кислота (5%-ная).

Приготовление растворов белка для проведения качественных реакций

Неразбавленный белок куриного яйца

Ход работы.

Отделяют белок трех куриных яиц от желтков. Считая, что масса белка в одном яйце в среднем равна 33 г, получают около 100 мл неразбавленного раствора белков куриного яйца. Этот раствор содержит 88% воды, 1 % углеводов и 0,5% минеральных веществ, остальное приходится на белок. Таким образом,

полученный неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10%-ный раствор белка.

Разбавленный раствор яичного альбумина

Ход работы.

Белок одного куриного яйца после отделения от желтка хорошо взбивают и затем смешивают в колбе при встряхивании с десятикратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой смоченной водой марли, помещенной в воронку. Отфильтровывают раствор яичного альбумина, в осадке (на марле) остается яичный глобулин. Учитывая, что концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%, полученный разбавленный раствор яичного альбумина является примерно 0,5%-ным.

Белки мяса

Ход работы.

Помещают в стакан 40–50 г пропущенного через мясорубку мяса (постного), добавляют 80–100 мл 10%-ного раствора хлорида натрия и оставляют смесь стоять 15–20 мин при частом помешивании. Отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр или через двойной слой марли окрашенную в красный цвет жидкость. В растворе содержится главным образом мышечный альбумин и глобулин.

Белки молока

Ход работы.

К 50 мл свежего молока добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. При этом выпадают в осадок глобулины и казеин. Отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр раствор альбуминов.

Растительный альбумин

Ход работы.

25 г пшеничной муки смешивают со 100 мл дистиллированной воды и смесь встряхивают в течение 1 ч с помощью встряхивателя. Взвесь муки центрифугируют и надосадочную жидкость фильтруют через складчатый фильтр.

Отфильтрованный прозрачный раствор содержит преимущественно альбумин пшеничных зерен.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 1

1. Какова роль белков в питании человека?
2. Дайте характеристику проблемы дефицита белка. Каковы пути её решения?
2. Какова роль нетрадиционного растительного и животного сырья для пополнения ресурсов пищевого белка?
3. Перечислите основные функциональные свойства белков. Какова их роль в технологических процессах производства пищевых продуктов?
4. Какие физико–химические и химические превращения претерпевают белки в технологическом потоке производства пищевых продуктов?
5. Какие изменения претерпевают белки сырья при хранении в процессе технологической обработки при производстве пищевых продуктов?
6. Дайте определение понятиям: пищевая и биологическая ценность белков, незаменимые аминокислоты, лимитирующие аминокислоты.
7. Какие свойства характерны для аминокислот?
8. Перечислите незаменимые аминокислоты.
9. Какие методы качественного и количественного определения белков вы знаете?
10. В чём состоит сущность определения общего количества белка рефрактометрическим методом?
11. В чём состоит сущность определения общего количества белка методом формольного титрования?
12. В чём заключается методика расчёта химического сора аминокислот белков молока?
13. Как определяется биологическая ценность белков?
14. В чём заключается принцип нингидриновой реакции?
15. Назовите серосодержащие аминокислоты. С помощью какой реакции их можно обнаружить в продукте?
16. Какую реакцию проводят для обнаружения пептидных связей в белках?

17. В чём состоит сущность биуретовой реакции?
18. Перечислите ароматические незаменимые аминокислоты.
19. Объясните принцип ксантопротеиновой реакции.
20. Какой реакцией можно обнаружить остатки ароматических циклических аминокислот?
21. С помощью каких цветных реакций можно обнаружить остатки карбоновых кислот, входящих в состав белков?
22. Перечислите незаменимые аминокислоты.
23. Какова роль незаменимых аминокислот в питании человека?
24. Приведите классификацию белков.
25. Какова энергетическая и пищевая ценность белков?
26. Структуры белковой молекулы.
27. Понятие денатурации.
28. Какие факторы способны денатурировать белки?
29. Существует ли разница между денатурацией и коагуляцией?
30. Как коагуляция белков влияет на их биологическую ценность?
31. Изменяются ли физические свойства белка в процессе денатурации, какие именно?
32. Как изменяется биологическая активность белка при денатурации?
33. Приведите примеры соле-, водо-, щелоче-, спирто-растворимых белков.
34. Продукт гидролиза белков.
35. В чём отличие процессов денатурации и гидролиза белков?
36. Ферментативный гидролиз белка.
37. От чего зависит скорость гидролиза белка?
38. Какие факторы влияют на растворимость белков и их стабильность в растворе?
39. Почему при нагревании в слабокислой или слабощелочной среде белок легко выпадает в осадок?
40. На каких свойствах белка основаны реакции осаждения и каково их практическое применение?
41. При добавлении к водному раствору белков нейтральных солей в высоких концентрациях белок выпадает в осадок. Как

называется это явление? Почему добавление солей в высоких концентрациях приводит к понижению растворимости белка?

42. Дайте определение изоэлектрической точке белка и изоэлектрическому состоянию его.

43. Что такое денатурация белков и какими факторами можно ее вызвать?

44. Какие свойства характерны для денатурированных белков?

45. Какова химическая природа белка? Назовите структурные единицы белковой молекулы.

46. Напишите структурные формулы протеиногенных аминокислот, имеющих в радикале:

а) гетероциклическое кольцо

б) серу

в) гидроксогруппы

г) амидные– группы

47. Напишите структурные формулы незаменимых аминокислот. Почему они называются незаменимыми?

48. Чем объяснить розово–фиолетовое окрашивание щелочного раствора белка в присутствии катионов меди? Напишите уравнение биуретовой реакции с пептидом ала–иле–гли–вал–фен.

49. Какие аминокислоты в белке обуславливают ксантопротеиновую реакцию?

Напишите уравнение ксантопротеиновой реакции с одной из них.

50. На чем основана реакция обнаружения серосодержащих аминокислот в белковой молекуле? Приведите уравнение реакции.

51. Какой качественной реакцией можно определить α – аминокислотный состав белка? Приведите химизм этого процесса. Почему пролин в отличие от других аминокислот дает желтое окрашивание? Напишите уравнение этой реакции с пролином.

52. Какую аминокислоту открывают реакцией Сакагучи? Напишите уравнение реакции.

53. Чем обусловлены цветные реакции на белки?

54. Как с помощью цветных реакций обнаружить в белке триптофан?

55. Как обнаружить в белке тирозин?

56. Как обнаружить в белке гуанидин?

57. Даны 2 пробирки с растворами: одна с раствором белка, другая содержит смесь аминокислот. При помощи цветных реакций определите:

а) в какой пробирке содержится белок;

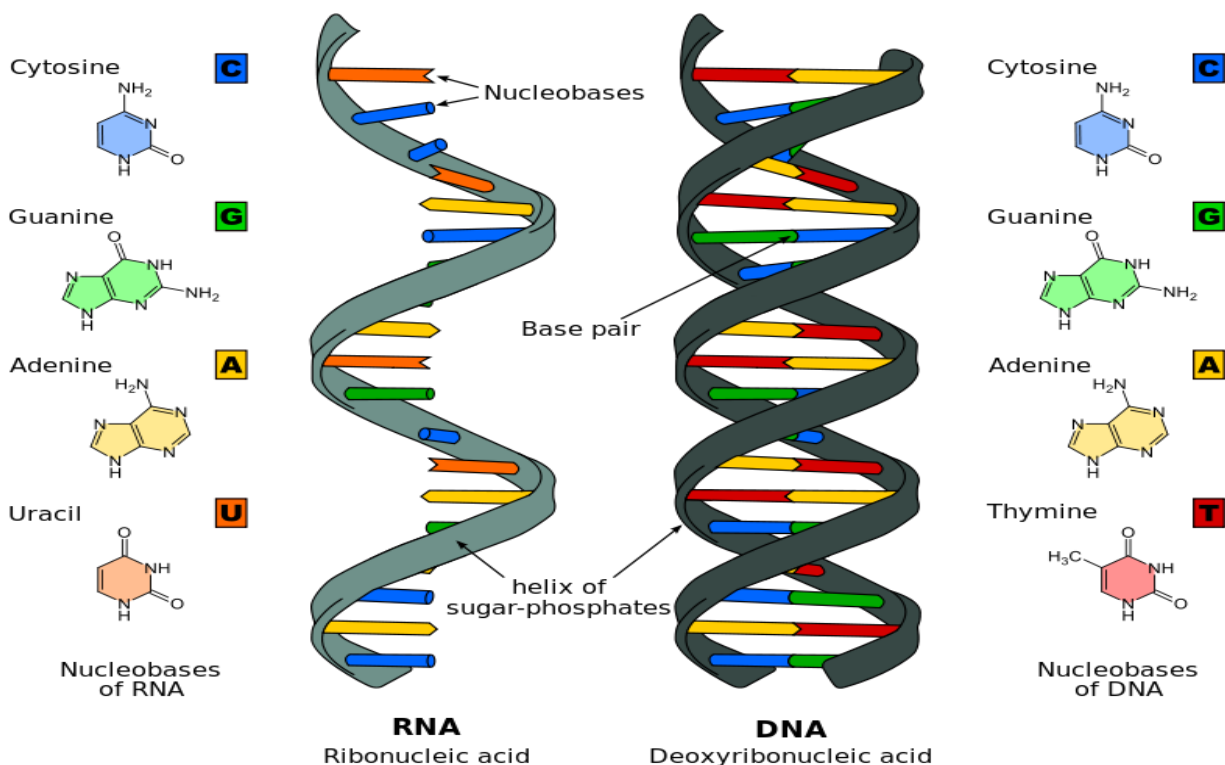
б) какие аминокислоты содержатся в другой пробирке?

58. Что такое денатурация белка? Чем отличается денатурированный белок от нативного?

59. При каких условиях, и какие вещества вызывают необратимое осаждение белков? В какой среде белок не свертывается?

ГЛАВА II. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

СОСТАВ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



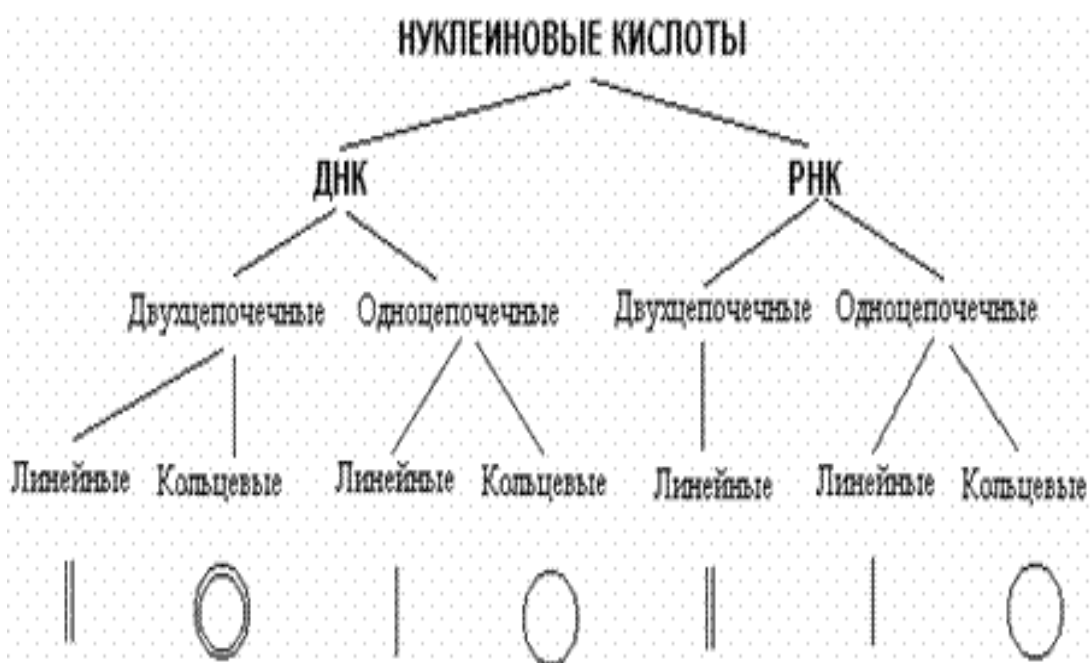
Нуклеиновые кислоты – важнейшие биополимеры с относительной молекулярной массой, достигающей $5 \cdot 10^9$. Они содержатся во всех без исключения живых организмах и являются не только хранителем и источником генетической информации, но и выполняют ряд других жизненно важных функций. Нуклеиновые кислоты являются полимерами, мономерными звеньями которых являются *нуклеотиды*.

ОБЩАЯ ФОРМУЛА НУКЛЕОТИДА



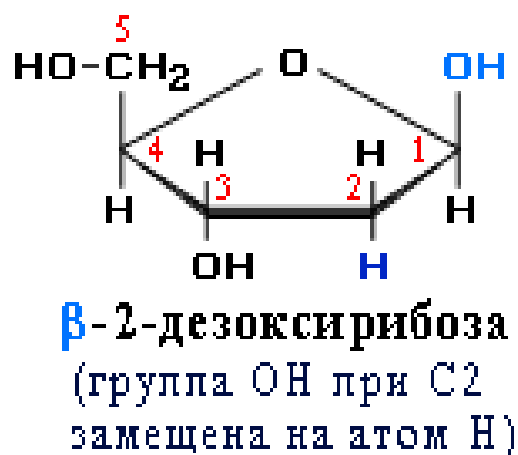
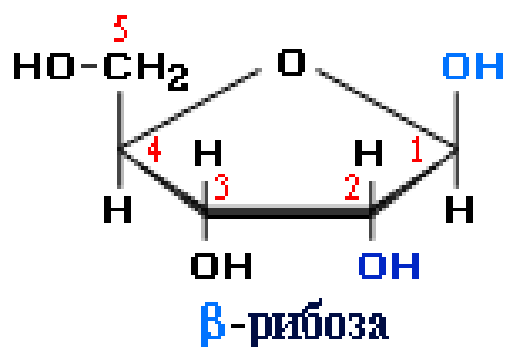
К нуклеиновым кислотам относят высокополимерные соединения, распадающиеся при гидролизе на пуриновые и пиримидиновые основания, пентозу и фосфорную кислоту. Нуклеиновые кислоты содержат углерод, водород, фосфор, кислород и азот. Различают два класса нуклеиновых кислот: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезорибонуклеиновые кислоты (ДНК).

Нуклеиновые кислоты могут быть линейными и кольцевыми (ковалентно замкнутыми). Они могут состоять из одной или двух цепей. Ниже приведена схема, отражающая существование в природе различных типов нуклеиновых кислот:

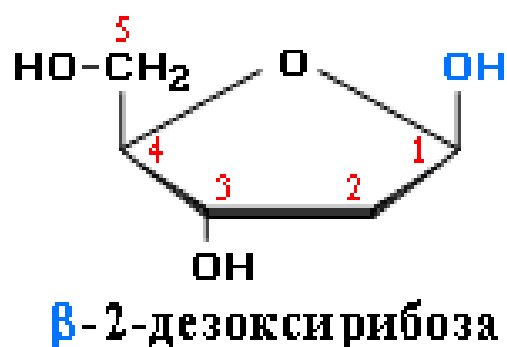
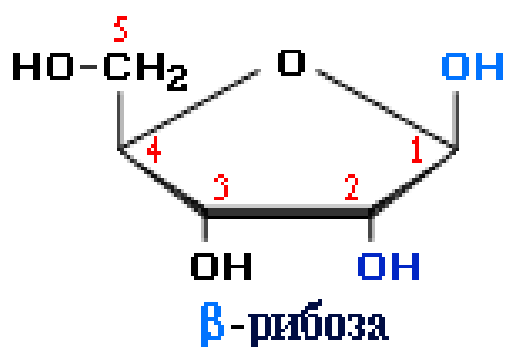


Нуклеиновым кислотам присущи три важнейшие функции: хранение, передача и реализация генетической информации. Кроме этих, они выполняют и другие функции, например, участвуют в катализе некоторых химических реакций, осуществляют регуляцию реализации генетической информации, выполняют структурные функции и др.

