

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Тольяттинский государственный университет  
Институт химии и инженерной экологии  
Кафедра «Рациональное природопользование и ресурсосбережение»

**Р.С. Галиев**

# **БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

Электронное учебно-методическое пособие

© ФГБОУ ВО «Тольяттинский  
государственный университет», 2018

ISBN 978-5-8259-1400-8

УДК 543.9(075.8)

ББК 28.072я73

Рецензенты:

д-р хим. наук, старший научный сотрудник,  
зав. лаб. экологической биохимии Института экологии  
Волжского бассейна РАН *В.Г. Козлов*;  
канд. биол. наук, доцент кафедры «Рациональное  
природопользование и ресурсосбережение» Тольяттинского  
государственного университета *Е.П. Загорская*.

Галиев, Р.С. Биохимические методы анализа : электронное учеб.-метод. пособие / Р.С. Галиев. – Тольятти : Изд-во ТГУ, 2018. – 1 оптический диск.

В пособии рассмотрены основные методики биохимического анализа простых и сложных углеводов, белков, водорастворимых и жирорастворимых витаминов, ферментов, а также пептидных и стероидных гормонов. Представлены современные качественные реакции на определение основных классов органических соединений. В каждой практической работе кратко представлены теоретический материал, ход проведения опытов и контрольные вопросы.

Предназначено для магистрантов направления подготовки 18.04.01 «Химическая технология», изучающих курс «Биохимические методы анализа».

Текстовое электронное издание.

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом Тольяттинского государственного университета.

Минимальные системные требования: IBM PC-совместимый компьютер: Windows XP/Vista/7/8; PIII 500 МГц или эквивалент; 128 Мб ОЗУ; SVGA; CD-ROM; Adobe Acrobat Reader.

© ФГБОУ ВО «Тольяттинский  
государственный университет», 2018

Редактор *Е.В. Пилясова*  
Технический редактор *Н.П. Крюкова*  
Компьютерная верстка: *Л.В. Сызганцева*  
Художественное оформление,  
компьютерное проектирование: *Г.В. Карасева, И.В. Карасев*

Дата подписания к использованию 14.11.2018.  
Объем издания 18 Мб.  
Комплектация издания: компакт-диск, первичная упаковка.  
Заказ № 1-87-17.

Издательство Тольяттинского государственного университета  
445020, г. Тольятти, ул. Белорусская, 14,  
тел. 8 (8482) 53-91-47, [www.tltsu.ru](http://www.tltsu.ru)

## Содержание

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                         | 5  |
| Модуль 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ БИОХИМИИ                                                    |    |
| МИКРООРГАНИЗМОВ .....                                                                  | 6  |
| Тема 1. Биохимический состав микроорганизмов .....                                     | 9  |
| Тема 2. Качественные реакции .....                                                     | 15 |
| Тема 3. Количественные методы исследований<br>в биохимии микроорганизмов .....         | 16 |
| Тема 4. Методы выделения и анализа органических<br>веществ микроорганизмов .....       | 21 |
| Практическое занятие 1. Простые углеводы .....                                         | 29 |
| Практическое занятие 2. Сложные углеводы .....                                         | 32 |
| Практическое занятие 3. Цветные реакции на белки .....                                 | 34 |
| Модуль 2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА .....                                           | 38 |
| Практическое занятие 4. Реакция осаждения белков .....                                 | 38 |
| Практическое занятие 5. Сложные белки. Фосфолипиды .....                               | 41 |
| Практическое занятие 6. Ферменты .....                                                 | 42 |
| Практическое занятие 7. Качественные реакции<br>на водорастворимые витамины .....      | 47 |
| Практическое занятие 8. Качественные реакции<br>на жирорастворимые витамины .....      | 50 |
| Практическое занятие 9. Качественные реакции<br>на гормоны, производные пептидов ..... | 53 |
| Практическое занятие 10. Качественные реакции<br>на гормоны щитовидной железы .....    | 55 |
| Вопросы для итогового контроля по дисциплине .....                                     | 57 |
| Библиографический список .....                                                         | 60 |

## ВВЕДЕНИЕ

Цель курса «Биохимические методы анализа» — повышение качества подготовки магистрантов в области биохимического метода анализа основных представителей классов высокомолекулярных соединений, входящих в состав живой материи (микроорганизмов), — белков, жиров, витаминов, ферментов и углеводов; повышение целостной системы знаний, умений и навыков по качественным и количественным методам биохимических исследований.

Учебно-методическое пособие по биохимическим методам анализа предназначено для помощи в подготовке к практическим занятиям по дисциплине, а также может быть использовано при выполнении диссертационного исследования.

Основными задачами курса являются формирование способности применять биохимические методы анализа при исследовании химического строения представителей основных классов высокомолекулярных соединений, формирование понятий об основных биохимических процессах, протекающих в живой клетке, а также о важности соблюдения условий в технологических процессах производства.

# **Модуль 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ БИОХИМИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

## **Темы лекционных занятий**

1. Биохимический состав микроорганизмов.
2. Качественные реакции.
3. Количественные методы исследований в биохимии микроорганизмов.
4. Методы выделения и анализа органических веществ микроорганизмов.

## **Темы практических занятий**

1. Простые углеводы.
2. Сложные углеводы.
3. Цветные реакции на белки.

## **Учебные вопросы**

Изучив данный модуль, студент должен:

**знать** основные понятия и методы биохимического анализа;

**уметь:**

- использовать биохимические методы анализа в профессиональной деятельности;
- применять методы качественного и количественного анализа при определении химических соединений;

**владеть навыками:**

- планирования эксперимента, обработки и представления полученных результатов;
- построения биохимических моделей по результатам активного эксперимента;
- биохимического анализа типовых профессиональных задач и интерпретации полученных результатов.

## **Методические рекомендации по изучению темы**

Изучить учебный материал по дисциплине «Биохимические методы анализа», используя лекционный материал и материал библиотечного фонда по данной тематике. Акцентировать внимание на изучении биохимического состава микроорганизмов, а также методов их определения.

*Ответить на контрольные вопросы:*

1. Понятие о химическом составе микроорганизмов.
2. Примеры простых углеводов.
3. Классификация белков.
4. Качественные методы анализа, их сущность и примеры.
5. Свойства (функции) нуклеиновых кислот.
6. Анаэробные процессы.
7. Этапы биосинтеза белка.
8. Глюконеогенез.
9. Динамическая биохимия.

### ***Биохимический состав микроорганизмов***

В данном разделе необходимо изучить химический состав микроорганизмов. Химические вещества делятся на органические и неорганические. Важнейшими органическими веществами являются углеводы, белки, жиры, нуклеиновые кислоты.

