

Федеральное агентство по образованию Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Ивановский государственный химико-технологический университет

Практикум по биохимии

Методические указания

Составители: О. А. Петров
 С. Г. Пуховская

Иваново 2006

УДК 577.1 (072)

Практикум по биохимии: Методические указания / Сост.: О. А. Петров, С. Г. Пуховская.; ГОУ ВПО Иван. гос. хим. – технол. ун-т. – Иваново, 2006. – 60 с.

В методических указаниях кратко изложены теоретические положения, касающиеся строения и роли биологически активных молекул в процессах жизнедеятельности. Приведены методики определения и исследования аминокислот, белков, ферментов, а также контрольные работы и задания по основным классам соединений.

Методические указания представляют собой руководство для выполнения практических работ по биологической химии студентами заочной формы обучения по направлению 260100 – «Технология продуктов питания».

Табл. 4.

Ил. 2.

Рецензент доктор химических наук В. А. Козлов (ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет)

Техн. редактор О. А. Соловьева

Подписано в печать 26. 10. 2006. Формат 60×84 1/16. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 3,49. Уч.-изд. л. 3,87. Тираж 100 экз. Заказ

ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет

Отпечатано на полиграфическом оборудовании кафедры экономики и финансов ГОУ ВПО «ИГХТУ»

153000, г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7

СОДЕРЖАНИЕ

I. Аминокислоты и белки	4
Лабораторная работа № 1. Качественные реакции на аминокислоты и белки	12
Лабораторная работа № 2. Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Серенсену	20
Лабораторная работа № 3. Реакции осаждения белков	22
Лабораторная работа № 4. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге	24
Контрольные вопросы	27
Контрольная работа №1	29
II. Ферменты, коферменты и витамины	30
Лабораторная работа № 5. Изучение действия ферментов	34
Лабораторная работа № 6. Качественные реакции на водорастворимые витамины	37
Лабораторная работа № 7. Качественные реакции на жирорастворимые витамины	39
Контрольные вопросы	43
III. Углеводы	44
Лабораторная работа № 8. Качественные реакции на углеводы	48
Контрольные вопросы	51
Контрольная работа №2	52
IV. Нуклеиновые кислоты.	53
Лабораторная работа № 9. Гидролиз нуклеопротеинов дрожжей	58
Контрольные вопросы	60

І. Аминокислоты и белки

Гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно амино – и карбоксильную группы называются аминокислотами. Общее число, встречающихся в природе аминокислот, достигает 100. При этом в организме человека найдено около 70 аминокислот, из которых 20 входят в состав белков. Они относятся к α-аминокислотам и называются протеиногенными (табл. 1).

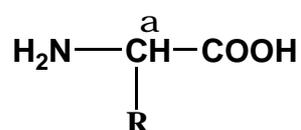


Таблица 1.

Протеиногенные α – аминокислоты

Название	Сокращенное название аминокислоты		Формула
	русское	международное	
1	2	3	4
Глицин	Гли	Gly	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}\text{H}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Аланин	Ала	Ala	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}\text{H}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Валин	Вал	Val	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}\text{H}-\text{COOH} \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Лейцин	Лей	Leu	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}\text{H}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Продолжение табл.1

1	2	3	4
Изолейцин	Иле	Иле	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Серин	Сер	Ser	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Треонин	Тре	Thr	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Цистеин	Цис	Cys	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$
Метионин	Мет	Met	$\begin{array}{c} \text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SCH}_3 \end{array}$
Аспаргиновая кислота	Асп	Asp	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Аспаргин	Асп	Asn	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Глутаминовая кислота	Глу	Glu	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$

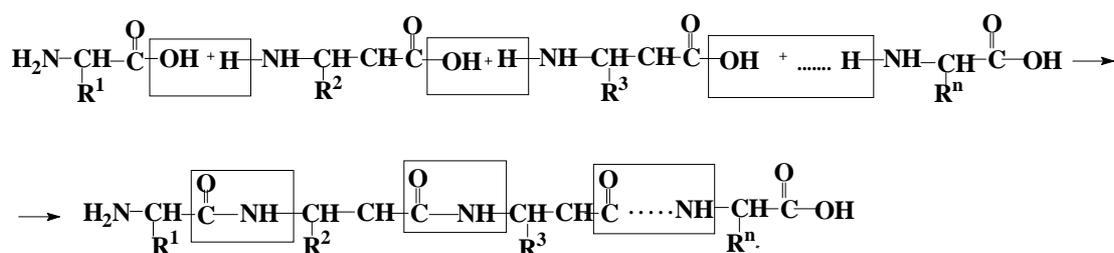
Окончание табл. 1

1	2	3	4
Глутамин	Глн	Gln	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Лизин	Лиз	Lys	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{O}=\text{C} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Аргинин	Арг	Arg	$ \begin{array}{c} \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{NH} \\ \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{O}=\text{C} \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Фенилаланин	Фен	Phe	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $
Тирозин	Тир	Tyr	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Триптофан	Три	Trp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array} $
Гистидин	Гис	His	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2 \end{array} $
Пролин	Про	Pro	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \end{array} $

Одновременное присутствие в молекулах α-аминокислот аминной и карбоксильной групп обуславливает их способность вступать в реакции поликонденсации, которые приводят к образованию пептидных (амидных) связей между мономерными звеньями.

В результате такой реакции образуются биоорганические полимеры – белки (протеины). Они содержат свыше 100 аминокислотных остатков и имеют молекулярную массу от 10000 до нескольких миллионов. Чередование аминокислотных остатков в молекуле белка неповторимо и строго специфично. Специфичность белков определяется аминокислотным составом и аминокислотной последовательностью.

Аминокислотный состав – это природа и количественное соотношение входящих в них α-аминокислот, а аминокислотная последовательность, т. е. порядок чередования α-аминокислотных остатков – это первичная структура белка:



Кроме первичной в белковых молекулах выделяют вторичную, третичную и четвертичную структуры.

Под вторичной структурой белка подразумевают конформацию полипептидной цепи, т. е. способ её скручивания или складывания в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре, в α -спираль или β -структуру. Ключевую роль в стабилизации этой структуры играют водородные связи, которые в α -спирали образуются между карбонильными атомами кислорода каждого первого и атомом водорода NH-группы каждого пятого α -аминокислотных остатков (рис.1).

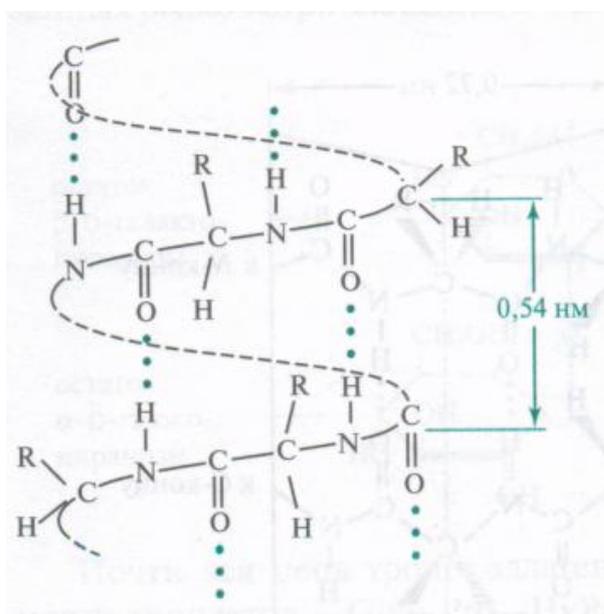


Рис.1. Вторичная структура белка (α -спираль)

В отличие от α -спирали β -структура образована за счёт межцепочечных водородных связей между соседними участками полипептидной цепи (рис. 2).

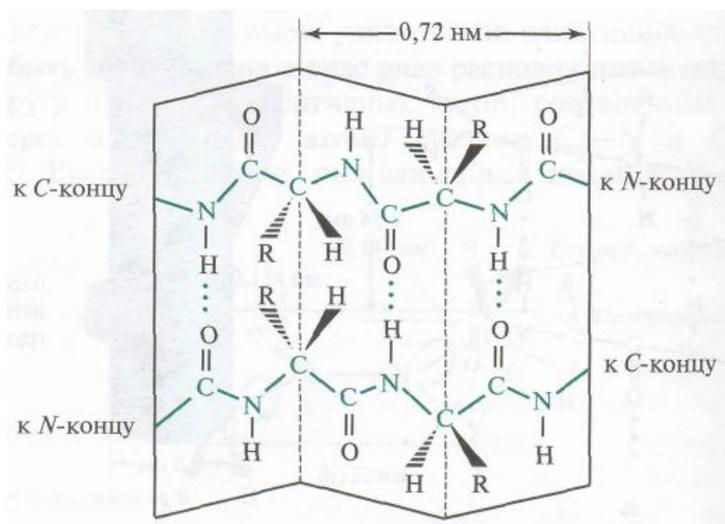


Рис. 2. Вторичная β -структура белка.

Особенности вторичной структуры белка во многом определяются аминокислотным составом (табл. 2)

Таблица 2

Некоторые аминокислоты, определяющие тип вторичной структуры белка

α -спираль	β -структура
Аланин	Валин
Глутаминовая кислота	Изолейцин
Глутамин	Треонин
Лейцин	Тирозин
Лизин	Фенилаланин
Метионин	
Гистидин	

Под третичной структурой белка (субъединицей) подразумевают пространственную ориентацию полипептидной цепи в опреде-

ленном объеме, которая включает элементы вторичной структуры. Она стабилизируется за счет различных взаимодействий (рис. 3), в которых участвуют боковые радикалы α -аминокислотных остатков, находящихся в линейной полипептидной цепи на значительном удалении друг от друга, но сближенные в пространстве за счет изгибов цепи.

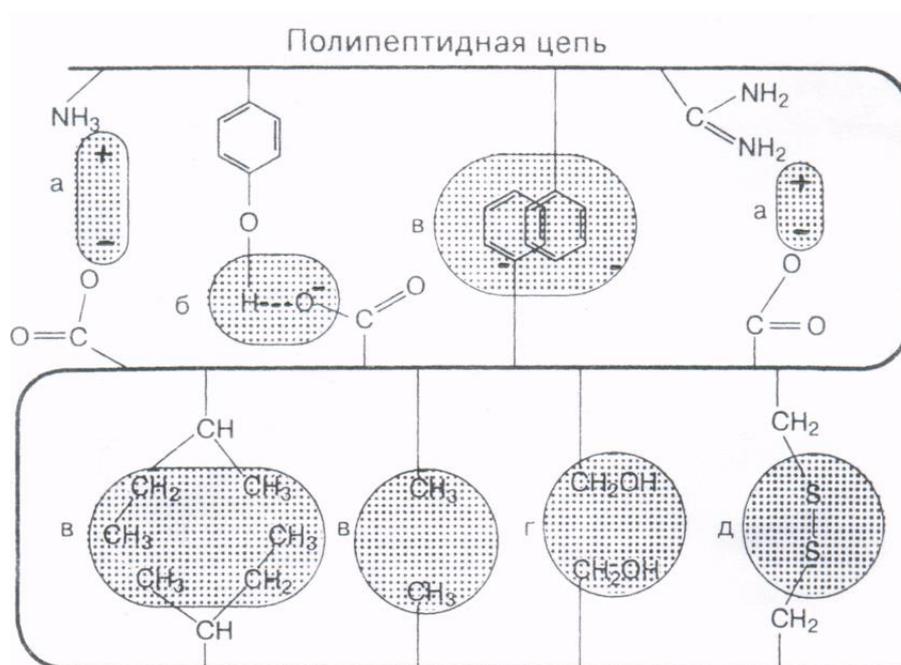


Рис. 3. Типы взаимодействий, стабилизирующие третичную структуру белка

Под четвертичной структурой белка подразумевают ассоциированные между собой две или более субъединиц, ориентированных в пространстве. Четвертичная структура поддерживается за счет во-

дородных связей и гидрофобных взаимодействий (рис. 4). Она характерна для некоторых белков (гемоглобин).