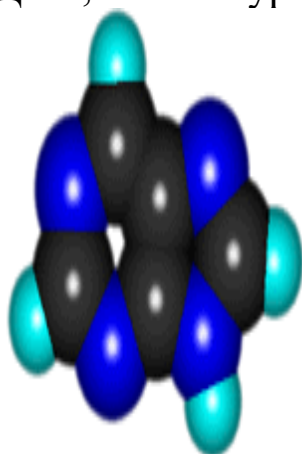
Нуклеотиды в составе РНК содержат β -рибозу, в ДНК – β -дезоксирибозу.



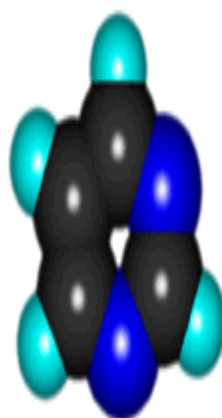
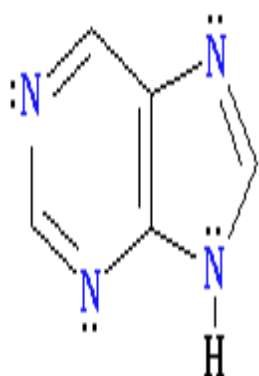
В сокращенных формулах связи C-H
не изображаются:



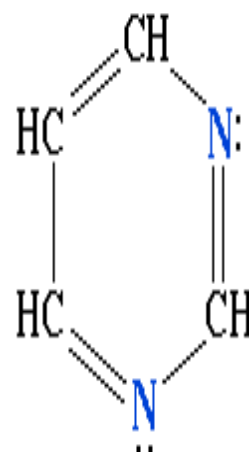
Азотистые основания, которые обычно встречаются в РНК и ДНК, — это пурины и пиримидины.

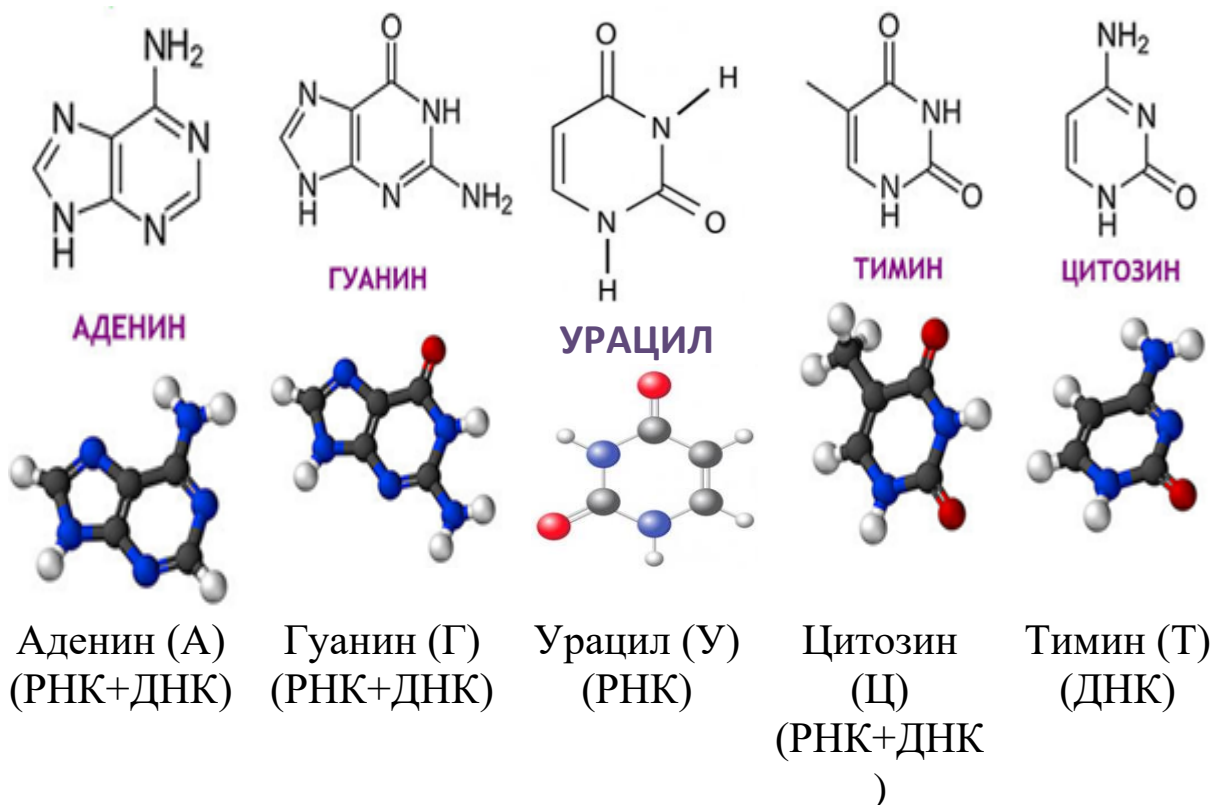


Пурин



Пиримидин





Пурины и пиримидины — плоские молекулы, для Г, У, Ц, Т известна кетоенольная таутомерия, однако кетоструктуры гораздо более стабильны и доминируют при физиологических условиях. Кроме постоянных азотистых оснований в составе РНК и ДНК присутствуют минорные (редкие) азотистые основания, особенно это характерно для тРНК.

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ДНК

ДНК — полимер, мономерами которой являются дезоксирибо–нуклеотиды. Модель пространственного строения молекулы ДНК в виде двойной спирали была предложена в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком (для построения этой модели они использовали работы М. Уилкинса, Р. Франклин, Э. Чаргаффа).

Эрвин Чаргафф (англ. *Erwin Chargaff*; 11 августа 1905, Черновицы, Австро-Венгрия — 20 июня 2002, Нью-Йорк, США) — американский биохимик еврейского происхождения родом из Буковины. Родился 11 августа 1905 года в городе Черновицы в обеспеченной еврейской семье. Отца звали Герман Харгаф (1870—1934), мать — Роза Зильберштейн (1878—1943). Герман

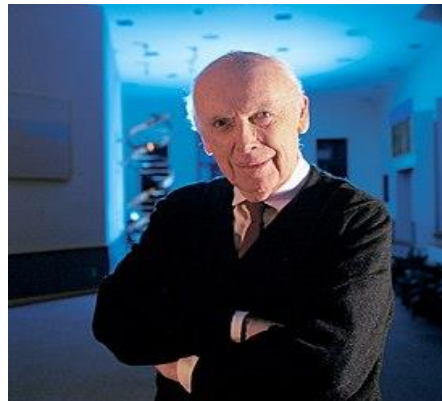


Харгаф унаследовал небольшую банковскую контору в Черновцах от своего отца, Исаака Харгафа (1842—1903). Во время Первой мировой войны банк Германа Харгаффа разорился и семья переехала в Вену. В 1924 году Чаргафф поступил на химическое отделение в Венский университет, который окончил в 1928 году и был принят в постдокторантуру в лаборатории обменной химии в Йельском университете в США (1928—1930), продолжил обучение в Берлинском университете (1930—1933), где был оставлен преподавать приватдоцентом. В 1933 году покинул Германию в связи с приходом к власти нацистов, в 1933—1934 годах работал в Пастеровском институте в Париже. Главным направлением научной деятельности было изучение химического состава и структуры нуклеиновых кислот. Эрвин Чаргафф определил количественное отношение азотистых оснований, входящих в их состав. В 1950—1953 годах им было показано, что общее количество адениновых остатков в каждой молекуле ДНК равно количеству тиминных остатков, а количество гуаниновых остатков - количеству цитозинных. Правила Чаргаффа использовали Френсис Крик и Джеймс Уотсон при определении структуры ДНК в виде двойной спирали. Также Чаргафф доказал, что ДНК обладает видовой специфичностью, и отверг гипотезы о существовании многих разновидностей ДНК. Эрвин Чаргафф был первым, кто начал исследовать денатурацию ДНК. Кроме того, он занимался исследованием свертывания крови, изучал липиды и липопротеины и метаболизм аминокислот.

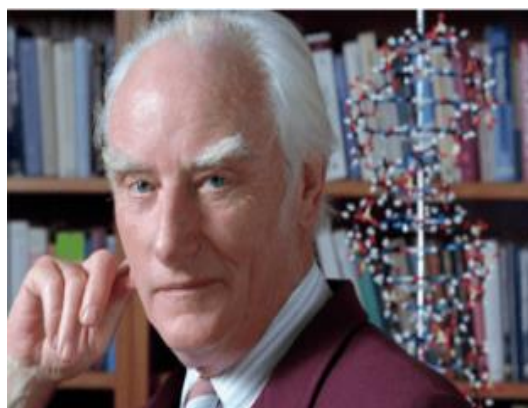
Джеймс Дьюи Уотсон (англ. James Dewey Watson; род. 6 апреля 1928 года в Чикаго, Иллинойс, США) — американский биолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 года — совместно с Фрэнсисом Криком и Морисом Х. Ф. Уилкинсом за открытие структуры молекулы ДНК.

В 1952 году Уотсон и Крик стали работать над моделированием структуры ДНК. Используя правила Чаргаффа и рентгенограммы Розалинды Франклин и Мориса Уилкинса, в середине марта 1953 года Уотсон и Крик вывели структуру двойной спирали ДНК.

Важным для их открытия были экспериментальные данные, собранные в Королевском колледже Лондона Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом. Сэр Лоуренс Брэгг, директор лаборатории Кавендиша (где работал Уотсон и Крик) сделал оригинальное сообщение об этом на Сольвеевском конгрессе по белкам в Бельгии 8 апреля 1953 года, но не сообщил об этом прессе. Уотсон и Крик представили свою знаменитую статью в научном журнале *Nature* (опубликована 25 апреля 1953 года). Брэгг выступил с речью в Медицинской школе больницы Гая в Лондоне в четверг 14 мая 1953 года, в результате чего вышла статья Ритчи Колдера 15 мая 1953 года в лондонской газете «Хроника новостей» под названием «Почему ты это ты. Ближайшая тайна жизни». Позже Брэгг номинировал Крика, Уотсона и Уилкинса на Нобелевскую премию 1962 года по Физиологии и Медицине.



Фрэнсис Крик (англ. *Francis Harry Compton Crick*; 8 июня 1916, Нортгемптон, Англия, Великобритания — 28 июля 2004, Сан-Диего, Калифорния, США) – британский молекулярный биолог, биофизик и нейробиолог.



Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 года — совместно с Джеймсом Д. Уотсоном и Морисом Х. Ф. Уилкинсом с формулировкой «за открытия, касающиеся молекулярной структуры нуклеиновых кислот и их значения для передачи информации в живых системах».

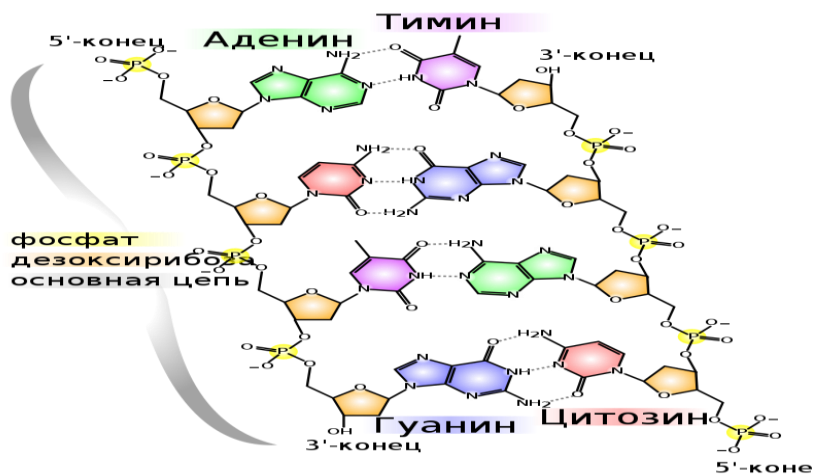
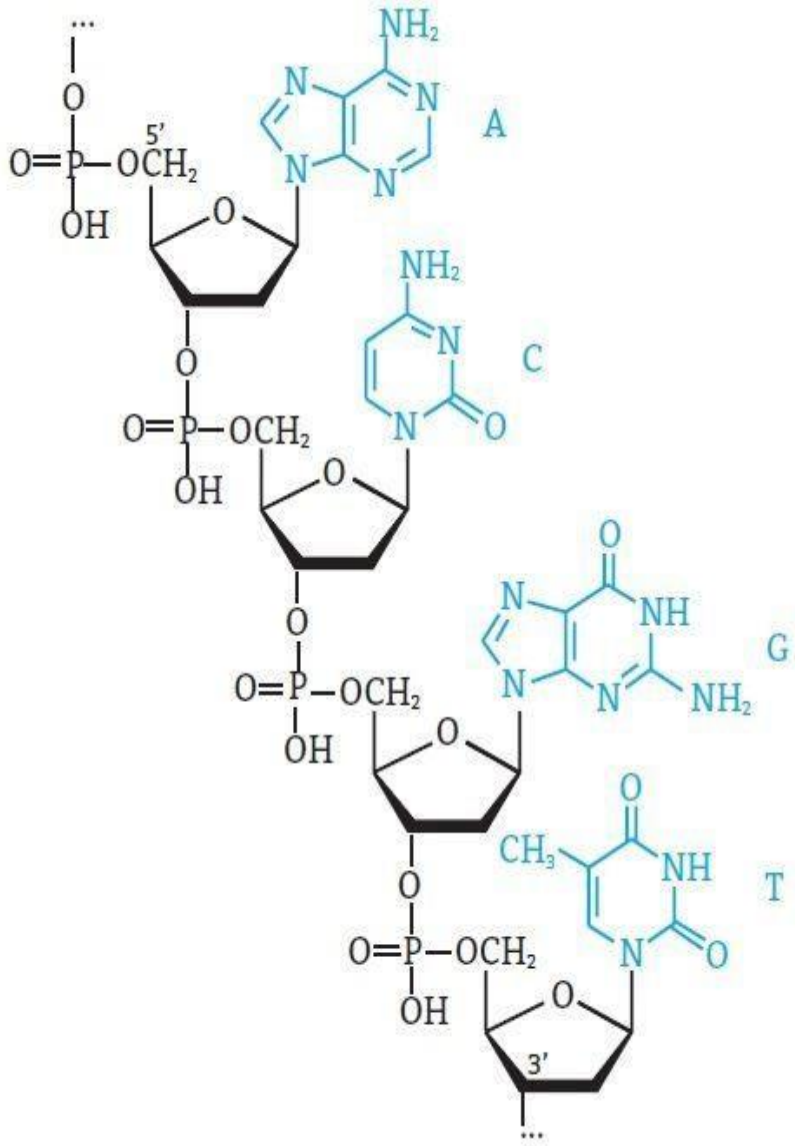
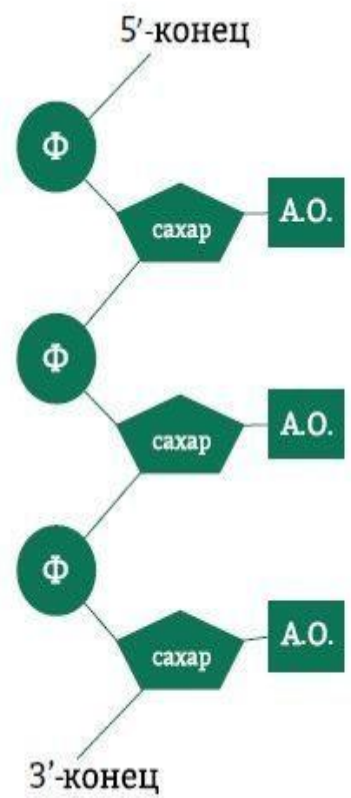
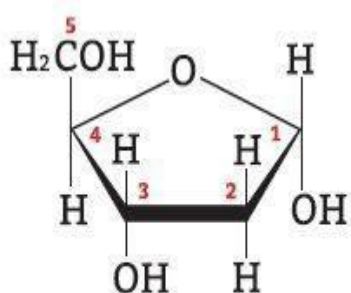


Схема
изображение
некоторых
особенностей
молекулы ДНК.
Иллюстрация пары
оснований гуанин –
цитозин и аденин –
тимин. Азотистые
основания
удерживаются

вместе водородными связями. Фосфатные остовы расположены антипараллельно.