Студент при изучении материала должен разобраться в классификации химических веществ.

*Вопросы для самопроверки*

1. Каков химический состав микроорганизма?
2. Дайте общую характеристику и классификацию углеводов.
3. Каковы химические свойства моносахаридов?
4. Каковы химические свойства олигосахаридов?
5. Каковы химические свойства полисахаридов?
6. Дайте общую характеристику и классификацию липидов.
7. Каково биологическое значение липидов?
8. Дайте характеристику жирных кислот.

### ***Качественные реакции***

В данном разделе необходимо изучить принципы качественных реакций на определение основных органических веществ.

Студент при освоении материала должен изучить методику основных качественных реакций.

#### ***Вопросы для самопроверки***

1. Какие вы знаете качественные реакции на углеводы?
2. Какие вы знаете качественные реакции на белки?
3. Какие вы знаете качественные реакции на липиды?
4. Дайте характеристику фосфолипидов и их роли в животном организме.
5. Каковы физико-химические свойства глицеридов?
6. Дайте характеристику стероидам.
7. Каковы функции белков?
8. Каков химический состав белка?
9. Каковы строение и свойства аминокислот?
10. Каково строение белков?

### ***Количественные методы исследований в биохимии микроорганизмов***

В данном разделе необходимо изучить принципы количественных реакций для определения основных органических веществ.

Студент при освоении материала должен изучить методику основных количественных реакций.

#### ***Вопросы для самопроверки***

1. Какие вы знаете количественные реакции на углеводы?
2. Какие вы знаете количественные реакции на белки?
3. Какие вы знаете количественные реакции на липиды?
4. Какова классификация белков?
5. Дайте характеристику простым белкам.
6. Каковы химические свойства белков?
7. Дайте характеристику сложным белкам.
8. Каковы структурные элементы нуклеиновых кислот?
9. Каково строение ДНК?
10. Каково строение РНК?

## ***Методы выделения и анализа органических веществ микроорганизмов***

В данном разделе необходимо изучить методы выделения органических веществ микроорганизмов: бактерий, дрожжей, актиномицетов, сине-зеленых водорослей и вирусов.

Студент при освоении материала должен изучить методику получения биологического материала для исследований.

### ***Вопросы для самопроверки***

1. Какие вам известны методы выделения органических веществ из бактерий?
2. Какие вам известны методы выделения органических веществ из дрожжей?
3. Какие существуют методы выделения органических веществ из актиномицетов?
4. Какие существуют методы выделения органических веществ из сине-зеленых водорослей?
5. Какие существуют методы выделения органических веществ из вирусов?

## **Тема 1. Биохимический состав микроорганизмов**

Клетка — универсальная единица живой материи. По химическому составу существенных отличий у прокариотических и эукариотических клеток нет. Химические элементы, входящие в состав живой материи, можно разделить на три основные группы:

1. *Биогенные* химические элементы (C, O, N, H). На их долю приходится 95 % сухого остатка, в том числе 50 % — C, 20 % — O, 15 % — N, 10 % — H.

2. *Макроэлементы* — P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na. На них приходится около 5 %.

3. *Микроэлементы* — Fe, Cu, I, Co, Mo и др. На них приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

Химические элементы входят в состав различных веществ — воды, белков, липидов, нейтральных жиров, углеводов, нуклеиновых кислот. Синтез соединений контролируется генами. Многие ве-

щества бактериальная клетка может получать из окружающей среды или организма хозяина.

*Вода* составляет от 70 до 90 % биомассы. Содержание воды больше у капсульных бактерий, меньше всего — в спорах.

*Белки* встречаются во всех структурных элементах клетки. Белки могут быть более простые (протеины) и сложные (протеиды), в чистом виде или в комплексе с липидами, сахарами. Выделяют структурные (структурообразующие) и функциональные (регуляторные) белки, к последним относятся ферменты.

В составе белков присутствуют как обычные для эукариотов аминокислоты, так и оригинальные — *диаминопимелиновая*, *D-аланин*, *D-глутанин*, входящие в состав пептидогликанов и капсул некоторых бактерий. Только в спорах находится *дипиколиновая кислота*, с которой связана их высокая резистентность. Жгутики построены из белка *флагеллина*, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами. Пили (ворсинки) содержат особый белок — *пилин*.

Пептидную природу имеют капсулы представителей рода *Bacillus*, возбудителя чумы, поверхностные антигены ряда бактерий, в том числе стафилококков и стрептококков. *Белок А* — специфический белок *S. aureus* — фактор, обуславливающий ряд свойств этого возбудителя. *Белок М* — специфический белок гемолитических стрептококков серогруппы А, позволяющий дифференцировать серовары (около 100), что имеет эпидемиологическое значение.

Ряд белков содержит наружная мембрана грамотрицательных бактерий, из которых 3–4 *мажорных* (основных) и более 10 — второстепенных, выполняющих различные функции. Среди мажорных белков — *порины*, образующие диффузные поры, через которые в клетку могут проникать мелкие гидрофильные молекулы.

Белки входят в состав пептидогликана — биополимера, составляющего основу бактериальной клеточной стенки. Он состоит из остова (чередующиеся молекулы двух аминокислот) и двух наборов пептидных цепочек — боковых и поперечных. Наличие двух типов связей — гликозидных (между аминокислотами) и пептидных, которые соединяют субъединицы пептидогликанов, — придают этому гетерополимеру структуру *молекулярной сети*. *Пептидогликан* — наи-

более устойчивое соединение, которое образует ригидную мешковидную макромолекулу, определяющую постоянную форму бактерий и ряд их свойств. А именно:

1. Пептидогликан содержит родо- и видоспецифические антигенные детерминанты.
2. Он запускает классический и альтернативный пути активации системы комплемента.
3. Пептидогликан тормозит фагоцитарную активность и миграцию макрофагов.
4. Он способен инициировать развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).
5. Пептидогликан обладает противоопухолевым действием.
6. Он оказывает пирогенное действие, т. е. вызывает лихорадку.

Из соединений белков с небелковыми компонентами наибольшее значение имеют *липопротеиды*, *гликопротеиды* и *нуклеопротеиды*.

Удивительное таинство жизни — синтез белка осуществляется в *рибосомах*. Существует два основных типа рибосом — 70S (S — константа седиментации, единица Сведберга) и 80S. Рибосомы первого типа встречаются только у прокариотов. Антибиотики не действуют на синтез белка в рибосомах типа 80S, распространенных у эукариотов.