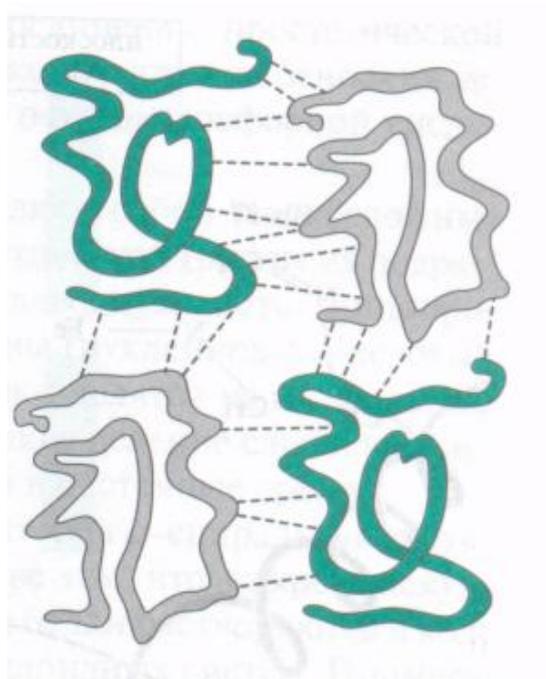


Рис. 4. Четвертичная структура белковой молекулы, построенная из отдельных субъединиц

Пространственная структура белковой молекулы способна нарушаться под влиянием изменения рН-среды, повышенной температуры, облучения УФ-светом и т.д. Разрушение природной (нативной) макроструктуры белка называется денатурацией, в результате которой исчезает биологическая активность и снижается растворимость белков. Первичная структура белка при денатурации сохраняется.

Лабораторная работа № 1

Качественные реакции на аминокислоты и белки

Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие некоторых аминокислот в различных белках.

Существуют два типа цветных реакций:

- 1) универсальные - биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки)
- 2) специфические - только на определенные аминокислоты в составе белка или в растворах отдельных аминокислот, например, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

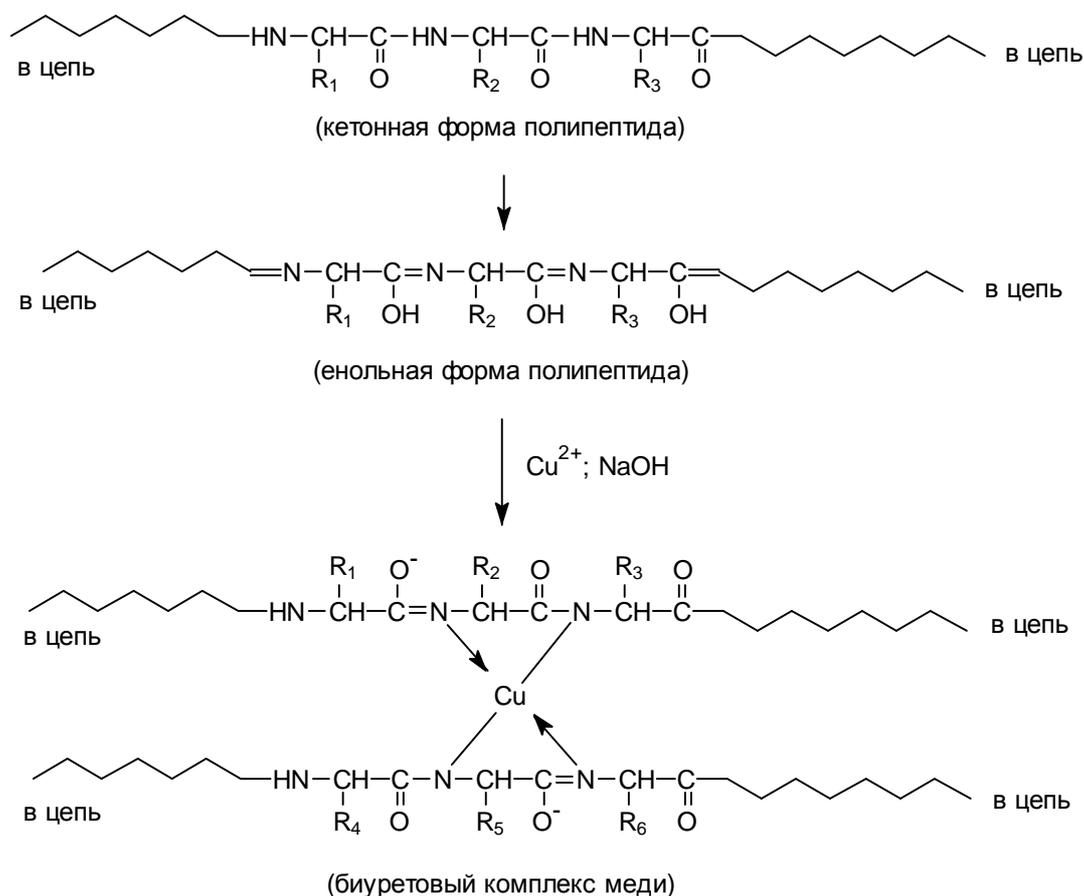
NaOH (10 и 20% - ные растворы), CuSO_4 (1 и 6% - ные растворы), нингидрин (0,5% - ный водный раствор), HNO_3 концентрированная, реактив Фоля (к 5% - ному раствору $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ прибавляют равный объем 30% - ного раствора NaOH до растворения образовавшегося осадка), реактив Миллона (в 30 мл концентрированной HNO_3 ($\gamma = 1,40$) растворяют при комнатной температуре 20 г ртути, затем помещают в теплую водяную баню до прекращения выделения бурых паров оксида азота и перемешивают. После этого добавляют двойной объем воды (60 мл) и полученный раствор разбавляют водой (1:1)), α -нафтол (0,2% - ный спиртовой раствор), NaBrO (гипобромид натрия), мочевины (40% - ный водный раствор), сульфаниловая кислота (1% - ный раствор в 5% - ном растворе HCl), NaNO_2 (0,5% - ный раствор), Na_2CO_3 (10% - ный

раствор), глиоксиловая кислота (к 2 г порошкообразного магния приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного до 0°C насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды, фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 2000 мл. Раствор хранят в холодильнике), H₂SO₄ концентрированная, о-фталевый диальдегид (водный раствор), пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 2 мл, раствор белка, растворы аминокислот.

Универсальные реакции

Биуретовая реакция

Схема реакции:



Биуретовая реакция обусловлена наличием в белке пептидных (-NHCO-) связей, которые в щелочной среде образуют с сернокис

лой медью окрашенные комплексы. При этом цвет раствора может изменяться от сине-фиолетового до красного в зависимости от длины полипептидной цепи. Следует отметить, что биуретовую реакцию способны давать вещества, содержащие не менее двух пептидных связей.

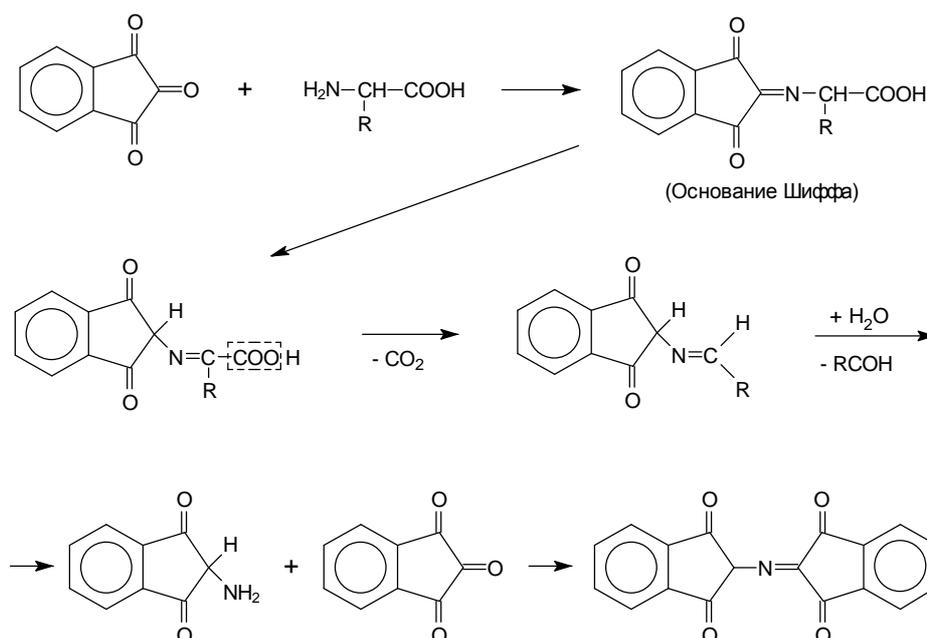
Ход эксперимента

К 5 каплям 1% - ного раствора белка прибавляют 5 капель 10% - ного раствора NaOH, 2 капли 1% - ного CuSO₄ и перемешивают. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Нингидриновая реакция

Белки и свободные α-аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином. Реакция обусловлена наличием аминогрупп в α-положении.

Схема реакции:



Ход эксперимента

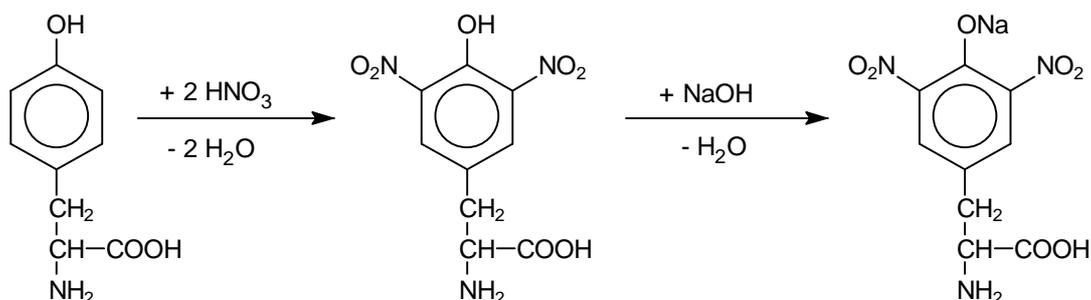
К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель 0,5% - ного водного раствора нингидрина и кипятят 1 - 2 минуты. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Специфические реакции

Ксантопротеиновая реакция

Реакция характерна для ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), которые при взаимодействии с азотной кислотой дают соединения желтого цвета, а в щелочной среде вследствие образования натриевой соли окраска усиливается и переходит в оранжевую.

Схема реакции:



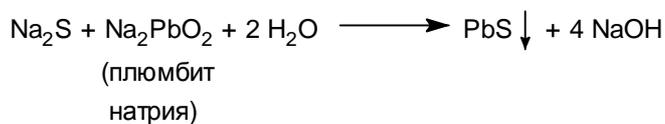
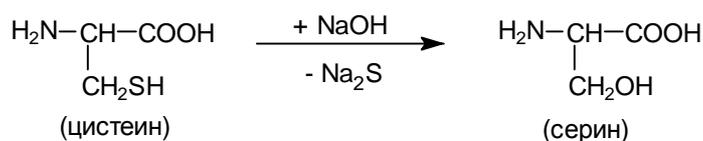
Ход эксперимента

К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли концентрированной HNO₃ и осторожно нагревают до кипения. После охлаждения в пробирку добавляют 10 - 15 капель 20% - ного раствора NaOH и наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу.

Реакция характерна для серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина и метионина). Серу можно обнаружить благодаря ее свойству давать с солями свинца черный осадок сернистого свинца.

Схема реакции:



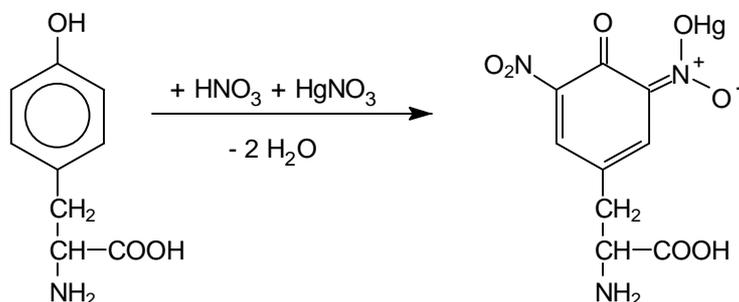
Ход эксперимента

К 5 каплям исследуемого раствора прибавляют 5 капель реактива Фоля. Содержимое пробирки доводят до кипения. Изменение цвета раствора наступает через 1 - 2 минуты после охлаждения реакционной смеси.

Реакция на тирозин

Тирозин дает красное окрашивание раствора при взаимодействии с реактивом Миллона.