Молекула ДНК образована двумя полинуклеотидными цепями, спирально закрученными друг около друга и вместе вокруг воображаемой оси, т.е. представляет собой двойную спираль (исключение – некоторые ДНК–содержащие вирусы имеют одноцепочечную ДНК). Диаметр двойной спирали ДНК — 2 нм, расстояние между соседними нуклеотидами – 0,34 нм, на один оборот спирали приходится 10 пар нуклеотидов. Длина молекулы может достигать нескольких сантиметров. Молекулярный вес — десятки и сотни миллионов. Суммарная длина ДНК ядра клетки человека — около 2 м. В эукариотических клетках ДНК образует комплексы с белками и имеет специфическую пространственную конформацию.

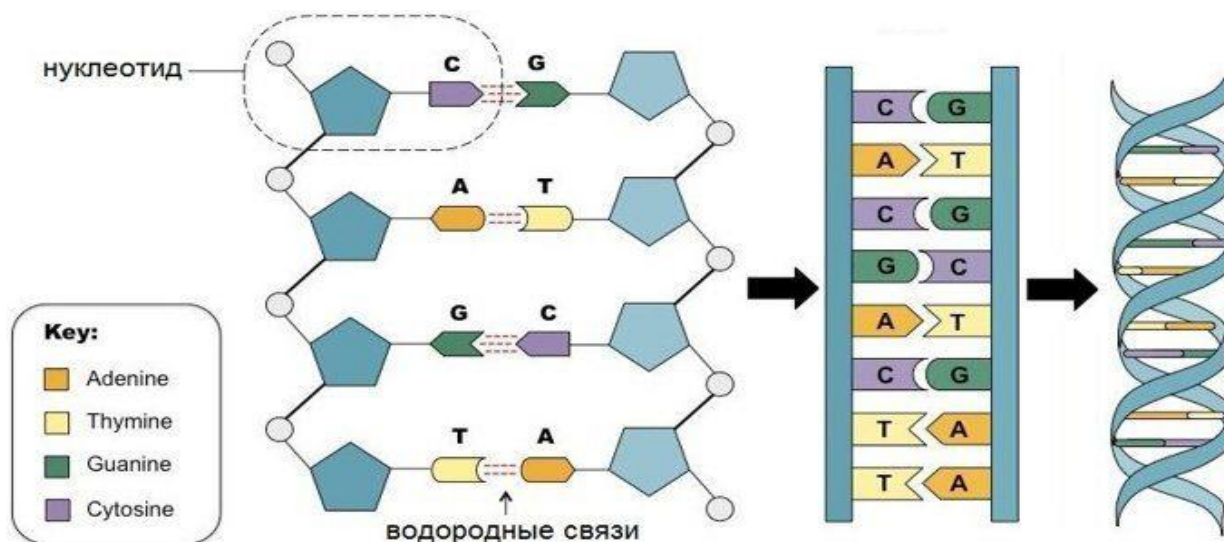
Мономер ДНК — нуклеотид (дезоксирибонуклеотид) — состоит из остатков трех веществ: 1) азотистого основания, 2) пятиуглеродного моносахарида (пентозы) и 3) фосфорной кислоты. Азотистые основания нуклеиновых кислот относятся к классам пиримидинов и пуринов. **Пиримидиновые основания ДНК** (имеют в составе своей молекулы одно кольцо) — тимин, цитозин. **Пуриновые основания** (имеют два кольца) — аденин и гуанин.



Выделение 3' и 5' – концов цепи ДНК

Моносахарид нуклеотида ДНК представлен дезоксирибозой. Название нуклеотида является производным от названия соответствующего основания. Нуклеотиды и азотистые основания обозначаются заглавными буквами.

Азотистое основание	Название нуклеотида	Обозначение
Аденин	Адениловый	А (A)
Гуанин	Гуаниловый	Г (G)
Тимин	Тимидиловый	Т (T)
Цитозин	Цитидиловый	Ц (C)



Расположение нуклеотидов в ДНК

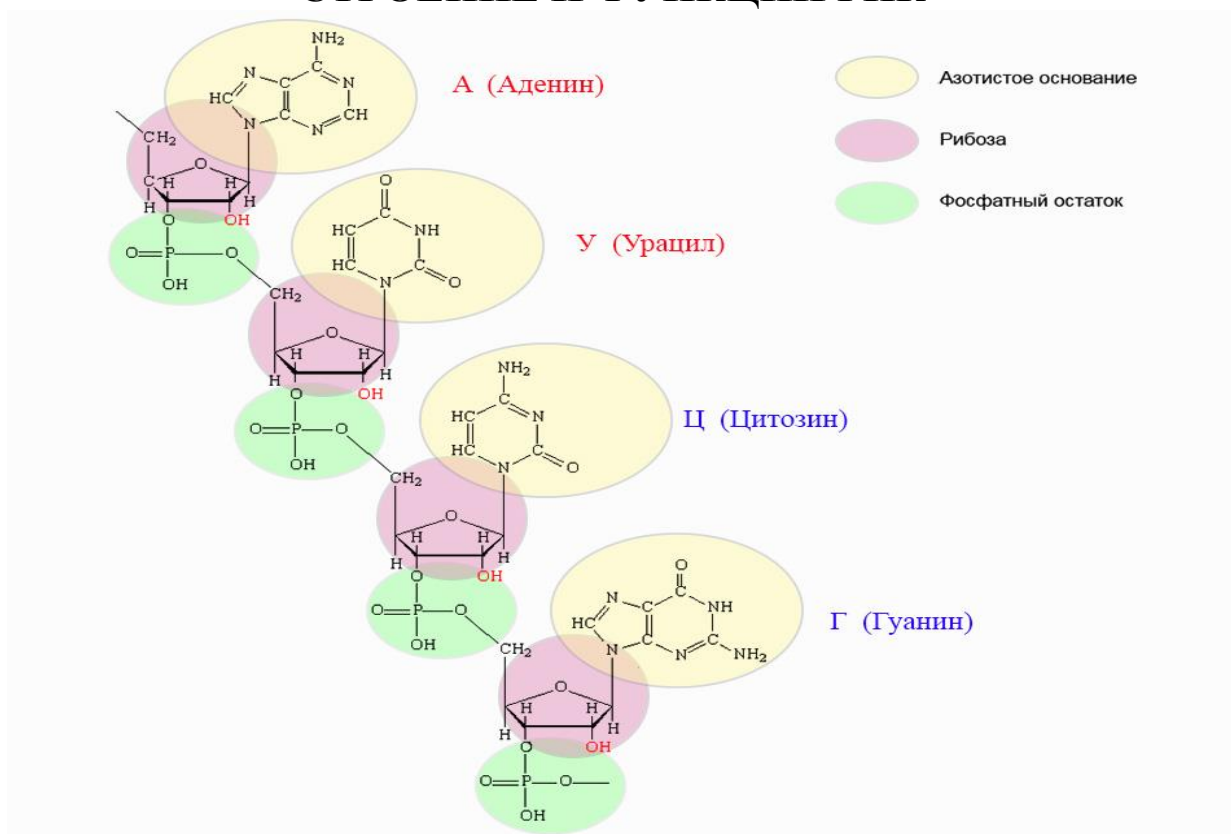
Полинуклеотидная цепь образуется в результате реакций конденсации нуклеотидов. При этом между 3'-углеродом остатка дезоксирибозы одного нуклеотида и остатком фосфорной кислоты другого возникает **фосфоэфирная связь** (относится к категории прочных ковалентных связей). Один конец полинуклеотидной цепи заканчивается 5'-углеродом (его называют 5'-концом), другой – 3'-углеродом (3'-концом).

Против одной цепи нуклеотидов располагается вторая цепь. Расположение нуклеотидов в этих двух цепях не случайное, а строго определенное: против аденина одной цепи в другой цепи всегда располагается тимин, а против гуанина — всегда цитозин, между аденином и тимином возникают две водородные связи, между гуанином и цитозином – три водородные связи. Закономерность, согласно которой нуклеотиды разных цепей ДНК строго упорядоченно располагаются (аденин – тимин, гуанин – цитозин) и избирательно соединяются друг с другом, называется **принципом комплементарности**. Следует отметить, что Дж. Уотсон и Ф. Крик пришли к пониманию принципа комплементарности после ознакомления с работами Э. Чаргаффа. Э. Чаргафф, изучив огромное количество образцов тканей и органов различных организмов, установил, что в любом фрагменте ДНК содержание остатков гуанина всегда точно соответствует содержанию цитозина, а аденина – тимину («правило Чаргаффа»), но объяснить этот факт он не смог.

Из принципа комплементарности следует, что последовательность нуклеотидов одной цепи определяет последовательность нуклеотидов другой.

Цепи ДНК антипараллельны (разнонаправлены), т.е. нуклеотиды разных цепей располагаются в противоположных направлениях, и, следовательно, напротив 3'-конца одной цепи находится 5'-конец другой. Молекулу ДНК иногда сравнивают с винтовой лестницей. «Перила» этой лестницы – сахарофосфатный остов (чередующиеся остатки дезоксирибозы и фосфорной кислоты); «ступени» – комплементарные азотистые основания.

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ РНК



Строение РНК

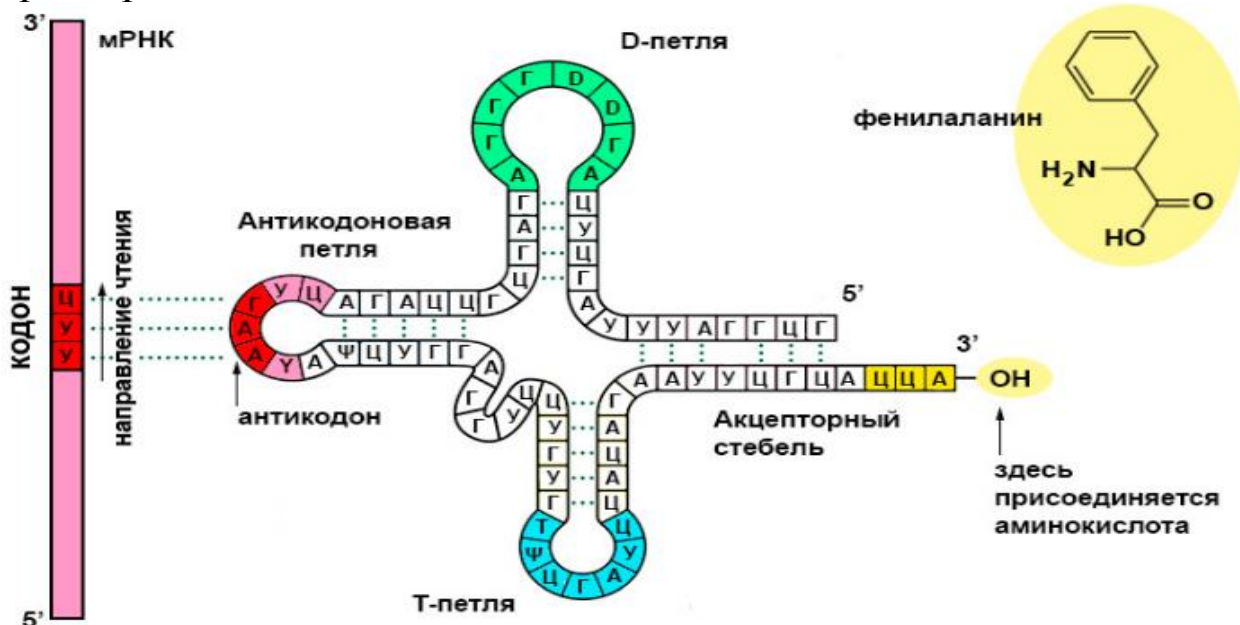
РНК – полимер, мономерами которой являются **рибонуклеотиды**. В отличие от ДНК, РНК образована не двумя, а одной полинуклеотидной цепочкой (исключение – некоторые РНК–содержащие вирусы имеют двухцепочечную РНК). Нуклеотиды РНК способны образовывать водородные связи между собой. Цепи РНК значительно короче цепей ДНК.

Мономер РНК – нуклеотид (рибонуклеотид) – состоит из остатков трех веществ: 1) азотистого основания, 2) пятиуглеродного моносахарида (пентозы) и 3) фосфорной кислоты. Азотистые основания РНК также относятся к классам пиримидинов и пуринов.

Пиримидиновые основания РНК – урацил, цитозин, пуриновые основания – аденин и гуанин. Моносахарид нуклеотида РНК представлен рибозой.

Выделяют **три вида РНК**: 1) **информационная** (матричная) РНК – иРНК (мРНК), 2) **транспортная** РНК – тРНК, 3) **рибосомная** РНК – рРНК.

Все виды РНК представляют собой неразветвленные полинуклеотиды, имеют специфическую пространственную конформацию и принимают участие в процессах синтеза белка. Информация о строении всех видов РНК хранится в ДНК. Процесс синтеза РНК на матрице ДНК называется транскрипцией.



Транспортная РНК

Транспортные РНК содержат обычно 76 (от 75 до 95) нуклеотидов; молекулярная масса — 25 000–30 000. На долю тРНК приходится около 10% от общего содержания РНК в клетке.

Функции тРНК: 1) транспорт аминокислот к месту синтеза белка, к рибосомам, 2) трансляционный посредник. В клетке

встречается около 40 видов тРНК, каждый из них имеет характерную только для него последовательность нуклеотидов. Однако у всех тРНК имеется несколько внутримолекулярных комплементарных участков, из-за которых тРНК приобретают конформацию, напоминающую по форме лист клевера. У любой тРНК есть петля для контакта с рибосомой (1), антикодоновая петля (2), петля для контакта с ферментом (3), акцепторный стебель (4), антикодон (5). Аминокислота присоединяется к 3'-концу акцепторного стебля. **Антикодон** — три нуклеотида, «опознающие» кодон иРНК. Следует подчеркнуть, что конкретная тРНК может транспортировать строго определенную аминокислоту, соответствующую ее антикодону. Специфичность соединения аминокислоты и тРНК достигается благодаря свойствам фермента аминоацил-тРНК-синтетаза.

Рибосомные РНК содержат 3000–5000 нуклеотидов; молекулярная масса — 1 000 000–1 500 000. На долю рРНК приходится 80–85% от общего содержания РНК в клетке. В комплексе с рибосомными белками рРНК образует рибосомы — органоиды, осуществляющие синтез белка. В эукариотических клетках синтез рРНК происходит в ядрышках.

Функции рРНК: 1) необходимый структурный компонент рибосом и, таким образом, обеспечение функционирования рибосом; 2) обеспечение взаимодействия рибосомы и тРНК; 3) первоначальное связывание рибосомы и кодона-инициатора иРНК и определение рамки считывания, 4) формирование активного центра рибосомы.

Информационные РНК разнообразны по содержанию нуклеотидов и молекулярной массе (от 50 000 до 4 000 000). На долю иРНК приходится до 5% от общего содержания РНК в клетке. **Функции иРНК:** 1) перенос генетической информации от ДНК к рибосомам, 2) матрица для синтеза молекулы белка, 3) определение аминокислотной последовательности первичной структуры белковой молекулы.