*Липиды* (главным образом форфолипиды) содержатся в цитоплазматической мембране (липидный бислой), в также в наружной мембране грамотрицательных бактерий. Есть микроорганизмы, содержащие большое количество липидов (до 40 % сухого остатка) — микобактерии. В состав липидов входят различные *жирные кислоты*, весьма специфичные для разных групп микроорганизмов. Их определение имеет в ряде случаев диагностическое значение, например у анаэробов, микобактерий.

У микобактерий туберкулеза в составе липидов имеется ряд кислотоустойчивых жирных кислот — *фтионовая*, *миколовая* и др. Высокое содержание липидов и их состав определяют многие свойства микобактерий туберкулеза, а именно:

- устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам;
- трудная окрашиваемость красителями (используют специальные методы окраски, чаще — по Цилю — Нильсену);

- устойчивость возбудителя к солнечной радиации и дезосредствам;
- патогенность.

*Тейхоевые кислоты* встречаются в клеточных стенках грамположительных бактерий. Представляют собой водорастворимые линейные полимеры, содержащие остатки глицерина или рибозы, связанные фосфодиэфирными связями. С тейхоевыми кислотами связаны главные поверхностные антигены ряда грамположительных бактерий.

*Углеводы* встречаются чаще в виде *полисахаридов*, которые могут быть экзо- и эндоклеточными. Среди экзоклеточных полисахаридов выделяют каркасные (входят в состав капсул) и истинно экзополисахариды (выходят во внешнюю среду). Среди бактериальных полисахаридов многие находят медицинское применение. *Декстраны* — полисахариды с большой молекулярной массой, по виду напоминают слизь. 6-процентный раствор декстрана — кровезаменитель полиглюкин. Декстрановый гель *сефадекс* используется в колоночной хроматографии как молекулярное сито. Эндоклеточные полисахариды — запасные питательные вещества клетки (крахмал, гликоген и др.).

*Липополисахарид* (ЛПС) — один из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, это соединение липида с полисахаридом. ЛПС состоит из комплекса:

1. Липид А.
2. Одинаковое для всех грамотрицательных бактерий *полисахаридное ядро*.
3. Терминальная сахаридная цепочка (*О — специфическая боковая цепь*).

Синонимы ЛПС — эндотоксин, О — антиген.

ЛПС выполняет две основные функции — определяет антигенную специфичность и является одним из основных факторов патогенности. Это эндотоксин, токсические свойства которого проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток. Его токсичность определяется липидом А. ЛПС запускает синтез более 20 биологически активных веществ, определяющих патогенез эндотоксикоза, обладает пирогенным действием.

*Нуклеиновые кислоты* — ДНК и РНК. *Рибонуклеиновые кислоты* (РНК) находятся главным образом в рибосомах (р-РНК — 80–85 %,

т(транспортные)-РНК — 10 %, м(матричные)-РНК — 1–2 %) главным образом в одноцепочечной форме. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) может находиться в ядерном аппарате (хромосомная ДНК) или в цитоплазме в специализированных образованиях — плаزمидах — плазмидная (внехромосомная) ДНК. Микроорганизмы отличаются по структуре нуклеиновых кислот, содержанию *азотистых оснований*. Генетический код состоит всего из четырех букв (оснований) — А (аденин), Т (тимин), Г (гуанин) и Ц (цитозин). Наиболее часто для характеристики микроорганизмов используют как таксономический признак процентное соотношение Г/Ц, которое существенно отличается у различных групп микроорганизмов.

Микроорганизмы синтезируют различные *ферменты* — специфические белковые катализаторы. У бактерий обнаружены **ферменты 6 основных классов**:

1. Оксидоредуктазы — катализируют окислительно-восстановительные реакции.
2. Трансферазы — осуществляют реакции переноса групп атомов.
3. Гидролазы — осуществляют гидролитическое расщепление различных соединений.
4. Лиазы — катализируют реакции отщепления от субстрата химической группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединением химической группы к двойным связям.
5. Лигазы или синтетазы — обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пиррофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.
6. Изомеразы — определяют пространственное расположение групп элементов.

В соответствии с механизмами генетического контроля у бактерий выделяют три группы ферментов:

- *конститутивные*, синтез которых происходит постоянно;
- *индуцибельные*, синтез которых индуцируется наличием субстрата;
- *репрессибельные*, синтез которых подавляется избытком продукта реакции.

Ферменты бактерий делят на *экзо- и эндоферменты*. Экзоферменты выделяются во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений.

Способность к образованию экзоферментов во многом определяет *инвазивность* бактерий — способность проникать через слизистые, соединительнотканые и другие тканевые барьеры.

Примеры: *гиалуронидаза* расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость тканей (клостридии, стрептококки, стафилококки и многие другие микроорганизмы); *нейраминидаза* облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточном пространстве (холерный вибрион, дифтерийная палочка, вирус гриппа и многие другие). К этой же группе относятся энзимы, разлагающие антибиотики.

В бактериологии для дифференциации микроорганизмов по биохимическим свойствам основное значение часто имеют конечные продукты и результаты действия ферментов. В соответствии с этим существует следующая **микробиологическая (рабочая) классификация ферментов**:

1. Сахаролитические.
2. Протеолитические.
3. Аутолитические.
4. Окислительно-восстановительные.
5. Ферменты патогенности (вирулентности).

Ферментный состав клетки определяется геномом и является достаточно постоянным признаком. Знание биохимических свойств микроорганизмов позволяет идентифицировать их по набору ферментов. Основные продукты ферментирования углеводов и белков — кислота, газ, индол, сероводород, хотя реальный спектр для различных микроорганизмов намного более обширный.

Основные ферменты вирулентности — гиалуронидаза, плазмокоагулаза, лецитиназа, нейраминидаза, ДНКаза. Определение ферментов патогенности имеет значение при идентификации ряда микроорганизмов и выявления их роли в патологии.

Ряд ферментов микроорганизмов широко используется в медицине и биологии для получения различных веществ (аутолитические, протеолитические), в генной инженерии (рестриктазы, лигазы).

## Тема 2. Качественные реакции

*Качественный анализ* — совокупность химических, физико-химических и физических методов, применяемых для обнаружения элементов, радикалов и соединений, входящих в состав анализируемого вещества или смеси веществ. В качественном анализе используют легковыполнимые, характерные химические реакции, при которых наблюдается появление или исчезновение окрашивания, выделение или растворение осадка, образование газа и др. Реакции должны быть как можно более селективны и высокочувствительны. Качественный анализ в водных растворах основан на ионных реакциях и позволяет обнаружить катионы или анионы.