Схема реакции:



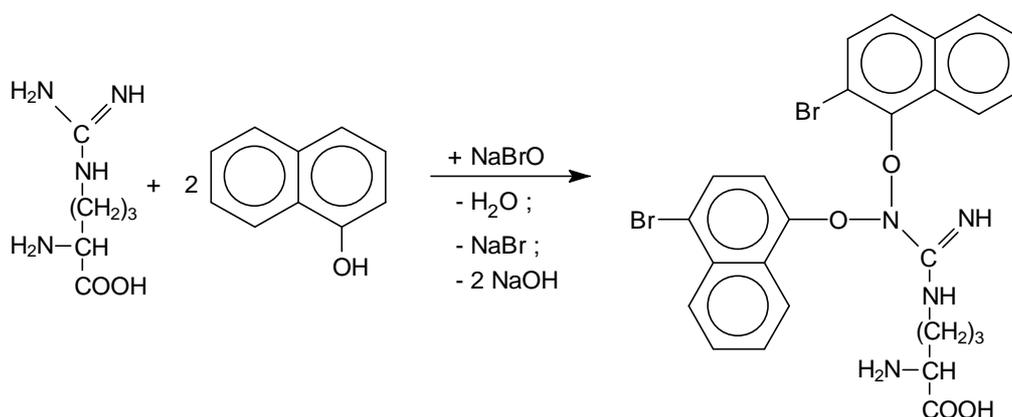
Ход эксперимента

К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают, наблюдая за изменением цвета раствора.

Реакция на аргинин

Аргинин дает красное окрашивание раствора при взаимодействии с α -нафтолом в щелочной среде.

Схема реакции:



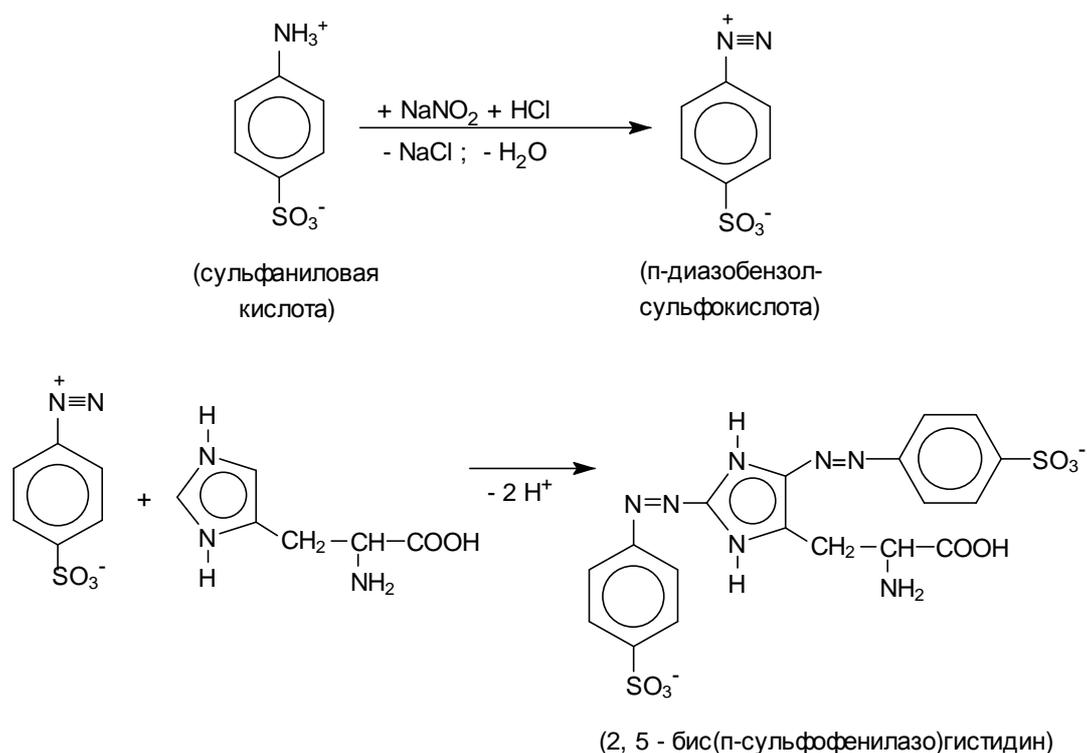
Ход эксперимента

К 10 каплям исследуемого раствора добавляют 10 капель 10% - ного раствора NaOH и 3 капли 0,2% - ного спиртового раствора α -нафтола. Содержимое пробирки перемешивают. Затем добавляют 10 капель раствора гипобромида натрия (NaBrO) и вновь перемешивают. Для стабилизации развивающегося красного окрашивания быстро добавляют 5 капель 40% - ного раствора мочевины.

Реакция на гистидин

Гистидин дает вишнево-красное окрашивание при взаимодействии с диазотированной сульфаниловой кислотой в щелочном растворе.

Схема реакции:



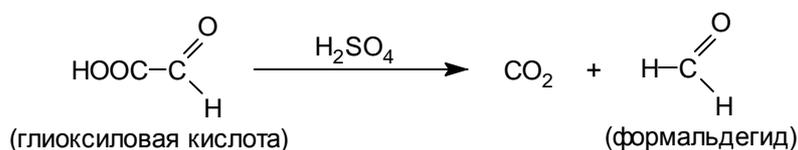
Ход эксперимента

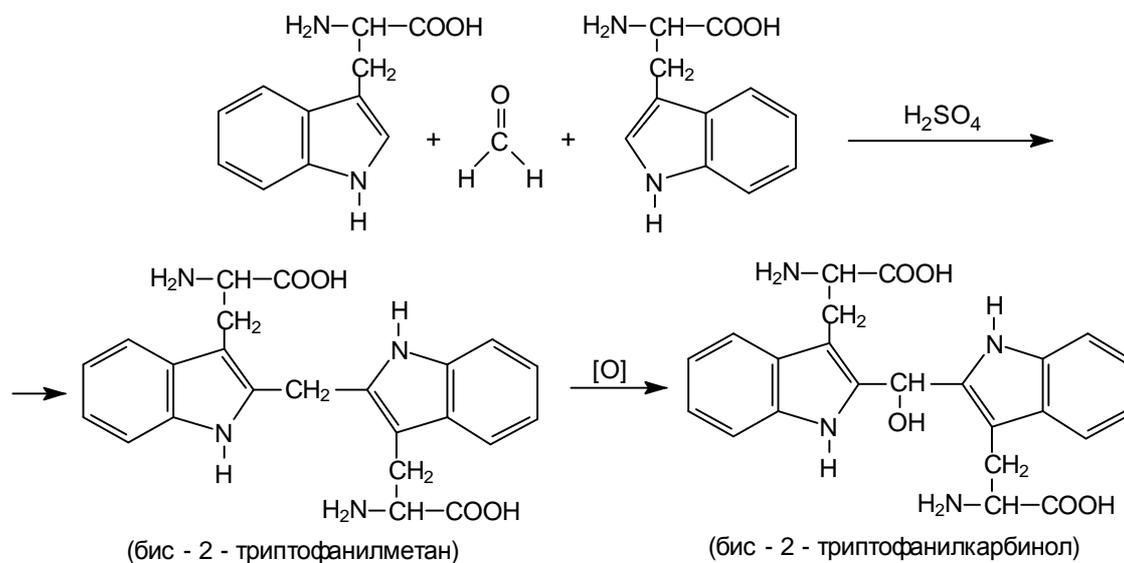
К 5 каплям 1% - ного раствора сульфаниловой кислоты в 5% - ном растворе HCl добавляют 10 капель 0,5% - ного раствора NaNO_2 . Содержимое пробирки встряхивают и быстро добавляют сначала 10 капель исследуемого раствора, а затем, после перемешивания, 10 капель 10% - ного раствора Na_2CO_3 .

Реакция на триптофан

Триптофан дает сине-фиолетовое окрашивание раствора при взаимодействии с глиоксиловой кислотой в концентрированной H_2SO_4 .

Схема реакции:





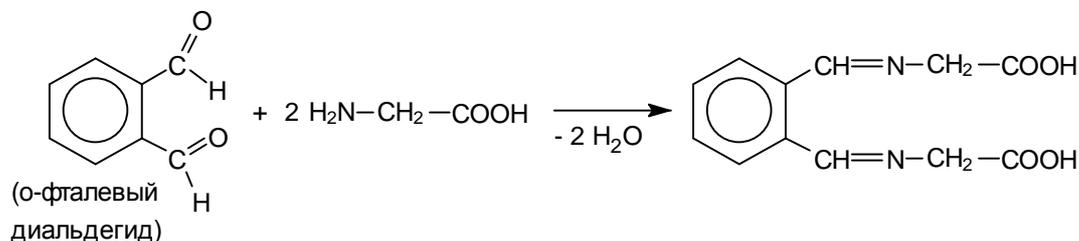
Ход эксперимента

К 5 каплям исследуемого раствора добавляют 5 капель раствора глиоксиловой кислоты и 2 капли 6% - ного раствора CuSO_4 . Затем добавляют небольшими порциями 10 капель концентрированной H_2SO_4 , охлаждая содержимое пробирки в ванночке со льдом. Оставляют на 10 минут при комнатной температуре и затем ставят на 5 минут в кипящую водяную баню.

Реакция на глицин

Глицин дает ярко-зеленое окрашивание раствора при взаимодействии с о-фталевым диальдегидом в щелочном растворе.

Схема реакции:



Ход эксперимента

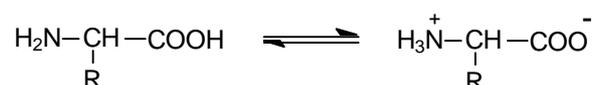
К 10 каплям исследуемого раствора прибавляют 10% - ный раствор NaOH до $\text{pH}=8$ (по лакмусу). Затем приливают 2 - 3 капли водного раствора о-фталеевого диальдегида.

Лабораторная работа № 2

Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Серенсену

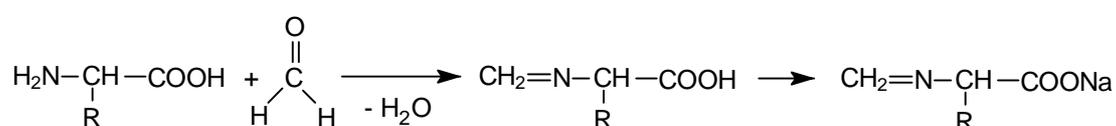
Гидролиз, проводимый в лабораторных условиях, является важным методом исследования для расшифровки первичной структуры белков. При кислотном гидролизе белки распадаются на высокомолекулярные пептиды, низкомолекулярные пептиды, дипептиды и аминокислоты. Полный гидролиз белка протекает при многочасовом кипячении раствора.

Формоловое титрование служит для определения количества карбоксильных групп, которое увеличивается вследствие разрыва пептидных связей в процессе гидролиза. В водных растворах аминокислоты образуют внутримолекулярные соли:



Поэтому без предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот щелочью невозможно.

В процессе реакции формальдегид блокирует α -аминогруппу. Образующееся метиленовое соединение (метиленаминокислота) затем оттитровывается щелочью.



Реактивы, оборудование и исследуемый материал

Концентрированная HCl, NaOH (1% и 10% - ные растворы), уксусная кислота (1% - ный раствор), формалин (20% - ный раствор), фенолфталеин (0,25 г фенолфталеина растворяют в 25 мл этанола и добавляют 25 мл воды), NaOH (0,05 Н - раствор для титрования), лакмусовая бумага, активированный или животный

уголь, круглодонная колба с воздушным холодильником, стеклянные палочки, конические колбы, пипетки на 1 и 2 мл, микробюретка, цилиндр на 25 мл, раствор яичного белка (белок 2 - х куриных яиц растворяют в 1 л воды, фильтруют через слой марли и хранят в холодильнике).

Порядок выполнения работы

1. Титрование -COOH групп в растворе белка до гидролиза

К 1 мл раствора яичного белка добавляют 5 капель 20% - ного раствора формалина и 3 капли 0,5% - ного раствора фенолфталеина. Титруют из микробюретки 0,05 н. раствором NaOH до устойчивой бледно-розовой окраски и точно отмеряют количество затраченной щелочи.