Каждый из компонентов нуклеотидов может давать ту или иную специфическую реакцию, которая позволяет судить о наличии, количестве и составе нуклеиновых кислот. В клетке ДНК и РНК находятся и функционируют в виде

нуклеопротеиновых кислот одной из задач является их выделение и очистка.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ВЫДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Описаны многочисленные методики выделения нуклеиновых кислот из природных источников. Основными требованиями, предъявляемыми к методу выделения, являются эффективное отделение нуклеиновых кислот от белков, а также минимальная степень фрагментации полученных препаратов. Классический метод выделения ДНК был описан в 1952 году и используется в настоящее время без значительных изменений^[7]. Клеточные стенки исследуемого биологического материала разрушаются одним из стандартных методов, а затем обрабатываются анионным детергентом. При этом белки выпадают в осадок, а нуклеиновые кислоты остаются в водном растворе. ДНК может быть осаждена в виде геля осторожным добавлением этанола к её солевому раствору. Концентрацию полученной нуклеиновой кислоты, а также наличие примесей (белки, фенол) обычно определяют спектрофотометрически по поглощению на λ_{260} нм.

Нуклеиновые кислоты легко деградируют под действием особого класса ферментов – нуклеаз. В связи с этим при их выделении важно обработать лабораторное оборудование и материалы соответствующими ингибиторами.

Рибонуклеопротеинами богаты дрожжи, печень, почки и поджелудочная железа. При гомогенизации ткани нуклеопротеины растворяются в разбавленных щелочей и выпадают в осадок при подкислении раствора.

Реактивы: диэтиловый эфир, вода дист., песок, NaOH 0,4 раствор, CH_3COOH 5% раствор, дрожжи.

Ход работы.

2,5 г дрожжей увлажняют в ступке с 1 мл вода + 1 мл диэтилового эфира и, добавляя немного стеклянного порошка или песка, растирают с раствором NaOH. Раствор щелочи приливают небольшими порциями (по 5-10 мл). всего расходуют

до 25 мл раствора щелочи. Растирание продолжают в течение 15-20 минут. Содержимое ступки фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют 10 минут при 2500 об/мин. Фильтрат или центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям добавляют раствор CH_3COOH до полного осаждения нуклеопротеина (обычно расходуют 10-15 мл раствора). Осадок отделяют центрифугированием.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. ГИДРОЛИЗ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ



Нуклеиновые кислоты характеризуются определенным составом и распадаются:

– при неполном ферментативном гидролизе РНК и ДНК, щелочном гидролизе РНК (ДНК не гидролизуются под действием щелочей) до структурных единиц нуклеиновых кислот – мононуклеотидов.

– при полном гидролизе мононуклеотидов до пуриновых (аденина, гуанина) и пиримидиновых (цитозина, тимина – только в ДНК, урацила – только в РНК) азотистых оснований, пентоз (рибозы – в РНК, дезоксирибозы – в ДНК) и фосфорной кислоты.

При непродолжительном гидролизе дрожжевой массы или выделенных из нее нуклеопротеидов последние распадаются на полипептиды, пуриновые и пиримидиновые основания, рибозу и дезоксирибозу, фосфорную кислоту.

Продукты гидролиза нуклеопротеидов могут быть обнаружены в гидролизате специфическими для каждого соединения реакциями.

Реактивы: 1) серная кислота, 5% р-р; 2) препарат нуклеопротеинов;
3) NaOH, 10% р-р; 4) CuSO₄, 1% р-р; 5) аммиак; 6) оксид серебра, 1% р-р в аммиаке. 7) тимол, 1 % спиртовой р-р. 8) серная кислота, конц.;
9) молибденовый реактив; 10) серная кислота, 5% р-р.

Ход работы.

Гидролиз происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой. Осадок нуклеопротеинов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5 % серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20–25 мл раствора. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипячения. Кипятят 1–1,5 часа, после чего охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят реакции на пуриновые основания, полипептиды, пентозы и фосфорную кислоту.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Обнаружение белков и полипептидов

Ход работы: Для открытия белка с частью фильтрата (1–2 мл) проводят биуретовую реакцию, добавляя 1–2 мл 10 % р-ра NaOH до щелочной реакции по лакмусу. Затем вносят 2–3 капли 1 % р-ра CuSO₄ и появляется розовая или фиолетовая окраска.

Открытие пуриновых оснований

Ход работы: К 2 мл фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции на лакмус и приливают 1 мл аммиачного раствора окиси серебра. Через несколько минут выпадают хлопья серебряных солей пуриновых оснований.

Открытие пентоз (реакция Молиша)

Основано на реакции с тимолом и конц. серной кислотой, которая вызывает дегидратацию пентоз и образование фурфурола, дающего с тимолом соединение красного цвета (продукты конденсации).

Ход работы: К 1 мл фильтрата добавляют 2–3 капли спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно настилают 1 мл конц. серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев.

Открытие фосфорной кислоты

Фосфорная кислота образует с молибденовым реактивом желтый кристаллический осадок фосфорномолибденового аммония:



желтый крист. осадок

Ход работы: К 1 мл фильтрата приливают двойной объем молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 2–3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорномолибденово–кислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК

Метод основан на свойстве дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, образовывать синее окрашивание прямо пропорциональное концентрации ДНК.

Реактивы: дифениламинный реактив (1 г дифениламина в 100 мл ледяной уксусной кислоты, + 2,75 мл H_2SO_4 конц.), дистиллированная вода, водный раствор ДНК.

Оборудование: термостат, спектрофотометр, автоматические пипетки, пробирки, штатив.

Ход работы.

Вначале необходимо построить калибровочный график. Для этого в 3 пробирки наливают по 1 мл раствора ДНК с

различной концентрацией (50, 100, 200 мкг/мл) и по 2 мл дифениламинового реактива. Помещают пробирки на 10 – 15 минут в кипящую водяную баню для развития окраски, затем определяют оптическую плотность каждого из растворов при длине волны 595 нм. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс концентрацию использованных растворов ДНК, по оси ординат – соответствующие им значения оптической плотности.

Затем берут две пробирки: в контрольную пробирку наливают 1 мл воды, в опытную пробирку – 1 мл водного раствора ДНК (неизвестной концентрации). В каждую пробирку добавляют по 2 мл дифениламинового реактива. Обе пробирки помещают на 10 – 15 минут в кипящую водяную баню. Затем пробы охлаждают и измеряют насыщенность окраски против контроля при $\lambda = 595$ нм. Зная оптическую плотность пробы, по калибровочному графику находят количество ДНК в ней.

Состав проб

Пробирки	ДНК (мл)				Дифенил – аминовы й реактив (мл)	H ₂ O (мл)
	50 (мкг/мл)	100 (мкг/мл)	200 (мкг/мл)	X (мкг/мл)		
1	1	–	–	–	2	–
2	–	1	–	–	2	–
3	–	–	1	–	2	–
X	–	–	–	1	2	–
К	–	–	–	–	2	1
10 – 15 мин кипящ. водян. баня						
охладить, измерить оптич. плотность при $\lambda=595$ нм						

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №9

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Реактивы: *раствор ДНК – 0,003 %.*

Оборудование: *спектрофотометр, термостат.*

Ход работы.

Чистоту препаратов нуклеиновых кислот определяют по спектру поглощения препарата в ультрафиолетовой области и по величине отношений $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$.

В спектрофотометрическую кювету наливают 3 мл раствора ДНК (0,003%) и на спектрофотометре измеряют оптическую плотность (D) при длине волн: 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм.

На основе полученных данных строят график зависимости D (ДНК) от длины волны, т.е спектр поглощения ДНК. Находят максимум поглощения в ультрафиолетовом свете препарата ДНК. Затем определяют отношения $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$. Для препаратов нуклеиновых кислот достаточно хорошо очищенных от примесей белков и полисахаридов, эти показатели должны быть в пределах 2,1 – 2,4. Делают вывод о чистоте исследованного препарата ДНК.

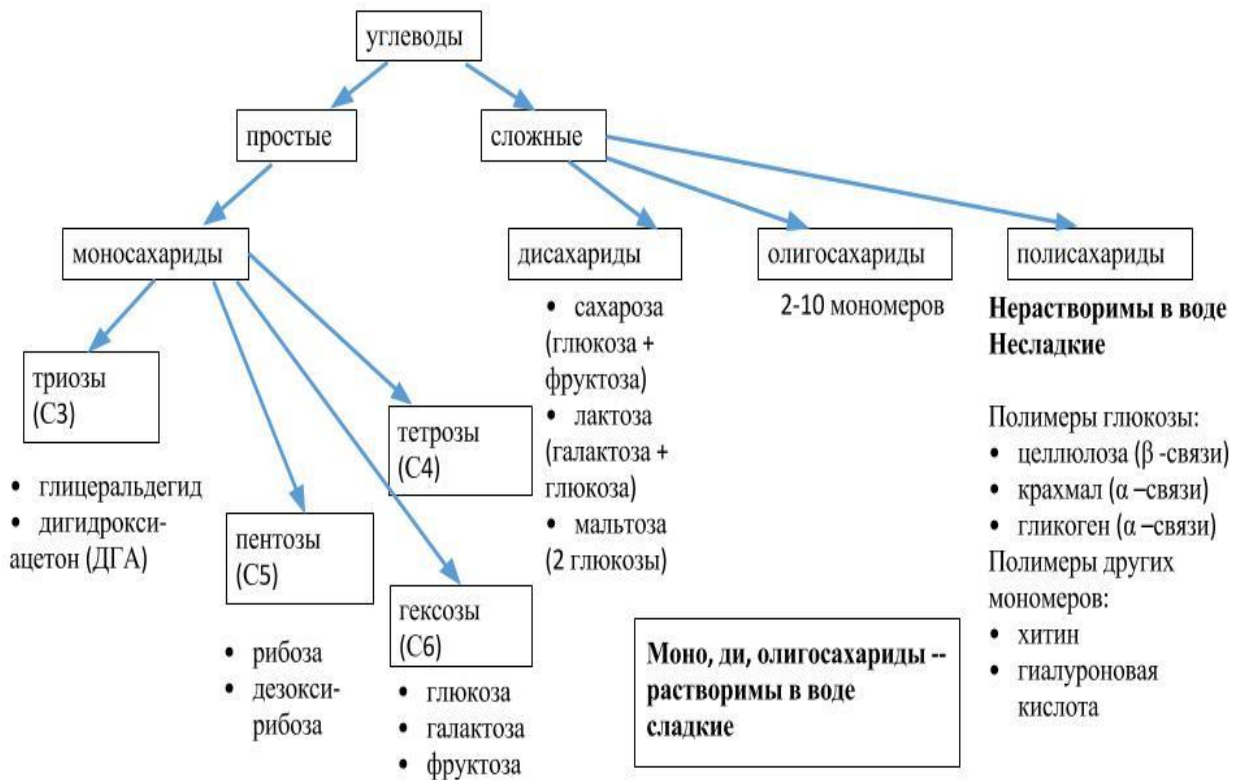
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 2

1. Какие вещества являются мономерами нуклеиновых кислот? При помощи каких химических связей они соединены в полинуклеотидные цепи?
2. Что такое нуклеопротеиды? К какому классу биомолекул они относятся?
3. В каких участках клетки локализуются нуклеопротеиды?
4. Химический состав нуклеиновых кислот.
5. Назовите особенности строения нуклеотидов ДНК и РНК.
6. Что такое минорные основания? Приведите примеры.
7. Какой состав имеют нуклеопротеиды.
8. При каких условиях проводится гидролиз нуклеопротеидов? Что является продуктами такого гидролиза? Как можно его контролировать?
9. При каких условиях нуклеопротеиды распадаются на нуклеиновые кислоты и белки?
10. Какие продукты полного гидролиза нуклеопротеидов? Какими качественными реакциями их можно обнаружить?

11. Общая характеристика, классификация и функции нуклеиновых кислот.
12. Первичная и вторичная структура ДНК. Правила Чаргаффа.
13. Первичная структура РНК. Типы РНК.
14. Структура тРНК. Особенности нуклеотидного состава тРНК.
15. Назовите структурные различия ДНК и РНК.
16. Гидролиз нуклеиновых кислот. Продукты их полного и неполного гидролиза.
17. Напишите формулы пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Лактимные и лактамные формы оксипроизводных азотистых оснований.
18. Принцип комплементарного взаимодействия азотистых оснований (примеры).
19. Написать структурную формулу тринуклеотида dGdCdT и УАС.
20. Написать структурные формулы нуклеозидов, входящих в состав РНК.
21. Написать структурные формулы нуклеотидов АМР и GTP.
22. Запишите формулы нуклеотидов ГТФ, УДФ, дАМФ, дТДФ, дЦТФ.
 - а) в составе нуклеотидов обведите карандашом пуриновые азотистые основания;
 - б) подчеркните нуклеотиды, содержащие рибозу, одной чертой а нуклеотиды, содержащие дезоксирибозу – двумя чертами.
23. Напишите формулу тринуклеотида А–Ц–Г.
 - а) укажите фосфодиэфирные связи;
 - б) отметьте 5' – и 3' –концы.
24. Дан фрагмент одной из цепей ДНК:
Г–Ц–Т–А–А–Т–Ц–Г–Ц–Т–А–Г.
 - а) Запишите нуклеотидную последовательность второй комплементарной цепи;
 - б) укажите 5' – и 3' –концы в цепей ДНК.
25. Фрагмент иРНК имеет следующую нуклеотидную последовательность:
5'А–Ц–У–А–Ц–Ц–А–Ц–А–А–Ц–Г–У–Г–А3'
 - а) определите, сколько аминокислот закодировано в данном фрагменте;

- б) пользуясь таблицей генетического кода, определите закодированную аминокислотную последовательность;
- в) по фрагменту иРНК установите первичную структуру обеих цепей ДНК, отметьте транскрибируемую цепь, укажите 5' – и 3' – концы в цепях ДНК.
26. Что собой представляет ДНК по внешнему строению?
 27. Что является мономером в ДНК?
 28. Какое строение имеет каждый нуклеотид?
 29. По какому принципу соединяются цепи ДНК между собой?
 30. Какие связи образуются между нуклеотидами в ДНК?
 31. Что собой представляет РНК по внешнему виду?
 32. Какое строение имеет нуклеотид РНК?
 33. Какие типы РНК вы знаете?
 34. Когда и кто впервые выделил ДНК из растения?
 35. Кто и когда впервые обосновал теорию строения молекулы ДНК?

ГЛАВА III. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА УГЛЕВОДОВ



Углеводы являются наиболее распространенным классом органических соединений природы. Углеводы входят в состав клеток и тканей всех растительных и животных организмов. По массе углеводы составляют основную часть органического вещества на земле. Углеводы в живой природе имеют большое значение как источники запасной энергии в метаболических процессах: крахмал – в растениях; гликоген – в животных. Углеводы служат строительным материалом для многих организмов: целлюлоза — клеточные стенки растений, мурамин – бактерий, хитин – грибов и т. д. Углеводы являются составными частями важнейших вещества, таких как нуклеиновые кислоты, липиды, белки, выполняющих в организме сложные и важные функции.

Углеводы составляют обширную группу соединений, которая делится на моносахариды (простые сахара) и продукты их конденсации *олиго-* и *полисахариды-* (сложные сахара). **Моносахариды** — это простейшие углеводы, не подвергающиеся гидролизу. **Сложные углеводы** способны

гидролизироваться. **Олигосахаридами** называются углеводы, гидролизующиеся с образованием 2–10 молекул моносахаридов. Полисахариды высокомолекулярные углеводы, при гидролизе которых образуются сотни и тысячи молекул моносахаридов.

ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ

Резервно-энергетическая – глюкоза является моносахаридом, способным откладываться в виде крахмала (растительные клетки) или в виде гликогена (животные клетки). Большое преимущество углеводов (по сравнению с жирными кислотами) состоит в их способности окисляться как в аэробных, так и в анаэробных условиях (гликолиз).

