

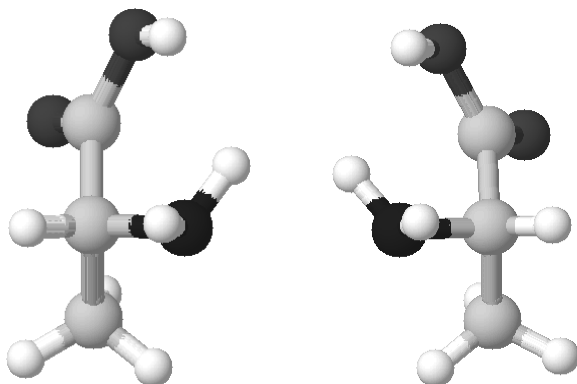
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Часть 1

Учебно-методическое пособие



Севастополь
СевГУ
2018

Р е ц е н з е н т:

Е.Н. Корж – канд. хим. наук, доцент кафедры «Химия» СевГУ

Практикум по биохимии: учеб.-метод. пособие к выполнению лабораторных работ. Ч. 1 / Сост. Л.А. Яковишин. – Севастополь: СевГУ, 2018. – 79 с.

Целью учебно-методического пособия является оказание помощи студентам в выполнении лабораторных работ и самостоятельном изучении материала по дисциплине «Биохимия».

УДК 577.1

Учебно-методическое пособие рассмотрено и утверждено на заседании кафедры «Химия», протокол № 6 от 27 февраля 2018 г.

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия для студентов направлений подготовки 19.03.04 Технология продукции и организация общественного питания и 12.03.04 Биотехнические системы и технологии.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1. Лабораторная работа «Сtereoхимическое моделирование биомолекул»	5
2. Лабораторная работа «Хроматографический анализ аминокислот»	13
3. Лабораторная работа «Свойства аминокислот»	21
4. Лабораторная работа «Определение изоэлектрической точки яичного альбумина»	32
5. Лабораторная работа «Свойства белков»	36
6. Лабораторная работа «Ферментативный гидролиз крахмала»	44
7. Лабораторная работа «Хромопротеиды»	55
Библиографический список	67
Приложение А	68

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимии, как и любой другой естественной науки, подразумевает не только ознакомление с теоретическим материалом, но и проведение лабораторных работ. Лабораторные работы, содержащиеся в данном практикуме, в основном включают опыты, основанные на выделении биохимически важных веществ, их качественных реакциях и основных химических свойствах.

Учебно-методическое пособие включают краткие теоретические сведения, описание методик проведения опытов, а также вопросы и задачи, относящиеся к лабораторным работам. В приложении приведены необходимые справочные материалы, общая структура составления отчета и список вопросов для защиты лабораторных работ.

1. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА СТЕРЕОХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОМОЛЕКУЛ

1.1. Цель работы

Рассмотреть пространственное строение протеиногенных аминокислот, циклогексана и его производных.

1.2. Краткие теоретические сведения

1.2.1. Модели молекул. Для представления пространственного строения молекул широко используют различные модели (см. *рисунок 1.1*). Среди них наиболее точно передают строение *полусферические модели* (*модели Стюарта – Бриглеба*). В них атомы изображаются в виде срезанных шаров. Количество срезов определяется валентностью атомов элемента. Срезы делаются согласно валентным углам. Расстояние от среза до центра шара равно ковалентному радиусу атома, поэтому полусферические модели точно передают длину химической связи. В отличие от полусферических, *шаростержневые, стержневые и проволочные модели* (*рисунок 1.1*) создают иллюзию ажурности молекул и наличия у них большого количества пустоты. В действительности атомы имеют плотную упаковку.

Для учебных целей широко используют шаростержневые модели (*рисунок 1.1*). В таких моделях атомы изображаются шарами разных цветов (как правило, атомы углерода изготавливают черными, водорода – белыми, серы – желтыми, кислорода – красными, азота – синими), а химические связи передаются стержнями. Шары делают пропорционально радиусу атомов или все одинакового

размера. Длина стержней также может быть разной или одинаковой. Отверстия для стержней соответствуют направленности химических связей.

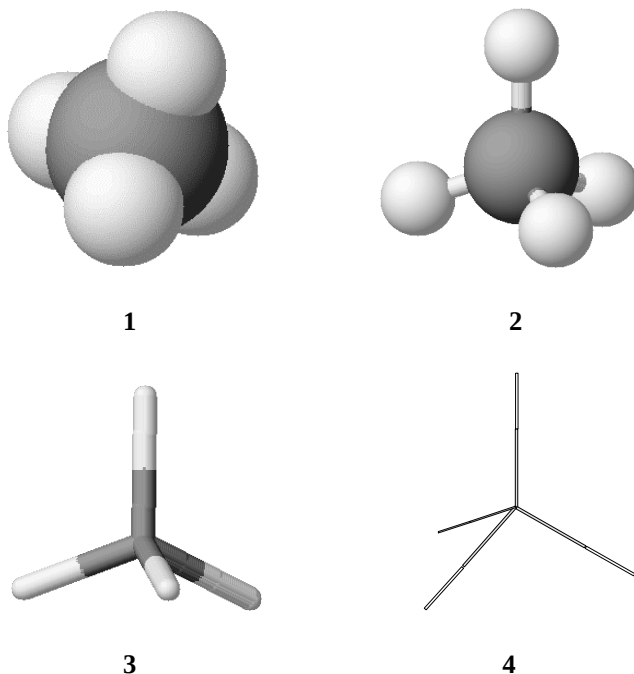


Рисунок 1.1 – Модели молекулы метана CH_4
(1 – полусферическая, 2 – шаростержневая, 3 – стержневая (палочковая), 4 – проволоочная)

1.2.2. Стереохимия аминокислот. Для молекул протеиногенных α -аминокислот (кроме глицина) характерна *стереоизомерия* (*пространственная изомерия*). Стереоизомерия – это явление существования *стереоизомеров*, соединений, имеющих одинаковые структурные формулы, но отличающихся положением атомов в пространстве. α -Аминокислоты, за исключением глицина, являются *асимметричными*, т.е. их молекулы не имеют

элементов симметрии. Поэтому такие соединения существуют в виде *зеркальных изомеров – энантиомеров* (рисунок 1.2). Их молекулярные модели при наложении друг на друга никогда не совпадают.

Свойство молекулы не совпадать со своим зеркальным изображением получило название «*хиральность*». Одним из *элементов хиральности* является *хиральный центр*. Хиральным центром в аминокислотах является α -атом углерода. Такой атом связан с четырьмя разными заместителями и называется *асимметрическим*. Обычно в формулах асимметрический атом помечают звездочкой «*». У глицина α -атом углерода связан с двумя одинаковыми заместителями (атомами водорода), поэтому он не является асимметрическим. Некоторые протеиногенные аминокислоты имеют по два асимметрических атома углерода. Это треонин, изолейцин и гидроксипролин.

Количество стереоизомеров в общем случае определяется по формуле:

$$N = 2^n, \text{ где } n - \text{число асимметрических атомов углерода.}$$

Энантиомеры изображают с помощью так называемых *проекционных формул Фишера* (рисунок 1.2). Они представляют собой проекцию объемной молекулы на плоскость чертежа. В проекционной формуле заместители, расположенные слева и справа (в аминокислотах – аминогруппа и водород), лежат перед плоскостью. Верхние и нижние заместители (в аминокислотах – карбоксильную группу и радикал) располагают за плоскостью чертежа. Для обозначения такого положения заместителей вертикальную линию иногда изображают пунктиром. Сверху записывают самую старшую группу (в аминокислотах это карбоксильная группа). В точке пересечения вертикальной и горизонтальной линий находится асимметрический атом (в аминокислотах – α -углерод). Он расположен в плоскости чертежа.

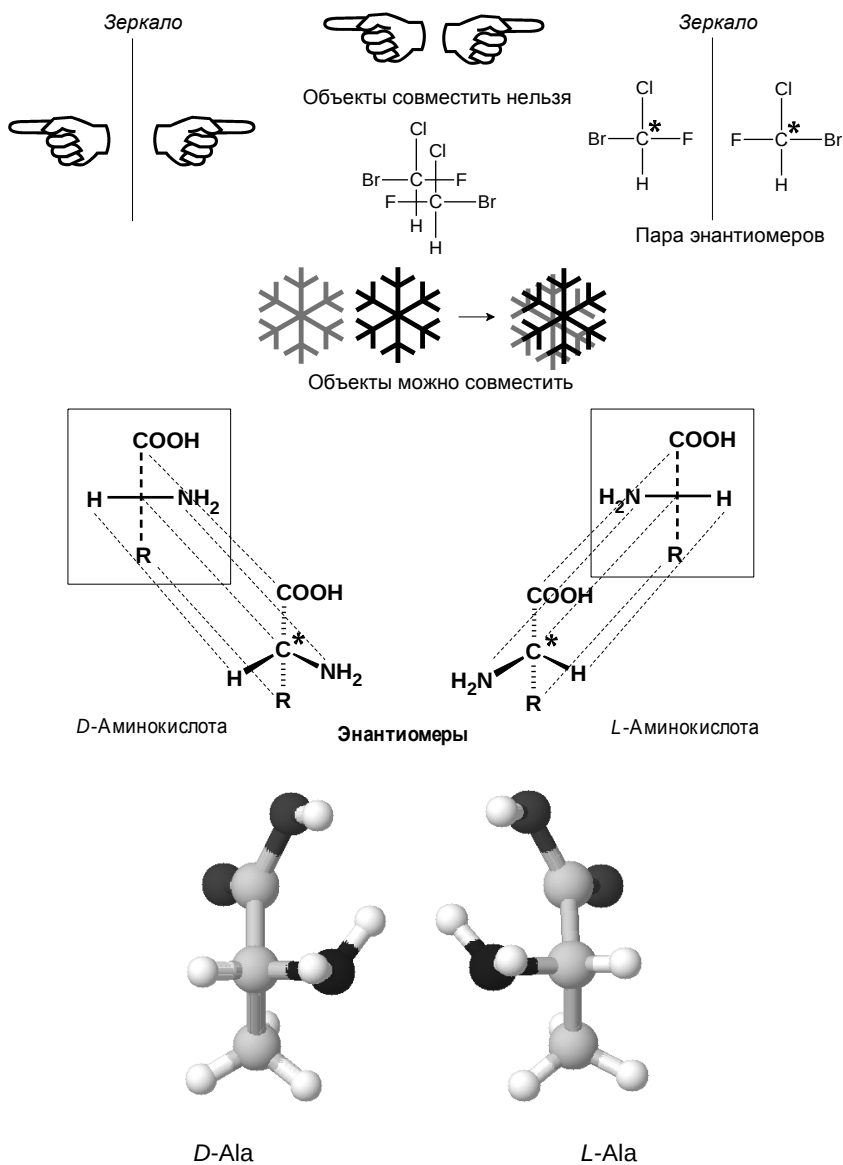
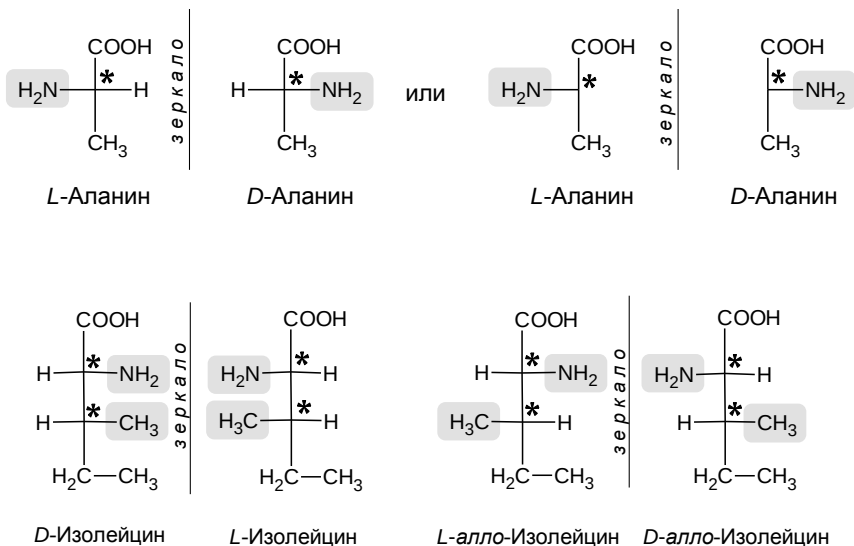


Рисунок 1.2 – Зеркальная изомерия

Для условного обозначения расположения заместителей вокруг асимметрического атома углерода (конфигурации) используют *D*-, *L*-номенклатуру. Если в формуле Фишера водород у асимметрического α -атома углерода расположен слева, то это *D*-конфигурация аминокислоты, если справа – то *L*-конфигурация аминокислоты. Таким образом, если в молекуле аминокислоты аминогруппа будет слева (водород – справа), то это *L*-аминокислота и, наоборот, при расположении аминогруппы справа (водород – слева) получаем *D*-аминокислоту. Большинство природных белков и пептидов образовано остатками *L*-аминокислот. *D*-Аминокислоты встречаются в природе редко. Они найдены в некоторых антибиотиках белковой природы, в бактериях (например, в оболочке бактерии сибирской язвы), грибах и водорослях. При обозначении *L*-аминокислот букву «*L*» обычно опускают. Если имеется *D*-аминокислота, то буква «*D*» указывается обязательно.



Если молекула хиральна, то она может являться *оптически активной*. Оптическая активность проявляется во вращении плоскополяризованного света. Зеркальные изомеры вращают плоскость поляризации света на одну и ту же величину, но только в противоположные стороны (направление вращения указывают знаком «+» для правовращающей формы и «-» — для левовращающей). Поэтому зеркальные изомеры еще называют *оптическими изомерами*. Энантиомеры не отличаются по своим физическим и химическим свойствам, за исключением знака вращения, а также в ряде случаев и вкуса. При взаимодействии с другими оптически активными веществами они обнаруживают различия в химических свойствах.

Смесь энантиомеров в соотношении 1:1 называется *рацематом*. Рацемат не является оптически активным. Процесс потери оптической активности называют *рацемизацией*. Химические свойства энантиомеров и их рацемата одинаковы при взаимодействии с оптически неактивными веществами. Различия возникают только при взаимодействии с оптически активными реагентами, например, ферментами.

1.3. Оборудование

Набор для сборки шаростержневых моделей молекул органических веществ.

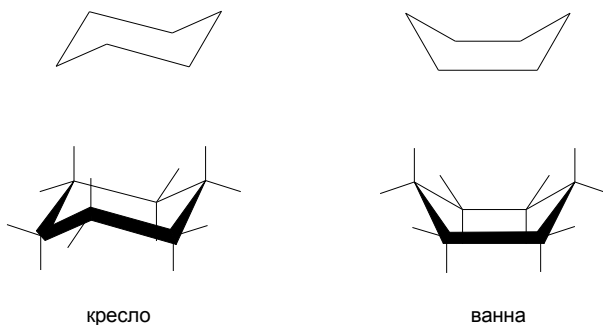
1.4. Ход работы

1. *Стереохимия протеиногенных α -аминокислот.* Соберите шаростержневую модель молекулы глицина. Почему он не имеет стереоизомеров? Составьте молекулярные модели *L*- и *D*-аланина и *L*- и *D*-серина. Попробуйте совместить модели для каждой из аминокислот.

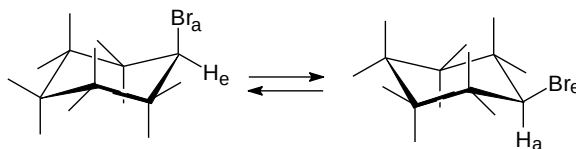
Напишите для *L*- и *D*-серина проекционные формулы Фишера.

Сколько асимметрических атомов в молекуле треонина? Сколько стереоизомеров у треонина? Напишите для них проекционные формулы Фишера. Соберите их шаростержневые модели.

2. Изучение конформаций циклогексана и его производных. Соберите шаростержневые модели молекулы циклогексана в конформациях «кресло» и «ванна». Какая из них наиболее энергетически выгодна? Почему? Оцените устойчивость этих конформаций.