2. Кислотный гидролиз белка

В круглодонную колбу отмеривают 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной HCl ($\rho=1,19$); колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и закрепляют на штативе с асбестовой сеткой. Содержимое колбы кипятят в течение 45 минут с момента начала кипения.

3. Титрование -COOH групп после гидролиза белка

По окончании гидролиза в колбу вносят небольшое количество активированного угля для обесцвечивания бурого раствора, взбалтывают и кипятят еще 5 минут. Затем гидролизат охлаждают, выливают в цилиндр, доводят объем жидкости до 25 мл дистиллированной водой и фильтруют. Отмеривают 1,25 мл гидролизата, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10% -

ным раствором NaOH из микробюретки до слабо-розовой окраски (NaOH используется для нейтрализации HCl, поэтому количество щелочи не учитывается). Если при нейтрализации окраска становится ярко-красной, то добавляют до обесцвечивания по каплям 1% - ный раствор CH_3COOH , избыток которой нейтрализуют 1% - ным раствором NaOH до слабо-розовой окраски. Затем приливают 5 капель 20% - ного раствора формалина, обесцвеченный раствор титруют 0,05 н. раствором NaOH до бледно-розового цвета и точно отмеряют количество затраченной щелочи. Проводят расчет азота аминокрупп по количеству затраченной щелочи исходя из ее нормальности: 1 мл 0,05 н. раствора NaOH соответствует 0,07 мг азота. По количеству аминокрупп судят о количестве карбоксильных групп.

4. Открытие промежуточных продуктов распада белка в гидролизате при помощи биуретовой реакции

В пробирку наливают 5 капель гидролизата белка и нейтрализуют 10% - ным раствором NaOH по лакмусу. После нейтрализации гидролизата проводят биуретовую реакцию, прибавляя 2 капли CuSO_4 . Появляется фиолетово-розовое окрашивание. При полном гидролизе белка (~2,5 часа) до аминокислот биуретовая реакция с гидролизатом отрицательна.

Лабораторная работа № 3

Реакции осаждения белков

Устойчивость белковых растворов связана с наличием одноименных зарядов у молекул данного белка в растворе и гидратированностью белковых молекул. Все это препятствует сближению белковых молекул, их «слипанию», а поэтому и осаждению. Факторы, уменьшающие заряд белковых молекул или их гидратированность, способствуют осаждению белков из растворов.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

Раствор яичного белка (белок двух куриных яиц растворяют в 100 мл воды, фильтруют через слой марли и хранят в холодильнике); этанол или ацетон; NaCl; концентрированные кислоты: HNO_3 , H_2SO_4 , H_3PO_4 , CCl_3COOH (трихлоруксусная кислота); пипетки на 1, 2, 5 мл; пробирки, капельницы, мерный цилиндр на 5 мл.

Порядок выполнения работы

1. Осаждение белков спиртом или ацетоном

К 1 мл белкового раствора с несколькими кристаллами хлорида натрия прибавляют 5 мл спирта или ацетона. При их добавлении происходит дегидратирование белковых молекул и их осаждение.

2. Осаждение минеральными кислотами

В три сухие пробирки прибавляют по 1 – 2 мл концентрированной азотной, серной и фосфорной кислоты. Затем, наклонив каждую пробирку и отвернув от себя, осторожно по стенке приливают из пипетки 0,5 мл исследуемого раствора белка так, чтобы он не смешивался с кислотой. В месте соприкосновения двух жидкостей появляется аморфный осадок, кроме пробирки с фосфорной кислотой, которая не осаждает белки. При встряхивании осадок, выпавший при действии азотной кислоты, увеличивается в объёме, а осадок, выпавший при действии серной кислоты, растворяется в её избытке.

3. Осаждение органическими кислотами.

В пробирку прибавляют 2 – 3 мл исследуемого раствора белка, а затем несколько капель 5% - ного раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок. Реакция необратима. Трихлоруксусная кислота осаждает только белки и не осаждает продукты их распада и аминокислоты, поэтому её часто используют для полного удаления белков из биологических жидкостей.

Лабораторная работа № 4

Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

Хроматографией называется физико-химический метод разделения смесей, при котором разделяемые компоненты распределяются между двумя зонами, одной из которых является неподвижный слой с большой поверхностью контакта, а другая – представляет собой поток, фильтрующийся через неподвижный слой. В настоящее время существует много разновидностей этого метода. Одной из таких модификаций является распределительная хроматография на бумаге.

Распределительная хроматография основана на различии коэффициентов распределения отдельных компонентов изучаемой смеси между двумя несмешивающимися фазами. В качестве несмешивающихся фаз обычно применяют воду и какой – либо органический растворитель. Анализируемая смесь веществ наносится в виде пятна на специальную хроматографическую бумагу, которая отличается от фильтровальной более равномерным распределением волокон. Органический растворитель, насыщенный водой, пропускают через хроматографическую бумагу. При этом одна из двух жидких фаз – вода – удерживается бумагой, которая играет роль инертного носителя, а другая – органический растворитель – движется по бумаге с определённой скоростью. Отдельные вещества анализируемой смеси будут вести себя по-разному. Те из них, которые растворимы только в воде и не растворимы в органическом растворителе, останутся на месте их нанесения. Те соединения, которые растворимы только в органическом растворителе, но не растворимы в воде, будут двигаться по бумаге в виде пятна вместе с фронтом органического растворителя. Однако это крайние случаи. Большинство исследуемых соединений смеси, как правило, частично растворяются в

воде и в органическом растворителе. Эти вещества в виде пятен будут занимать на хроматограмме промежуточное положение между двумя крайними случаями. При этом локализация каждого из веществ будет определяться степенью его распределения между водой и органическим растворителем. Для характеристики этого показателя вводится величина α , называемая коэффициентом распределения.

$$\alpha = \frac{\text{Конц. вещества в водной фазе}}{\text{Конц. вещества в неводной фазе}}$$

Очевидно, чем меньше α , тем больше данное вещество растворимо в движущейся неводной фазе и тем дальше оно располагается на хроматограмме от линии старта. Величины α химических веществ различны для разных органических растворителей, и их значения приводятся в специальных руководствах. Однако не всегда положение вещества на хроматограмме целиком определяется коэффициентом α . Поэтому на практике положение веществ на хроматограмме характеризуют величиной R_f , которую устанавливают опытным путём:

$$R_f = \frac{\text{Путь, пройденный пятном}}{\text{Путь, пройденный фронтом растворителя}}$$

Нахождение R_f опытным путём не представляет большого труда. Однако воспроизводимость значения R_f зависит от качества бумаги, постоянства температуры, объёма пробы, однотипности процедуры и пр. В настоящее время метод широко используется для анализа аминокислот, углеводов, различных пигментов.

Реактивы и оборудование

Растворитель: н-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода в соотношении 4 : 1 : 5; 0,5% раствор нингидрина в абсолютном ацетоне; растворы аминокислот в 0,1 н. соляной кислоте; хроматографическая бумага. Микропипетки; подставки для микропипеток; вентилятор; зажимы со штативом; хроматографическая камера; делительная воронка; кювета для проявления; линейка; ножницы.

Порядок выполнения работы

Из хроматографической бумаги вырезать полоску шириной 16 см и длиной до конца листа с поперечным расположением волокон. На расстоянии 8 см от края бумаги провести стартовую линию и отметить на ней 4 точки. Расстояние между точками 4 см, от края листа – 2 см. Закрепить лист между планками так, чтобы стартовая линия была внизу. Набрать в 3 микропипетки исследуемые растворы аминокислот, а в четвёртую смесь аминокислот (метчики) и положить на подставку в том порядке, в каком они отмечены на хроматограмме. Беря по очереди пипетки, нанести в каждую точку по 2 капли исследуемых растворов и по 7 капель смеси метчиков. Диаметр пятна не должен превышать 0,5 см. После нанесения первых капель хроматограмму сушат вентилятором досуха и только потом наносят вторую каплю. После нанесения необходимого количества и высушивания хроматограмму помещают в камеру для разгонки. На дно камеры наливают нижнюю фазу растворителя для её насыщения, а верхнюю фазу наливают в лодочку, куда предварительно закрепляют хроматограмму. Через 24 – 36 часов разгонки хроматограмму вынимают, высушивают и проявляют погружением в ванночку с проявителем (нингидрин в ацетоне). Высушив под тягой, хроматограмму помещают на 15 мин в сушильный шкаф при $t = 60^{\circ}\text{C}$. Аминокислоты дают с нингидрином лиловое окрашивание разных оттенков. Исключение составляют аспаргин (коричнево-оранжевое окрашивание), пролин и гидроксипролин (желтое).

Используя значения R_f , идентифицируют аминокислоты сначала в смеси метчиков, а затем исследуемой смеси.

Для растворителя : *n*-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода в соотношении 4 : 1 : 5, аминокислоты имеют следующие значения R_f : аланин – 0,45; аргинин – 0,20; аспаргиновая кислота – 0,24; валин – 0,60; гистидин – 0,20; глицин – 0,25; глутаминовая кислота – 0,30; лейцин – 0,73; метионин – 0,55; пролин – 0,43; серин – 0,23; тирозин – 0,45; треонин – 0,35; триптофан – 0,50; фенилаланин – 0,68; цистеин – 0,07; цистин – 0,08.

Контрольные вопросы

- 1) Какие из предложенных соединений образуют в щелочном растворе биуретовый комплекс меди?
 - а) Asp; Ser; Cys; Met; Met-Thr-Phe
 - б) Ser-Cys-Ala; Gly; Val; Leu; Trp-Tyr
 - в) Ser; Ile; Glu-Met; Leu-Ala; Gly-Leu-Ala
 - г) Trp-Trp-Tyr; His; Lys; Pro-Pro; Pro
 - д) Phe-Tyr-Ala; Arg; Asn; Gln-Arg; Lys
 - е) Asp-Asn-Ala; Phe; Trp; Pro-Val; Leu
 - ж) Ser-Ile; Gly-Arg-Gly; Pro; Phe; Met
 - з) Asp-Ile-Leu; Asp; Ala-Thr; Gly, Pro
 - и) Cys; Met; Val; Trp-Ala-Thr; Gly-Met-Cys
 - к) Ser; Met-Gly-Arg; Trp; Pro; Asp

- 2) Какие из предложенных аминокислот вступают в ксантопротеиновую реакцию?
 - а) Ile; Val; Met; Phe; Trp
 - б) Lys; Pro; Phe; Gln; Tyr
 - в) Tyr; Phe; Pro; His; Arg
 - г) Thr; Ser; His; Phe; Trp
 - д) Trp; Pro; Ala; Val; Phe

- 3) Какие аминокислоты вступают в реакцию с реактивом Фоля?
 - а) Cys; Thr; Met; Val; Arg
 - б) Gly; Ala; Met; Leu; Cys
 - в) Asp; Val; Cys; Thr; Met
 - г) Glu; Met; Pro; His; Gys
 - д) Gys; Ile; Met; Ala; Gly

4) Какие из предложенных аминокислот вступают в реакцию с реактивом Милона:

Gly; Val; Ile; Tyr; Pro ?

5) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента α - нафтол:

Glu; Asp; Ala; Met; Arg?

6) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента *n*-дiazобензолсульфонокислоту:

Thr; Met; Ala; Trp; His?

7) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента глиоксиловую кислоту:

Trp; Tyr; Gln; Gly; Ala?

8) Для распознавания какой аминокислоты используют в качестве реагента *o*-фталевый диальдегид:

Leu; Gly; Cys; Met; Asn?

Контрольная работа №1

1. Получите предложенные аминокислоты по методу Штреккера – Зелинского из соответствующих альдегидов.
2. Какой тип вторичной структуры в составе белка они определяют?
3. В образовании каких типов связей в составе третичной структуры белка принимают участие их аминокислотные остатки?
4. Для аминокислот, полученных в задании 1, запишите реакции:
 - a) дезаминирования по Ван – Слайку;
 - b) декарбоксилирования;
 - c) этерификации;
 - d) образования дипептида по галоген-ацильному методу Фишера и Отто.
5. В полученном дипептиде выделите плоскостные и внеплоскостные участки и укажите связи, относительно которых возможно изменение пространственного расположения одних групп атомов по отношению к другим.