Защитно-механическая – основное вещество трущихся поверхностей суставов, находятся в сосудах и слизистых оболочках (гиалуроновая кислота и другие гликозаминогликаны).

Опорно-структурная – целлюлоза в растениях, гликозаминогликаны в составе протеогликанов, например, хондроитинсульфат в соединительной ткани.

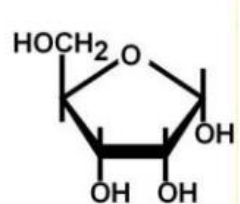
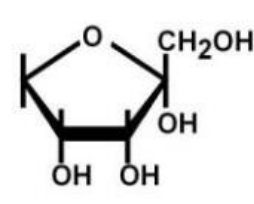
Гидроосмотическая и ионрегулирующая – гетерополисахариды обладают высокой гидрофильностью, отрицательным зарядом и, таким образом, удерживают H_2O , ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ в межклеточном веществе, обеспечивают тургор кожи, упругость тканей.

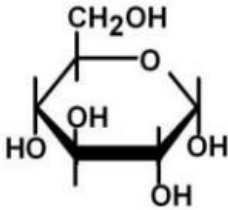
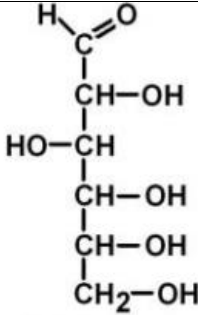
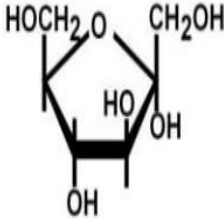
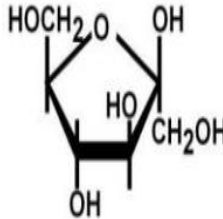
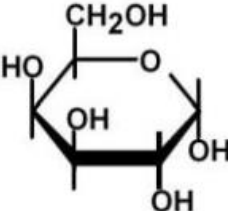
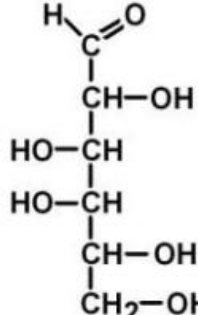
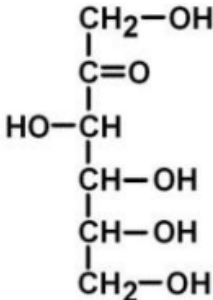
Кофакторная – гепарин является кофактором липопротеинлипазы плазмы крови (участие в обмене липопротеинов) и фермента антикоагулянтной системы крови - антитромбина III.

Моносахариды – это углеводы, которые не могут быть гидролизованы до более простых форм углеводов. В свою очередь они подразделяются:

- на стереоизомеры по конформации асимметричных атомов углерода – например, L- и D-формы,
- в зависимости от расположения НО-группы первого атома углерода – α - и β -формы,
- в зависимости от числа содержащихся в их молекуле атомов углерода – триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы, октозы,

– в зависимости от присутствия альдегидной или кетонной группы – кетозы и альдозы.

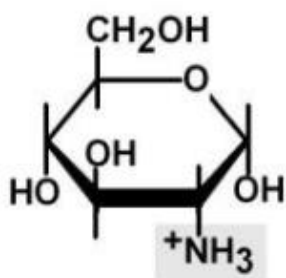
	Альдозы	Кетозы
Триозы	$ \begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array} $ <p>Глицеральдегид</p>	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $ <p>Диоксиацетон</p>
Тетрозы	$ \begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $ <p>Эритроза</p>	
Пентозы	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{OH} \end{array} $  <p>α-Рибоза</p>	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{OH} \end{array} $  <p>α-Рибулоза</p>

Гексозы				
	α-Глюкоза	D-	α-Фруктоза	β-
	Глюкоза		Фруктоза	
				
α-Галактоза	D-	D-Фруктоза		
Галактоза				

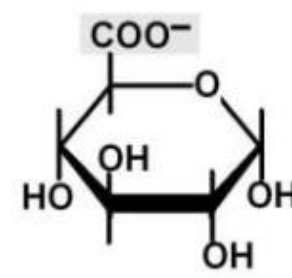
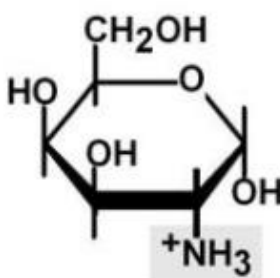
Производные моносахаридов

В природе существуют многочисленные производные как перечисленных выше моносахаров, так и других. К ним, например, относятся:

Уроновые кислоты – дериваты гексоз, имеющие в 6 положении карбоксильные группы, например, глюкуроновая, галактуроновая, идуроновая, аскорбиновая кислоты.



Глюкоамин



Галактозамин

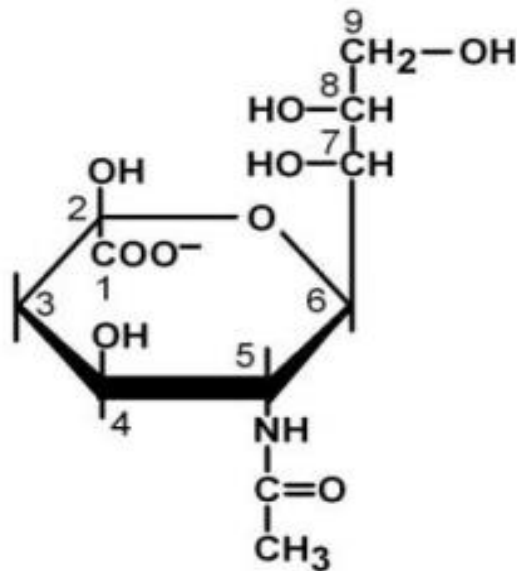
Глюкуроновая кислота

Строение производных некоторых гексоз

Аминосахара – производные моносахаров, содержащие аминогруппы, например, глюкозамин или галактозамин. Эти

производные обязательно входят в состав дисахаридных компонентов гетерополисахаридов. Ряд антибиотиков (эритромицин, карбомицин) содержат в своем составе аminosахара.

Сиаловые кислоты являются N- или O-ацил-производными нейраминовой кислоты, которую можно рассматривать как производное глюкозы. Они, наряду с аminosахарами, входят в состав гликопротеинов и гликолипидов (ганглиозидов).



N-Ацетилнейраминавая кислота (сиаловая кислота)

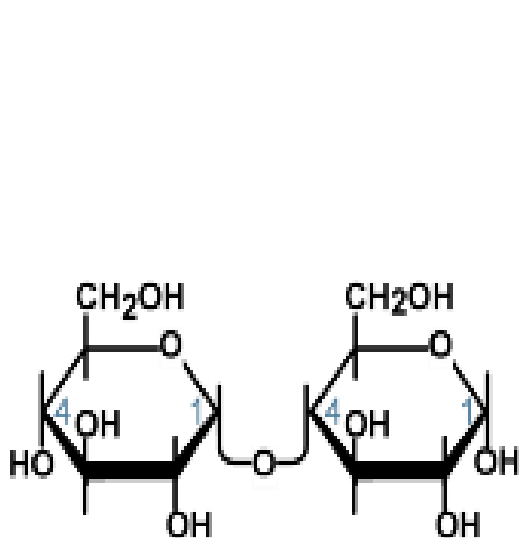
Гликозиды – соединения, образующиеся путем конденсации моносахарида (свободного или в составе полисахарида) с

гидроксильной группой другого соединения, которым может быть любой моносахарид или вещество неуглеводной природы (агликон), например, метанол, глицерол, стерол, фенол.

Дисахариды – это углеводы, которые при гидролизе дают две одинаковые или различные молекулы моносахарида.

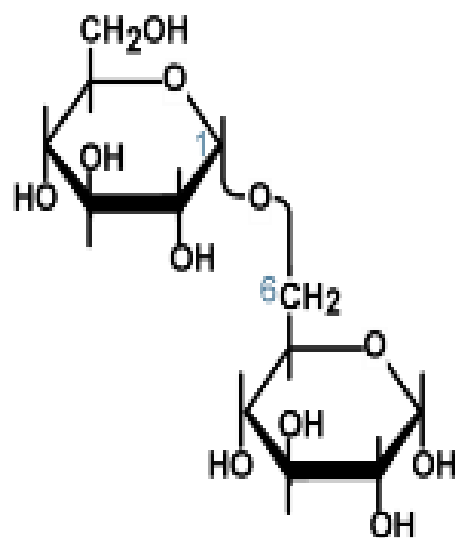
Сахароза – пищевой сахар, в которой остатки α -глюкозы и β -фруктозы связаны α 1,2-гликозидной связью. Присутствует в большинстве фруктов, в ягодах и в некоторых овощах, в наибольшем количестве содержится в сахарной свекле и сахарном тростнике, в моркови, ананасах, сорго.

Мальтоза – промежуточный продукт гидролиза крахмала и гликогена, в ней два остатка α -глюкозы связаны α 1,4-гликозидной связью, содержится в солоде, проростках злаков.



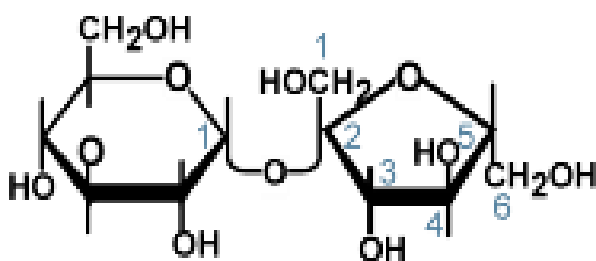
Мальтоза

α -D-глюкопиранозил-(1-4)-
 α -D-глюкопираноза



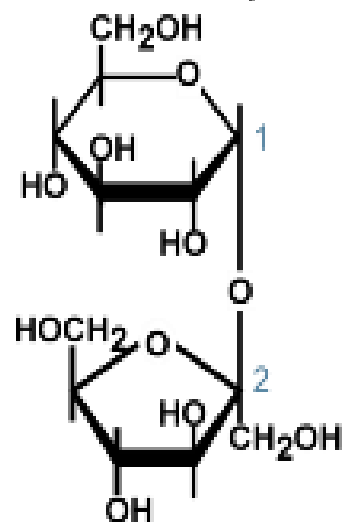
Изомальтоза

α -D-глюкопиранозил-(1-6)-
 α -D-глюкопираноза



Сахароза (два варианта написания)

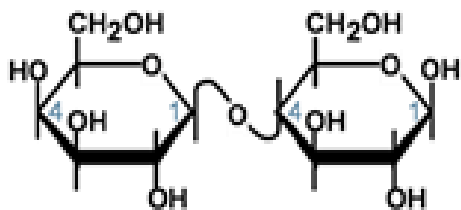
α -D-глюкопиранозил-(1-2)- β -D-фруктофураноза



Лактоза – содержится в молоке (до 4-6%), в ней остаток β -галактозы связан с α - или β -глюкозой β 1,4-гликозидной связью. В некоторых ситуациях (например, беременность) может появляться в моче.

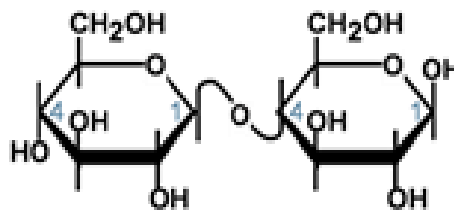
Целлобиоза – промежуточный продукт гидролиза целлюлозы в кишечнике, в ней остатки β -глюкозы связаны β 1,4-гликозидной связью. Здоровая микрофлора кишечника

способна гидролизовать до 3/4 поступающей сюда целлюлозы до свободной глюкозы, которая либо потребляется самими микроорганизмами, либо всасывается в кровь.



Лактоза

β -D-галактопиранозил-(1-4)-
 β -D-глюкопираноза



Целлобиоза

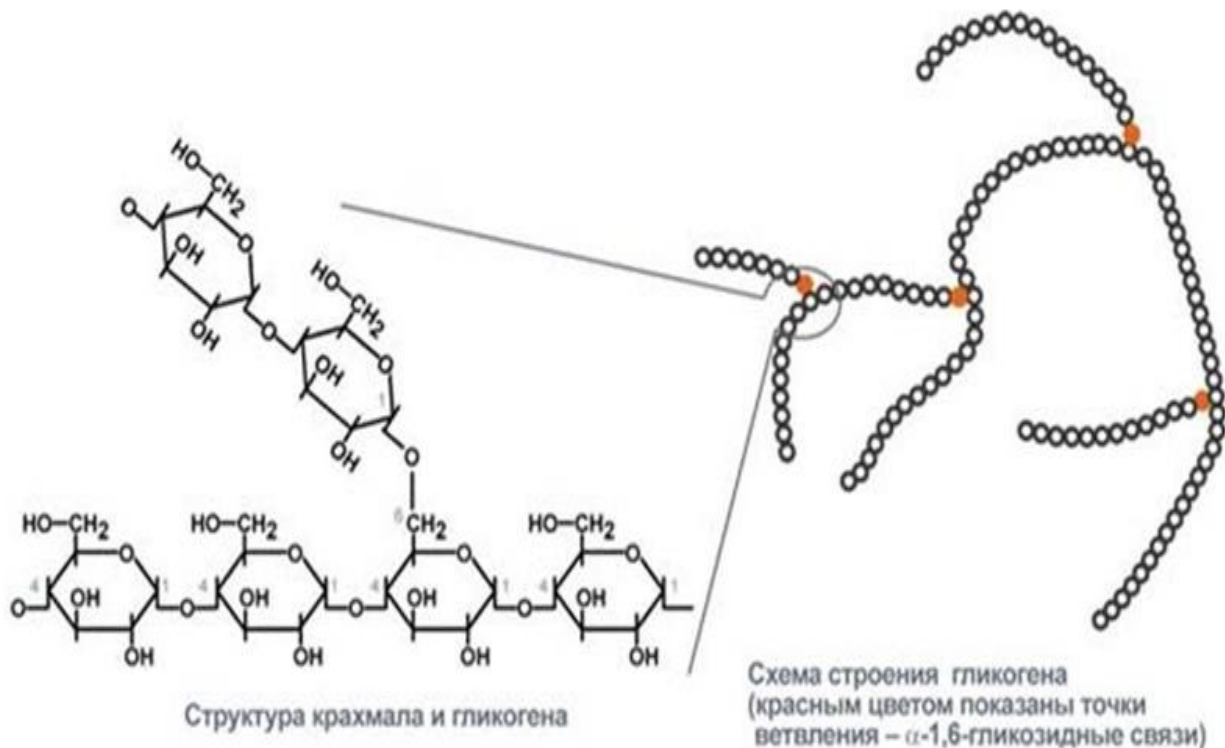
β -D-глюкопиранозил-(1-4)-
 β -D-глюкопираноза

Полисахариды. Выделяют **гомополисахариды**, состоящие из одинаковых остатков моносахаров (крахмал, гликоген, целлюлоза) и **гетерополисахариды** (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты), включающие разные моносахара.

Крахмал – гомополимер α D-глюкозы. Находится в злаках, бобовых, картофеле и некоторых других овощах. Синтезировать крахмал способны почти все растения.

Двумя основными компонентами крахмала являются амилоза (15-20%) и амилопектин (80-85%). Амилоза представляет собой неразветвленную цепь с молекулярной массой от 5 до 500 кДа, в которой остатки глюкозы соединены исключительно α 1,4-гликозидными связями.