Запишите уравнение реакции взаимодействия циклогексана с бромом. Соберите модели полученного производного, учитывая, что циклогексановое кольцо находится в конформации «кресло» и тот факт, что атом брома может занимать аксиальное или экваториальное положения:

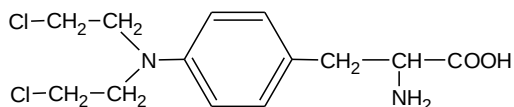


Пользуясь моделями, установите, какое из этих положений наиболее выгодно.

1.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

1. Сколько оптических изомеров имеет валин и триптофан? Напишите для них проекционные формулы Фишера. Обладает ли оптической активностью глицин? Свой ответ поясните.

2. Производным какой аминокислоты можно считать противоопухолевый препарат сарколизин (см. формулу)? Сколько стереоизомеров будет у сарколизина? Напишите для них проекционные формулы Фишера.



3. Какая из аминокислот не имеет стереоизомеров? Объясните свой ответ.

2. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ

2.1. Цель работы

Провести плоскостную хроматографию аминокислот. Рассчитать коэффициент R_f для отдельных аминокислот.

2.2. Краткие теоретические сведения

Хроматография сегодня является мощным методом разделения и идентификации веществ. Она основана на различном распределении веществ между подвижной (поток жидкости или газа) и неподвижной (твердой или жидкой) фазами. По типу взаимодействия между разделяемыми веществами и фазами различают адсорбционную, распределительную, ионообменную и гель-хроматографию (см. *таблицу 2.1*). В зависимости от вида фаз выделяют газовую, газожидкостную и жидкостную хроматографию (*рисунок 2.1*).

Хроматографию проводят в колонках, на бумаге или в тонком слое сорбента (см. *рисунки 2.1–2.4*). Последние два вида относят к плоскостной хроматографии (*рисунки 2.2 и 2.4*). Хроматографическое разделение в этом случае, как и в варианте колоночной хроматографии, обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых веществ.

Разделяемые вещества на пластинке или на полоске бумаги (см. *рисунки 2.2 и 2.4*) образуют отдельные зоны (пятна). Зоны можно детектировать визуально. В случае, если визуальный контроль невозможен, хроматограммы освещают УФ-лампой (при этом предварительно в слой сорбента вводят флуоресцентный агент), просто нагревают над

электроплиткой или в сушильном шкафу до обугливания веществ, либо обрабатывают специальными реагентами (обычно с последующим нагревом).

Таблица 2.1 – Основные виды хроматографии

Вид	Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Характер проведения	Механизм распределения
<i>Газовая</i>				
Газо-адсорбционная	Газ	Твердая	Колонка	Адсорбционный
Газо-жидкостная	Газ	Жидкость	Колонка	Распределительный
<i>Жидкостная</i>				
Твердо-жидкостная	Жидкость	Твердая	Колонка	Адсорбционный
Жидкостно-жидкостная	Жидкость	Жидкость	Колонка	Распределительный
<i>Ионообменная</i>				
Ионообменная	Жидкость	Твердая	Колонка	Ионообменный
<i>Плоскостная</i>				
Тонкослойная	Жидкость	Твердая	Тонкий слой	Адсорбционный
Тонкослойная	Жидкость	Жидкость	Тонкий слой	Распределительный
Бумажная	Жидкость	Жидкость	Лист бумаги	Распределительный
<i>Ситовая (гель-проникающая)</i>				
Ситовая	Жидкость	Жидкость	Колонка	По размерам молекул

Положение пятен на хроматограмме характеризуется величинами R_f (от англ. *ratio of flow rates* – отношение скоростей потоков) – относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое или по бумажной полоске (так называемой *хроматографической подвижностью*). Экспериментально величину R_f определяют как отношение расстояния, пройденного веществом ($l_{\text{вещества}}$), к расстоянию,

пройденному растворителем ($l_{\text{растворителя}}$) от старта до линии фронта (рисунок 2.2):

$$R_f = \frac{l_{\text{вещества}}}{l_{\text{растворителя}}}$$

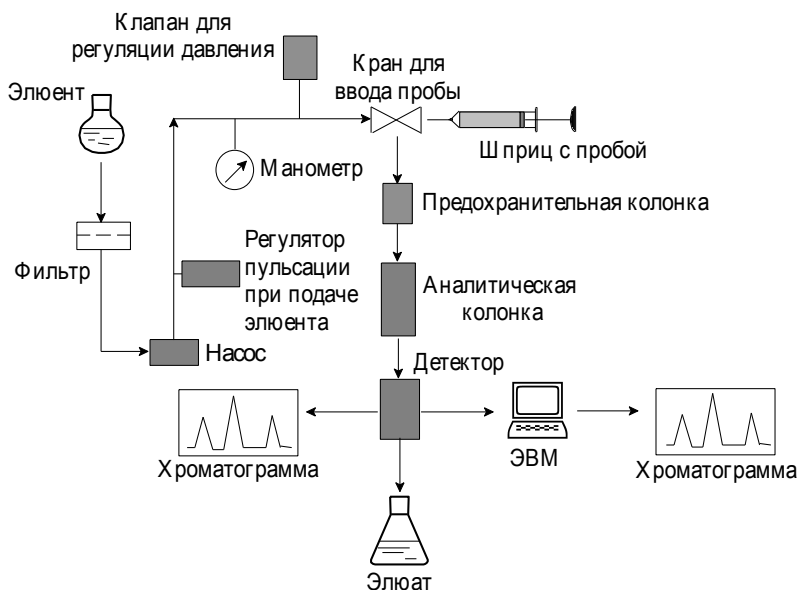


Рисунок 2.1 – Схема аппаратурного оформления высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Хроматографическая подвижность R_f всегда меньше или равна единице. Величина R_f зависит от природы носителя (типа бумаги, активности, природы и толщины слоя сорбента), качества и природы растворителя или их смеси, способа нанесения пробы и сорбента, размера частиц сорбента, температуры и некоторых других факторов.

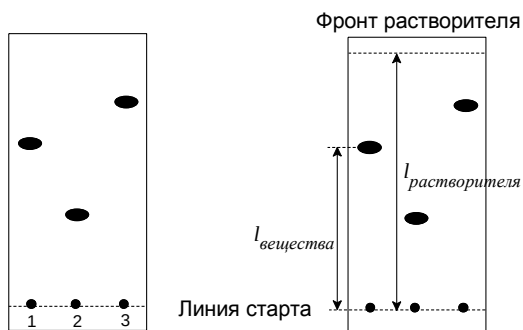


Рисунок 2.2 – Плоскостная хроматография

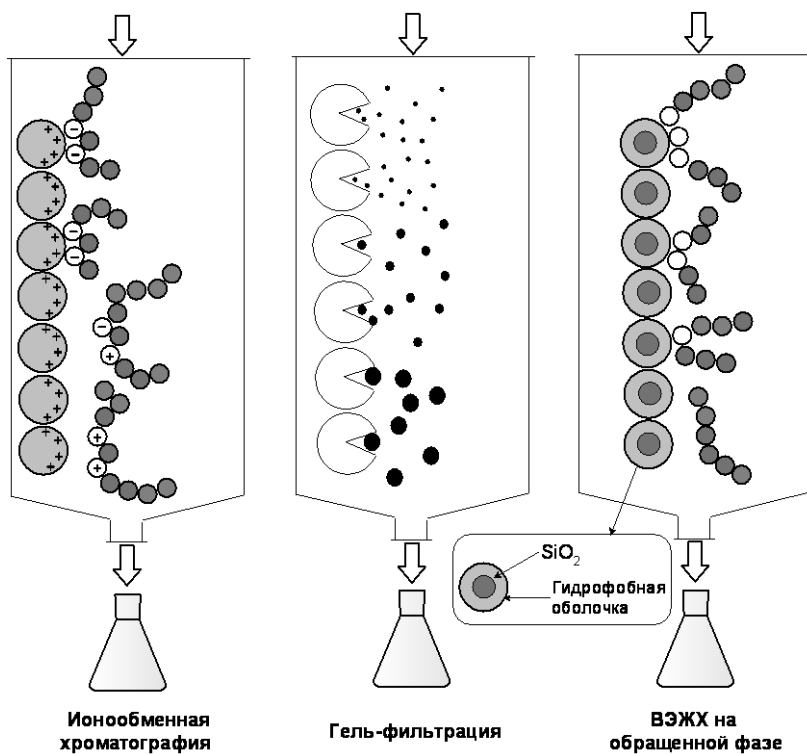


Рисунок 2.3 – Виды колоночной хроматографии

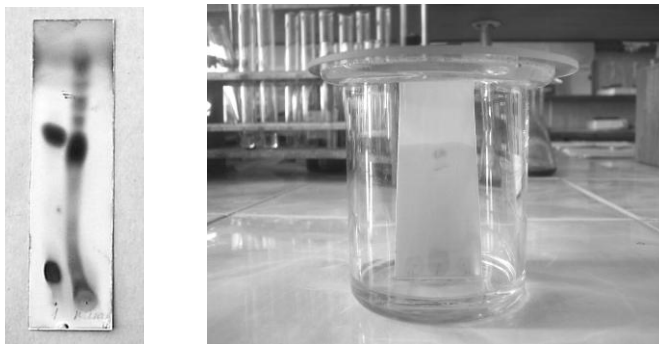


Рисунок 2.4 – Пластика ТСХ и бокс (камера) для хроматографирования

Плоскостная хроматография проста по технике выполнения, экспрессна, не требует дорогостоящего оборудования. Воспроизводимость величин R_f в ТСХ значительно лучше, чем в БХ, и обычно составляет $\pm 0,05R_f$.

2.3. Реактивы и оборудование

Система растворителей бутанол–уксусная кислота–вода (40:10:10), 1 % растворы аминокислот, капиллярные трубки, бокс (цилиндр) для хроматографирования с крышкой, электроплитка, тепловентилятор, сушильный шкаф, хроматографическая бумага или пластинка для тонкослойной хроматографии, пинцет, 0,1 % раствор нингидрина в воде, химический стакан.

2.4. Ход работы

Возьмите хроматографическую бумагу или пластинку для тонкослойной хроматографии (пластинку ТСХ) длиной ≈ 7 см. На расстоянии по 1 см от ее нижнего и левого краев отметьте простым карандашом стартовые точки. Точки должны располагаться на расстоянии 1–1,5 см друг от друга. Точки пронумеруйте. Количество точек соответствует числу

анализируемых аминокислот. В бокс для хроматографирования налейте смесь для элюирования (бутанол–уксусная кислота–вода) так, чтобы высота жидкости была примерно 0,5 см (см. *рисунок 2.5*).

В точки с помощью капилляра поместите растворы аминокислот. Пробы наносите небольшими порциями. Не допускайте сильного растекания пятен! Новую порцию наносите только после высыхания предыдущей. Для ускорения процесса высыхания бумагу (пластинку ТСХ) можно слегка нагреть на плитке или просушить с использованием тепловентилятора.

Бумагу (пластинку) с нанесенными аминокислотами внесите в бокс так, чтобы нижняя часть пластинки с нанесенными аминокислотами оказалась погруженной в систему растворителей. При этом растворитель не должен касаться нанесенных пятен. При использовании хроматографической бумаги подвесьте ее на крючок (см. *рисунок 2.5*). Бокс закройте. Как только фронт растворителя дойдет почти до конца бумаги (пластинки ТСХ), выньте ее из бокса и карандашом отметьте уровень фронта растворителя. Пластинку высушите над электроплиткой, с использованием тепловентилятора или в сушильном шкафу. Как только пластинка высохнет, опустите ее с помощью пинцета в раствор нингирина. Затем хроматограмму снова просушите. При нагревании будет происходить нингидриновая реакция. Места, где находятся аминокислоты на бумаге (пластинке), окрасятся в сине-фиолетовый цвет. Составьте уравнения реакций взаимодействия нингирина с аминокислотами.

Измерьте с помощью линейки (с точностью до 1 мм) расстояние от точки старта до середины окрашенного пятна для каждой аминокислоты. Обозначьте его как $l_{\text{аминокислоты}}$. Измерьте расстояние, пройденное растворителем (расстояние от старта до фронта, отмеченного карандашом). Обозначьте его как $l_{\text{растворителя}}$. Результаты вычислений представьте в виде *таблицы 2.2*. Коэффициенты R_f рассчитайте по следующей формуле:

$$R_f = \frac{l_{\text{аминокислоты}}}{l_{\text{растворителя}}}$$

Таблица 2.2 – Определение R_f аминокислот

Аминокислота	$l_{\text{аминокислоты}}$, мм	$l_{\text{растворителя}}$, мм	R_f

2.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

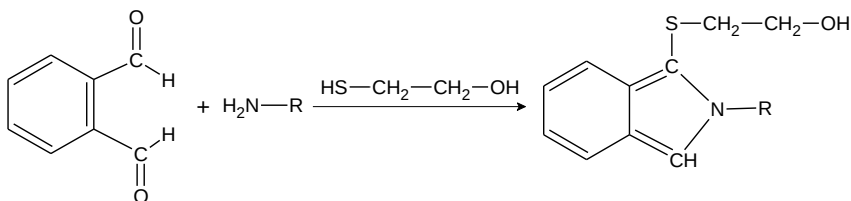
1. Что такое хроматография? Какие виды хроматографии Вам известны?

2. При ТСХ-анализе двух веществ определили, что они поднялись на пластинке от линии старта на 2 см и 4 см, а система растворителей – на 8 см. Определите величины R_f для соединений. Какое из веществ обладает бóльшей хроматографической подвижностью?

3. Какова роль хроматографии при работе аминокислотного анализатора?

4. Напишите уравнение реакции взаимодействия фенилаланина с нингидрином.

5. Для идентификации аминокислот при хроматографическом анализе используют *орто*-фталевый альдегид. Он реагирует с аминокислотами по схеме:



Составьте уравнение реакции аланина с этим реагентом.

3. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

3.1. Цель работы

Изучить химические свойства протеиногенных аминокислот. Провести качественные реакции на аминокислоты и определить рН их растворов.

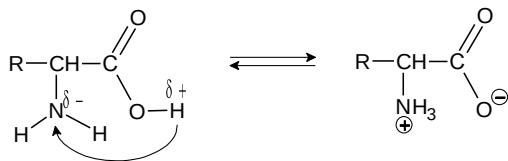
3.2. Краткие теоретические сведения

Аминокислоты – это органические вещества, в молекулах которых наряду с карбоксильной (карбоксильными) группами имеются одна или несколько аминогрупп.

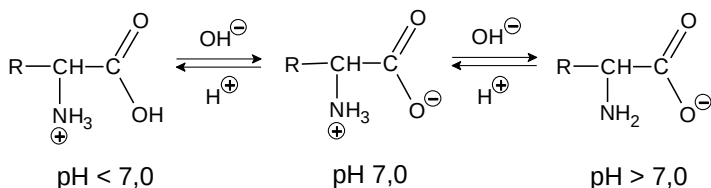
Аминокислоты проявляют химическую двойственность, т.е. они являются амфотерными соединениями, т.к. содержат в своем составе карбоксильные группы, ответственные за кислотные свойства, и аминогруппы, обладающие основными свойствами. Кроме того, ряд аминокислот имеют дополнительные функциональные группы, поэтому их химические свойства еще более разнообразны. Свойства аминокислот можно подразделить на протекающие с участием только amino- и карбоксильной групп, а также с одновременным участием этих функциональных групп.

Свойства аминокислот с одновременным участием карбоксильной и аминогрупп:

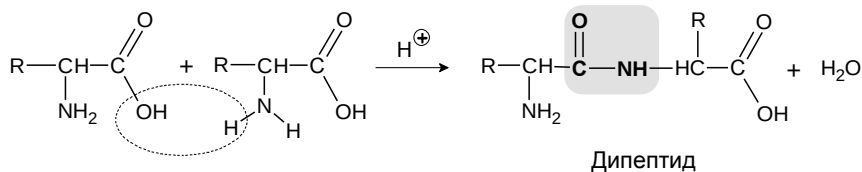
1) *Взаимодействие с образованием внутренних солей (биполярных ионов или цвиттер-ионов).* Этим взаимодействием объясняется факт существования аминокислот в ионной форме. Цвиттер-ион образуется за счет взаимодействия протона карбоксильной группы и атома азота аминогруппы. Ионное строение аминокислот подтверждают их физические свойства.