*Качественные реакции.* Для определения присутствия веществ, анионов, катионов используются качественные реакции (табл. 1). Проведя их, можно подтвердить однозначно их наличие. Эти реакции широко используются при проведении качественного анализа, целью которого является определение наличия веществ или ионов в растворах или смесях.

Таблица 1

Основные качественные реакции

|          |                    |                           |
|----------|--------------------|---------------------------|
| Крахмал  | Раствор $I_2$ в KI | Синее окрашивание         |
| Белки    | $HNO_3$ (конц.)    | Желтое окрашивание        |
| Глюкоза  | $CuSO_4$ , NaOH    | Выпадение красного осадка |
| Сахароза | $Cu(OH)_2$         | Растворение осадка        |

### Тема 3. Количественные методы исследований в биохимии микроорганизмов

В биохимии широко применяют диализ, центрифугирование, оптические методы, различные виды хроматографии и др.

#### *Оптические методы*

В основу *абсорбционной* спектроскопии положен принцип измерения поглощения света, проходящего сквозь раствор исследуемого вещества, вследствие его абсорбции. Измерение спектров осуществляют на специальных спектральных аппаратах, в которых пробу вещества помещают между источником света и фотоэлементом, регистрирующим свет. Каждое вещество имеет характерный свет поглощения. Для аналитических целей используют длину волны, соответствующую максимуму поглощения исследуемого соединения ( $\lambda_{\max}$ ).

*Фотоэлектроколориметрия* — это измерение поглощения видимой части спектра окрашенными растворами.

Собственно спектрофотометрия — это измерение поглощения (пропускания) прозрачных растворов в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной зонах спектра (220–1100 нм).

*Нефелометрия* — метод измерения интенсивности рассеянного света.

К приборам, базирующимся на измерении светопоглощения веществ, относятся фотоэлектроколориметры (ФЭК) и спектрофотометры (СФ). ФЭК позволяют проводить измерения поглощения в видимой части спектра. СФ дают возможность проводить измерения в широком диапазоне длин волн — от ультрафиолетового до инфракрасного (210–1100 нм) — и исследовать окрашенные и бесцветные растворы в узкой зоне спектра, на участке максимального поглощения монохроматического потока света.

В основе абсорбционной спектрофотометрии лежат общие принципы способности веществ поглощать световую энергию по законам Бугера — Ламберта и Бера:

$$D = k \cdot c \cdot d,$$

где  $D$  — оптическая плотность раствора;  $k$  — молярный коэффициент поглощения (экстинкция), который равен оптической плотности

1 М раствора при толщине слоя в 10 мм;  $c$  — концентрация раствора, моль/л;  $d$  — толщина слоя жидкости, см.

### *Электрофорез*

Явление электрофореза — это перемещение заряженных частиц в электрическом поле.

Поведение частицы в электрическом поле описывается тремя основными характеристиками: скоростью движения частицы  $v$ , электрокинетическим потенциалом  $\xi$  и электрофоретической подвижностью  $U$ .  $\xi$ -потенциал прямо пропорционален свободному (не скомпенсированному ионами среды) заряду частицы ( $Q$ ) и обратно пропорционален ее радиусу ( $r$ ). Скорость заряженной частицы прямо пропорциональна  $\xi$ -потенциалу.

Электрофоретическая подвижность  $U$  равна отношению скорости частицы к напряжению электрического поля.

Наиболее часто метод используют для аналитических целей — для разделения смеси заряженных веществ на фракции с последующим качественным и количественным их определением. Таким способом удастся разделить, например, белки сыворотки крови на 5 фракций: альбумин и 4 фракции глобулинов. Эту задачу часто решают в клинической биохимии, так как соотношение фракций закономерно изменяется при многих патологических процессах.

Метод подразделяется на **фронтальный**, или свободный, электрофорез (электрофорез в жидкой среде) и **зональный**, или электрофорез в поддерживающих средах. В качестве поддерживающих сред применяются различные инертные пористые природные либо синтетические материалы: бумага, ацетицеллюлоза, крахмал в виде влажных зерен и в виде геля, гель агара либо агарозы, полиакриламидный синтетический гель — ПААГ. Задача поддерживающей среды — стабилизировать жидкость, уменьшить диффузию, а в ряде случаев — создать дополнительный механизм разделения. Например, в некоторых вариантах метода разделение по электрофоретической подвижности можно сочетать с разделением по молекулярной массе (наилучшим образом это достигается в ПААГ).

Одной из высокоразрешающих разновидностей метода является *диск-электрофорез* (англ. *discontinuous* — прерывистый, неодно-

родный). В этом методе движение молекул проходит вначале через концентрирующий крупнопористый гель, где разделяемая смесь концентрируется благодаря движению между двумя сортами ионов. Движущиеся впереди пробы ведущие ионы (принадлежат сильно-му электролиту) и находящиеся позади пробы замыкающие ионы (принадлежат слабому электролиту) создают разную напряженность поля по обе стороны зоны, занятой пробой. Вследствие этого «фронт» пробы тормозится, а «тыл», напротив, подгоняется. Таким путем достигается эффект концентрирования. Затем проба переходит в разделяющий гель с иным значением pH буферного раствора. Вследствие изменения pH (а значит, и степени диссоциации слабого электролита) замыкающие ионы опережают пробу, которая перемещается теперь на фоне замыкающих ионов — оказывается в однородной по pH мелкопористой среде. В этом втором, разделяющем геле происходит обычный электрофорез. Повышение разрешающей способности метода достигается за счет того, что перед разделением проба концентрируется в виде очень узкой стартовой зоны, и таким образом удается разделить даже вещества, мало отличающиеся друг от друга по свойствам.

### *Хроматография*

Хроматографические методы основаны на динамическом разделении смеси веществ. Общий принцип хроматографии состоит в том, что непрерывный поток *подвижной* фазы, содержащей анализируемый образец, направленно проходит через *стационарную* фазу, которая в зависимости от своей природы взаимодействует в различной степени с компонентами образца.

Распределение соединения между двумя несмешивающимися фазами определяется *коэффициентом распределения*, который для каждого конкретного вещества в системе из двух фаз при данной температуре постоянен и выражается отношением концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в стационарной фазе. Фазы для хроматографического разделения выбирают так, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными.

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы хроматографические методы делят на *газовую и жидкостную* хроматографию; в зависимости от геометрической формы стационарной фазы — на *колоночную и плоскостную* (бумажную или тонкослойную).

В зависимости от механизма разделения веществ выделяют следующие виды хроматографии.