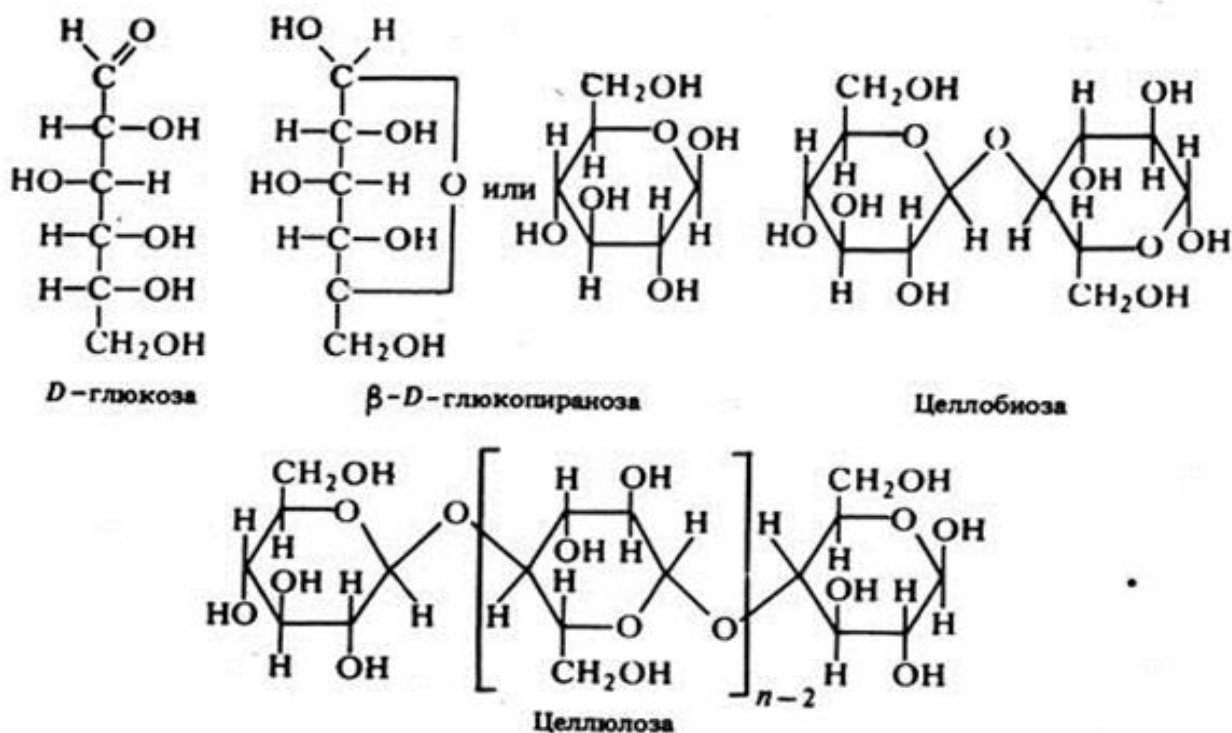
Амилопектин содержит α 1,4- и α 1,6-гликозидные связи, имеет массу не менее 1 млн Да и является разветвленной молекулой, причем ветвление происходит за счет присоединения небольших глюкозных цепочек к основной цепи посредством α 1,6-гликозидных связей. Каждая ветвь имеет длину 24-30 остатков глюкозы, веточки возникают примерно через 14-16 остатков глюкозы в цепочке.



Гликоген – резервный полисахарид животных, находится в цитоплазме многих типов клеток, но в наибольшей мере в гепатоцитах и миоцитах. Структурно он схож с амилопектином, но, во-первых, длина веточек меньше – 11-18 остатков глюкозы, и во-вторых, он более разветвлен – через каждые 8-10 остатков. За счет этих особенностей гликоген более компактно уложен, что немаловажно для животной клетки.

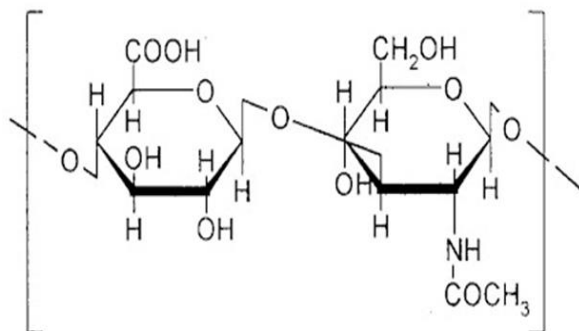
Целлюлоза состоит из остатков β -глюкозы, единственной связью в целлюлозе является β 1,4-гликозидная связь. Она является наиболее распространенным органическим соединением биосферы, около половины всего углерода Земли находится в ее составе. В отличие от предыдущих полисахаридов целлюлоза является внеклеточной молекулой, имеет волокнистую структуру и абсолютно нерастворима в воде.

Основными представителями **гликозаминогликанов** является гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, кератансульфаты и дерматансульфаты, гепарин. Большинство из них характеризуется наличием повторяющихся дисахаридных остатков.

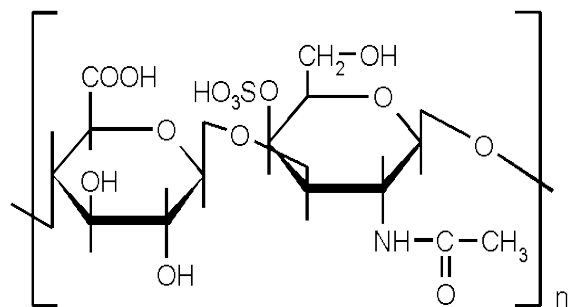


Гиалуроновая кислота состоит из повторяющихся дисахаридных звеньев: глюкуроновая кислота и *N*-ацетилглюкозамин, соединенные β 1,3-гликозидной связью. **Хондроитин-4-сульфат** включает повторяющееся дисахаридное звено: глюкуроновая кислота и 4-сульфат-*N*-ацетилгалактозамин, соединенные β 1,3-гликозидной связью.

Дисахариды включают в себя уоновую кислоту и аминсахар. Дублируясь, дисахариды образуют олиго- и полисахаридные цепи – **гликаны**. В биохимии используются синонимы – **кислые гетерополисахариды** (имеют много кислотных групп) и **гликозаминогликаны** (производные глюкозы, содержат аминогруппы). Эти молекулы входят в состав протеогликанов (мукополисахаридов) – сложных белков, функцией которых является заполнение межклеточного пространства и удержание здесь воды, также они выступают как смазочный и структурный компонент суставов, хрящей, кожи. В частности, гиалуроновая кислота находится в стекловидном теле глаза, в синовиальной жидкости, в межклеточном пространстве.



Строение гиалуроновой кислоты



Строение хондроитин-4-сульфата

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10. КАЧЕСТВЕННЫЕ РАБОТЫ НА УГЛЕВОДЫ

Обнаружение лактозы и мальтозы.

Лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде образуют окрашенное соединение

Реактивы: концентрированный раствор аммиака, 1% раствор лактозы, 1 % – й раствор мальтозы, 20 % – й раствор гидроксида калия.

Оборудование: штатив, пробирки, спиртовки, пипетки на 1 мл, 0,5 мл, 50 мкл.

Ход работы

В две пробирки, содержащие по 1 мл лактозы и мальтозы, добавляют по 0,5 мл раствора аммиака, 50 мкл гидроксида калия и нагревают на водяной бане до появления красно-коричневого цвета.

Обнаружение восстанавливающих сахаридов реакцией Троммера

Моносахариды и некоторые дисахариды, в молекулах которых есть карбонильная группа, в щелочной среде восстанавливают оксид меди (II) в оксид меди (I).

Реактивы: 1 % – й растворы глюкозы, мальтозы, сахарозы, крахмала, 10 % – й раствор гидроксид натрия, 5 % – й раствор сульфата меди.

Ход работы

В 4 пронумерованные пробирки внести по 10 капель одного из углеводов: глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала. Добавить по 10 капель гидроксида натрия и по 2 капли сульфата меди, нагревают до кипения. В пробирках с мальтозой и глюкозой выпадает осадок оксида меди (I) кирпично–красного цвета.

Обнаружение крахмала

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

Реактивы: 1 % – й раствор крахмала, 1% – й раствор йода.

Ход работы

К 10 каплям раствора крахмала добавить 1 – 2 капли йода. Наблюдается ярко–синее окрашивание.

Обнаружение крахмала в продуктах питания

Крахмал основной резервный углевод растений, представляет смесь двух полисахаридов, линейного (амилозы) и разветвленного (амилопектина), дает цветную реакцию с раствором иода в иодиде калия – окрашивается в темно–синий цвет. Крахмал белое аморфное вещество, не растворимое в холодной воде, выделяют из картофеля.

Материалы и реактивы: крахмал; картофель; отварной рис; мука; яблоко; лимон; растительное масло; раствор иода в иодистом калии (1 г иодистого калия растворяют в нескольких миллилитрах воды, в концентрированном растворе соли растворяют 1 г иода и разбавляют водой до 300 см³) или спиртовой раствор иода; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки; ступка с пестиком.

Ход работы

1. Исследуемые твердые продукты (картофель, отварной рис, яблоко, лимон) по отдельности разотрите до кашецеобразного состояния в ступе.
2. В семь пронумерованных пробирок поместите по 0,5 –1 г растертых продуктов.
3. Во все пробирки добавьте по 2 – 3 см³ дистиллированной воды и пробы тщательно перемешайте.
4. Добавьте в пробирки по 1 – 2 капли раствора иода.
5. Отметьте пробирки, в которых наблюдается синее окрашивание.

Оформление результатов

Оформите проведенные исследования в виде таблицы. Сделайте вывод о содержании крахмала в изученных продуктах.

№ пробирки	Исследуемый продукт	Наблюдаемая окраска	Содержание крахмала

Количественное определение глюкозы

Глюкоза при нагревании с ортолуидиновым реактивом дает зеленую окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации глюкозы.

Реактивы: ортолуидиновый реактив, стандартный раствор глюкозы 1 мг/мл, раствор глюкозы неизвестной концентрации.

Оборудование: Спектрофотометр, пипетки, водяная баня, штатив, пробирки.

Ход работы

К 0,2 мл стандартного раствора глюкозы и 0,2 мл раствора с неизвестной концентрацией добавить по 2 мл ортолуидинового реактива. Пробирки со смесью поместить в кипящую водяную баню на 8 минут. Пробирки вынуть, охладить под струей водопроводной воды до комнатной температуры.

Оптическую плотность раствора измеряют при длине волн 590 – 650 нм. Расчет ведут по формуле:

$$C_x = \frac{E_x}{E_{ст}} * C_{ст}$$

где:

C_x – концентрация глюкозы в исследуемом растворе (мг/мл);

$C_{ст}$ – концентрация глюкозы в стандартном растворе (мг/мл);

E_x – оптическая плотность исследуемого раствора;

$E_{ст}$ – оптическая плотность стандарта.

Химические свойства моносахаридов

Реактивы: глицерин; 1 %-й раствор глюкозы; 1 %-й раствор фруктозы или 2 %-й раствор меда (основным компонентом меда является фруктоза); реактив Селиванова (0,05 г резорцина

растворяют в 100 см³ 20 %-й соляной кислоты); 5 %-й раствор сульфата меди; 5 %-й раствор гидроксида натрия; 5 %-й раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте); 10 %-й раствор аммиака; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, водяная баня.

Ход работы

Качественная реакция на гликоли.

В четыре пронумерованные пробирки внесите по 10 капель воды, глицерина, растворов глюкозы и фруктозы (или раствора меда). Добавьте в каждую пробирку по 2 капли раствора сульфата меди, затем по 5 капель раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирок тщательно перемешайте. Образуется ли осадок гидроксида меди (II)? Сделайте вывод о структурной особенности глюкозы и фруктозы.

Качественная реакция на альдегидную группу.

Полученные в предыдущих опытах растворы, содержащие глюкозу и фруктозу, нагрейте на водяной бане. Раствор окрашивается сначала в желтый, а затем в оранжевый цвет. О чем это говорит?

В пробирку налейте 1 см³ раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака. Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 см³ раствора глюкозы, а во вторую 1 см³ раствора фруктозы (или раствора меда). Пробирки поставьте в горячую (80 °С) воду на 5 – 10 минут. На стенках пробирок образуется зеркальный налет металлического серебра. Запишите уравнения протекавших реакций, учитывая, что у фруктозы окисляется до карбоксильной группы концевая спиртовая группа, соседняя с карбонильной.

Качественная реакция на кетозы.

В две пробирки внесите по 1 см³ раствора Селиванова. В одну пробирку добавьте 2 капли раствора глюкозы, а во вторую – 2 капли раствора фруктозы (или 4 капли раствора меда). Пробирки нагрейте на кипящей водяной бане. В пробирке с раствором фруктозы (или меда) появляется вишнево-красное окрашивание.

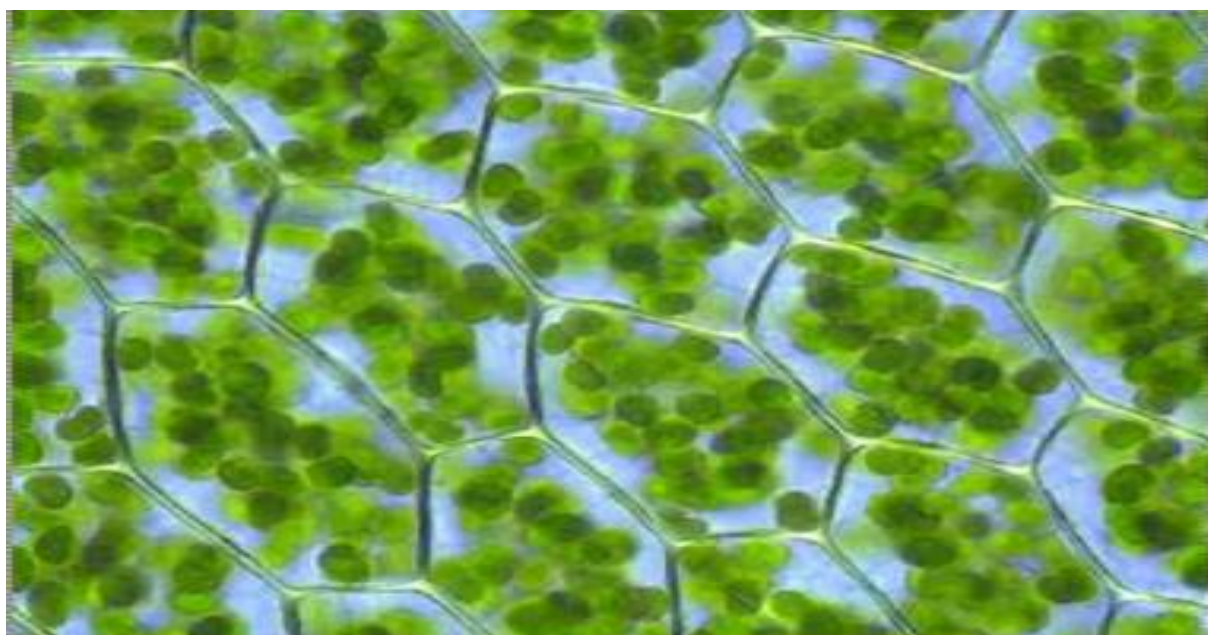
Оформление результатов

Оформите проведенные исследования в виде таблицы.

Сделайте выводы о структуре моносахаридов.

№ задания	Исследуемое вещество	Реагент	Условия проведения реакции	Наблюдаемое явление	Вывод

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №11. ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ ОТ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ



Гидролиз полисахаридов

Реактивы: 1 %-й раствор сахарозы; 1,5 %-й крахмальный клейстер; фильтровальная бумага; 10 %-й раствор серной кислоты; 5 %-й раствор сульфата меди; 10 %-й раствор гидроксида натрия; концентрированная серная кислота.

Оборудование: пробирки, водяная баня.

Ход работы

Гидролиз сахарозы.

В две пробирки поместите по 10 капель раствора сахарозы. В одну пробирку добавьте 1 – 2 капли 10 %-го раствора серной кислоты. Пробирку с подкисленным раствором сахарозы поставьте в почти кипящую водяную баню. Через 20 минут пробирку достаньте и охладите. В обе пробирки прибавьте по 1 капле раствора сульфата меди и по каплям прибавляйте 10 %-й раствор гидроксида натрия до появления интенсивно-синей окраски, свидетельствующий о полной нейтрализации кислоты. Нагрейте обе пробирки на водяной бане. В обеих ли пробирках появилась оранжево-желтая окраска?