α -Аминокислоты в нейтральных растворах и в кристаллическом виде существуют преимущественно в виде цвиттер-ионов. По этой причине они имеют высокие температуры плавления. В кислой среде аминокислоты несут положительный заряд на атоме азота, а в щелочной – отрицательный заряд на атоме кислорода:



2) Межмолекулярное взаимодействие с образованием пептидов:



Эта реакция имеет важное значение, т.к. приводит к образованию пептидов и белков.

3) Комплексообразование с катионами металлов. При взаимодействии водных растворов аминокислот со свежеосажденными гидроксидами меди(II), никеля(II) и других металлов образуются комплексные соединения

хелатного типа (*качественная реакция на аминокислоты*). Медный комплекс имеет ярко-синий цвет и характерную форму кристаллов (*рисунок 3.1*).

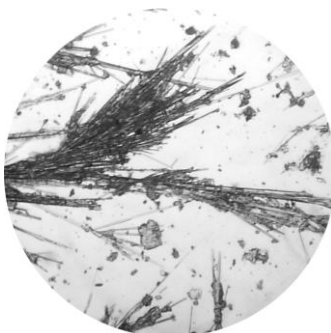
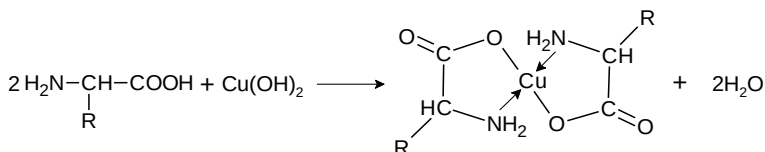
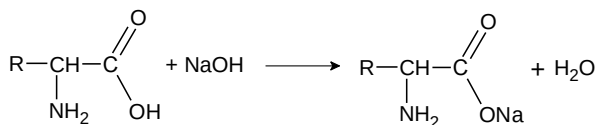


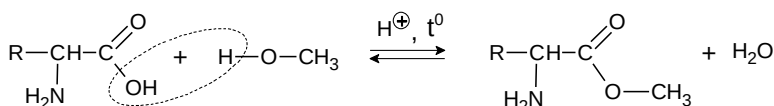
Рисунок 3.1 – Кристаллы медного комплекса глицина при наблюдении под микроскопом

Свойства карбоксильной группы аминокислот:

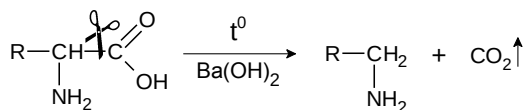
1) Образование солей по группе COOH:



2) Этерификация. Аминокислоты образуют сложные эфиры:

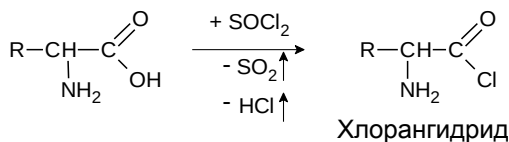
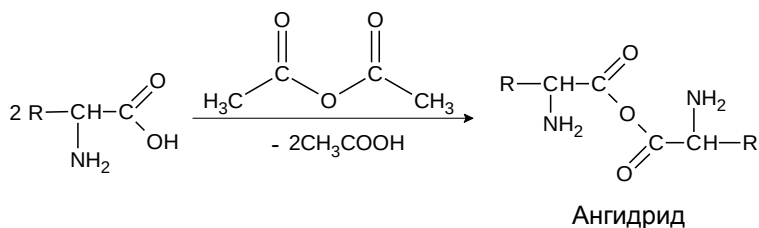


3) *Декарбоксилирование* (отщепление CO_2) при нагревании в щелочной среде. В ходе реакции получается первичный амин:



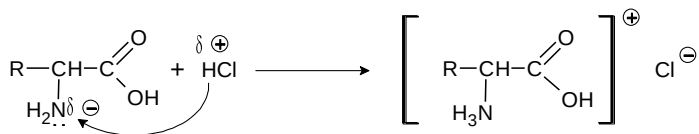
4) *Образование ангидридов и галогенангидридов.*

Аминогруппу при проведении процесса защищают, например, ацетильной группой.

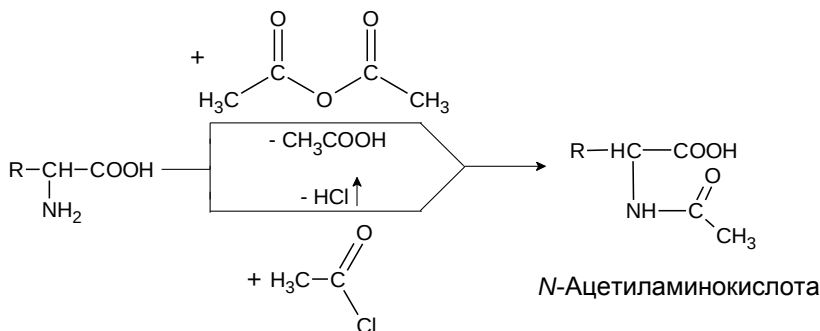


Свойства аминогруппы аминокислот:

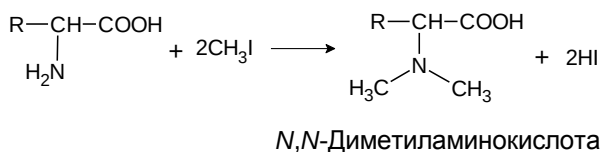
1) *Образование солей при взаимодействии с кислотами:*



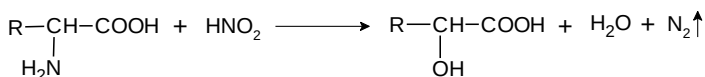
2) *N*-Ацилирование. Аминокислоты (защищенные по карбоксильной группе) можно ацилировать ангидридами и галогенангидридами карбоновых кислот:



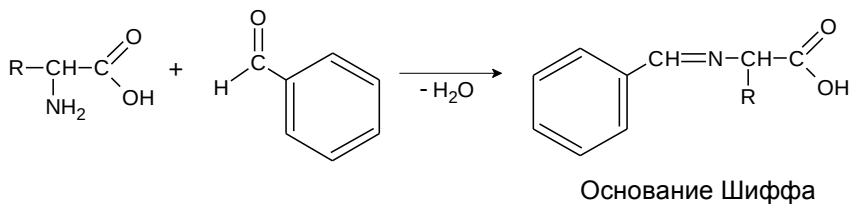
3) *N*-Алкилирование. Реакцию проводят с помощью алкилгалогенидов:



4) *Взаимодействие с азотистой кислотой (дезаминирование in vitro – вне организма).* Эта реакция сопровождается удалением аминогруппы и образованием оксикислоты. Такой процесс называют *дезаминированием*:



5) *Взаимодействие с альдегидами.* В реакцию вступает amino- и альдегидная группы. Процесс сопровождается образованием *оснований Шиффа (иминов)*:

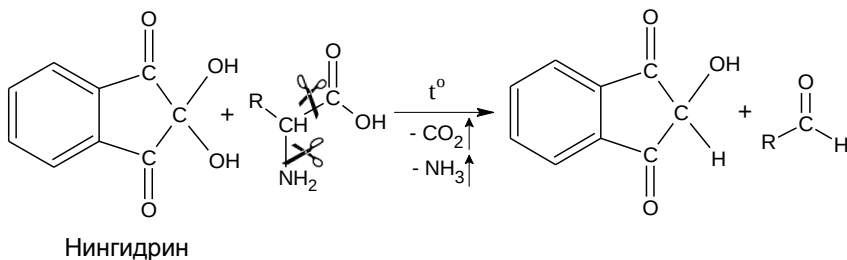


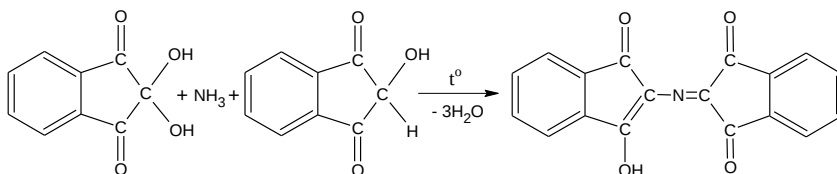
Качественные реакции на аминокислоты:

1) Реакция с нингидрином (реакция Руэмана).

Нингидрин при нагревании с аминокислотами образует *пурпур Руэмана* – вещество сине-фиолетового цвета. Аминокислоты пролин и гидроксипролин, у которых отсутствуют группа $-\text{NH}_2$, образуют с нингидрином продукты желтого цвета. Нингидриновая реакция очень чувствительная. Ее широко используют для обнаружения аминокислот.

Нингидриновая реакция протекает в две стадии. Сначала образуется восстановленный нингидрин и аммиак, которые затем конденсируются с новой молекулой нингидрина. Нингидриновую реакцию дают и соединения других классов, также содержащие аминогруппу, например, аммиак, белки и пептиды.





Пурпур Руэмана

2) *Взаимодействие со свежеосажденным гидроксидом меди(II) или никеля(II).* При взаимодействии с $\text{Cu}(\text{OH})_2$ образуется комплексное соединение ярко-синего цвета (с. 22–23). С $\text{Ni}(\text{OH})_2$ аминокислоты дают синюю окраску. Полученные комплексы имеют характерную форму кристаллов.

Изоэлектрическая точка аминокислот. Величина pH , при которой суммарный заряд молекулы равен нулю, называют *изоэлектрической точкой* pI (*ИЭТ*). В общем случае для предварительной оценки величины изоэлектрической точки используем следующие соотношения количества амино- и карбоксильных групп аминокислоты:

$$n(\text{NH}_2\text{-групп}) = n(\text{COOH-групп}) \Rightarrow \text{pI} \approx 7$$

$$n(\text{NH}_2\text{-групп}) > n(\text{COOH-групп}) \Rightarrow \text{pI} > 7$$

$$n(\text{NH}_2\text{-групп}) < n(\text{COOH-групп}) \Rightarrow \text{pI} < 7$$

Глицин, например, является моноаминомонокарбоновой кислотой (одна NH_2 - и COOH -группа), поэтому его $\text{pI} \approx 7$.

Для моноаминомонокарбоновых кислот (если отсутствуют другие функциональные группы кислотно-основного характера) величину pI можно рассчитать по формуле:

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_{\text{A}}^{\text{COOH}} + \text{pK}_{\text{A}}^{\text{NH}_3^+}}{2}.$$

В изоэлектрической точке аминокислоты не перемещаются в электрическом поле. В таком состоянии их растворимость минимальная.

3.3. Реактивы и оборудование

Пробирки, 1 М или 2 М раствор NaOH, 10 % растворы аминокислот, пробиркодержатель, стакан, 10 % растворы CuSO₄, NiCl₂ (NiSO₄), 5 % раствор NaNO₂, 0,1 % раствор нингидрина в воде, ледяная уксусная кислота, 10 % раствор формальдегида, 0,2 % раствор метилового красного в воде, часовое или предметное стекло, пипетка, микроскоп, универсальная индикаторная бумага, горячая вода (60–70 °C), термометр.

3.4. Ход работы

Опыт 1. *Получение комплекса аминокислот с медью(II) и никелем(II).* В пробирку с 1–2 мл раствора глицина (или другой аминокислоты) добавьте столько же раствора щелочи и 1–2 капли раствора CuSO₄. Пробирку взболтайте. Что Вы наблюдаете? В другой пробирке проведите аналогичный опыт, используя соль никеля. Напишите уравнения реакций. Полученные медный и никелевый комплексы вылейте на часовые или предметные стекла и оставьте высыхать. Рассмотрите образовавшиеся кристаллы под микроскопом и зарисуйте их.

Опыт 2. *Определение pH растворов аминокислот.* Поместите на индикаторную бумагу по капле выданных растворов аминокислот. По ее цвету определите pH растворов. Дайте объяснения полученным результатам и сравните их с величинами pI, приводимыми в справочной литературе (таблица А.5 приложения). Результаты опыта представьте в виде таблицы 3.1.

Таблица 3.1 – Определение pH растворов аминокислот

Аминокислота	pH (по индикаторной бумаге)	pI (справочные данные)

Опыт 3. *Дезаминирование аминокислот in vitro.* В пробирку налейте 1–2 мл раствора аминокислоты и добавьте столько же раствора нитрита натрия NaNO_2 . Содержимое пробирки перемешайте. К полученной смеси прилейте несколько капель ледяной уксусной кислоты и взболтайте содержимое. Соблюдайте осторожность! Опыт проводите под тягой! Что при этом происходит? Напишите уравнения реакций получения азотистой кислоты *in situ* из нитрита натрия и уксусной кислоты и процесса дезаминирования. Назовите продукты реакции дезаминирования.

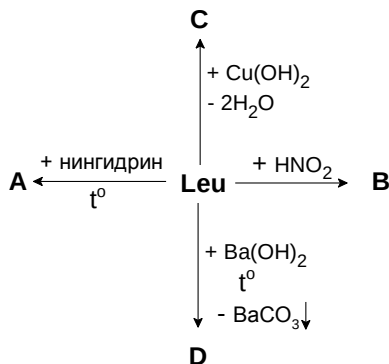
Опыт 4. *Нингидриновая реакция (реакция Руэмана).* В пробирку налейте по 1–2 мл растворов глицина и нингидрина. Смесь перемешайте и поставьте в стакан с горячей водой (60–70 °С). Опишите свои наблюдения. Приведите уравнение нингидриновой реакции.

3.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

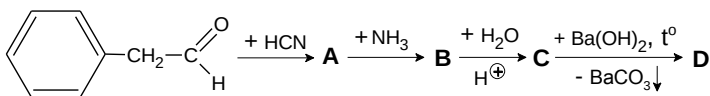
1. Напишите уравнения реакций:

- а) взаимодействия аланина с гидроксидом калия (с образованием соли);
- б) взаимодействия валина со свежееосажденным $\text{Cu}(\text{OH})_2$ с образованием комплексного соединения;
- в) взаимодействия лейцина с этиловым спиртом (этерификация).

2. Напишите уравнения реакций к следующей схеме превращений:



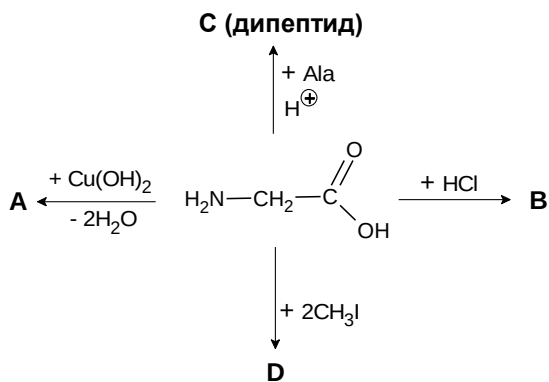
3. В схеме превращений, приведенной ниже, расшифруйте вещества **A–D**. Напишите уравнения соответствующих реакций.



4. Напишите уравнения реакций:

- а) декарбоксилирования лизина в щелочной среде;
- б) взаимодействия валина с формальдегидом;
- в) неокислительного дезаминирования аспарагиновой кислоты с образованием непредельной кислоты;
- г) переаминирования (трансаминирования) фенилаланина при его взаимодействии с пировиноградной кислотой.

5. Напишите уравнения реакций к следующей схеме превращений:



4. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

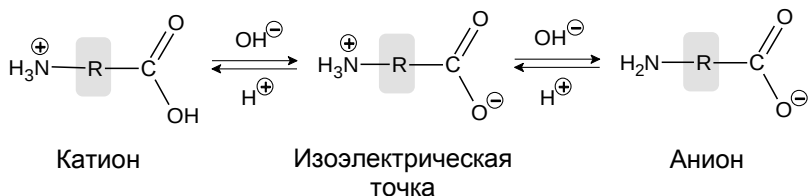
4.1. Цель работы

Приготовить раствор яичного альбумина и определить величину его изоэлектрической точки разными методами.

4.2. Краткие теоретические сведения

4.2.1. Изоэлектрическая точка белков. Величина pH, при которой суммарный заряд белковой молекулы равен нулю, называют *изоэлектрической точкой* pI (*ИЭТ*) белка. В этом случае концентрация положительно и отрицательно заряженных ионов одинакова. В состоянии изоэлектрической точки молекулы белков не перемещаются в электрическом поле и характеризуются минимальной растворимостью в воде. Вязкостью растворов белков в этом случае также минимальна. Из-за потери заряда молекулами белков их водные растворы отличаются неустойчивостью, т.к. стабилизируются только за счет гидратации.