II. Ферменты, коферменты и витамины

Ферменты или энзимы – это белки, которые катализируют химические реакции, происходящие в живых системах. В зависимости от характера катализируемой реакции ферменты делятся на 6 классов (см. табл. 3).

Таблица 3

Классы ферментов и типы катализируемых ими реакций

Класс ферментов	Тип реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные процессы, лежащие в основе биологического окисления
Трансферазы	Перенос отдельных атомов или групп атомов с одной молекулы на другую
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление химических связей с образованием в молекуле двойных связей или негидролитическое расщепление двойных связей в результате присоединения различных групп по месту её разрыва
Изомеразы	Взаимопревращения различных изомеров (цис-транс изомеризация, перемещение двойных связей и фосфатных групп по углеродной цепи)
Лигазы (синтетазы)	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений с использованием энергии распада аденозинтрифосфорной кислоты

В природе существуют как простые (однокомпонентные), так и сложные (двухкомпонентные) ферменты. Сложные ферменты состоят из белкового и небелкового компонентов. Белковая часть называется апоферментом. Небелковая – коферментом, если она легко диссоциирует от белковой части или простетической группой, если она прочно связана с белком. Соединение белковой и небелковой части ферментов осуществляется при помощи водородных, гидрофобных или ионных связей.

Основные свойства ферментов

1. Специфичность действия.

В отличие от катализаторов небелковой природы ферменты обладают способностью «узнавать» строго определенный субстрат, т. е. соединение, превращение которого они ускоряют. Благодаря этому обеспечивается высокая избирательность протекания отдельно взятой реакции из огромного количества других химических реакций, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

2. Термолабильность ферментов.

Оптимальной для действия большинства ферментов является температурный интервал от 40 до 50°C.

3. Зависимость активности ферментов от pH среды.

Наибольшая активность подавляющего большинства ферментов наблюдается при pH = 6 – 8.

Механизм действия ферментов включает в себя три основные стадии (рис.5, 6):

- присоединение субстрата к макромолекуле фермента;
- непосредственно ферментативную реакцию;
- отделение продуктов превращения субстрата от фермента.

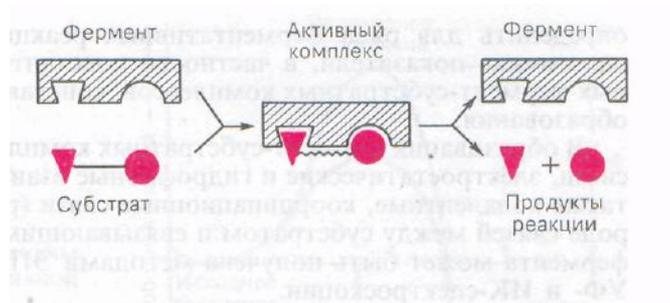


Рис. 5. Схема функционирования простого фермента

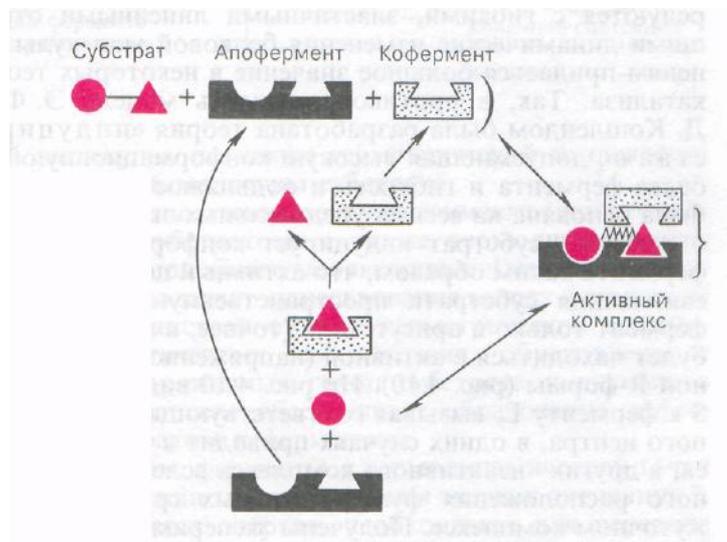


Рис.6. Схема функционирования сложного фермента

Витамины - низкомолекулярные органические соединения разнообразной химической природы, не синтезирующиеся в организме. Они необходимы для нормальной жизнедеятельности человека и животных в ничтожно малых количествах по сравнению с другими продуктами питания. Биологическая роль большинства витаминов заключается в том, что они, являясь составной частью коферментов, участвуют в ферментативных процессах. Подавляющее число витаминов, входящих в состав коферментов, растворимы в воде.

Классификация витаминов

I. Витамины, растворимые в воде

Витамин В₁ (тиамин)

Витамин В₂ (рибофлавин)

Витамин В₃ (пантотеновая кислота)

Витамин В₅ (никотинамид, никотиновая кислота)

Витамин В₆ (пиридоксин, пиридоксамин, пиридоксаль)

Витамин В₁₂ (цианкобальтамин)

Витамин В₁₅ (пангамовая кислота)

Витамин В_c (фолиевая кислота)

Витамин С (аскорбиновая кислота)

Витамин Н (биотин)

II. Витамины растворимые в жирах

Витамин А (ретинол)

Витамин Д (эргокальциферол, холекальциферол)

Витамин Е (α – токоферол, β – токоферол, γ – токоферол)

Витамин К (филлохинон, менахинон)

Лабораторная работа № 5

Изучение действия ферментов

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

Яичный белок, растительное масло, NaHCO_3 (1% - ный раствор), фенолфталеин (1% - ный спиртовой раствор), крахмальный клейстер (готовят из 0,2% - ного раствора крахмала), I_2 (0,1% - ный раствор в 0,2% - ном растворе KI), сахараза (2% - ный раствор), реактив Фелинга (раствор А: 40 г сегнетовой соли и 30 г NaOH растворяют в 200 мл дистиллированной воды; раствор Б: 8 г CuSO_4 растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Перед применением смешивают равные объемы этих растворов), пробирки, водяная баня, капельницы, стеклянные палочки, пипетки на 2 мл, мерный цилиндр на 5 мл, фарфоровая ступка, термостат, раствор пепсина, липаза (солизин) (5 - 7% - ный раствор), раствор амилазы (отмеряют 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3 - 5 минут в несколько приемов; собранную жидкость фильтруют через вату и фильтрат используют в качестве источника фермента), раствор сахаразы (10 г пекарских дрожжей растирают в фарфоровой ступке с 6 мл дистиллированной воды; к растертой массе прибавляют 20 мл дистиллированной воды и фильтруют через вату).

Действие пепсина

Пепсин является ферментом, который относится к классу гидролаз. Он гидролизует пептидные связи в белковых молекулах, NH – группа которых принадлежит ароматическим аминокислотам – тирозину, фенилаланину, триптофану. В отличие от других гидролаз, расщепляющих пептидные связи, он отличается высокой устойчивостью в сильноокислой среде. Оптимальные значения pH для каталитического действия пепсина составляют от 1,0 до 2,0.

Ход эксперимента

В пробирку наливают 1 мл яичного белка и подогревают до его осаждения ($t \sim 85^{\circ}\text{C}$). После этого добавляют раствор пепсина и наблюдают за растворением белка.

Действие липазы

Липаза катализирует гидролиз эфирных связей триглицеридов на глицерин и жирные кислоты. Наибольшая активность липазы наблюдается при $\text{pH} = 8 - 9$.

Ход эксперимента:

В пробирку наливают 0,5 мл растительного масла, 2 мл дистиллированной воды и 2,5 мл NaHCO_3 . Энергично встряхивают до образования эмульсии (липаза действует только на эмульгированные жиры) и прибавляют 3 капли спиртового раствора фенолфталеина. Затем в пробирку добавляют 0,5 мл препарата липазы, перемешивают и ставят в термостат при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Через некоторое время в зависимости от активности фермента раствор в пробирке с липазой вследствие образования жирных кислот становится бесцветным, так как жирные кислоты сдвигают pH среды в кислую область.

Действие амилазы

Амилаза является ферментом, который катализирует гидролиз α -глюкозидной связи α -1-4-крахмала и гликогена до промежуточных продуктов (декстринов). Крахмал обладает способностью образовывать с иодом соединение синего цвета, амилодекстрин - фиолетового, эритродекстрин - красно-бурого, ахродекстрин - желтого.

Ход эксперимента

В пробирку вносят 5 мл крахмального клейстера и добавляют 0,5 мл раствора амилазы. Содержимое пробирки хорошо перемешивают.

вают и оставляют стоять; через 15 минут в пробирку добавляют 5 капель раствора J_2 в KI . Через некоторое время раствор становится бесцветным.

Действие сахаразы

Сахараза катализирует гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Образовавшиеся моносахариды определяют реакцией Фелинга. Сахароза не имеет свободной альдегидной группы и поэтому не обладает восстановительными свойствами.

Ход эксперимента

В пробирку наливают 1 мл раствора сахаразы и добавляют 3 мл раствора сахарозы, хорошо перемешивают и ставят в термостат при $t = 38^\circ C$. Через 15 минут в пробирку вносят 2 мл реактива Фелинга, перемешивают и нагревают до кипения, после чего наблюдают образование красного осадка.

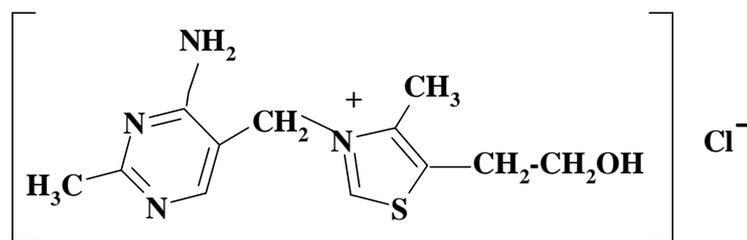
Лабораторная работа № 6

Качественные реакции на водорастворимые витамины

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

Диазореактив (5 капель 1% - ного раствора сульфаниловой кислоты в 2% - ном растворе HCl + 5 капель раствора $NaNO_2$), Na_2CO_3 (10% - ный раствор), концентрированная HCl , цинковая пыль, концентрированная CH_3COOH , $Cu(CH_3COO)_2$ (2% - ный раствор), $FeCl_3$ (1% - ный раствор), пробирки, пипетки, водяная баня, растворы витаминов B_1 , B_2 , B_5 , B_6 .

Реакция на витамин B_1

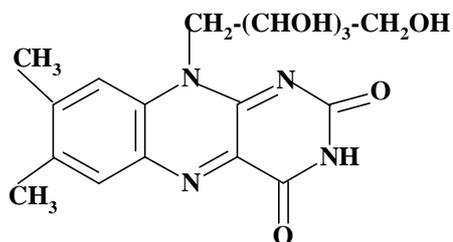


Витамин B_1 дает красное или оранжевое окрашивание раствора при взаимодействии с диазореактивом в щелочной среде вследствие образования сложного комплексного соединения с диазобензосульфокислотой.

Ход эксперимента

К 10 каплям диазореактива добавляют 2 - 4 капли витамина B_1 и 5 - 7 капель раствора Na_2CO_3 . Наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

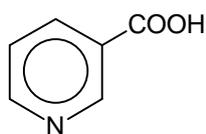


Реакция на витамин В₂ основана на его способности легко восстанавливаться. Восстановление сопровождается первоначальным изменением желтой окраски раствора в розовую или красную с последующим обесцвечиванием.

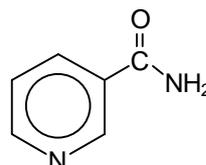
Ход эксперимента

В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель НСl и немного цинковой пыли. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на витамин В₅



(никотиновая кислота)



(никотинамид)

Витамин В₅ при взаимодействии с $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ в CH_3COOH дает синее окрашивание раствора в результате образования медной соли никотиновой кислоты.

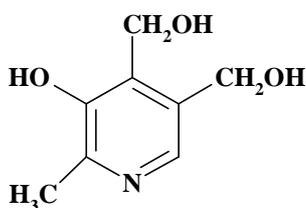
Ход эксперимента

В ампулу с 1% - ным раствором витамина В₅ добавляют 1 каплю концентрированной CH_3COOH , все перемешивают. Затем из ампулы в пробирку отмеряют 20 капель раствора и нагревают до кипения.