Гидролиз крахмала.

Поместите в пробирку 10 капель крахмального клейстера и добавьте 2 капли 10 %-го раствора серной кислоты. Поставьте пробирку в кипящую водяную баню. Через 30 минут пробирку выньте. Раствор стал прозрачным. К полученному раствору добавьте 1 каплю раствора сульфата меди и по каплям добавляйте 10 %-й раствор гидроксида натрия до появления интенсивно-синей окраски. Нагрейте пробирку на водяной бане. Появляется оранжево-желтая окраска.

Гидролиз целлюлозы.

При выполнении этого задания необходимо соблюдать особую осторожность!

Поместите в пробирку мелкоизмельченный кусочек фильтровальной бумаги и добавьте 1–3 капли (ОСТОРОЖНО!) концентрированной серной кислоты так, чтобы кислота смочила бумагу. Смесь осторожно нагрейте (обычно достаточно тепла руки) до почти полного растворения целлюлозы. К полученному раствору добавьте 10 капель воды, хорошо перемешайте и поместите пробирку в кипящую водяную баню на 30 минут. По окончании реакции к небольшой порции раствора прибавьте 1 каплю раствора сульфата меди и по каплям

добавляйте 10 %-й раствор гидроксида натрия до появления интенсивно-синей окраски. Нагрейте пробирку на водяной бане. Появляется оранжево-желтая окраска.

Оформление результатов

Оформите проведенные исследования в виде таблицы. Сделайте выводы о структуре полисахаридов и продуктах его гидролиза.

№ задания	Исследуемое вещество	Наблюдаемое явление	Вывод

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №12. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ САХАРОЗЫ И ГЛЮКОЗЫ

Принцип метода. Глюкоза при нагревании с о-толуидином в растворе уксусной кислоты дает зеленое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию глюкозы. Содержание глюкозы определяют в жидкости, из которой предварительно удаляют белок.

Сахарозу в пробе определяют после его кислотного гидролиза.

Реактивы: орто-толуидиновый реактив, ТХУ 30 %-й раствор, стандартный раствор глюкозы 2 мг/мл, 2 н соляная кислота.

Оборудование: пробирки, кюветы, спектрофотометр, центрифуга.

Ход работы

№ пробирки	Содержимое	Действия
1	0,5 мл. опытной жидкости + 0,5 мл. ТХУ	1) 10 мин Выдержать, до выпадения белого осадка 2) Отцентрифугировать 3) Отобратить 0,5 мл
2	0,5 мл стандарта (1 мг глюкозы) + 0,5 мл. ТХУ	Отобратить 0,5 мл
3	0,5 мл. NaCl + 0,5 мл. ТХУ	Отобратить 0,5 мл

Ко всем 0,5 мл из каждой пробирки добавить по 2 мл орто-толуидинового реактива.

Пробирку 1 прокипятить в водяной бане в течении 8 минут.

Измерить оптическую плотность содержимого пробирки 1` против контрольной 2 пробы при длине волны 640 нм.

По формуле $C_{оп} = (C_{ст} * E_{оп}) / E_{ст} =$ мг/мл рассчитать содержание глюкозы в опытной жидкости.

$C_{оп}$ – концентрация глюкозы в исследуемой пробе,

$C_{ст}$ – концентрация глюкозы в стандартной пробе,

$E_{оп}$ и $E_{ст}$ – оптическая плотность опытной и стандартной проб.

Для определения сахара к 1 мл исследуемой пробы добавляют 0,5 мл 2 н соляной кислоты и проводят гидролиз 20 минут при температуре 80 °С. Полученный гидролизат охлаждают и нейтрализуют 0,5 мл 2 н раствора гидроксида натрия. Далее в гидролизате определяют содержание глюкозы С в мг/мл. Концентрацию сахарозы находят по разнице содержания глюкозы в растворе после и до кислотного гидролиза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №13. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФРУКТОЗЫ

Цель работы: ознакомиться с фотометрическим методом определения фруктозы в биоматериале.

Принцип метода. Определение фруктозы основано на реакции Селиванова: при нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол. Оксиметилфурфурол с резорцином образуют соединение (продукт конденсации), окрашенное в вишнево-красный цвет. Скорость образования оксиметилфурфуrolа в реакции фруктозы с соляной кислотой при нагревании во много раз больше, чем для альдогексоз, что обуславливает специфичность реакции Селиванова для фруктозы.

Величину экстинкции раствора, содержащего продукт конденсации образованного из фруктозы оксиметилфурфуrolа с резорцином, определяют фотометрически. Для количественного определения содержания фруктозы готовят стандартный раствор фруктозы (контроль),

Реактивы: исследуемый раствор фруктозы (10 — 100 мг/мл), стандартный раствор фруктозы (25 мг/мл), 0,1 %-й раствор резорцина в 96 %-м этиловом спирте, 30 %-й раствор соляной кислоты.

Оборудование: стеклянные палочки, пробирки с пришлифованным воздушным обратным холодильником, пипетки, штатив для пробирок, водяная баня, часы, термометр лабораторный, спектрофотометр.

Ход работы:

В одну пробирку с пришлифованным обратным холодильником вносят 2 мл исследуемого раствора фруктозы (проба), в другую — 2 мл стандартного раствора фруктозы (контроль). Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл раствора резорцина и по 6 мл раствора соляной кислоты. Содержание пробирок перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 8 мин при t 80 °С. После нагревания растворы охлаждают и колориметрируют при 490 нм. Экстинкцию измеряют, используя реактивы, заменяя 2 мл раствора фруктозы 2 мл дистиллированной воды.

Массовую концентрацию фруктозы в исследуемой пробе (мкг/мл) вычисляют по формуле:

$$C = QE_1/E_2,$$

где E_1 и E_2 — экстинкция исследуемого и стандартного растворов соответственно;

Q — коэффициент, который представляет собой отношение массовой концентрации в стандартной пробе к объему пробы.

Этим методом можно определить также массовую концентрацию фосфорных эфиров фруктозы — фруктозо–1,6–дифосфата и фруктозо–6–фосфата. Ход работы такой же, как для фруктозы, но для расчета концентрации фруктозо–1,6–дифосфата найденное значение для фруктозы нужно умножить на 3,6, а для фруктозо–6–фосфата — на 2,39. Эти поправки вводятся с учетом того, что в фруктозо–1,6–дифосфате и в фруктозо–6–фосфате фруктоза составляет 53 % и 60,5% соответственно, а интенсивность ее цветовой реакции—52,3 % и 69,2 %.

Оформление работы

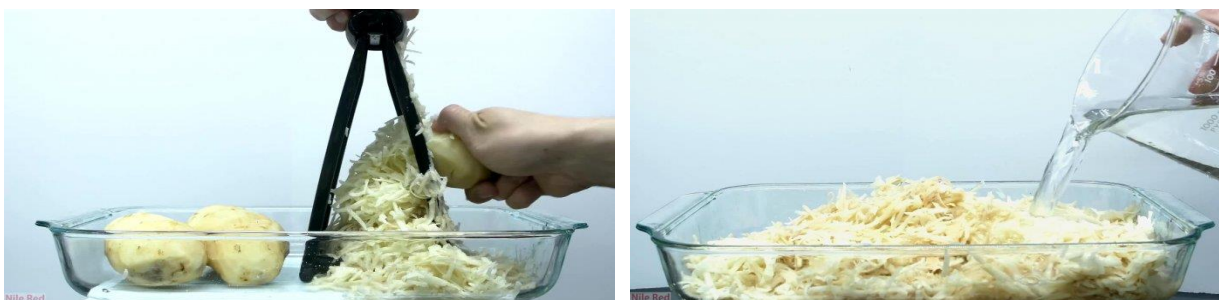
Привести расчеты по приготовлению реактивов. Провести количественное определение фруктозы, привести соответствующие расчеты.

Крахмал является довольно распространённым источником энергии в рационе человека. Он содержится не только в картофеле, но и во многих продуктах, которые мы едим каждый день. Крахмал является одним из продуктов фотосинтеза и довольно широко распространён среди растений, где выступает в качестве запаса веществ. Так, высокое содержание крахмала (около 80%) наблюдается в составе представителей злаковых культур – в зёрнах риса, пшеницы, кукурузы. В клубнях картофеля содержание крахмала меньше – примерно, 20 %.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14. ВЫДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА ИЗ КАРТОФЕЛЯ

Сам крахмал – порошок белого цвета, растворим в горячей воде и нерастворим в холодной. Его получение не является трудоёмким процессом. Итак, для проведения эксперимента нам понадобится четыре крупные картофелины, которые необходимо очистить. Далее на тёрке измельчаем наш картофель.

При этом разрушаются растительные клетки, в которых содержится крахмал. После измельчения заливаем картофельную стружку тёплой водой, которая должна её чуть покрывать.



Крахмал сразу начинает выделяться, и нам лишь надо чуть “соскрести” его рукой в раствор. Когда покажется, что весь крахмал смыт с картофеля, переливаем раствор в другую ёмкость.

Рукой не даём стружке просочиться вместе с жидкостью, однако на данном этапе это не критично. После ещё пару раз промываем стружку. Более она нам не понадобится, её можно использовать для приготовления чего-либо или просто

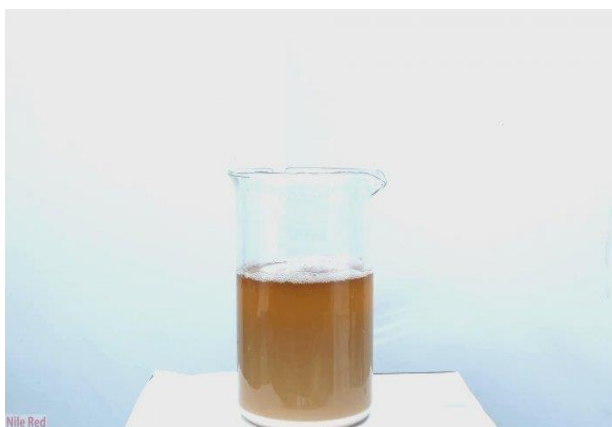
выбросить. На данном этапе надо дать раствору настояться около часа, чтобы крахмал осел на дно сосуда.



Вода в растворе приобретает коричневый цвет из-за разложения прочих веществ, содержащихся в картофеле. Когда крахмалосядет, сливаем большую часть воды. Оставшийся в сосуде раствор фильтруем через сито и промываем небольшим количеством воды.



Снова даём раствору отстояться, для того чтобы крахмал осел.



Через полчаса можно продолжать опыт мутную воду сливаем, а собравшийся на дне крахмал промываем дистиллированной водой и перемешиваем.



опять даем крахмалу осесть.

Сливаем мутную воду и повторяем ещё раз. Это мы делаем для того, чтобы на выходе у нас было чистое вещество. После повторной процедуры выкладываем осадок ложкой на обычной бумаге, подстелив под неё бумажное полотенце, и оставляем высыхать. Через сутки крахмал высохнет, и мы получим белый хрустящий порошок.

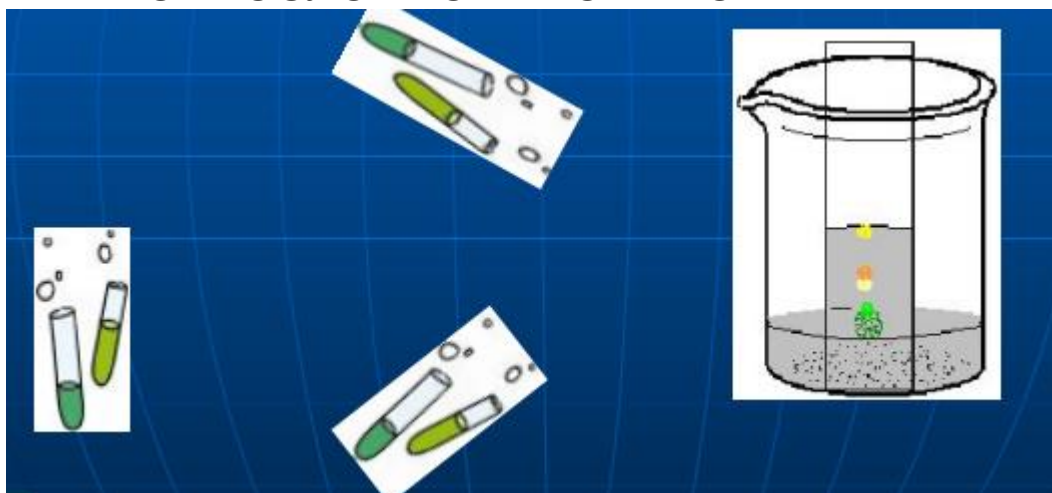


Выход чистого вещества составил 47 грамм.

Заключение

Опыт получился довольно наглядный и отлично подходит для ребёнка с большой и интересной наукой – химией. Полученный крахмал в дальнейшем можно применять в пищу, либо в качестве реактива для некоторых химических опытов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ



Цель работы: ознакомиться с методом тонкослойной хроматографии углеводов.

Принцип метода. При проведении хроматографического разделения углеводов методом тонкослойной хроматографии пластинку с тонким слоем пористого носителя (например, пластинку SiluFol), на которую нанесены растворы углеводов, помещают в растворитель, который, продвигаясь за счет капиллярных сил, перемещает углевод. По завершению хроматографии проводят обработку пластинки, позволяющую выявить пятна углевода, и расчетным методом определяют массу углевода в исследуемом растворе.

Оборудование и реактивы: пластинки Silufol или Silufol–UV, исследуемый (раствор меда) и стандартный (10 мкг в пробе) раствор углевода (глюкозы, галактозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы), растворитель — смесь бутанол–ацетон–вода (4:5:1), в случае использования пластинок Silufol нафторезорциновый реактив (свежеприготовленная смесь равных объемов 20 %-го водного раствора трихлоруксусной кислоты и 0,2 %-го спиртового раствора нафторезорцина). Микропипетки, пульверизатор в случае использования пластинок Silufol или источник ультрафиолетового света в случае использования пластинок Silufol–UV, хроматографическая камера, линейка, простой карандаш, планиметр, сушильный шкаф.

Ход работы

На пластинке на расстоянии 2 см от нижнего края (линия старта) аккуратно намечают карандашом три точки нанесения растворов углеводов. С помощью микропипетки в отмеченные места наносят равные объемы исследуемого раствора углевода (5 – 20 мкг в пробе), разбавленного исследуемого раствора углевода и стандартного раствора углевода таким образом, чтобы получить пятна одного диаметра. После высушивания пятен пластинку помещают в хроматографическую камеру, на дне которой находится растворитель — смесь бутанол–ацетон– вода (4 :5:1). Высота слоя растворителя — 1 см. Хроматографию проводят до прохождения растворителем 10 см от линии старта. После этого хроматограмму высушивают и проявляют. При использовании пластинок Silufol хроматограмму опрыскивают из пульверизатора раствором нафторезорцина и сушат в сушильном шкафу 5 – 10 мин при температуре 90 – 100 °С для проявления пятен углевода. Пятна глюкозы и галактозы имеют сине–фиолетовый цвет, фруктозы — красно–черный, сахарозы и мальтозы — красный, лактозы — красно–фиолетовый, рамнозы — зеленый, ксилозы — светло–серый, манозы — светло–синий, арабинозы — сине–зеленый.

В случае использования пластинок Silufol–UV пятна углевода выявляют под ультрафиолетовым светом.

Определяют площадь пятен. Массу углевода в пробе исследуемого раствора (мкг) рассчитывают по формуле

$$\lg M = \lg M_{st} + \left(\frac{\sqrt{S} - \sqrt{S_{st}}}{\sqrt{S_p} - \sqrt{S}} \right) \lg P,$$

где M_{st} – масса углевода в пробе стандартного раствора;

S_{st} , S , S_p – площади пятна стандарта; исследуемого раствора и разбавленного исследуемого раствора;

P – фактор разведения.