Белки – типичные амфолиты, они могут диссоциировать и как кислоты, и как основания. При добавлении кислоты белок заряжается положительно, а основания – отрицательно. Схематично этот процесс можно изобразить следующим образом:



Отклонение рН от изоэлектрической точки приводит к изменению конформаций молекул белков, т.к. при этом происходит электростатическое отталкивание одноименно заряженных ионов.

Величины изоэлектрических точек для некоторых белков приведены в *таблице А.4* приложения. Для большинства белков рI находятся в интервале 4,5–6,0, т.е. лежат в слабо кислой области.

4.2.2. Альбумины. Альбумины (от лат. *albuminis* – белок) представляют собой простые глобулярные белки с небольшой молекулярной массой. Входят в состав цитоплазмы животных и растительных клеток, сыворотки крови и молока. Альбумины содержат много лейцина. Они хорошо растворимы в воде. Из растворов их обычно высаливают сульфатом аммония. Для получения в промышленных масштабах альбумины осаждают холодными растворами этилового спирта.

Яичный (овальбумин) и молочный (лактоальбумин) альбумины используют в пищевой промышленности. *Сывороточный альбумин* применяют в качестве кровезаменителя и в составе питательных сред.

4.3. Реактивы и оборудование

Яичный белок, 0,01 и 0,0001 М растворы HCl, 0,2 М раствор CH_3COOH , 0,2 М раствор CH_3COONa , дистиллированная вода, 0,01 М и 0,0001 М растворы NaOH, колба на 200–250 мл с пробкой, марля (бинт), воронка, горячая вода (60–70 °С), большой стакан, мерный цилиндр на 10 мл, стеклограф, термометр, вискозиметр, 6 пробирок, 6 стаканов.

4.4. Ход работы

Приготовление раствора яичного альбумина. Белок куриного яйца осторожно отделите от желтка и поместите в колбу, в которую добавьте 100–150 мл дистиллированной воды. Колбу закройте пробкой и встряхивайте в течение 5

мин. Полученную смесь профильтруйте, используя в качестве фильтра двойной слой марли или бинта. В фильтрате получится раствор яичного альбумина, а на фильтре остается яичный глобулин.

Приготовление смеси растворов CH_3COOH и CH_3COONa . Смешайте 4,1 мл 0,2 М раствора CH_3COOH и 5,9 мл 0,2 М раствора CH_3COONa .

Таблица 4.1 – Определение изоэлектрической точки яичного альбумина

Раствор	рН раствора	Степень мутности	Среднее время истечения, с
1 (0,01 М раствор HCl)			
2 (0,0001 М раствор HCl)			
3 (смесь растворов CH_3COOH и CH_3COONa)			
4 (дистиллированная вода)			
5 (0,01 М раствор NaOH)			
6 (0,0001 М раствор NaOH)			

Опыт 1. *Определение изоэлектрической точки по степени мутности.* Налейте в 6 пробирок (пробирки подпишите стеклоглафом) по 2 мл растворов **1–6** (см. таблицу 4.1) с разным значением рН и добавьте в каждый из растворов по 2 мл раствора яичного альбумина. Содержимое пробирок перемешайте и поместите пробирки в стакан с горячей водой (60–70 °С). Изоэлектрическую точку альбумина определите визуально по максимальному помутнению раствора с определенным значением рН. рН этого раствора будет соответствовать изоэлектрической точке pI . Сравните pI для яичного альбумина, определенную экспериментально, со справочными данными (таблица А.4 приложения). Результаты исследования представьте в виде таблицы 4.1. В колонке «Степень мутности» мутность

раствора условно оцените количеством знаков «+», например, «++++». Расчетные формулы для вычисления рН приведены в *таблице А.6* приложения.

4.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

1. На основе строения аминокислот аланина, фенилаланина и валина предскажите, какой изоэлектрической точкой они будут обладать ($pI=7,0$, $pI>7,0$ или $pI<7,0$). Рассчитайте для них величины изоэлектрических точек (см. *таблицу А.5* приложения).

2. Определите, какой из глобулинов крови (α -, β - или γ ; pI соответственно равны 4,8, 5,2 и 6,4) будет более эффективно связывать соли меди(II)? Почему? Напишите схему взаимодействия белка с солями меди(II).

3. При отравлении солями ртути(II) человеку дают выпить яичный белок. Чем это можно объяснить? Какой белок будет более эффективен в этом случае – яичный альбумин (pI 4,8) или казеин молока (pI 4,6)? Напишите схему взаимодействия белка с солями ртути(II).

4. Зависимость вязкости раствора желатина от величины рН приведена на *рисунке 4.2*. Объясните появление на графике минимума.

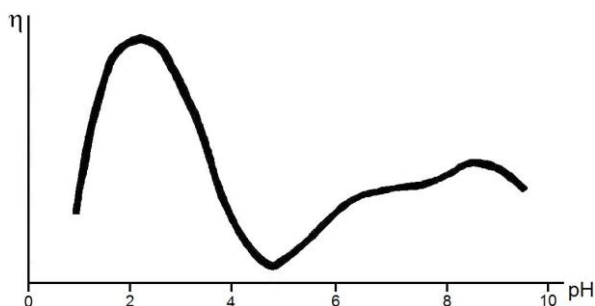


Рисунок 4.2 – Зависимость вязкости раствора желатина от величины рН

5. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА СВОЙСТВА БЕЛКОВ

5.1. Цель работы

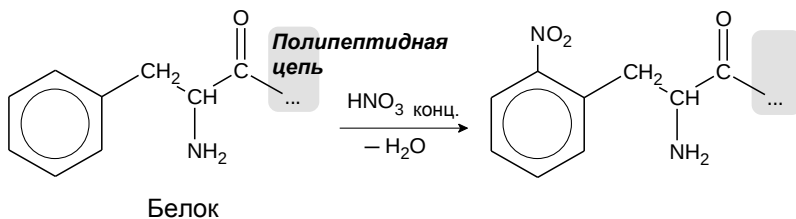
Познакомиться с основными химическими свойствами белков (денатурацией и цветными реакциями – биуретовой, ксантопротеиновой, нингидриновой, сульфгидрильной и Адамкевича).

5.2. Краткие теоретические сведения

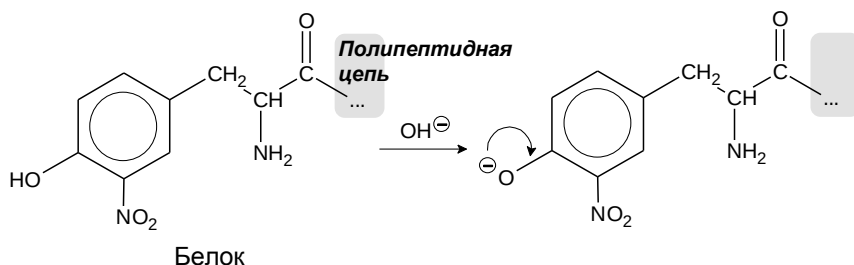
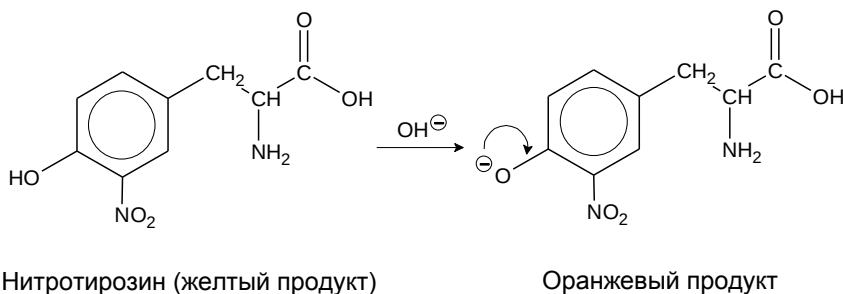
Химические свойства белков. 1) Денатурация и ренатурация. Высшие структуры белка (вторичная, третичная и четвертичная) легко разрушаются в присутствии солей, кислот, щелочей, растворителей, при нагревании, освещении, радиоактивном облучении и даже механическом воздействии (встряхивании, ударе). Этот процесс называется *денатурацией*. Некоторые белки способны восстанавливать свою структуру после исключения внешнего воздействия. Это процесс *ренатурации*.

2) Гидролиз белков в присутствии кислот, щелочей или ферментов. При этом образуются свободные аминокислоты. При частичном гидролизе можно получить смесь аминокислот и пептидов. При гидролизе белковых комплексов наряду с аминокислотами и пептидами могут образоваться и другие продукты.

3) Качественные реакции на белки (цветные реакции). *Биуретовая реакция* – образование фиолетового окрашивания при взаимодействии со свежесосажденным гидроксидом меди(II) (дают все белки; за реакцию ответственна амидная связь).

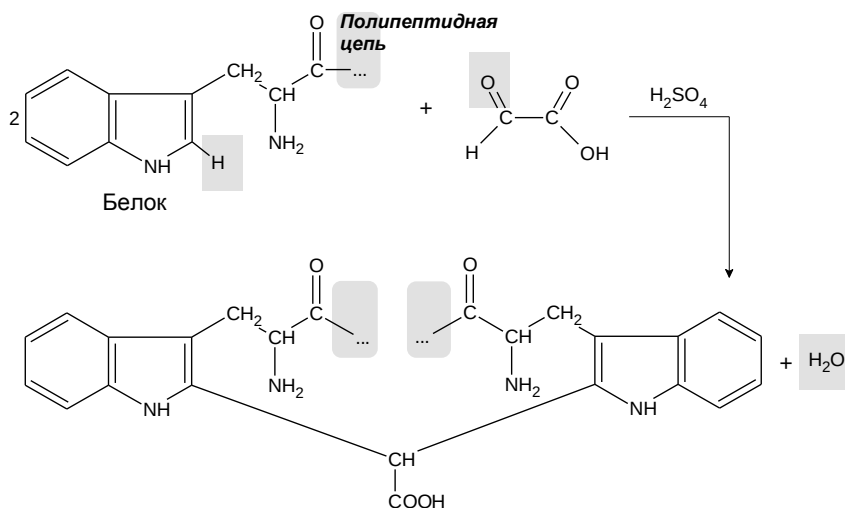
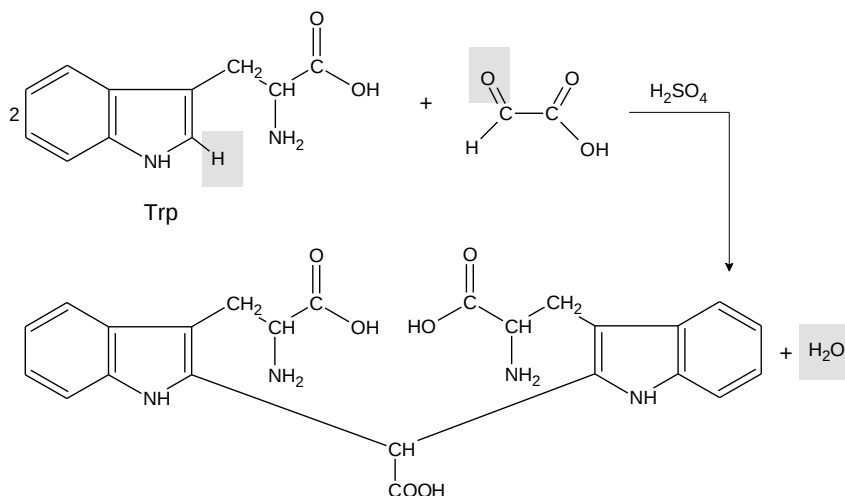


В щелочной среде остатки аминокислоты тирозина и сам тирозин, подвергнутые нитрованию, образуют соли типа фенолятов. Электронная плотность фенолят-иона вступает в сопряжение с ароматической системой, что и вызывает изменение цвета с желтого на оранжевый:

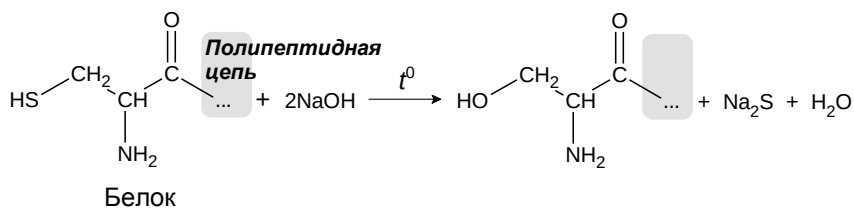
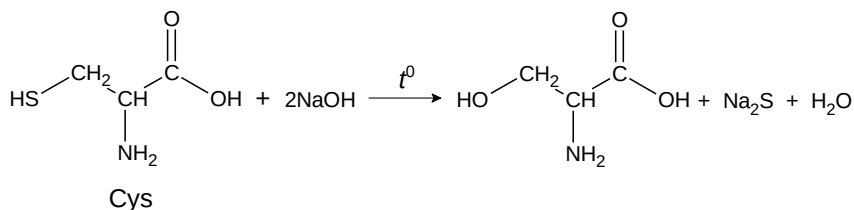


Реакция Адамкевича на триптофан. Реакция основана на образовании окрашенных продуктов конденсации триптофана с альдегидами в кислой среде. Белок, содержащий остаток триптофана, с глиоксиловой кислотой в

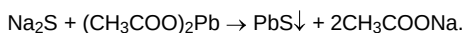
присутствие концентрированной серной кислоты дает красно-фиолетовое окрашивание. Обычно для реакции используют ледяную уксусную кислоту, которая всегда содержит примесь глиоксиловой кислоты.



Сульфгидрильная реакция (реакция Фолья) – реакция белков с солями свинца(II) в присутствии щелочи и при нагревании, сопровождающаяся выпадением черного осадка PbS. Такую реакцию дают белки с остатками серусодержащих аминокислот (цистеина, цистина и метионина), а также и сами свободные серусодержащие аминокислоты. При нагревании белка со щелочью сера отщепляется в виде сульфида, т.е. происходит обессеривание аминокислоты (при этом происходит и гидролиз пептидных связей):

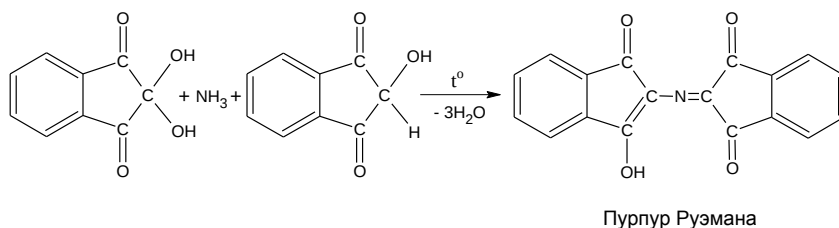
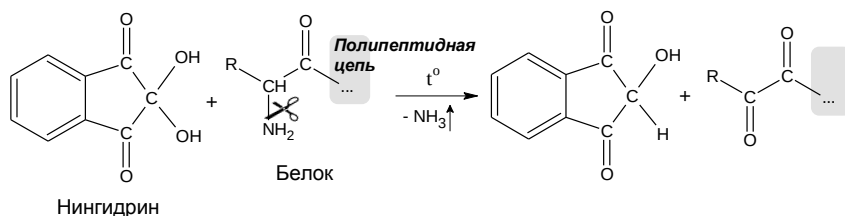


Образовавшийся сульфид образует с солью свинца(II) сульфид свинца(II):



Реакция с нингидрином (реакция Руэмана). Нингидрин при нагревании с пептидами и белками, как и с аминокислотами, образует *пурпур Руэмана* – вещество сине-фиолетового цвета. Реакция нингидрина с белками, в отличие от реакции с аминокислотами, не сопровождается выделением углекислого газа. Реакция не является высоко

специфичной, т.к. ее дают прочие соединения со свободной аминогруппой, а также аммиак.



5.3. Реактивы и оборудование

Раствор яичного альбумина, пробирки, пробиркодержатель, спиртовка, 10 % растворы CuSO_4 и ацетата (или нитрата) свинца(II), 1 М или 2 М раствор NaOH , концентрированные растворы HNO_3 , H_2SO_4 и аммиака, ледяная уксусная кислота, пипетка, стакан, электроплитка.