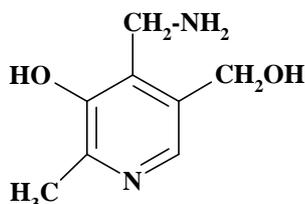
ния, при этом мутный раствор становится прозрачным. К нагретому раствору витамина В₅ добавляют 20 капель 2% - ного раствора Cu(CH₃COO)₂. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и быстро охлаждают в токе холодной воды. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на витамин В₆

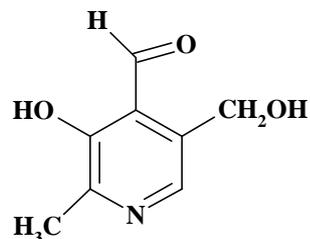
Активностью витамина В₆ обладают производные пиридина:



(пиридоксин)



(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

При взаимодействии витамина В₆ с раствором хлорида железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексной соли типа фенолята железа.

Ход эксперимента

К 5 каплям раствора витамина В₆ приливают равное количество раствора FeCl₃ и перемешивают. Наблюдают окрашивание раствора.

Лабораторная работа № 7

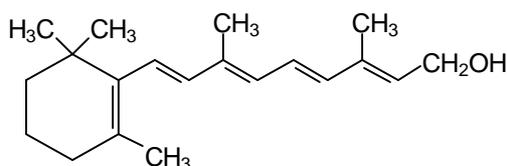
Качественные реакции на жирорастворимые витамины

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

Концентрированная H₂SO₄, анилиновый реактив (анилин в концентрированной HCl (15:1)), концентрированная HNO₃, цистеин

(0,025% - ный раствор), NaOH (10% - ный раствор), штатив, пробирки, водяная баня, капельницы, стекла, пипетки, витамин А (масляный раствор в хлороформе в соотношении 1:5), витамин D (раствор в хлороформе в соотношении 1:5), викасол (0,05% - ный раствор).

Реакция на витамин А



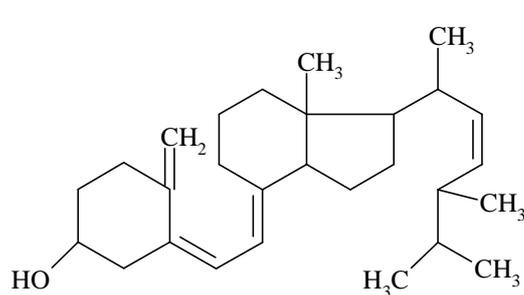
При взаимодействии хлороформного раствора витамина А с концентрированной серной кислотой развивается красно-бурое окрашивание смеси в результате образования комплекса из нескольких молекул витамина А.

Ход эксперимента

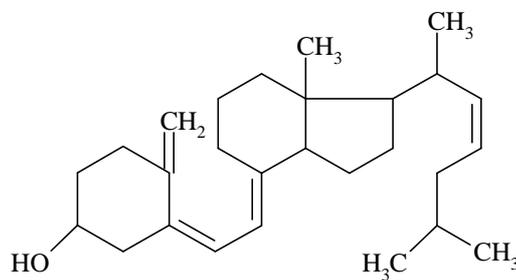
На сухом стекле смешивают 6 капель раствора витамина А в хлороформе с одной каплей концентрированной H_2SO_4 . Наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на витамин D

Известно два сходных по строению и свойствам витамина группы D : витамин D₂ (эргокальциферол) и D₃ (холекальциферол).



(эргокальциферол)



(холекальциферол)

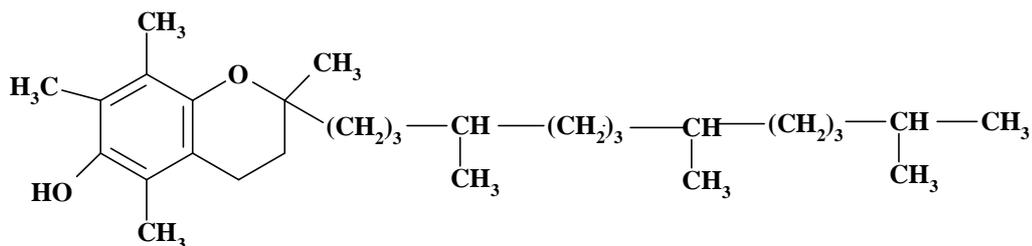
При нагревании хлороформного раствора витамина D со смесью анилина и концентрированной соляной кислоты раствор окрашивается в красный цвет.

Ход эксперимента

В сухую пробирку к 1 - 2 каплям витамина D в хлороформе вносят 1 каплю анилинового раствора. После перемешивания и нагревания наблюдают за изменением цвета раствора.

Реакция на витамин E

Известно три витамина группы E, отличающихся по степени метилирования хроманового ядра и биологической активности: α - токоферол, β - токоферол, γ - токоферол. Наибольшей биологической активностью обладает α - токоферол.



(α - токоферол)

При взаимодействии витамина E с азотной кислотой наблюдается желтое окрашивание раствора.

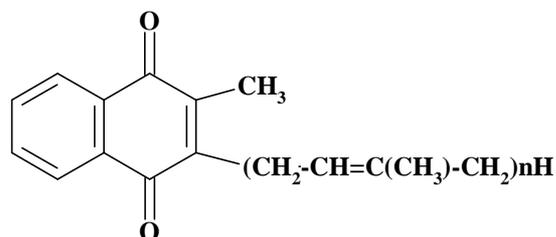
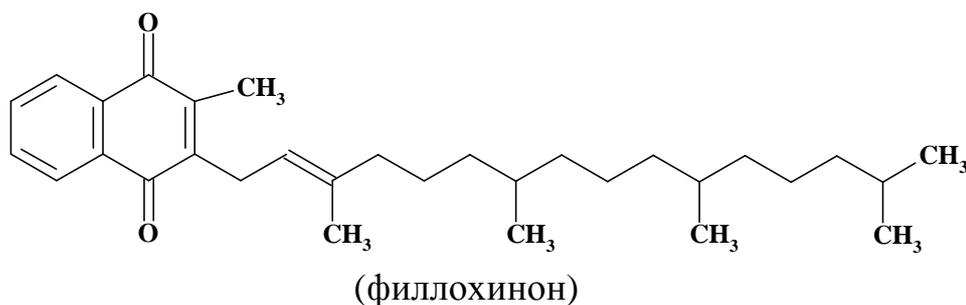
Ход эксперимента

В сухую пробирку вносят 3 капли раствора витамина E, осторожно по стенке пробирки добавляют 6 капель концентрированной HNO_3 , пробирку слегка встряхивают. После расслаивания образующейся

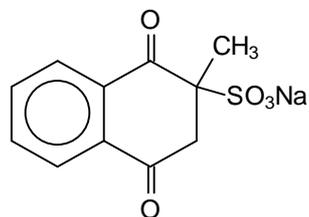
эмульсии наблюдают окрашивание верхнего маслянистого слоя продуктом окисления токоферола.

Реакция на витамин К

Известно два природных витамина группы К: витамин К₁ (филлохинон) и К₂ (менахинон).



Кроме природных витаминов К₁ и К₂, ряд активных производных нафтохинона получены методом химического синтеза. Так, ви-касол является искусственно синтезированным аналогом витамина К₁. Он обладает биологической активностью последнего.



При взаимодействии викасола со щелочным раствором цистеина появляется лимонно-желтое окрашивание раствора.

Ход эксперимента

В пробирку помещают 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10% - ного раствора NaOH. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Контрольные вопросы

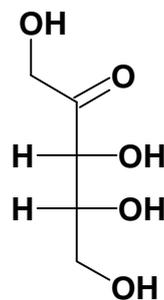
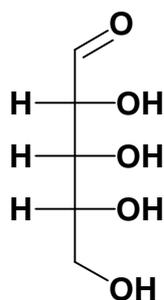
1. К какому классу ферментов относится пепсин?
2. К какому классу ферментов относится липаза?
3. К какому классу ферментов относится амилоза?
4. К какому классу ферментов относится сахараза?
5. В чём заключается специфичность действия пепсина, липазы, амилазы и сахаразы?
6. Как изменяется активность ферментов в зависимости от температуры и pH среды?
7. В чём заключается взаимосвязь ферментов и витаминов?

III. Углеводы

Органические соединения, имеющие общую молекулярную формулу $C_x(H_2O)_y$ называют углеводами. По способности к гидролизу их делят на моносахариды (монозы), дисахариды (биозы) и полисахариды (гликаны).

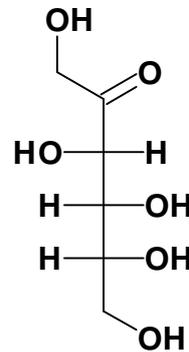
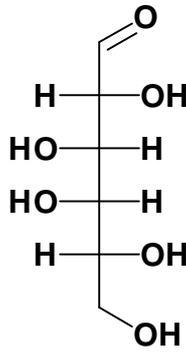
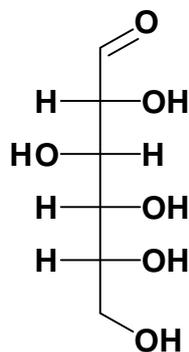
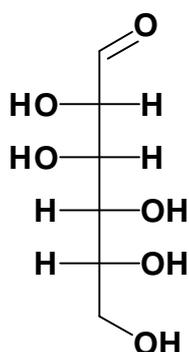
Моносахариды не подвергаются гидролизу с образованием более простых углеводов в отличие от дисахаридов и полисахаридов.

Моносахариды содержат в своём составе карбонильную (альдегидную или кетонную) и несколько гидроксильных групп. Моносахариды, содержащие альдегидную группу называются альдозами, а кетонную (обычно в положении 2) – кетозами. Наиболее распространёнными в природе являются пентозы и гексозы.



альдопентоза (D-рибоза)

кетопентоза (D-рибулоза)



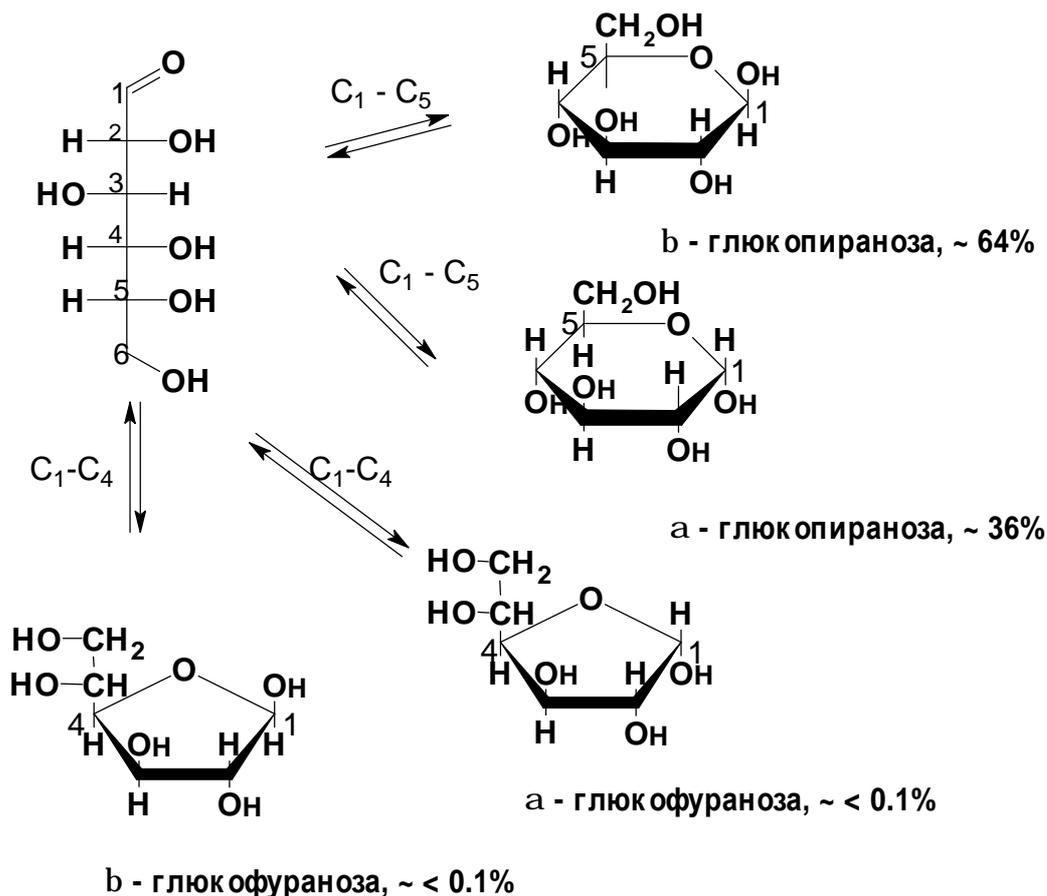
альдогексоза
(D-маноза)