**Адсорбционная хроматография** основана на различной адсорбируемости компонентов разделяемой смеси на поверхности раздела фаз. Эти различия связаны главным образом с различиями в дипольных моментах (в полярности) разделяемых веществ, а также подвижной и неподвижной фаз хроматографической системы. Так, из полярной подвижной фазы на неполярном адсорбенте лучше адсорбируются неполярные вещества. Примером неполярного адсорбента могут служить активированный уголь, сажа; полярного — окислы металлов, гидроокиси, некоторые соли, силикагель, полисахариды.

**Абсорбционная (распределительная) хроматография** основана на различной абсорбируемости (поглощении всем объемом стационарной жидкой фазы, растворимости в ней) компонентов разделяемой смеси. В основе метода также лежит соотношение дипольных моментов разделяемых веществ и компонентов хроматографической системы. Примером распределительной хроматографии может служить разделение аминокислот в системе бутанол — вода либо фенол — вода. Стационарная полярная фаза — вода удерживается инертным пористым твердым телом — бумагой, силикагелем и т. п. Бутанол — неполярная подвижная фаза — содержит компоненты разделяемой смеси и движется относительно воды, удерживаемой твердой пористой подложкой.

**Хемосорбционные методы** основаны на использовании хемосорбции. Наиболее распространенным из них является **ионообменный** метод, в котором используются различия в константах диссоциации разделяемых веществ-электролитов. Разделяемые вещества в виде катионов или анионов обратимо обмениваются на катионы или анионы, содержащиеся в стационарной твердой фазе (катионите или анионите соответственно). Подвижная фаза — полярный растворитель (обычно буферный или солевой водный раствор). В качестве твердого пористого тела, содержащего прикрепленные

к нему обмениваемые ионы, служат природные или синтетические полимеры — ионообменные смолы (целлюлоза, декстран, агароза, полиакриламид, полистирол).

**Гель-хроматография (молекулярно-ситовая хроматография)** основана на разделении веществ в соответствии с их размерами (молекулярными массами). В этом методе используются те же пористые тела, что служат основой для ионообменной хроматографии, но без прикрепленных к ним ионогенных групп. Материал стационарной фазы представляет собой сферические гранулы определенного размера, внутри которых имеются поры. Размер пор также стандартен и выбирается так, чтобы обеспечить хорошую разрешающую способность метода. Наиболее крупные молекулы не могут проникнуть во внутренние мелкие поры и передвигаются только по промежуткам между гранулами. Они идут с наибольшей скоростью. Более мелкие частицы движутся с разными скоростями, в зависимости от того, какая доля объема внутренних пор доступна для них в соответствии с их размерами. Медленнее всех движутся самые мелкие молекулы.

**Аффинная хроматография.** Метод основан на специфическом сродстве (*affinity*) некоторых биологически активных веществ друг другу. Один из партнеров — аффиант — обездвиживают (иммобилизуют) на твердой пористой подложке, вместе с которой он образует стационарную фазу. Вторым партнером содержится в подвижной фазе. Аффинная хроматография позволяет выделить его из смеси любой степени сложности. Так, при пропускании через крахмал был выделен из панкреатического сока только один из его компонентов — фермент амилаза, для которого крахмал является субстратом. Наиболее распространенные пары веществ: фермент и субстрат, фермент и ингибитор, фермент и кофермент, антитело и антиген, рецептор и сигнальная молекула, транспортный белок и транспортируемое им вещество, комплементарные друг другу нуклеотиды. В связи с чем аффинная хроматография широко используется для очистки антигенов и антител, гормонов, рецепторов, транспортных белков, ферментов и т. п.

### ***Метод центрифугирования***

Разделение и исследование веществ с помощью центрифугирования основано на разной скорости оседания (седиментации) в центробежном поле частиц, имеющих разную плотность, форму или размеры.

Коэффициент седиментации зависит от молекулярной массы и формы частицы, а также от плотности и вязкости среды выделения, что используется для определения молекулярной массы.

Простейшая задача центрифугирования заключается в отделении осаждённых веществ от растворов как этап выполнения аналитических работ. Например, отделение белков от других органических соединений после осаждения. Подбирая скорости центрифугирования и определенные среды выделения, можно избирательно осаждать разные клеточные структуры: ядра, митохондрии, лизосомы, рибосомы, эндоплазматический ретикулум.

### ***Радиоизотопные методы***

Основаны на способности нестабильных радиоизотопов испускать частицы или электромагнитное излучение, которые фиксируются специальными методами.

Основными преимуществами методов с применением радиоизотопных меток являются их чувствительность и возможность вводить метки в живой организм, что позволяет исследовать метаболические превращения, механизмы и скорости поглощения и переноса веществ в интактном организме, возраст биологических образцов.

## **Тема 4. Методы выделения и анализа органических веществ микроорганизмов**

Основными методами очистки и выделения органических соединений являются: фильтрование, кристаллизация, сублимация, экстракция, перегонка.

### ***Фильтрование и центрифугирование***

Наиболее простой способ отделения твердых частиц от жидкостей — *декантация* — основан на том, что при отсутствии перемешивания твердое вещество оседает на дно сосуда и прозрачная

жидкость может быть отделена сливанием. Однако при этом невозможно полностью отделить жидкость, и для получения чистого осадка следует использовать фильтрование.

При фильтровании жидкостей следует учитывать нижеперечисленные факторы:

- 1) эффективность фильтрующей поверхности;
- 2) разность давлений по обе стороны фильтра;
- 3) размер частиц твердых компонентов фильтруемой смеси;
- 4) скорость осаждения твердых веществ;
- 5) сопротивление фильтрующего материала прохождению фильтрата;
- 6) сопротивление осадка на фильтре прохождению фильтрата;
- 7) вязкость фильтрата;
- 8) температуру.

В простейших случаях фильтрование проводят в конической воронке через складчатый фильтр из пористой фильтровальной бумаги, так как он имеет большую фильтрующую поверхность.

Чрезвычайно важно правильно выбрать размер прибора: большой фильтр и большая воронка удобны для быстрого фильтрования, но в этом случае потери за счет вещества, которое остается на фильтрующем материале и на стенках воронки, достаточно велики. Небольшая воронка и небольшой фильтр дают меньшие потери, однако они не подходят для фильтрования больших объемов. Таким образом, следует подбирать размер фильтра в зависимости от целей фильтрования в каждом конкретном случае. Размер фильтра всегда должен соответствовать размерам воронки.

В качестве фильтрующего материала наиболее часто используют беззолые фильтры. Эти фильтры освобождают от большей части минеральных примесей путем обработки их соляной или фтористоводородной кислотой. Они выпускаются в виде кружков определенных диаметров и имеют очень незначительное, а главное — постоянное содержание золы. Содержание золы обычно указывается на упаковке.