5.4. Ход работы

Опыт 1. Ксантопротеиновая реакция. В пробирку поместите 1–2 мл раствора яичного альбумина и добавьте 1–2 капли концентрированной азотной кислоты. Соблюдайте осторожность! Если изменений нет, то пробирку осторожно нагрейте. Объясните происходящее. К полученной смеси добавьте несколько капель щелочи или раствора аммиака до

щелочной реакции среды. Что при этом наблюдается? Напишите уравнение ксантопротеиновой реакции.

Опыт 2. *Биуретовая реакция.* В пробирку налейте 1–2 мл раствора белка и столько же раствора щелочи. К полученной смеси прилейте несколько капель раствора CuSO_4 . Пробирку взболтайте. Что Вы наблюдаете? Напишите схему реакции.

Опыт 3. *Сульфгидрильная реакция (реакция Фоля).* В пробирку поместите 1–2 мл раствора белка и столько же раствора щелочи. Прокипятите смесь на водяной бане в течение 1–2 мин. Пробирку охладите и добавьте в нее 1–2 мл раствора ацетата или нитрата свинца(II). Что происходит? Напишите уравнения реакций.

Опыт 4. *Денатурация белка.* В пробирку с 1–2 мл раствора белка добавьте 1–2 мл раствора нитрата или ацетата свинца(II). Что происходит? Дайте необходимые объяснения.

Опыт 5. *Реакция Адамкевича на триптофан.* В пробирку налейте 1–2 мл раствора белка и 1–2 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь осторожно перемешайте. Наклонив пробирку, по ее стенке прилейте 1 мл концентрированной серной кислоты. Соблюдайте осторожность! На образовавшейся границе жидкостей должно появиться красно-фиолетовое кольцо.

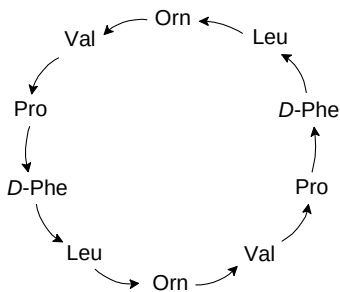
5.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

1. Рассчитайте, сколько пептидов может быть получено:

- а) из девяти разных аминокислот;
- б) из восьми аминокислот, две из которых одинаковые;
- в) из десяти аминокислот, две из которых одинаковые.

2. Будет ли грамицидин S давать положительную ксантопротеиновую реакцию (стрелки в формуле направлены к аминокислотам, аминогруппы которых участвуют в построении пептидных связей)? Свой ответ обоснуйте.

Напишите уравнение ксантопротеиновой реакции с необходимой аминокислотой.



Грамицидин S

3. Какие из пептидов, приведенных ниже, будут давать положительную реакцию Фоля (сульфгидрильную реакцию)? Свой ответ обоснуйте. Приведите уравнение реакции Фоля, написав его с необходимой аминокислотой.

- а) $\text{NH}_2\text{-Ala-Cys-Phe-Cys-COOH}$; б) $\text{NH}_2\text{-Gly-Val-Gly-Ser-Ala-COOH}$;
в) $\text{NH}_2\text{-Ser-Ala-Met-Pro-COOH}$; г) $\text{NH}_2\text{-Gly-Cys-Cys-Ala-Ala-COOH}$.

4. Назовите следующие пептиды:

- а) $\text{NH}_2\text{-Gly-Glu-Gln-Ala-COOH}$; б) $\text{NH}_2\text{-Val-Phe-Thr-Ser-COOH}$;
в) $\text{NH}_2\text{-Asp-Met-Ile-Leu-COOH}$; г) $\text{NH}_2\text{-Cys-Cys-Met-Asp-COOH}$.

5. Все ли белки дают: а) биуретовую реакцию; б) ксантопротеиновую реакцию; в) сульфгидрильную реакцию (реакцию Фоля)? Объясните свой ответ.

6. Какие трипептиды можно получить из смеси аминокислот Gly, Ala и Val? Напишите схемы реакций их получения (аминокислоты изобразите трехбуквенно; в трипептидах укажите N- и C-концы).

6. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

6.1. Цель работы

Приготовить раствор амилазы слюны человека и осуществить гидролиз крахмала с ее участием.

6.2. Краткие теоретические сведения

6.2.1. Ферменты. Известно, что катализаторы увеличивают скорость химической реакции. Биологические катализаторы – ферменты – способны сделать это в 10^8 – 10^{12} раз. *Ферменты* (от лат. *fermentum* – закваска) – это белки, белковые комплексы или молекулы РНК, проявляющие каталитическую активность. Ферменты также называют *энзимами* (от греч. *en* – в, внутри и *zymē* – закваска). Небелковые ферменты, состоящие из РНК, называют *рибозимами* (*рибонуклеиновыми энзимами*). Ферменты изучает наука *энзимология*.

По сравнению с обычными катализаторами, ферменты отличаются большей селективностью и чувствительностью. Ферменты – это высоко специфичные катализаторы. Имеются ферменты с абсолютной специфичностью (реагируют только с определенным субстратом, например, уреазы), чувствительные только к определенной химической связи, действующие на родственные вещества, а также проявляющие стереоспецифичность. Ферменты активны в достаточно мягких условиях. Это, к сожалению, является и их недостатком.

Каталитическая активность ферментов проявляется в способности понижать энергию активации биохимического процесса (*рисунок 6.1*). В результате этого скорость реакции существенно возрастает.

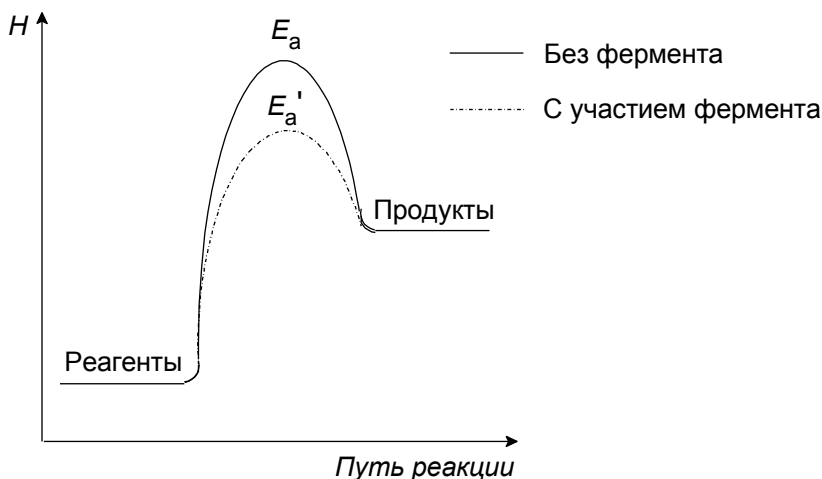


Рисунок 6.1 – Энергетические профили ферментативной реакции и реакции без участия фермента

Белковые ферменты подразделяются на *простые* (однокомпонентные) и *сложные* (двухкомпонентные). Простые ферменты (например, уреаза, пепсин, трипсин, химотрипсин, папаин) представляют собой только белки, а сложные – состоят из белковой (*апофермент* или *апоэнзим*) и небелковой составляющей – *кофактора*. Кофакторы – это низкомолекулярные вещества, способствующие действию ферментов или необходимые для осуществления ими каталитической активности. Кофакторы подразделяются на *коферменты* (коэнзимы) и *простетические группы*. Коферменты образуют с апоферментом непрочный, легко распадающийся комплекс. Простетические группы, наоборот, дают прочный комплекс с белковой составляющей. Коферменты являются переносчиками электронов, ионов H^+ или определенных функциональных групп. Одно и то же вещество в разных ферментах может быть как коферментом, так и простетической группой.

К простетическим группам относят катионы металлов (чаще всего железа, меди, цинка и молибдена) и органические вещества, например, витамины. Коферментами могут быть катионы металлов, витамины, АТФ и прочие вещества.

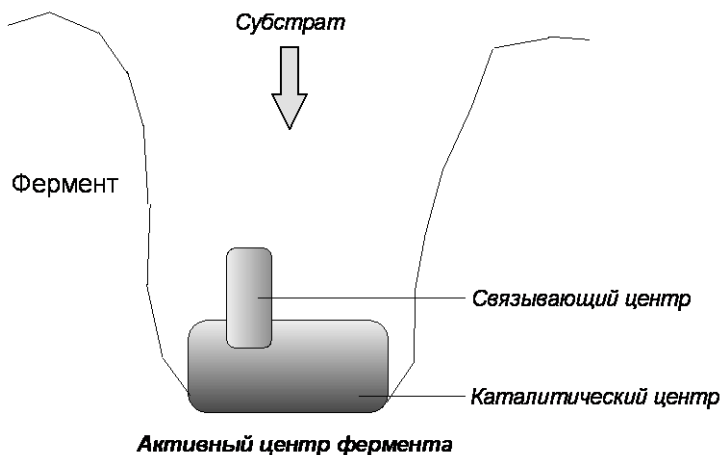
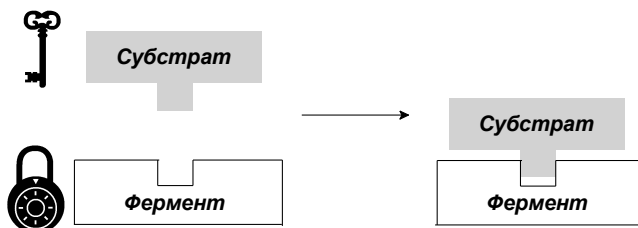


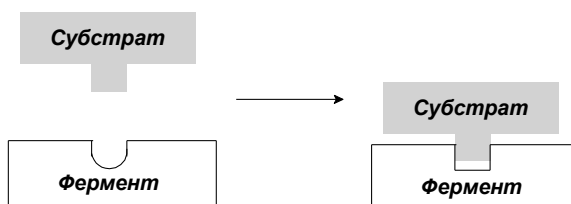
Рисунок 6.2 – Активный центр фермента

В структуре ферментов выделяют *активный центр*, который у белковых молекул состоит из определенных аминокислот, обладающих сродством к субстрату. У фермента может быть несколько активных центров. В активном центре фермента субстрат превращается в продукт реакции. Активный центр представляет собой объемную (трехмерную) составляющую, которая имеет форму впадины (щели) на поверхности белковой глобулы (рисунок 6.2). Активными группами ферментов являются группы $-SH$, $-OH$, $-COOH$, $-Phe-OH$, никотинамидное кольцо, имидазольное кольцо, катионы металлов и др. В активном центре выделяют определенные участки (центры, сайты) – *каталитический* и *связывающий*. Схематическое строение активного центра ферментов приведено на рисунке 4.2. На каталитическом

участке происходит собственно сам катализ. Субстрат удерживается в активном центре на связывающем сайте за счет водородных связей, электростатических, гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.



Модель "ключ-замок"



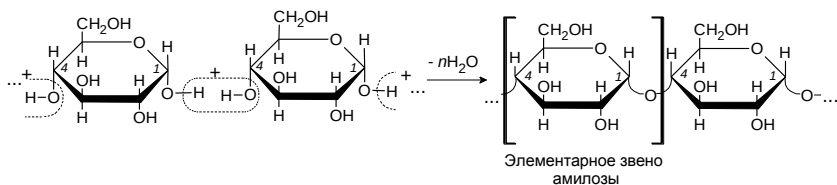
Модель индуцированного (вынужденного) соответствия

Рисунок 6.3 – Модели активности ферментов

Если активный центр полностью комплементарен субстрату, то говорят о взаимодействии типа «ключ–замок» (рисунок 6.3). Активный центр фермента может незначительно менять свою конформацию – «подстраиваться» под структуру субстрата. Такая модель каталитической активности получила название *модели индуцированного (вынужденного) соответствия* (рисунок 4.3).

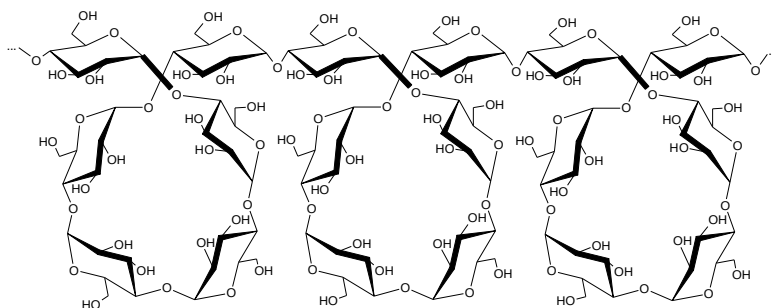
Существуют вещества, способные усиливать действие ферментов или переводить их в активное состояние. Это *активаторы*. Активаторами могут быть соли, кислоты и органические вещества. Активность ферментов может быть уменьшена за счет *обратимых* и *необратимых ингибиторов* (*инактиваторов*). Необратимые ингибиторы ковалентно связываются с ферментом, поэтому после их удаления из реакционной среды фермент остается инактивированным. Обратимые ингибиторы не образуют прочных связей с ферментом. После их удаления активность фермента может быть восстановлена. Ингибиторами являются катионы тяжелых металлов, синильная кислота, ряд органических соединений. Некоторые вещества для одних ферментов выступают активаторами, а для других – ингибиторами.

6.2.2. Крахмал. Крахмал представляет собой природный полимер. Причем крахмал не индивидуальное вещество, а смесь двух полимеров состава $(C_6H_{10}O_5)_n$ – *амилозы* (10–20 %) и *амилопектина* (80–90 %), состоящих из остатков α -D-глюкозы. Для амилозы $n = 200$ –1000, а для амилопектина – 6000–40000. Таким образом, молярная масса амилопектина может достигать 10^6 г/моль и даже больших значений (10^6 – 10^9 г/моль). Амилоза и амилопектин относятся к гомополисахаридам. Амилоза имеет линейное строение, а амилопектин – разветвленное. Особенности пространственного строения амилозы связаны с конфигурацией гликозидной связи. При образовании молекулы амилозы остатки глюкозы связываются между собой аксиальными $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидными связями.

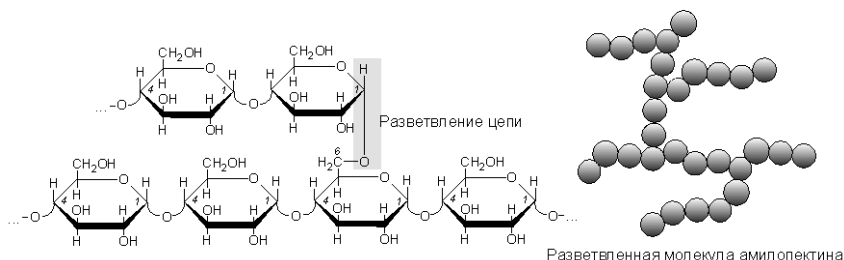




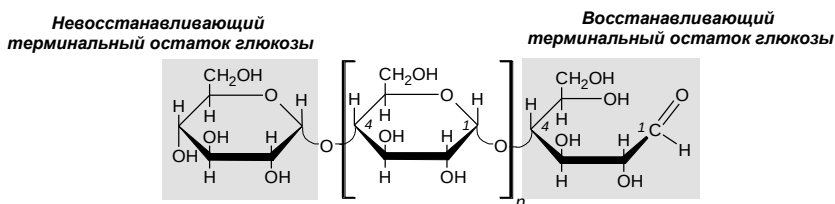
Полимерная цепь амилопектина также образована $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Разветвление цепи происходит за счет $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидных связей и наблюдается через 20–25 остатков *D*-глюкозы. В результате молекула амилозы образует спираль, на каждый виток которой приходится 6 остатков глюкозы:



Макромолекула амилопектина шарообразна. Имеются данные о незначительном (до 1 %) присутствии в структуре амилопектина также гликозидных связей $\alpha(1\rightarrow3)$.

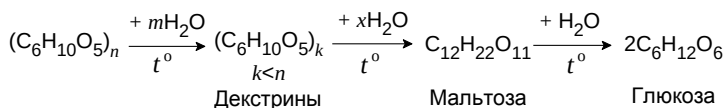


Один из терминальных (концевых) остатков глюкозы в полимерной цепи является невосстанавливающим, а другой обладает восстановительной активностью из-за *цикло-оксо-таутомерии*. Однако из-за крайне низкой доли восстанавливающих терминальных остатков глюкозы в крахмале, он не проявляет внешних признаков реакций, характерных для альдегидной формы глюкозы.