альдогексоза
(D-глюкоза)

альдогексоза
(D-галактоза)

кетогексоза
(D-фруктоза)

В кристаллическом состоянии моносахариды существуют в циклической пираноподобной или фураноподобной форме. В растворах имеют место взаимные превращения открытой и циклической форм:

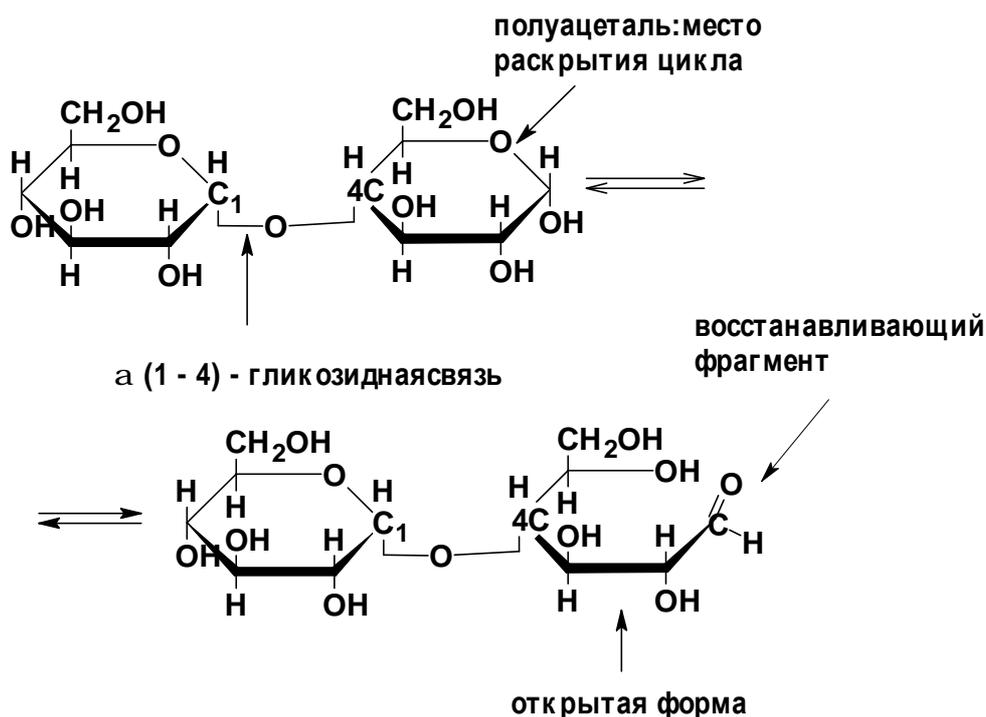


Благодаря этому моносахариды обладают способностью восстанавливать в щелочной среде катионы металлов (Ag^+ , Cu^{2+}), при этом они подвергаются расщеплению с образованием продуктов окисления.

Дисахариды состоят из двух одинаковых или различных остатков моносахаридов. Их связывание в природных дисахаридах осуществляется двумя путями.

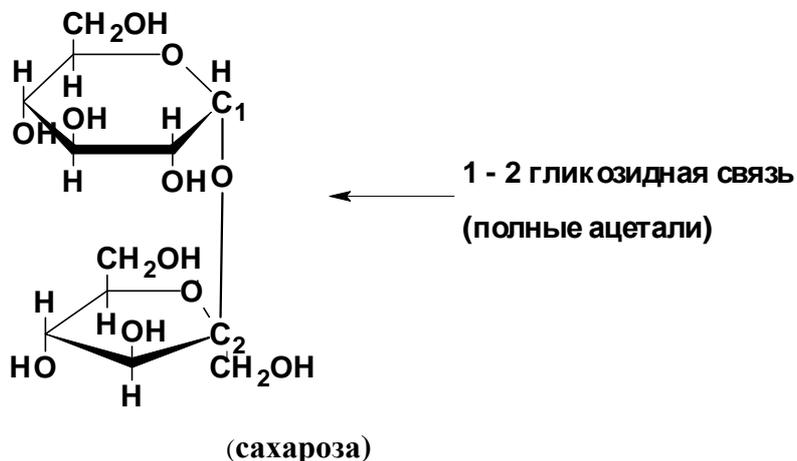
1. За счет полуацетальной (гликозидной) OH- группы одного и любой спиртовой OH-группы другого моносахарида, кроме полуацетальной. Это восстанавливающие дисахариды (гликозид – гликозиды). К ним относятся: мальтоза, целлобиоза, лактоза и др.

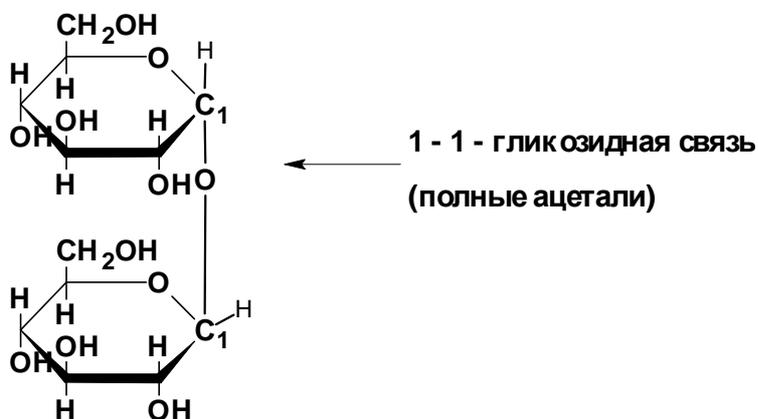
Так, мальтоза состоит из двух остатков α -глюкозы, соединенных $\alpha, \alpha - 1,4 - O$ - гликозидной связью.



Целлобиоза состоит из двух остатков β -глюкозы, соединенных $\beta, \beta - 1,4$ гликозидной связью. Лактоза состоит из остатков β -галактозы и α -глюкозы, соединенных $\alpha, \beta - 1,4 - O$ - гликозидной связью.

2. За счёт полуацетальных (гликозидных) OH- групп обоих моносахаридов. Это невосстанавливающие дисахариды: сахароза, трегалоза и другие.





(трегалоза)

Полисахариды – высокомолекулярные углеводы, которые по химической природе являются полигликозидами. В полисахаридах растительного происхождения в основном имеют место (1 – 4) и (1 – 6) гликозидные связи, а в полисахаридах животного и бактериального происхождения дополнительно имеются также (1 – 3) и (1 – 2) гликозидные связи. Полисахариды подразделяют:

1. на гомополисахариды (гомогликаны), которые состоят из остатков одного моносахарида. Так, крахмал состоит из остатков α -глюкозы, его дисахаридным фрагментом является мальтоза. Целлюлоза состоит из остатков β -глюкозы, его дисахаридным фрагментом является целлобиоза;
2. гетерополисахариды (гетерогликаны) состоят из остатков различных моносахаридов: гепарин, гиалуроновая кислота и др.

Полисахариды проявляют очень слабые восстановительные свойства и гидролизуются, подобно дисахаридам только в кислой среде.

Лабораторная работа №8

Качественные реакции на углеводы

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

NaOH (5% - ный раствор), CuSO₄ (5% - ный раствор), резорцин, HCl (25% - ный раствор), реактив Барфедда (6,5 г Cu(CH₃COO)₂ растворяют в 100 мл горячей воды (t = 70 °C), смесь фильтруют и к фильтрату прибавляют 1 мл ледяной CH₃COOH), раствор Люголя (0,3 г иода и 0,6 г иодистого калия растворяют в 15 мл дистиллированной воды и затем разбавляют водой до объема 100 мл), пробирки, пипетки, стеклянные палочки, водяная баня, глюкоза (5% - ный раствор), фруктоза (5% - ный раствор), лактоза (5% - ный раствор), мальтоза (5% - ный раствор), крахмал (0,1% - ный раствор).

Моносахариды

Реакция Троммера

Используется для определения восстанавливающих моносахаридов (глюкоза, фруктоза и др.). Моносахариды в щелочной среде восстанавливают оксид меди (II) в оксид меди (I) при этом образуется осадок красно-бурого цвета.

Ход эксперимента

В пробирку к 6 каплям 5% - ного раствора глюкозы добавляют 3 капли 5% - ного раствора NaOH и 2 капли 5% - ного раствора CuSO₄. Содержимое пробирки перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до изменения цвета раствора.

Реакция Селиванова на кетозы

При нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой и резорцином наблюдается вишнево-красное окрашивание раствора.

Ход эксперимента

В пробирку помещают 15 капель 5% - ного раствора фруктозы, 3 капли 25% - ного раствора HCl и несколько кристаллов резорцина. Смесь нагревают на водяной бане в течение 5 - 10 минут при $t = 80^{\circ}\text{C}$ до появления характерного окрашивания раствора.

Реакция Барфедда

Позволяет отличить восстанавливающие моносахариды от дисахаридов. Окисление углевода протекает не в щелочной среде (см. реакцию Троммера), а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях восстанавливающие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов. При взаимодействии моносахаридов с реактивом Барфедда образуется осадок красно-бурого цвета.

Ход эксперимента

К 5 каплям 5% - ного раствора глюкозы добавляют 5 капель реактива Барфедда. Смесь перемешивают и осторожно нагревают до кипения, наблюдая за изменением цвета раствора.

Дисахариды

Реакция Троммера

Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы) эти дисахариды обладают восстанавливающими свойствами.

Ход эксперимента

В пробирку к 4 каплям 5% - ного раствора лактозы (мальтозы) добавляют 3 капли 5% - ного раствора NaOH и 2 капли 5% - ного раствора CuSO₄. Содержимое пробирки перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до изменения цвета раствора.

Полисахариды

Реакция крахмала с иодом

При взаимодействии крахмала с иодом образуется комплексное адсорбционное соединение, окрашенное в синий цвет. При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойкого комплекса крахмала с иодом.

Ход эксперимента

К 5 каплям 0,1% - ного раствора крахмала добавляют 1 каплю раствора Люголя, содержимое пробирки перемешивают и наблюдают за изменением цвета раствора.

Контрольные вопросы

1. Какие из перечисленных углеводов вступают в реакцию Троммера:
 - а) глюкоза, фруктоза, лактоза, трегалоза;
 - б) сахароза, рибоза, арабиноза, ксилоза;
 - в) манноза, фруктоза, галактоза, трегалоза;
 - г) арабиноза, глюкоза, сахароза, рибоза?
2. Какие из предложенных углеводов вступают во взаимодействие с резорцином в кислой среде:
 - а) рибулоза, глюкоза, рибоза, манноза;
 - б) манноза, ксилулоза, арабиноза, галактоза;
 - в) фруктоза, рибоза, глюкоза, галактоза?
3. Какие из перечисленных углеводов вступают в реакцию Барфедда:
 - а) глюкоза, фруктоза, рибоза, лактоза;
 - б) сахароза, манноза, фруктоза, галактоза,
 - в) рибоза, лактоза, арабиноза, ксилоза;
 - г) арабиноза, трегалоза, манноза, глюкоза?
4. Какие из предложенных дисахаридов обладают восстанавливающими свойствами:
 - а) сахароза, лактоза, мальтоза;
 - б) целлобиоза, мальтоза, трегалоза?