Для фильтрования аморфных осадков применяют наименее плотную бумагу, так называемые фильтры «*черная лента*» (каждая пачка этих фильтров опоясана бумажной лентой черного цвета). В большинстве случаев можно использовать фильтры средней плот-

ности («белая лента»). Очень плотные («баритовые») фильтры («синяя лента») пропускают фильтрат медленно и задерживают тонкие порошкообразные суспензии. В отдельных случаях, например для фильтрования растворов при кристаллизации веществ, предназначенных для анализа, или для приготовления растворов для инъекций, применяют фильтры с *желтой полоской* (фильтры, отмытые эфиром от веществ, растворимых в органических растворителях). Помимо фильтровальной бумаги в качестве фильтрующего материала употребляют некоторые волокнистые массы. Так, летучие органические жидкости, которые на большой поверхности складчатого фильтра сильно испаряются и увлажняются вследствие конденсации водяных паров из воздуха, целесообразно фильтровать через вату, стеклянную вату, асбест и т. п.

Наибольшее значение имеет скорость фильтрования. Большинство выражений для ее вычисления выводится из предположения, что явление фильтрования в принципе подобно прохождению жидкости через капиллярные трубки и может быть выражено вариантом дифференциального уравнения Пуазейля.

В лабораторной практике можно довольствоваться качественной оценкой общих закономерностей процесса фильтрования. Поэтому часто для отделения осадка от фильтрата используют фильтрование при пониженном давлении. Основными компонентами установки для фильтрования в данном случае служат фарфоровая воронка Бюхнера, колба Бунзена, предохранительная склянка Вульфа (ловушка) и водоструйный или вакуумный насос.

Для фильтрования горячих растворов или фильтрования при низких температурах можно применять специальную воронку, через «рубашку» которой пропускают нагревательную или охлаждающую жидкость.

Для фильтрования растворов, содержащих агрессивные вещества, которые разрушают бумажные фильтры, используются пористые стеклянные фильтры с различным диаметром пор (фильтры Шотта).

Обычные способы фильтрования нельзя использовать в том случае, когда фильтруемая смесь или некоторые ее компоненты не выдерживают контакта с воздухом. Это относится к веществам, которые окисляются кислородом воздуха, а также к гигроскопическим

веществам, поглощающим влагу из воздуха, и некоторым основаниям, которые реагируют с диоксидом углерода, содержащимся в воздухе. В этом случае следует фильтровать в атмосфере инертного газа.

В тех случаях, когда необходимо без потерь отделить малые количества осадка, или когда осадок забивает поры фильтра, либо когда осадок такой мелкий, что проходит через фильтр, вместо фильтрования применяют центрифугирование. Обычно в лабораториях для препаративной работы используют седиментационные центрифуги с числом от 2000 до 6000 оборотов в минуту. Суспензию помещают в центрифужные пробирки, уравнивают их по массе и только после этого запускают центрифугу. Если после центрифугирования осадок прочно удерживается на дне пробирки, то находящуюся поверх него жидкость сливают, взмучивают осадок с небольшим объемом растворителя и повторно центрифугируют. После окончания процесса центрифугирования растворитель отбрасывают, его остатки удаляют кусочками фильтровальной бумаги, а осадок подсушивают на воздухе.

### *Перекристаллизация*

Важнейшим методом очистки и разделения смеси твердых веществ служит перекристаллизация. Данный метод применим для веществ, растворимость которых значительно возрастает с повышением температуры. При повышении температуры происходит растворение осадка и получается раствор, близкий к насыщенному, затем его охлаждают. При охлаждении, вследствие уменьшения растворимости, часть растворенного вещества осаждается в виде кристаллов. Полученные кристаллы содержат меньше примесей, чем исходный осадок, так как раствор относительно примесей, которых мало, является ненасыщенным, и примеси не будут выделяться вместе с кристаллами основного вещества.

Перекристаллизация малоэффективна, если примесь является малорастворимое вещество или если примесь изоморфна очищаемому веществу (образует с ним смешанные кристаллы).

Весь процесс очистки веществ перекристаллизацией можно подразделить на три этапа:

- выбор растворителя;
- проведение перекристаллизации;
- отделение выделившихся кристаллов очищенного вещества.

Для полного выпадения кристаллов вещества колбу с фильтратом закрывают и ставят в холодильник или охлаждающую смесь. Скорость кристаллизации органических веществ колеблется в очень широких пределах (от несколько минут до несколько суток), поэтому не следует преждевременно выбрасывать маточный раствор после отделения кристаллов от растворителя. Выделившееся вещество отфильтровывают от маточного раствора под вакуумом.

### *Сублимация*

Сублимацией (или возгонкой) называют явление испарения твердого вещества с последующей конденсацией пара непосредственно в твердое состояние, минуя жидкое состояние.

Нередко в случае смесей, содержащих много смолистых веществ, даже слабое нагревание приводит к плавлению, тогда процесс сублимации протекает по следующей схеме:

*твердая фаза — жидкая фаза — газовая фаза — твердая фаза.*

С практической точки зрения важнее всего соблюдать условия, при которых осуществляется последний переход газовая фаза — твердая фаза.

Возгонка протекает вследствие принудительного нарушения равновесия в системе твердое вещество — пар. Равновесие нарушается за счет отведения паров вещества в конденсационное пространство. Поэтому возгонкой можно очищать любые кристаллические вещества, которые имеют достаточную упругость паров при температурах ниже их температуры плавления. Возгонка дает хорошие результаты при очистке хинонов, многоядерных углеводов, органических кислот (бензойная, салициловая и др.). Для преодоления межмолекулярных сил кристаллической решетки необходимо сообщить веществу энергию, определяемую как теплота возгонки. Значение теплоты возгонки зависит от постоянных свойств данного вещества.

При простой возгонке скорость процесса возрастает при повышении температуры, вызывающей повышение упругости паров вещества. Поэтому оптимальной считается температура возгонки на несколько градусов ниже температуры кипения вещества.

## Экстракция

Экстракция веществ является очень важной и одной из основных операций в лаборатории. Экстракция — это способ разделения твердых или жидких смесей, основанный на различной селективной растворимости компонентов смеси в различных растворителях.

Экстракционное разделение осуществляется в условиях существования двух несмешивающихся фаз: твердой и жидкой или жидкой и жидкой. В любом случае используемый растворитель (экстрагент) не должен смешиваться с исходной смесью. Извлекаемое вещество распределяется между двумя фазами. Раствор извлекаемого вещества в экстрагенте называется экстрактом, или вытяжкой.