В целом крахмал – это белое твердое вещество без запаха и вкуса, малорастворимое в холодной воде, набухающее в горячей с образованием клейстера. При растирании крахмала слышится характерный скрип. Однако растворимость в воде компонентов крахмала неодинакова. Амилоза хорошо растворяется в теплой воде, а амилопектин – плохо. Он образует коллоидные растворы. На различной растворимости в воде основан метод разделения компонентов крахмала.

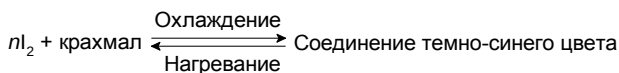
Крахмал подвергается кислотному гидролизу, который протекает ступенчато и беспорядочно. При расщеплении он сначала превращается в полимеры с меньшей степенью полимеризации – *декстрины*, потом в дисахарид мальтозу, и в итоге – в глюкозу. Таким образом, получается целый набор сахаридов.



Крахмал гидролизует ферментом α -амилазой (содержится в слюне и выделяется поджелудочной железой), расщепляющей беспорядочно $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи. β -Амилаза (присутствует в солоде) действует на $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи, начиная с невосстанавливающего терминального остатка глюкозы, и последовательно отщепляет от полимерной цепи молекулы дисахарида мальтозы. Глюкоамилаза (содержится в плесневых грибах), подобно двум другим амилазам, гидролизует $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи, последовательно отщепляя остатки D-глюкозы, начиная от невосстанавливающего конца. Селективное расщепление $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидных связей амилопектина происходит α -1,6-глюкозидазами, например, изоамилазой или пуллулазой.

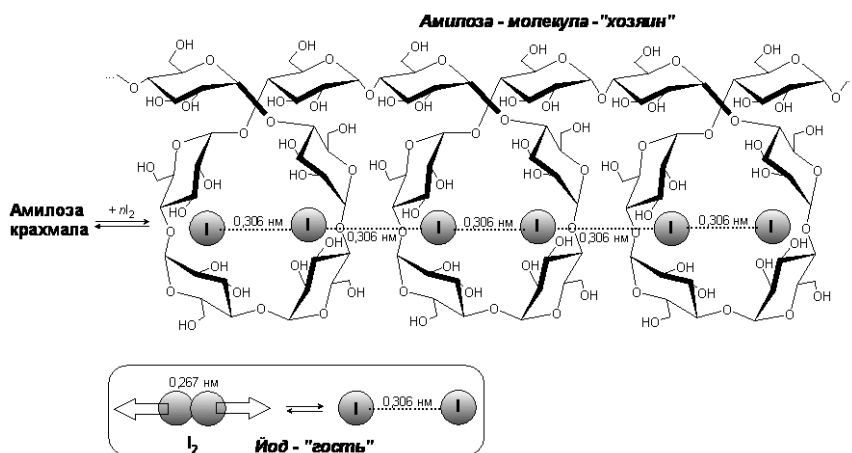
Амилаза, выделенная из *Bacillus macerans*, способна превращать крахмал в циклические продукты (*циклодекстрины*, *декстрины Шардингера*), в которых степень полимеризации равна 6–8, а остатки глюкоз связываются $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями.

Являясь многоатомным спиртом, крахмал образует простые и сложные эфиры. Характерной качественной реакцией на крахмал является его реакция с йодом (*йодкрахмальная реакция*):



При взаимодействии йода с крахмалом образуется соединение включения (клатрат) канального типа. Клатрат – это комплексное соединение, в котором частицы одного вещества («молекулы-гости») внедряются в кристаллическую структуру «молекул-хозяев». В роли «молекул-хозяев» выступают молекулы амилозы, а «гостями» являются молекулы йода. Молекулы йода располагаются в канале

спирали диаметром ~ 1 нм, создаваемой молекулой амилозы, в виде цепей $\cdots\text{I}\cdots\text{I}\cdots\text{I}\cdots\text{I}\cdots$. Попадая в спираль, молекулы йода испытывают сильное влияние со стороны своего окружения (ОН-групп), в результате чего увеличивается длина связи I–I до 0,306 нм (в молекуле йода длина связи 0,267 нм), причем эта длина одинакова для всех атомов йода в цепи. Этот процесс сопровождается изменением бурой окраски йода на сине-фиолетовую ($\lambda_{\text{макс}}$ 620–680 нм). Амилопектин, в отличие от амилозы, дает с йодом красно-фиолетовое окрашивание ($\lambda_{\text{макс}}$ 520–555 нм).



Декстрины, образующиеся при термической обработке крахмала, кислотном или ферментативном гидролизе, также реагируют с йодом, однако цвет комплекса сильно зависит от молярной массы полимера (см. таблицу 6.1). По мере уменьшения полимерной цепи растет доля восстанавливающих терминальных остатков глюкозы, поэтому низкомолекулярные декстрины начинают проявлять внешние признаки реакций альдегидной формы глюкозы.

Таблица 6.1 – Цветные реакции декстринов с йодом

Декстрин ($C_6H_{10}O_5$) _k	Степень полимеризации <i>k</i>	Окраска комплекса с йодом
Амилдекстрины	>30	Синяя или фиолетовая
Эритродекстрины	25–29	Красная
Охродекстрины	21–24	Желто-коричневая
Мальтодекстрины	<20	Отсутствие реакции

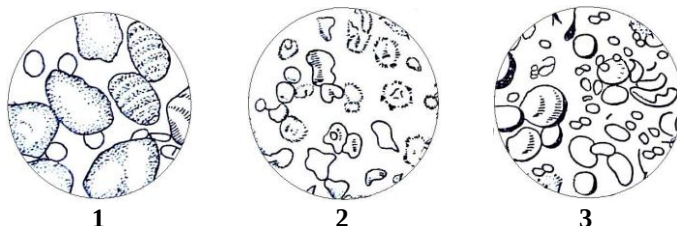


Рисунок 6.4 – Зерна крахмала из разных природных источников под микроскопом (1 – из картофеля, 2 – из кукурузы, 3 – из пшеницы)

Крахмал широко распространен в растениях и является для них резервным источником энергии. В основном он содержится в клубнях, семенах и корнях в виде зерен. В зависимости от растения зерна (см. *рисунок 6.4*) отличаются по форме и размеру (в среднем 0,002–0,15 мм). Самыми крупными являются зерна картофельного крахмала. В зерновых содержание крахмала достигает ~70 % (в зернах риса до 80 %), в картофеле ~20 %. Основными сырьевыми источниками получения крахмала являются картофель и кукуруза.

Крахмал используют как пищевой продукт, компонент лекарственных средств и для накрахмаливания белья. Его применяют для получения патоки, глюкозы и этилового спирта, а также в аналитической химии для обнаружения йода.

6.3. Реактивы и оборудование

Крахмальный клейстер (в стакан наливают 30–50 мл воды и добавляют 1 г крахмала; смесь нагревают до кипения при постоянном перемешивании; полученный клейстер охлаждают и фильтруют), большой стакан, бинт (марля), пробирки, стеклоглаф, мерный цилиндр на 10 мл, стеклянная палочка, термометр.

6.4. Ход работы

Тщательно прополаскайте рот для того, чтобы удалить остатки пищи. Затем наберите в рот 15–20 мл кипяченой или дистиллированной воды и ополаскивайте его примерно минуту. Жидкость профильтруйте через бинт или марлю. В стакане смешайте 10 мл полученного фильтрата, содержащего амилазу слюны, и столько же крахмального клейстера. Выдерживайте смесь при температуре примерно 40 °С в течение 10 мин, при этом через каждые две минуты отбирайте по 1–2 мл пробы и добавляйте к ней по капле раствор йода. Пробирки с пробами пронумеруйте стеклоглафом. Результаты занесите в *таблицу 6.2*.

Таблица 6.2 – Окраска продуктов реакции ферментативного гидролиза крахмала с йодом

Номер пробы	Время, мин	Окраска пробы
1 (до начала действия фермента)	0	Сине-фиолетовая
2	2	
3	4	
4	6	
5	8	
6	10	

7. ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА ХРОМОПРОТЕИДЫ

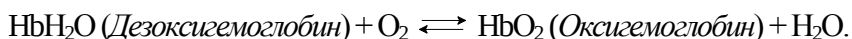
7.1. Цель работы

Познакомиться со сложными белками хромопротеидами на примере растительных хлорофиллов. Рассмотреть способы их выделения из природных объектов и некоторые химические свойства.

7.2. Краткие теоретические сведения

Хромопротеиды (хромопротеины) – это природные полимеры, в молекулах которых белковая часть соединена с пигментом (от греч. *chroma* – краска). К хромопротеидам относят, например, гемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb), у которых пигментом является *гем* – комплекс иона Fe^{2+} с порфириновым кольцом.

Гемоглобин (от греч. *háima* – кровь и лат. *globus* – шар) и *миоглобин* (от греч. *mys* – мышца) переносят молекулярный кислород, т.е. являются транспортными белками. Иногда их еще называют *дыхательными ферментами*:

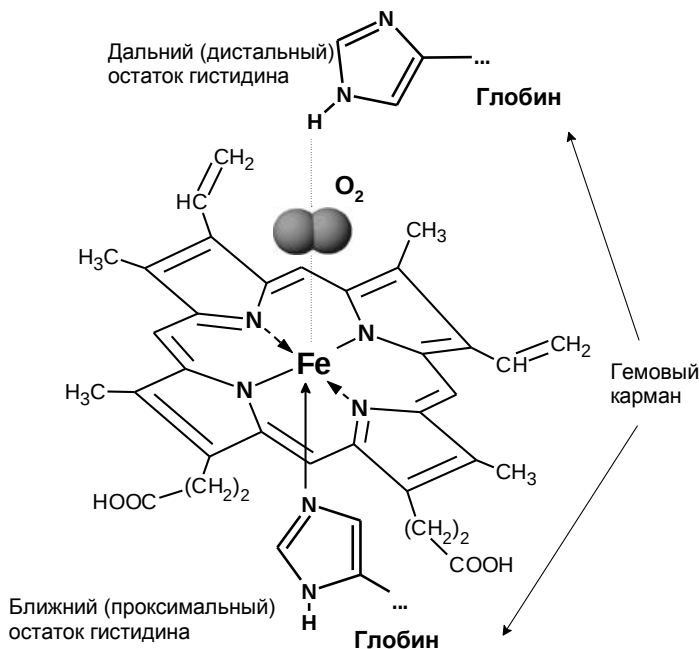


У гемоглобина и миоглобина хромофором является гем. Он связан с белковой частью (*глобином*) донорно-акцепторной (координационной) связью. Она образована железом и остатком гистидина полипептидной цепи глобина. Гем также удерживается в белковом кармане (*гемовом кармане*) и с помощью гидрофобных взаимодействий с неполярными радикалами остатков аминокислот. Четвертичная структура гемоглобина взрослого человека

(HbA) представлена двумя α -субъединицами (по 141 аминокислотному остатку) и двумя β -субъединицами (по 146 аминокислотных остатков). Таким образом, гемоглобин – тетрамер. Субъединицы связываются друг с другом посредством водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

В видимой области спектра поглощения гемоглобина наблюдаются два максимума при 430 (полоса CarE) и 555 нм, а оксигемоглобина – три максимума: 412–414 (полоса CarE), 540–542 и 576–578 нм (см. рисунок 7.1).

Миоглобин содержится в мышцах позвоночных и человека и участвует в обеспечении кислородом мышечных волокон. Он имеет более простое строение, чем гемоглобин. Его молекула состоит из одной субъединицы (включает 153 аминокислотных остатка), т.е. миоглобин является мономером.



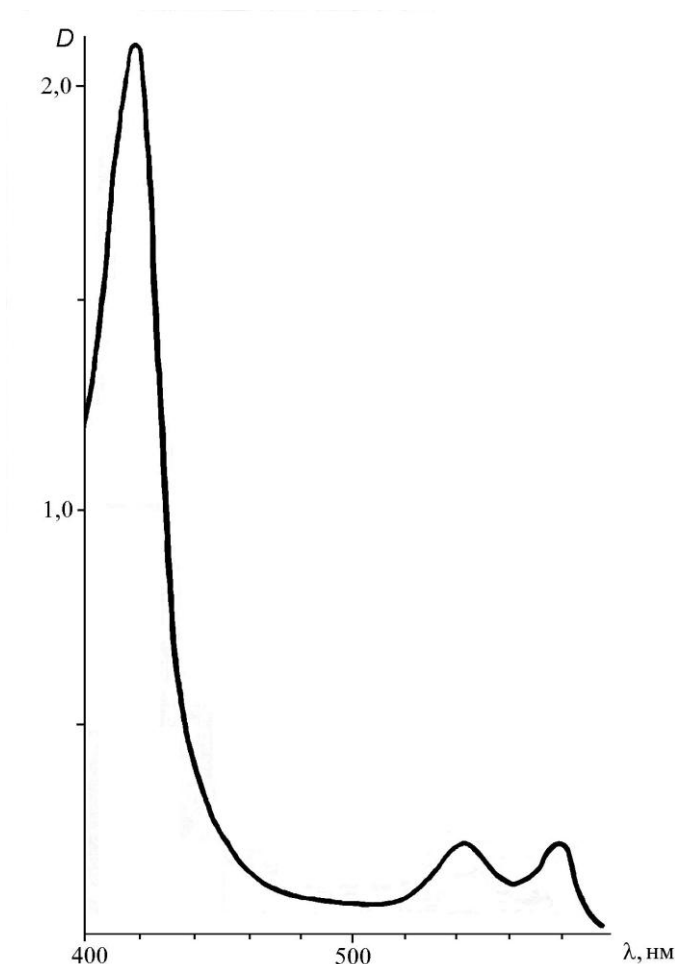
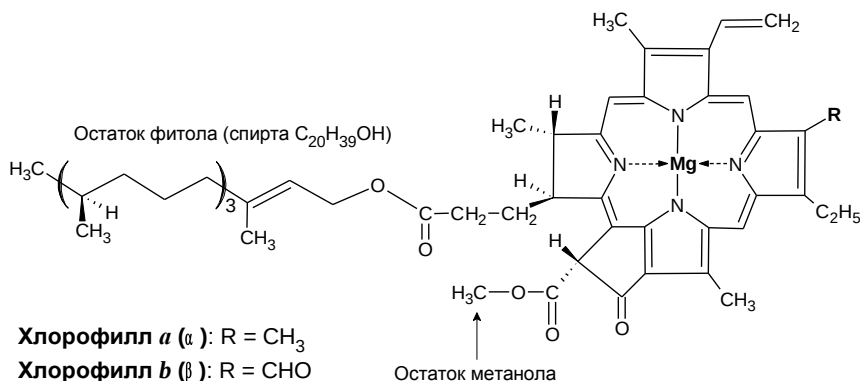


Рисунок 7.1 – Спектр поглощения раствора оксигемоглобина

Хлорофиллы (от греч. *chlorós*– зеленый и *phýllon* – лист) – это природные пигменты, содержащиеся в биологических объектах в виде комплексов с белками и участвующие в процессе фотосинтеза. Выделено более 50 различных хлорофиллов. Однако в высших растениях и зеленых

водорослях в основном содержатся хлорофиллы *a* (α) и *b* (β). Их формулы $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ и $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$, соответственно. Как и гемоглобин и миоглобин, хлорофиллы являются *металлопорфиринами*. Хлорофиллы также можно рассматривать как двухосновные кислоты, этерифицированные *фитолом* и метиловым спиртом. Фитол – это непредельный спирт, являющийся производным изопрена. В образовании сложноэфирных связей участвуют остатки пропионовой и муравьиной кислот, непосредственно связанные с порфириновым кольцом. Остаток фитола придает молекуле гидрофобность. Хлорофиллы *a* и *b* отличаются друг от друга только одним радикалом – в первом хлорофилле это метил, а во втором – формил (см. формулу). Хлорофиллы нековалентно связываются с белками, а также и с липидами.

Содержание хлорофиллов в растениях в среднем составляет 1 % в пересчете на сухое сырье. В клетках они находятся в пластидах, называемых хлоропластами или хлорофилловыми зернами. Распределяются хлорофиллы внутри клеток неравномерно. Хлорофиллы извлекают из растений ацетоном, спиртами, диэтиловым эфиром и другими растворителями. В воде они не растворяются.