Оформление работы

Привести расчеты по приготовлению реактивов. Провести ТСХ углеводов, идентифицировать их и определить содержание в пробе.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 3

1. Определите число оптических изомеров для альдопентоз.

2. Изобразите проекции Фишера всех линейных изомеров альдопентоз.
3. Определите отношение изомеров к D– или L–ряду по последнему от карбонильной группы хиральному центру.
4. Найдите среди изображенных изомеров D–рибозу.
5. Определите число оптических изомеров у альдогексоз.
6. Изобразите проекции Фишера всех линейных изомеров альдогексоз.
7. Определите отношение углеводов к D– или L–ряду.
8. Найдите среди изображенных изомеров D–глюкозу, D–галактозу, L–глюкозу.
9. На чем основан метод хроматографического разделения смеси веществ?
10. В каких условиях протекает гидролиз ди– и полисахаридов? Напишите уравнения реакций гидролиза мальтозы и целлюлозы.
11. Почему дисахарид сахароза не может существовать в двух аномерных формах, тогда как дисахарид мальтоза может существовать в двух α – и β – аномерных формах. Изобразите проекционные формы Хеуорса для аномерных форм лактозы и сахарозы.

ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Общие правила работы в лаборатории

Перед началом работы в биохимической лаборатории необходимо ознакомиться с правилами техники безопасности.

Каждый работающий в лаборатории обязан содержать свое рабочее место в чистоте и порядке. Работать в лаборатории можно только в халатах.

Работайте тщательно, аккуратно, без лишней торопливости; соблюдайте в лаборатории тишину.

Не загромождайте рабочее место портфелями, свертками, сумками и т.п.

Приступая к работе, необходимо ознакомиться с устройством приборов и аппаратов, их принципом действия.

Прежде чем приступить к лабораторной работе по данной теме, тщательно изучите ее описание; подготовьте необходимые приборы и реактивы.

Внимательно наблюдайте за ходом опыта, отмечая каждую его особенность (выпадение и растворение осадков, изменение окраски, температуры и т.д.). В ходе эксперимента аккуратно ведите записи в рабочем журнале.

Без указания преподавателя не проводите никаких дополнительных опытов.

Не переносите приборы и реактивы общего пользования.

Будьте осторожны при работе с электронагревательными приборами, не оставляйте их без присмотра.

Не принимайте в лаборатории пищу.

Категорически запрещается использовать посуду, имеющую трещины или отбитые края.

После окончания работы вымойте использованную посуду. Мытье производят водой, мыльными и слабощелочными растворами. Мытье хромовой смесью и органическими растворителями может быть рекомендовано в исключительных случаях для очистки нерастворимых в воде веществ. Эта работа производится в резиновых перчатках, фартуке и очках.

После окончания работы выключите воду, электронагревательные приборы и установки. Приведенное в порядок рабочее место сдайте дежурному лаборанту.

Правила работы с реактивами:

Все флаконы с реактивами в лаборатории должны иметь соответствующие этикетки. После использования раствора флаконы сразу закрываются пробками, которые нельзя путать. Категорически запрещается ставить их на книги и тетради.

Не расходуйте реактивы больше требуемого количества.

Нельзя брать химические вещества руками и пробовать на вкус. Вещества следует нюхать направляя их к себе движением ладони не вдыхая пары полным грудью.

Работы с вредными веществами проводить только в вытяжном шкафу.

Концентрированные кислоты и щелочи наливать осторожно в вытяжным шкафом; не уносить их на свое рабочее место.

Щелочи, кислоты и другие ядовитые вещества необходимо набирать в пипетку только при помощи резиновой груши или шприца.

Разбавление кислот, особенно серной, производят путем осторожного проливания кислоты тонкой струйкой по стеклянной палочке в холодную воду при непрерывном помешивании.

При составлении смеси кислот следует приливать кислоту с большим удельной плотность к кислоте с меньшей удельной плотностью.

Растворение щелочей следует проводить в фарфоровой или пластиковой посуде в вытяжном шкафу на поддоне. Куски щелочи запрещается брать руками. Растворение необходимо проводить небольшими порциями при перемешивании.

При нагревании жидкости пробирку следует держать отверстием в сторону от себя и от людей, находящихся рядом.

Запрещается производить какие-нибудь работы с легковоспламеняющимися веществами вблизи открытого огня.

Следует проявлять осторожность при нагревании жидкости, не допуская ее разбрызгивания.

При взбалтывании растворов в колбах или пробирках необходимо их закрыть пробкой.

При несчастных случаях немедленно заявляйте дежурному лаборанту или преподавателю. В лаборатории имеется медицинская аптечка с необходимыми медикаментами для оказания экстренной помощи.

Правила работы с оборудованием:

Центрифуги

Перед центрифугированием центрифужные пробирки уравнивают и располагают в центрифуге симметрично.

Необходимо, чтобы центрифужная камера была закрыта крышкой.

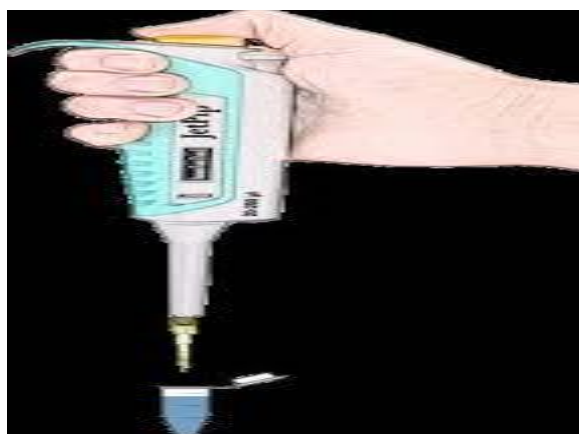
Во время работы центрифуги запрещается открывать крышку камеры.

После отключения центрифуги необходимо дать возможность ротору остановиться, запрещается тормозить ротор рукой.

Автоматические пипетки

Принципы дозирования:

- поворотным движением надеть наконечник на штوك пипетки,
- держа пипетку в вертикальном положении нажать кнопку до первого упора (фаза А),
- погрузить наконечник в жидкость на глубину 3 до 5 мм (фаза В),



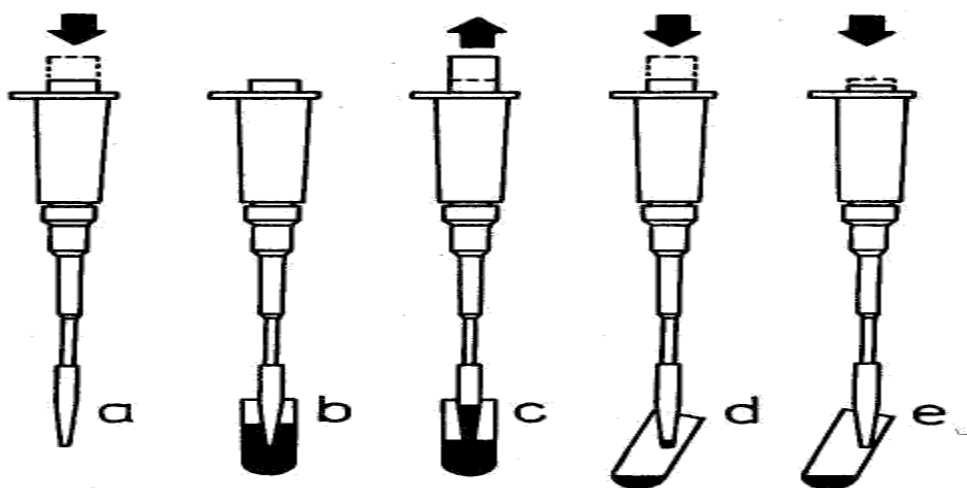
— набрать жидкость в наконечник медленно отпуская кнопку. Немного подождать и вынуть наконечник из жидкости (фаза С),

— прикоснуться наконечником к внутренней стенке намеченного сосуда и опорожнить наконечник, плавно нажимая кнопку до первого упора с такой же скоростью как при взятии пробы (фаза D),

— подождать около 1 секунды,

— нажимая кнопку пипетки до второго упора, удалить остатки жидкости и вынуть пипетку, скользя наконечником по внутренней стенке сосуда (фаза E),

— после снятия наконечника, пипетка готова к повторению цикла работы.



Запрещается набирать жидкость без предварительно наложенного наконечника.

Нельзя погружать наконечник в жидкость глубже 5 мм.

Нельзя допустить, чтобы большой палец соскользнул с кнопки во время наполнения наконечника.

Нельзя поворачивать пипетки, когда наконечник наполнен жидкостью или мокрый.

Перемещение кнопки пипетки при наполнении и опорожнении наконечника должно осуществляться плавно и медленно.

Во время дозирования жидкостей, смачивающих стенки наконечника (например: сыворотки, белка, органических растворителей), рекомендуется предварительно прополоскать несколько раз наконечник измеряемой жидкостью: в наконечник, наложенный на пипетку, нужно набрать и вылить из него жидкость, повторяя несколько раз эту операцию.

При работе с жидкостью, имеющей температуру, отличающуюся от температуры окружающей среды более 5°C также рекомендуется многократно прополоскать наконечники.

После окончания работы следует поместить пипетку в штативе.

Меры первой медицинской помощи

При ожогах кислотами и щелочами нужно быстро промыть обожженное место обильным количеством воды (струей), а затем обработать его нейтрализующим средством (5 %-й р-р пищевой соды в случае попадания на кожу кислоты и 4 %-й р-р уксусной кислоты при попадании щелочи).

При попадании в глаза кислоты или щелочи необходимо промыть глаза струей воды и осушить полотенцем, после чего обратиться за медицинской помощью.

При попадании кислоты или щелочи на одежду следует немедленно нейтрализовать пораженное место водным раствором аммиака, соды (в случае щелочи).

При термических ожогах наложить сухую асептическую повязку.

При порезах стеклом промыть рану можно только в случаях попадания в нее едких или ядовитых веществ, в остальных случаях, даже, если в рану попал песок и т.п., промывать водой нельзя; затем смазать настойкой йода вокруг раны.

При отравлении химическими веществами немедленно вызвать врача и одновременно приступить к оказанию первой помощи – если яд попал внутрь – вызвать рвоту, дать противоядие.

Методика проведения лабораторных работ

Лабораторные работы выполняются в следующей последовательности:

- изучение теоретического материала по теме работы;
- изучение методики выполнения работы;
- получение допуска к выполнению работы;
- выполнение лабораторной работы (проведение экспериментов);
- анализ полученных данных;
- формулирование выводов;
- оформление отчёта;
- защита работы.

Для подготовки к защите отчёта следует проанализировать экспериментальные результаты, сопоставить их с известными теоретическими положениями или справочными данными, обобщить результаты исследований в виде выводов по работе, подготовить ответы на вопросы, приводимые в методических указаниях к выполнению лабораторных работ.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- А – аденин
АМФ – аденозинмонофосфат
АДФ – аденозиндифосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
Г – гуанин
ГДФ – гуанозиндифосфат
ГМФ – гуанозинмонофосфат
ГТФ – гуанозинтрифосфат
дАДФ – дезоксиаденозиндифосфат
дАМФ – дезоксиаденозинмонофосфат
дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат
дГДФ – дезоксигуанозиндифосфат
дГМФ – дезоксигуанозинмонофосфат
дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат
дНДФ – дезоксинуклеозиддифосфат
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дНМФ – дезоксинуклеозидмонофосфат
дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат
дТДФ – дезокситимидиндифосфат
дТМФ – дезокситимидинмонофосфат
дТТФ – дезокситимидинтрифосфат
ДФФ – диизопропилфторфосфат
дЦДФ – дезоксицитидиндифосфат
дЦМФ – дезоксицитидинмонофосфат
дЦТФ – дезоксицитидинтрифосфат
иРНК – информационная РНК
мРНК – матричная РНК
НАД – окисленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ – окисленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН – восстановленный
никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НДФ – нуклеозиддифосфат
НМФ – нуклеозидмонофосфат
НТФ – нуклеозидтрифосфат

ПАБК – пара-аминобензойная кислота
пНФФ – пара-нитрофенилфосфат
РНК – рибонуклеиновая кислота
рРНК – рибосомная РНК
Т – тимин
тРНК – транспортная РНК
У – урацил
УДФ – уридиндифосфат
УМФ – уридинмонофосфат
УТФ – уридинтрифосфат
ФАД – окисленный флавинадениндинуклеотид
ФАДН₂ – восстановленный флавинадениндинуклеотид
ФМН – окисленный флавинмононуклеотид
ФМНН₂ – восстановленный флавинмононуклеотид
Ц – цитозин
цАМФ – циклическая АМФ
ЦМФ – цитидинмонофосфат
ЦДФ – цитидиндифосфат
ЦТФ – цитидинтрифосфат
ЦНС – центральная нервная система
Е – фермент
I – ингибитор
K_M – константа Михаэлиса
S – субстрат
t – время

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Глава I. Аминокислоты, пептиды и белки	7
Классификация аминокислот	8
Физико – химические свойства аминокислот	13
Строение и свойства пептидной связи	16
Белки	18
Характеристика методов качественного и количественного определения белков и аминокислот	28
Лабораторная работа №1. Качественные реакции на функциональные группы белков и аминокислот.....	34
Лабораторная работа №2. Физико–химические свойства белков	47
Лабораторная работа №3. Количественная и качественная оценки белков пищевых продуктов	56
Лабораторная работа №4. Выделение белков от природных источников	64
Контрольные вопросы к главе 1	67
Глава II. Нуклеиновые кислоты	71
Состав, строение, свойства нуклеиновых кислот	71
Строение и функции днк	74
Строение и функции рнк	80
Лабораторная работа №5. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей.....	83
Лабораторная работа №6. Гидролиз рибонуклеопротеинов дрожжей.....	84
Лабораторная работа №7. Качественные реакции на нуклеиновых кислот.....	85
Лабораторная работа №8. Количественное определение днк... Контрольные вопросы к главе 2	88
Глава III. Строение и свойства углеводов	91
Функции углеводов	92
Лабораторная работа №10. Качественные работы на углеводы	100
Лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде образуют окрашенное соединение	100

Лабораторная работа №11. Выделение углеводов от природных источников	104
Лабораторная работа №12. Количественное определение содержания сахарозы и глюкозы	106
Лабораторная работа №13. Количественное определение содержания фруктозы	107
Лабораторная работа №14. Выделение крахмала из картофеля.....	109
Лабораторная работа №15. Определение содержания углеводов методом тонкослойной хроматографии.....	112
Контрольные вопросы к главе 3	113
Правила работы в лаборатории биоорганической химии ...	114
Список принятых сокращений.....	120

Ф.М. Нурутдинова
Х.Т. Аvezов
Б.Ш. Ганиев

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Muharrir: A. Qalandarov
Texnik muharrir: G. Samiyeva
Musahhih: Sh. Qahhorov
Sahifalovchi: M. Ortiqova

Nashriyot litsenziyasi AI № 178. 08.12.2010. Original-maketdan bosishga ruxsat etildi: 18.01.2022. Bichimi 60x84. Kegli 16 shponli. «Times New Roman» garn. Ofset bosma usulida bosildi. Ofset bosma qog`ozi. Bosma tobog`i 7,7. Adadi 100. Buyurtma №11.

“Sadridin Salim Buxoriy” MCHJ
“Durdona” nashriyoti: Buxoro shahri Muhammad Iqbol ko`chasi, 11-uy.
Bahosi kelishilgan narxda.

“Sadridin Salim Buxoriy” MCHJ bosmaxonasida chop etildi.
Buxoro shahri Muhammad Iqbol ko`chasi, 11-uy. Tel.: 0(365) 221-26-45