Отношение, в котором вещество распределяется между двумя взаимно несмешивающимися фазами, зависит от многих факторов, прежде всего от концентрации вещества, относительного количества фаз, ассоциации растворенного вещества с растворителем и т. д. Простейшие сведения об этом отношении дает закон Нернста, согласно которому отношение концентраций растворенного вещества в двух несмешивающихся фазах в условиях равновесия, при определенной температуре является величиной постоянной и называется *коэффициентом распределения*.

При подборе экстрагента необходимо учитывать, чтобы плотность его отличалась от плотности исходной фазы.

Способ экстрагирования выбирают в зависимости от величины коэффициента распределения вещества между двумя фазами. Если коэффициент распределения гораздо больше единицы, т. е. извлекаемое вещество самопроизвольно переходит из первоначального раствора в растворитель, то часто простым встряхиванием обеих фаз можно сразу перевести практически всё вещество в экстракт. Если коэффициент распределения меньше или равен единице, то необходимо применить повторное экстрагирование по фракциям для того, чтобы выделить из раствора основную часть вещества. Наконец, если коэффициент распределения намного меньше единицы, то следует проводить многократное экстрагирование (перфорацию).

## *Перегонка*

Перегонка, или дистилляция, представляет собой процесс, основанный на различии состава жидкости и ее пара. Перегонку чаще всего применяют для очистки жидких веществ (для их отделения от менее летучих компонентов) или для разделения смесей жидких веществ с различной температурой кипения. Смесей, при перегонке которых состав пара не отличается от состава жидкости, называются нераздельнокипящими, или азеотропными.

По условиям проведения работы различают три способа перегонки жидкостей:

- 1) при атмосферном давлении (простая фракционная перегонка);
- 2) при пониженном давлении (перегонка в вакууме);
- 3) с водяным паром.

Для *простой перегонки при атмосферном давлении* перегоняемую жидкость нагреванием переводят в парообразное состояние и затем конденсируют в отдельной части прибора. При этом полного разделения удается достигнуть лишь в том случае, когда один из компонентов совершенно нелетуч или разница в температурах кипения разделяемых веществ достаточно велика (80–100 °C).

Перегонную колбу в зависимости от температуры кипения перегоняемых веществ нагревают на водяной, масляной, песчаной или воздушной бане. Перегнанное вещество называется дистиллятом. Скорость перегонки регулируют изменением температуры нагревания бани, причем скорость поступления дистиллята в приемную колбу не должна превышать 1–2 капель в секунду. Для обеспечения необходимой скорости перегонки температура в бане должна быть на 30 °C выше температуры паров. Пока отгоняется первый компонент смеси, температура перегонки остается постоянной. Резкое повышение температуры свидетельствует о том, что началась перегонка следующего, более высококипящего компонента.

Перегонку веществ, частично или полностью разлагающихся при температуре кипения при атмосферном давлении, осуществляют при пониженном давлении (*вакуумная перегонка*). Значение вакуумной перегонки состоит прежде всего в том, что в вакууме температура кипения вещества ниже, чем при атмосферном давлении. Приблизительные расчеты показывают, что снижение

давления на каждые 1,3 кПа вызывает понижение температуры кипения на 0,5 °С.

Например, вещества, кипящие с разложением при 350 °С/760 мм рт. ст., можно перегнать без разложения приблизительно при 160–210 °С/10 мм рт. ст., при 100–130 °С/0,01 мм рт. ст. и при 40–50 °С/0,0001 мм рт. ст.

В некоторых случаях снижение давления при перегонке сопровождается увеличением относительной летучести и тем самым улучшением разделения веществ. Наконец, перегонкой в вакууме иногда удастся предотвратить образование азеотропных смесей.

*Перегонку с водяным паром* применяют для выделения, очистки или разделения веществ, мало растворимых в воде и обладающих значительной упругостью паров при температуре кипения воды. Перегонка с водяным паром позволяет отгонять вещества, которые при обычной перегонке в той или иной степени разлагаются. Таким методом можно перегнать высококипящий компонент, как жидкий, так и твердый, при атмосферном давлении и температуре около 100 °С. Перегонкой с водяным паром разделяют смеси веществ, из которых только одно способно отгоняться с паром.

### ***Высушивание***

Высушивание является одним из заключительных этапов очистки вещества. Высушивание, т. е. удаление следов влаги (или какого-либо другого растворителя), можно производить методами, используемыми для разделения и очистки органических веществ (экстракция, выпаривание, фракционная перегонка, сублимация), а также с помощью осушающих реагентов, которые удаляют влагу вследствие адсорбции, образования гидратов или химической реакции с водой. Применение того или иного метода высушивания связано с природой вещества, его агрегатным состоянием, характером растворителя, требуемой степенью высушивания и т. д.

Высушивание твердых веществ можно проводить на воздухе между листами фильтровальной бумаги. Те вещества, которые не разлагаются при нагревании, сушат в сушильном шкафу при температуре ниже температуры плавления.

Эффективно происходит высушивание в присутствии веществ, поглощающих или связывающих пары растворителя. Для этого вещество помещают в эксикатор, на дне которого находится осушитель. В зависимости от природы удаляемого растворителя применяют различные высушивающие вещества. Например, для связывания паров воды и этилового спирта применяют гидроксид натрия или калия, обезвоженный хлорид кальция, оксид фосфора (V) и серную кислоту. Для ускорения процесса высушивания применяют вакуум-эксикаторы.

Высушивание жидких веществ осуществляют с помощью твердых неорганических соединений, способных поглощать воду. Основное требование к осушителям состоит в том, чтобы они были индифферентны как к растворителю, так и к осушаемому веществу. В колбу с жидкостью добавляют осушитель (1–3 % от массы жидкости), встряхивают ее, затем закрывают пробкой (если нет выделения газа) или пробкой с хлоркальциевой трубкой и оставляют стоять на некоторое время. После высушивания жидкость фильтруют.

Весьма эффективно высушивание жидкостей с помощью цеолитов — природных или синтетических алюмосиликатов. Цеолиты содержат поры различной величины, в которых задерживаются молекулы небольшого размера за счет адсорбции. В зависимости от природы осушаемого вещества подбирают цеолит определенной марки. Цеолиты часто применяются для осушения веществ, содержащих следы воды.

## **Практическое занятие 1**

### **Простые углеводы**

*Цель:* изучение свойств простых углеводов и их строения.

#### **Общие сведения**

Все углеводы принято делить на две большие группы: простые и сложные.