Хлорофиллы поглощают свет в пределах видимой части спектра (400–700 нм). В спектре поглощения изолированных хлорофиллов (см. *рисунок 7.2*) наблюдаются два пика поглощения в областях 430–470 (полоса Саре; сине-фиолетовая область спектра) и 640–660 нм (красная область спектра). Минимум поглощения приходится на область зеленых лучей, что объясняет зеленую окраску хлорофиллов *a* и *b*. Сопутствующие хлорофиллам каротины и ксантофиллы поглощают в сине-фиолетовой области. В живом листе максимумы поглощения хлорофиллов несколько сдвинуты в длинноволновую область, что объясняется образованием белково-липидных комплексов.

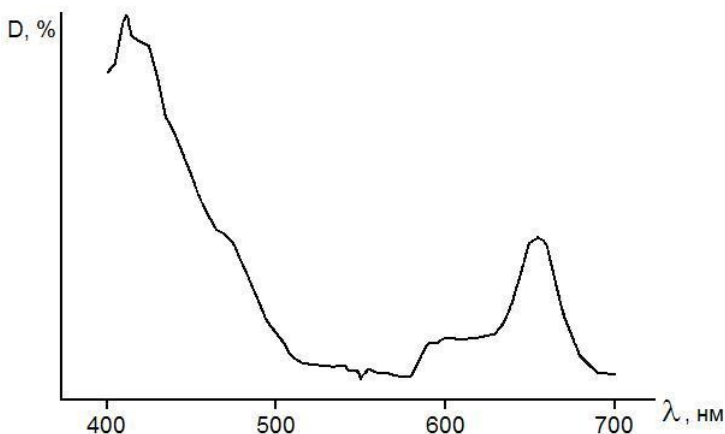
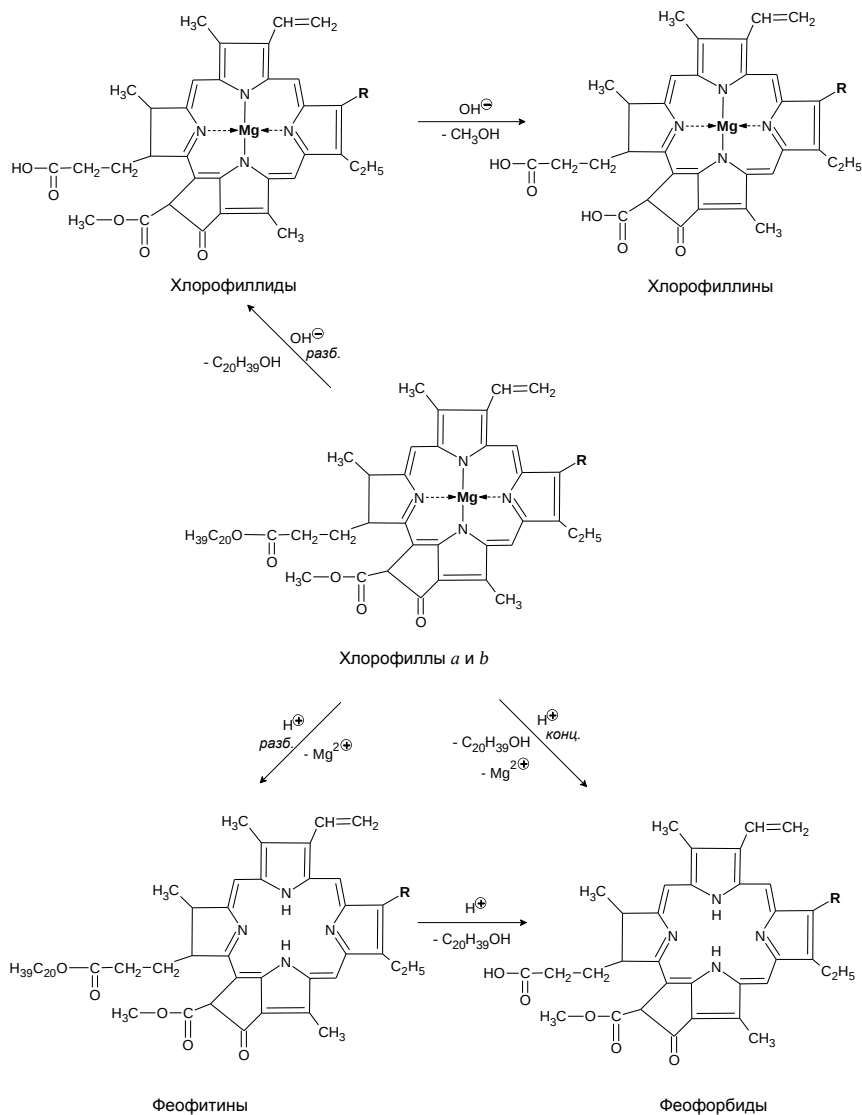


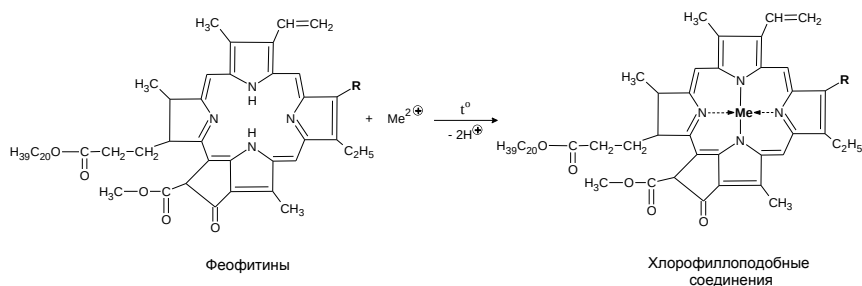
Рисунок 7.2 – Спектр поглощения спиртового раствора хлорофилла *a*

Магний-порфириновый комплекс легко разрушается в кислой среде. При этом получают *феофитины*. Они окрашены в бурый цвет. Концентрированные кислоты разрывают сложноэфирную связь с фитолом, образуя *феофобриды*. При обработке хлорофиллов щелочами происходит разрыв сложноэфирных связей с фитолом и

метанолом. При этом зеленая окраска у продуктов распада сохраняется.



Феофитины способны к образованию хлорофиллоподобных комплексов с двухзарядными катионами (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+}) при нагревании. Такие комплексы окрашены в зеленый цвет. Введение катионов магния в порфириновое кольцо феофитинов в таких условиях практически не происходит.



Зрительный родопсин (*зрительный пурпур*, *зрительный пигмент*) – хромопротеид, входящий в состав светочувствительных клеток сетчатки глаза – палочек. Он состоит из белка *опсина*, построенного из 348 аминокислотных остатков, и остатка ретиналя. Ретиналь ковалентно связан с белковой частью через атом азота ε-аминогруппы остатка лизина посредством образования основания Шиффа.

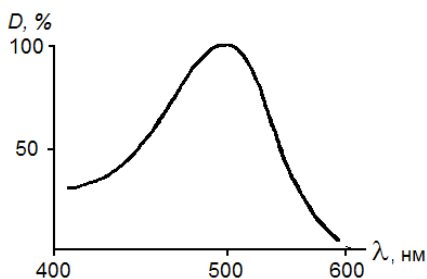
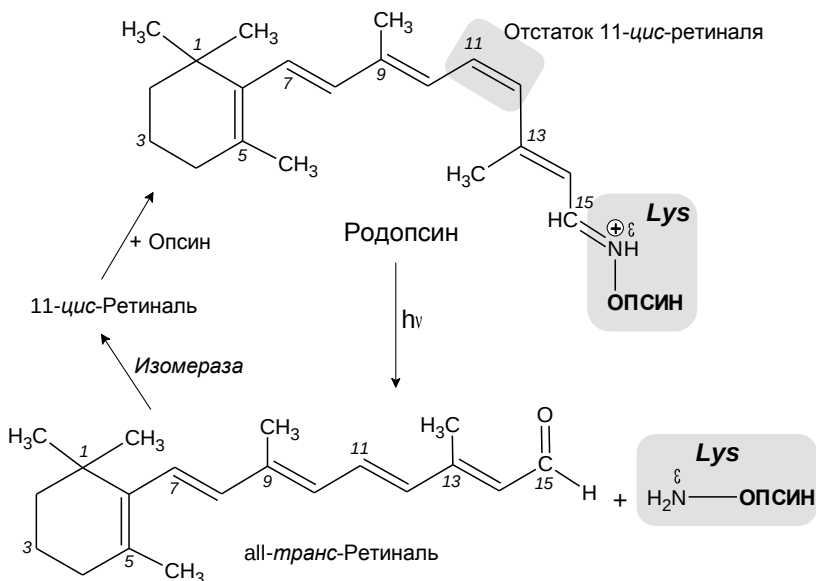


Рисунок 7.3 – Фрагмент спектра поглощения раствора зрительного родопсина

Под воздействием света происходит изомеризация остатка 11-*цис*-ретиная в полностью *транс*-ретинаяль (all-*транс*-ретинаяль). Это изменение приводит к разрушению связи ретинаяль с опсином.



Родопсин поглощает в видимой (максимум при ~500 нм) и УФ-областях (~280 и ~350 нм) спектра (см. рисунок 7.3). Это обуславливает красную окраску родопсина, т.к. он поглощает зеленые и синие лучи. Поглощение при 280 нм связано с белковой составляющей. Остальные максимумы поглощения обусловлены небелковой частью молекулы, т.е. остатком ретинаяля, находящимся во взаимодействии с опсином. При поглощении кванта света максимум поглощения 500 нм смещается, что связано с изомеризацией остатка 11-*цис*-ретинаяля в полностью *транс*-ретинаяль. Свободный all-*транс*-ретинаяль поглощает при 387 нм.

7.3. Реактивы и оборудование

Зеленые листья, фарфоровая ступка с пестиком, песок, смесь этанол–гексан (1:15 по объему) или ацетон, мел, 2 М раствор NaOH, концентрированная соляная кислота, кристаллические CuSO_4 , CuCl_2 и ZnSO_4 (кристаллогидраты), хроматографическая бумага или пластинки ТСХ, пинцет, хроматографический бокс с крышкой, сушильный шкаф или тепловентилятор, капилляр, стеклянный шпатель, пипетка, стакан, мерный цилиндр, горячая вода (80–90 °C).

7.4. Ход работы

Опыт 1. *Разделение хлорофиллов и сопутствующих им веществ методом плоскостной хроматографии.* Поместите в фарфоровую ступку несколько мелко нарезанных листьев, а также немного чистого песка и мела для нейтрализации кислот. Смесь тщательно перетрите. К полученной массе добавьте 20–25 мл смеси этанол–гексан (1:15 по объему) или ацетона. Смесь хорошо перемешайте и оставьте отстаиваться. При необходимости проведите фильтрование.

Возьмите хроматографическую бумагу или пластинку ТСХ шириной примерно 2 см и длиной 7 см. Отметьте на ней простым карандашом точку (на расстоянии примерно по 1 см от нижнего и левого краев; см. *рисунок 6.1*). С помощью капилляра поместите в точку полученный экстракт. Пробу наносите небольшими порциями. Не допускайте сильного растекания пятна! Новую порцию наносите только после высыхания предыдущей. В хроматографический бокс налейте смесь этанол–гексан (1:15 по объему) так, чтобы жидкость полностью покрыла дно сосуда. Опустите в бокс хроматограмму (при использовании хроматографической бумаги подвесьте ее на крючок) и закройте его крышкой. Учтите, что уровень жидкости в боксе не должен касаться

пятна с пробой! Как только фронт растворителя дойдет практически до конца бумаги (пластинки), извлеките ее из бокса и высушите с использованием (под тягой).

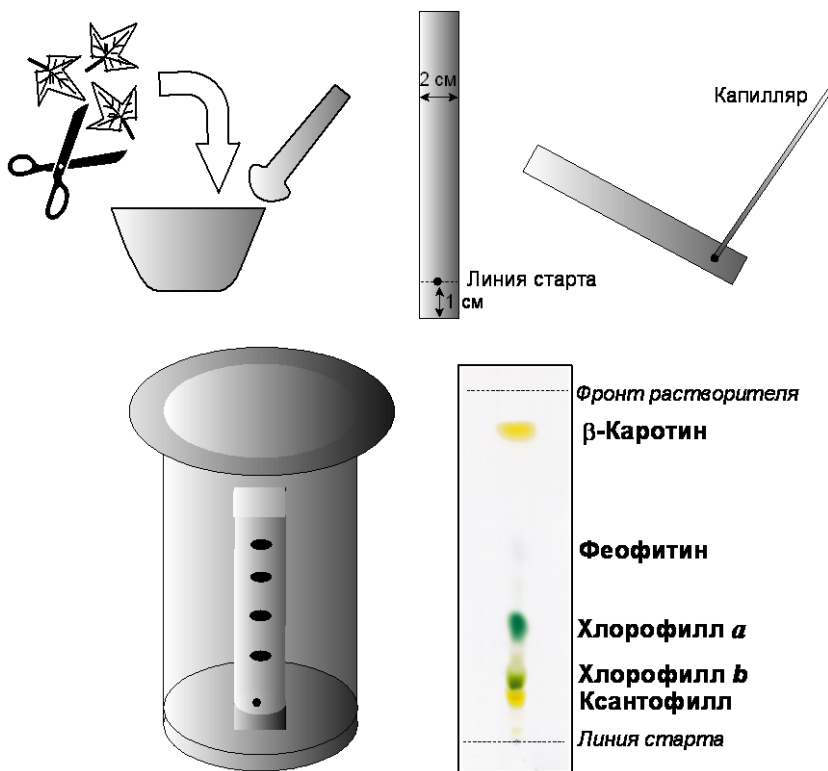
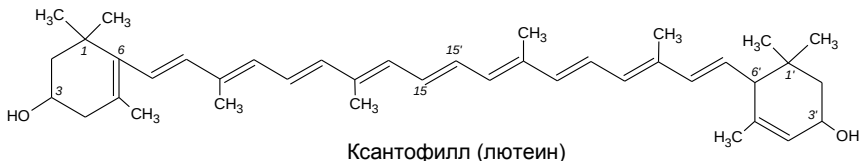


Рисунок 6.1 – Разделение хлорофиллов и сопутствующих им веществ методом плоскостной хроматографии

На хроматограмме (рисунок 6.1) будут видны окрашенные пятна: каротин (желто-оранжевое пятно), хлорофилл *a* (сине-зеленое пятно), ксантофилл (лютеин) (желтое пятно) и хлорофилл *b* (желто-зеленое пятно). Зарисуйте хроматограмму или приклейте в отчет оригинал. Отметьте на хроматограмме идентифицированные Вами

вещества и рассчитайте для них R_f . Почему хлорофилл *a* обладает большей хроматографической подвижностью, чем хлорофилл *b*?



Опыт 2. *Действие кислот и щелочей на хлорофилл.* В пробирку налейте 3–5 мл экстракта хлорофиллов, полученного в предыдущем опыте. Добавьте к нему 1–2 капли концентрированной соляной кислоты. Соблюдайте осторожность! Что наблюдается? Напишите уравнение реакции. Содержимое пробирки оставьте для опыта 3.

В новую пробирку налейте 1–2 мл полученного экстракта хлорофиллов и добавьте к нему 1–2 капли 2 М раствора NaOH. Происходит ли изменение окраски в этом случае? Почему? Составьте уравнение проведенной реакции.

Опыт 3. *Получение хлорофиллоподобных производных цинка и меди(II).* Смесь, оставшуюся после действия HCl на хлорофиллы, разлейте поровну по трем пробиркам. В одну из них добавьте на шпателе немного кристаллогидрата $ZnSO_4$, в другую – $CuSO_4$, а в третью – $CuCl_2$. Пробирки поместите в стакан с горячей водой (80–90 °C). Что наблюдается? Составьте необходимые схемы реакций.

7.5. Задачи и вопросы к лабораторной работе

1. Хромофорной группой зрительных пигментов некоторых рыб и амфибий является 11-*цис*-3,4-дидегидроретиналь. Напишите для него графическую формулу. Приведите графическую формулу полностью

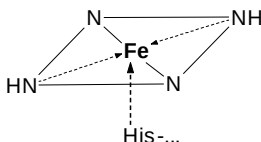
транс-3,4-дидегидроретиналя (*all-транс*-3,4-дидегидроретиналя).

2. Охарактеризуйте строение и биологическую роль гемоглобина.

3. Охарактеризуйте строение и биологическую роль зрительного родопсина.

4. Охарактеризуйте строение и биологическую роль миоглобина.