Контрольная работа №2

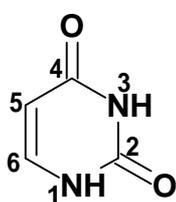
1. Для предложенных моносахаридов, содержащих альдегидную и кетонную группу, запишите кето-енольную таутомерию, в ходе которой образуются изомерные моносахариды.
2. Для изомерных моносахаридов запишите кольчато-цепную таутомерию, приводящую к образованию пираноподобной и фураноподобной структур.
3. Запишите уравнение реакции фосфорилирования с участием пиранозной формы моносахаридов.
4. Получите восстанавливающий и невосстанавливающий дисахариды, состоящие из одинаковых остатков моносахарида. Подействуйте на восстанавливающий дисахарид: а) окислителем ($\text{Br}_2 + \text{H}_2\text{O}$; HNO_3 (разб.)), б) восстановителем (H_2/Ni ; NaBH_4), в) 1 молем фенилгидразина, г) гидроксиамином.
5. Получите невосстанавливающий и восстанавливающий дисахариды, состоящие из остатков различных моносахаридов.

IV. Нуклеиновые кислоты

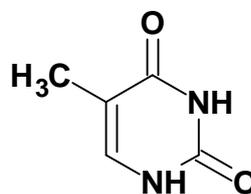
Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные гетерополимеры с молекулярной массой от 25 тыс. до 1 млн и более. Они являются важнейшими информационными молекулами, хранящими, копирующими и передающими сведения о важнейших признаках организма.

Химический состав нуклеиновых кислот

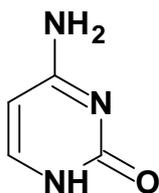
1. Азотистые основания производные пиримидина



урацил
(2,4-диоксопиримидин)

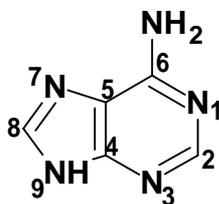


тимин
(2,4-диоксо-5-метилпиримидин)

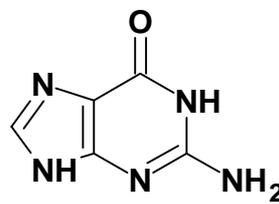


цитозин (2-оксо-4-аминопиримидин)

2. Азотистые основания производные пурина

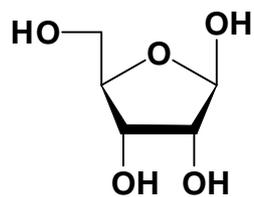


аденин (6-аминопурин)



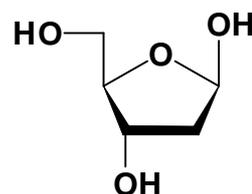
гуанин (2-амино-6-оксопурин)

3. Углеводные компоненты



рибоза

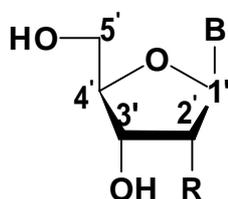
(β -D-рибофураноза)



дезоксирибоза

(β -2'-дезокси-D-рибофураноза)

Азотистые основания образуют с рибозой (дезоксирибозой) нуклеозиды (N – гликозиды). При этом пиримидиновые основания соединяются с углеводом N₁ - атомом, а пуриновые N₉ - атомом. Углевод соединяется с основанием за счёт OH-группы у C₁'- атома.



← b - N - гликозидная связь

(общая структура нуклеозидов)

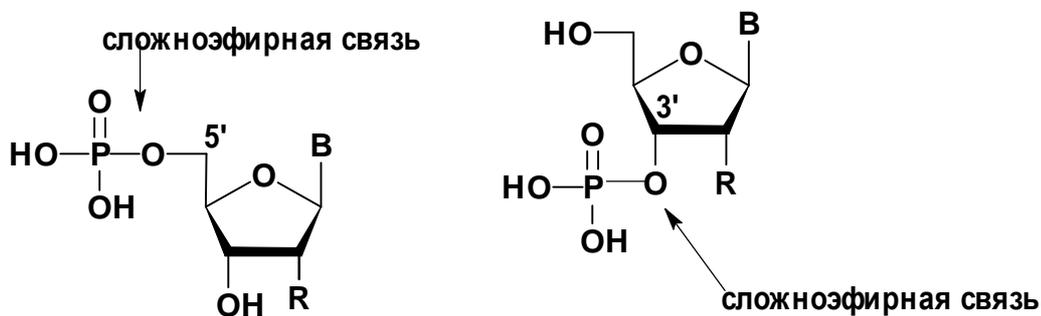
R = OH – рибонуклеозид

R = H – дезоксирибонуклеозид

B – гетероциклическое основание.

Нуклеозиды устойчивы к гидролизу в слабощелочной среде, однако в кислой среде они подвергаются расщеплению по β – N – гликозидной связи. При этом нуклеозиды, в состав которых входят пуриновые основания, гидролизуются легче, чем пиримидиновые нуклеозиды.

Этерификация фосфорной кислотой спиртового гидроксила при C₃' – или C₅' - атомах в остатке дезоксирибозы или рибозы приводит к образованию фосфатов нуклеозидов, которые принято называть нуклеотидами.



(общая структура мононуклеотидов)

R = OH – рибонуклеотид

R = H – дезоксирибонуклеотид

За счёт фосфатного остатка нуклеотиды проявляют свойства двухосновной кислоты и в физиологических условиях при pH ~ 7 находятся в ионизированном состоянии.

Полинуклеотиды (нуклеиновые кислоты) содержат в своём составе более 20 нуклеозидов. В полинуклеотидных цепях нуклеозидные звенья связаны через фосфатную группу. Она образует две сложноэфирные связи с C₃' предыдущего и с C₅' последующего нуклеотидных звеньев. Каркас цепи состоит из чередующихся фосфатных и углеводных остатков. При этом азотистые основания являются «боковыми» группами, присоединёнными к углеводным остаткам.

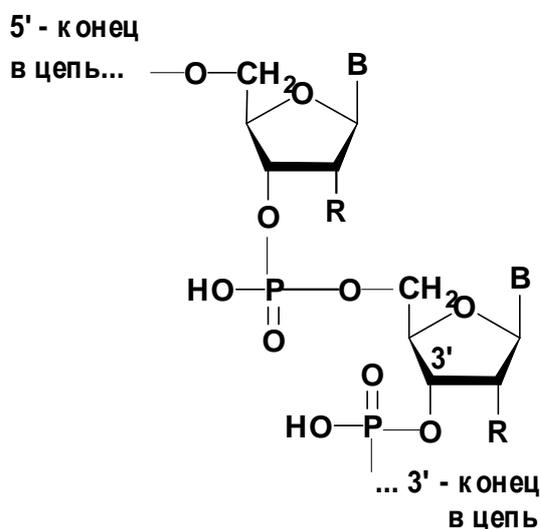


Таблица 4

Сходство и различие в химическом составе нуклеиновых кислот

ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота)	РНК (рибонуклеиновая кислота)
Азотистое основание	
Аденин	Аденин
Гуанин	Гуанин
Цитозин	Цитозин
Тимин	Урацил
Углеводный компонент	
Дезоксирибоза	Рибоза

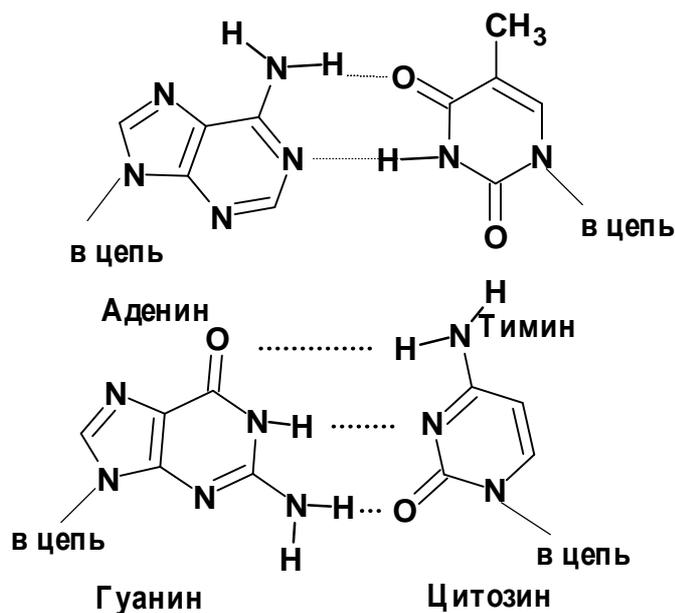
ДНК в основном содержится в ядрах клеток, а РНК находится в рибосомах и в протоплазме клеток. Молекулы РНК различаются по функциям (транспортная, матричная, рибосомная).

Структурная организация нуклеиновых кислот

Под первичной структурой нуклеиновых кислот понимают определенную последовательность расположения мононуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК и РНК.

У животных и человека молекула ДНК в отличие от РНК имеет более сложную пространственную организацию полинуклеотидной цепи. Так, двухцепочную правозакрученную спираль, состоящую из комплементарных друг другу антипараллельных полинуклеотидных цепей, относят ко вторичной структуре ДНК. В ней пуриновые и пиримидиновые основания направлены внутрь двойной спирали, а углеводно-фосфатные группы расположены снаружи

спирали. Азотистые основания аденин и тимин, гуанин и цитозин, принадлежащие двум цепям, соединяются за счёт водородных связей и образуют комплементарные пары оснований:



Основания, располагающиеся внутри спирали, прочно упакованы и не контактируют с водой. Вода контактирует лишь с OH – группами углевода и фосфатными группами.

Лабораторная работа №9

Гидролиз нуклеопротеинов дрожжей

В большинстве случаев нуклеиновые кислоты функционируют в биосистемах в виде комплексов с белками (протеинами). Эти комплексы, образованные благодаря высокоспецифичным взаимодействиям между соответствующими полипептидными и полинуклеотидными цепями, называют нуклеопротеинами.

Для изучения химического состава нуклеопротеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей. С помощью качественных реакций обнаруживают продукты гидролиза - белки, азотистые основания, а также рибозу (дезоксирибозу) и фосфорную кислоту.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал

NaOH (10% - ный раствор), $CuSO_4$ (1% - ный раствор), аммиак (концентрированный раствор), $AgNO_3$ (2% - ный раствор), дифениламин (1% - ный раствор) (1 г дифениламина растворяют в 50 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 и доводят ледяной уксусной кислотой до 100 мл), молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония растворяют в 50 мл концентрированной HNO_3), дистиллированная вода, лакмусовая бумага, круглодонная колба с обратным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, водяная баня и гидролизат дрожжей (помещают 2,5 г дрожжей в круглодонную колбу, добавляют 20 мл 10% - ного раствора H_2SO_4 . Затем колбу соединяют с обратным холодильником. Гидролиз дрожжей проводят при нагревании в течение 1 часа с момента закипания жидкости. После охлаждения гидролизат фильтруют и с ним проводят качественные реакции).

Биуретовая реакция на белки

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% - ного раствора NaOH до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу), затем 2 капли 1% - ного раствора CuSO₄. Появляется сине-фиолетовая окраска.

Серебряная проба на основания

К 10 каплям гидролизата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции (по лакмусу), затем добавляют 10 капель 2% - ного раствора AgNO₃. Через несколько минут образуется светло-коричневый осадок солей пуриновых оснований (содержимое пробирки при стоянии перемешивать не надо).

Реакция на углеводный компонент

Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с рибозой – зеленое.

К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 1% - ного раствора дифениламинового реактива и кипятят на водяной бане 15 минут. Появляется сине-зеленое окрашивание.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 10 каплям гидролизата прибавляют 20 капель молибденового реактива и осторожно кипятят несколько минут. В присутствии фосфорной кислоты наблюдается окрашивание раствора в лимонно-желтый цвет.

Контрольные вопросы

1. Какие из предложенных соединений входят в состав ДНК:
 - а) цитозин, гуанин, рибоза, урацил;
 - б) дезоксирибоза, тимин, гуанин, урацил;
 - в) аденин, дезоксирибоза, гуанин, тимин;
 - г) гуанин, цитозин, рибоза, аденин;
 - д) урацил, рибоза, тимин, аденин?

2. Какие из предложенных соединений входят в состав РНК:
 - а) рибоза, тимин, урацил, аденин;
 - б) урацил, аденин, дезоксирибоза, рибоза;
 - в) урацил, аденин, тимин, рибоза;
 - г) дезоксирибоза, тимин, рибоза, аденин;
 - д) аденин, урацил, тимин, рибоза?

3. Какие из предложенных соединений вступают во взаимодействие с дифениламиновым реактивом:
 - а) тимин, рибоза, урацил, аденин;
 - б) гуанин, дезоксирибоза, урацил, тимин;
 - в) аденин, гуанин, урацил, рибоза?

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