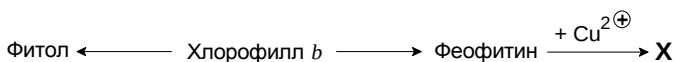
5. При попадании в кровь цианидов, например, цианида калия, происходит их взаимодействие с гемоглобином крови, в результате чего последний не может транспортировать кислород. Объясните, почему это происходит. Напишите реакцию дезактивации гемоглобина, используя для этого следующую условную формулу дезоксигемоглобина (дезоксигемоглобин):



6. Гемоглобин, взаимодействуя с угарным газом, не может переносить кислород к клеткам организма. Объясните причину этого процесса, записав схему взаимодействия с использованием формулы из предыдущей задачи.

7. Какой белок будет более эффективно связывать катионы свинца(II), яичный альбумин или гемоглобин?

8. Как осуществить превращения, приведенные ниже? Определите вещество **X** и напишите уравнения соответствующих реакций.



БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. – М.: Просвещение, 1987. – 815 с.
2. Яковишин Л.А. Избранные главы биоорганической химии / Л.А. Яковишин. – Севастополь: Стрижак-пресс, 2006. – 196 с.
3. Новокшанова А.Л. Биохимия для технологов в 2 ч. Часть 1.: учебник и практикум для академического бакалавриата / А.Л. Новокшанова. – 2-е изд., испр. – М.: Юрайт, 2017. – 211 с.
4. Новокшанова А.Л. Биохимия для технологов в 2 ч. Часть 2: учебник и практикум для академического бакалавриата / А.Л. Новокшанова. – 2-е изд., испр. – М.: Юрайт, 2017. – 302 с.
5. Мочульская Н.Н. Биоорганическая химия: учеб. пособие для вузов / Н.Н. Мочульская, Н.Е. Максимова, В.В. Емельянов; под науч. ред. В.Н. Чарушина. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Юрайт, 2017. – 108 с.
6. Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии / Л.М. Пустовалова. – Ростов н/Д.: Феникс, 1999. – 544 с.
7. Тюкавкина Н.А. Биоорганическая химия: учебник для вузов / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков. – М.: Дрофа, 2004. – 544 с.
8. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс; Пер. с англ. В.Л. Друцы и О.Н. Королевой. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
9. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии / Д.К. Шапиро. – Минск: Вышэйшая школа, 1976. – 288 с.
10. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений / В.В. Племенков. – Казань: Изд-во МПИК, 2001. – 376 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Оформление титульного листа и структура отчета по лабораторной работе

			Лабораторная работа № __ «Название лабораторной работы» <table><tr><td>Дата</td><td>Выполнена</td></tr><tr><td>01.01.01</td><td>Подпись преподавателя</td></tr></table>	Дата	Выполнена	01.01.01	Подпись преподавателя									
Дата	Выполнена															
01.01.01	Подпись преподавателя															
Без полей	<table><tr><th>№ опыта</th><th>Название опыта</th><th>Наблюдения и выводы</th></tr><tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td></tr><tr><td>3 клетки ↔</td><td>8 клеток ↔</td><td>До разворота тетради ↔ Разворот тетради</td></tr></table>	№ опыта	Название опыта	Наблюдения и выводы	1	2	3	3 клетки ↔	8 клеток ↔	До разворота тетради ↔ Разворот тетради	<table><tr><th>Уравнения реакций, рисунки, таблицы, формулы, вычисления</th></tr><tr><td>4</td></tr><tr><td>Поле всей страницы ↔</td></tr><tr><td>Разворот тетради</td></tr></table>	Уравнения реакций, рисунки, таблицы, формулы, вычисления	4	Поле всей страницы ↔	Разворот тетради	Без полей
	№ опыта	Название опыта	Наблюдения и выводы													
	1	2	3													
3 клетки ↔	8 клеток ↔	До разворота тетради ↔ Разворот тетради														
Уравнения реакций, рисунки, таблицы, формулы, вычисления																
4																
Поле всей страницы ↔																
Разворот тетради																

Таблица А.2 – Список вопросов для сдачи лабораторных работ

Лабораторная работа	Список вопросов
1	2
Классы органических соединений	Строение и важнейшие свойства углеводов, спиртов, альдегидов, карбоновых кислот и аминов
Стереохимическое моделирование биомолекул	Формулы и названия 20 биогенных аминокислот, их трехбуквенные обозначения и названия радикалов. Стереохимия аминокислот: понятие хиральности, асимметрического атома углерода, энантиомеров, рацемата, проекционные формулы Фишера, <i>D</i> - и <i>L</i> -номенклатура α -аминокислот
Хроматографический анализ аминокислот	Понятие о хроматографии. Разделение и очистка пептидов и белков. Хроматографические методы исследования пептидного материала. Аминокислотный анализатор. Электрофорез, диализ, высаливание
Свойства аминокислот	Химические и физические свойства α -аминокислот. Способы получения α -аминокислот. Расчет изоэлектрической точки аминокислот
Определение изоэлектрической точки яичного альбумина	Понятие о структурной организации белков. Строение пептидной связи. Конформации полипептидной цепи. Изоэлектрическая точка белков. Общая характеристика альбуминов.

Продолжение таблицы А.2

1	2
Свойства белков	Химические свойства белков (денатурация, ренатурация, цветные реакции, кислотный и щелочной гидролиз).
Ферментативный гидролиз крахмала	Понятие о ферментах, их классификации, строении. Модели каталитической активности ферментов. Факторы, влияющие на каталитическую активность ферментов
Хромопротеиды	Понятие о хромопротеидах. Общие представления о строении и биологической активности важнейших хромопротеидов (зрительного родопсина, хлорофилла, гемоглобина и миоглобина)

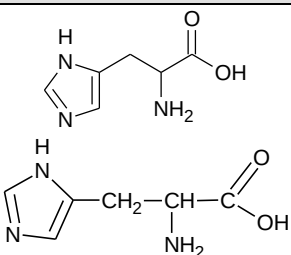
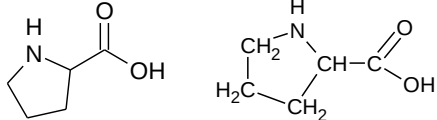
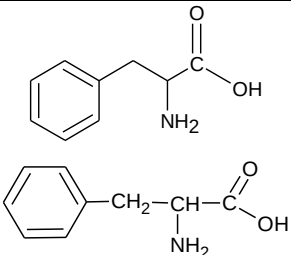
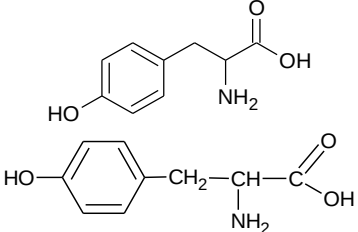
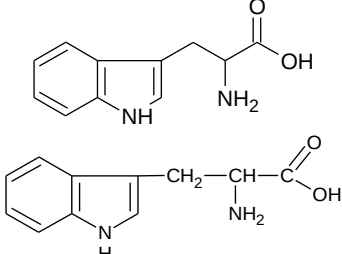
Таблица А.3 – Протеиногенные аминокислоты

Название аминокислоты и ее радикала	Структурная формула	Обозначение
1	2	3
Глицин (глицил)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \end{array}$ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Gly / G
Аланин (аланил)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Ala / A
Валин (валил)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Val / V
Лейцин (лейцил)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Leu / L
Изолейцин (изолейцил)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Ile / I
Аспарагиновая кислота (аспартил – одновалентный радикал, аспартоил – двухвалентный)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Asp / D

Продолжение таблицы А.3

1	2	3
Глутаминовая кислота (глутамил — одновалентный радикал, глутамоил — двухвалентный)	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Glu / E
Серин (серил)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Ser / S
Треонин (треонил)	$\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{HO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Thr / T
Цистеин (цистеинил)	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Cys / C
Метионин (метионил)	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Met / M
Аргинин (аргинил)	$\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Arg / R
Лизин (лизил)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	Lys / K

Продолжение таблицы А.3

1	2	3
Гистидин (гистидил)		His / H
Пролин (пролил)		Pro / P
Фенилаланин (фенилаланил)		Phe / F
Тирозин (тирозил)		Tyr / Y
Триптофан (триптофил)		Trp / W

Продолжение таблицы А.3

1	2	3
Аспарагин (аспарагинил)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \end{array}$	Asn / N
Глутамин (глутаминил)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \end{array}$	Gln / Q

Таблица А.4 – Изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	pI
Пепсин желудочного сока	2,08
Альбумин сыворотки крови	4,64
Казеин молока	4,6
Альбумин куриного яйца	4,7–4,8
α-Глобулин крови	4,8
Миозин мышц	5,0
β-Глобулин крови	5,2
Фибриноген крови	5,4
γ-Глобулин крови	6,4
Гемоглобин	6,8
Каталаза крови	7,0
Химотрипсин сока поджелудочной железы	8,6
Папаин	9,0
Клупеин	12,4

Таблица А.5 – Константы диссоциации аминокислот и их изоэлектрические точки

Аминокислота	Константы диссоциации			pI
	$pK_A (\alpha\text{-COOH}):$ $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$	$pK_A (\alpha\text{-NH}_3^+):$ $\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$	$pK_A (\text{R})$	
Gly	2,34	9,60		5,97
Ala	2,34	9,69		6,02
Val	2,29	9,72		6,01
Leu	2,36	9,60		5,98
Ser	2,21	9,15		5,68
Cys	1,71	10,78	8,27 (–SH)	4,99
Met	2,28	9,21		5,75
Asp	2,09	9,82	3,86 (вторая группа COOH)	2,98
Glu	2,19	9,76	4,25 (вторая группа COOH)	3,22
Arg	2,17	9,04	12,48 (гуанидиновая группа)	10,76
Lys	2,18	9,12	10,53 ($\epsilon\text{-NH}_3^+$)	9,83
Phe	1,83	9,13		5,48
Tyr	2,20	9,11	10,10 (HO–Ar)	5,66
Trp	2,38	9,39		5,89
His	1,82	9,17	6,00 (NH имидазольного кольца)	7,59
Ile	2,32	9,76		6,04
Thr	2,63	10,43		6,53
Pro	2,00	10,60 ($>\text{NH}_2^+$)		6,30
Asn	2,02	8,80		5,41
Gln	2,17	9,13		5,65

Таблица А.6 – Расчет pH растворов кислот, оснований и кислотно-основных буферных систем

Раствор	Формула для расчета pH
Общий случай	$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+]$ $\text{pH} = 14 + \lg[\text{OH}^-]$
Раствор сильной одноосновной кислоты	$[\text{H}^+] = C(\text{кислоты})$ $\text{pH} = -\lg C(\text{кислоты})$
Раствор сильной двухосновной кислоты	$[\text{H}^+] = 2C(\text{кислоты})$ $\text{pH} = -\lg[2C(\text{кислоты})]$
Раствор слабой кислоты	$\text{pH} = \frac{1}{2}\text{p}K_{\text{A}} - \frac{1}{2}\lg C(\text{кислоты})$
Раствор сильного однокислотного основания	$[\text{OH}^-] = C(\text{основания})$ $\text{pH} = 14 - \lg C(\text{основания})$
Раствор сильного двухкислотного основания	$[\text{OH}^-] = 2C(\text{основания})$ $\text{pH} = 14 + \lg[2C(\text{основания})]$
Раствор слабого основания	$\text{pH} = 14 - \frac{1}{2}\text{p}K_{\text{B}} + \frac{1}{2}\lg C(\text{основания})$
Буферный раствор	$\text{pH} = \text{p}K_{\text{A}} + \lg \frac{C(\text{соли})}{C(\text{кислоты})}$ $\text{pH} = 14 - \text{p}K_{\text{B}} + \lg \frac{C(\text{основания})}{C(\text{соли})}$

Таблица А.7 – Некоторые сокращения и условные обозначения, используемые в органической, биоорганической и биологической химии

Сокращения и условные обозначения	Расшифровка
1	2
АДФ	Аденозин-5'-дифосфат (аденозиндифосфат)
АМФ	Аденозин-5'-фосфат (аденозинмонофосфат)
АТФ	Аденозин-5'-трифосфат (аденозинтрифосфат)
6-АПК	6-Аминопенициллановая кислота
7-АЦК	7-Аминоцефалоспориновая кислота
БСИ (NBS)	N-Бромсукцинимид
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГТФ (GTP)	Гуанозин-5'-трифосфат (гуанозинтрифосфат)
ДАБИТЦ	4-N,N-Диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат
ДГБП	Дигидробиоптерин
ДНС (DNS)	Дансил
ДНСХ (DNSC)	Дансилхлорид
ДНФ (DNP)	Динитрофенил
ДНФБ (DNFB)	Динитрофторбензол
ДОФА	3,4-Дигидроксифенилаланин
ДТНБ (DTNB)	5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная кислота), реагент Эллмана
2,3-ДФГ (2,3-БФГ)	2,3-Дифосфоглицериновая кислота (2,3-бифосфоглицериновая кислота)
ДЦКИ (DCC, DCCD)	N,N'-Дициклогексилкарбодиимид
ИМФ (IMP)	Инозинмонофосфат
НАД ⁺ (NAD ⁺)	Никотинамидадениндинуклеотид, <i>окисленная форма</i>
НАДН (NADH)	Никотинамидадениндинуклеотид, <i>восстановленная форма</i>
НАДФ ⁺ (NADP ⁺)	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, <i>окисленная форма</i>
НАДФН (NADPH)	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, <i>восстановленная форма</i>
ТГБП	Тетрагидробиоптерин
ТГФК (THF)	Тетрагидрофолиевая (фолиновая) кислота

Продолжение таблицы А.7

1	2
ТСХ	Тонкослойная хроматография
УДФ (UDP)	Уридин-5'-дифосфат (уридиндифосфат)
ФАД (FAD)	Флавинадениндинуклеотид
ФИТЦ (PITS)	Фенилизотиоцианат
ФЛИТЦ (FITC)	Флуоресцеинизотиоцианат
ФТГ	Фенилтиогидантоин
ФТК	Фенилтиокарбамоил
цАМФ	Аденозин-3',5'-циклофосфат (циклоаденозинмонофосфат)
цГМФ (cGMP)	Гуанозин-3',5'-циклофосфат (циклогуанозинмонофосфат)
Ac	Ацетил
AcOH	Уксусная кислота
Ac ₂ O	Уксусный ангидрид
Adi	α -L-Аминоадипиновая кислота
Bu	Бутил
^t Bu	<i>трет</i> -Бутил
BuOH	Бутанол-1
^t BuOH	<i>трет</i> -Бутанол
CH ₃ CO~SCo A (CH ₃ CO~SKo A)	Ацетилкофермент А
cyt (цит)	Цитохром
Et	Этил
EtOH	Этиловый спирт (этанол)
TFA	Трифторуксусная кислота
Hb	Гемоглобин
H ₂ Co Q	Кофермент Q
HNBB	2-Гидрокси-5-нитробензилбромид (реагент Кошланда)
HSCo A (HSKo A)	Кофермент А
Hyp	Гидроксипролин
Me	Метил
MeOH	Метиловый спирт (метанол)
Pr	Пропил
ⁱ Pr	Изопропил
PrOH	Пропиловый спирт (пропанол-1)
ⁱ PrOH	Изопропиловый спирт (пропанол-2)

Таблица А.8 – Некоторые кислотно-основные индикаторы (изменение окраски индикаторов приведено в направлении повышения pH)

Индикатор	Интервал pH перехода окраски	Изменение окраски
Метилловый оранжевый (метилоранж)	3,1–4,4	Красная → оранжево-желтая
Фенолфталеин	8,2–10,0	Бесцветная → малиновая
Нейтральный красный	6,8–8,0	Красная → желто- коричневая
Феноловый красный	6,8–8,4	Желтая → красная
Бромтимоловый синий	6,0–7,6	Желтая → синяя
<i>мета</i> -Нитрофенол	6,8–8,6	Бесцветная → оранжевая
Лакмус	5,0–8,0	Красная → синяя
Метилловый красный	4,2–6,2	Красная → желтая

У ч е б н о е и з д а н и е

**ПРАКТИКУМ
ПО БИОХИМИИ**

Часть 1

Учебно-методическое пособие

*Составитель: **Яковишин** Леонид Александрович*

В авторской редакции

Изд. № 119/18. Объем 5 п.л.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»