Простыми углеводами — моносахаридами — называют сахара, которые при гидролизе не расщепляются на более простые. Простые сахара по количеству атомов углерода разделяют на тетрозы, пентозы, гексозы и т. д.

По своему строению простые сахара — соединения со смешанными функциями. Это многоатомные альдегидо- или кетоспирты. В зависимости от наличия альдегидной или кетонной группы все сахара делят на две группы: альдозы и кетозы. Нижеследующие реакции подтверждают представление о химических свойствах и строении простых сахаров.

### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в глюкозе**

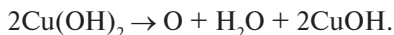
Поместить в пробирку 1 каплю 0,5%-ного раствора глюкозы и 6 капель 2н NaOH. К полученному раствору добавить 1 каплю 0,2н раствора  $\text{CuSO}_4$ . Образующийся вначале осадок гидроксида меди (II)  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  немедленно растворяется, и получается прозрачный раствор сахарата меди синего цвета. Растворение гидроксида меди (II) подтверждает наличие в молекуле глюкозы нескольких гидроксильных групп.

#### *Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

#### **Опыт 2. Восстановление гидроксида меди глюкозой при нагревании**

К полученному в предыдущем опыте раствору добавить 1,5–2 мл воды, нагреть пробирку в пламени спиртовки. Раствор сначала изменяет свой цвет с синего на желтый, так как образуется гидроксид меди (I):



При более продолжительном нагревании гидроксид меди (I) превращается в оксид меди (I)  $\text{Cu}_2\text{O}$  красного цвета:



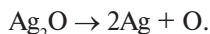
Выделяющийся при восстановлении гидроксида меди (II) кислород идет на окисление глюкозы.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Представить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 3. Восстановление аммиачного раствора оксида серебра глюкозой**

Поместить в пробирку 10 капель аммиачного раствора оксида серебра и 1–2 капли 0,5%-го раствора глюкозы. Раствор нагреть на пламени спиртовки до кипения. На стенках пробирки выделяется зеркальный налет или появляется черный осадок металлического серебра. Отсюда и название реакции «серебряное зеркало»:



*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Определение и роль биохимии в экологии.
2. Химический состав организма.
3. Общая характеристика и классификация углеводов.
4. Классификация моносахаридов.
5. Формула глюкозы и фруктозы.
6. Формула альдоз и кетоз.
7. Гидроксильные, альдегидные и кетонные группы.
8. Строение и химические свойства моносахаридов.
9. Строение и химические свойства олигосахаридов.
10. Строение и химические свойства полисахаридов.

## Практическое занятие 2

### Сложные углеводы

*Цель:* изучение строения и свойств сложных углеводов.

#### Общие сведения

Сложными называются такие сахара, которые при гидролизе расщепляются на более простые сахара или моносахариды. В зависимости от количества молекул моносахаридов, получающихся при гидролизе сложного углевода, различают олигосахариды и полисахариды.

Олигосахариды при гидролизе образуют молекулы простых сахаров (дисахариды, трисахариды).

Полисахариды при гидролизе образуют много молекул моносахаридов (от нескольких сотен до нескольких тысяч).

К дисахаридам относятся: сахароза, мальтоза, лактоза.

К полисахаридам относятся: крахмал, гликоген, клетчатка.

#### Алгоритм выполнения

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### Опыт 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в сахарозе

Поместить в пробирку 1 каплю 10%-го раствора сахарозы и 6 капель 2н NaOH. Добавить для разбавления 1,5–2 мл воды, прибавить 1 каплю 0,2н  $\text{CuSO}_4$ . Вместо ожидаемого осадка  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  получается раствор сахарата меди ярко-голубого цвета, подтверждающий наличие в сахарозе нескольких гидроксильных групп.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

## **Опыт 2. Отсутствие восстанавливающей способности в сахарозе**

Раствор сахара меди, полученного в предыдущем опыте, осторожно нагреть на спиртовке до кипения. Убедиться, что сахароза не дает реакции восстановления гидроксида меди из-за отсутствия в ее молекуле свободной альдегидной группы.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

## **Опыт 3. Наличие восстанавливающей способности в лактозе (мальтозе)**

Поместить в пробирку 1 каплю 1%-го раствора лактозы и 4 капли 2н NaOH. Добавить 1 каплю 0,2н  $\text{CuSO}_4$ . Появившийся осадок гидроксида меди растворяется с образованием ярко-голубого раствора. Добавить 1,5–2 мл воды. Затем нагреть пробирку до кипения. В нагретой части раствора появляется желтоватое окрашивание за счет образования гидроксида меди (I) желтого цвета. Появление  $\text{CuOH}$  свидетельствует о наличии в молекуле лактозы свободной альдегидной группы.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

## **Опыт 4. Ферментативный гидролиз крахмала под влиянием амилазы слюны**

Поместить в пробирку 5 капель 0,5%-го крахмального клейстера. Добавить в нее такой же объем собственной слюны и обязательно размешать. Через 1–2 минуты взять пипеткой одну каплю раствора и налить на предметное стекло. Добавить 1 каплю очень разведенного раствора йода в йодистом калии. Отсутствие синей окраски указывает на то, что крахмал полностью переварен слюной. К продукту гидролиза крахмала в пробирке добавить 5 капель 2н NaOH, 1 каплю 0,2н  $\text{CuSO}_4$  и взболтать. Нагреть раствор. Наблюдается отчетливое пожелтение раствора, что свидетельствует об образовании

гидроксида меди (I). Появление  $\text{CuOH}$  свидетельствует о том, что произошел гидролиз крахмала с образованием мальтозы и глюкозы.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Представители дисахаридов.
2. Представители полисахаридов.
3. Формулы мальтозы и сахарозы.
4. Формула крахмала.
5. Химические свойства лактозы.
6. Общая характеристика и классификация липидов.
7. Биологическое значение липидов.
8. Характеристика жирных кислот.
9. Строение и физико-химические свойства глицеридов.
10. Фосфолипиды и их роль в животном организме.
11. Характеристика стероидов.

## **Практическое занятие 3**

### **Цветные реакции на белки**

*Цель:* изучение цветных реакций на белки: биуретовой реакции, ксантопротеиновой реакции и реакции Фоля.

### **Общие сведения**

Белки разделяются на простые и сложные. Простые белки (протеины) состоят только из аминокислот и являются высокомолекулярными полимерными органическими соединениями — полипептидами.

Сложные белки (протеиды) содержат, кроме аминокислот, другие вещества небелковой природы, так называемые простетические группы, например углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и другие. Белки не только служат главным строительным материалом клетки, но и являются регуляторами всех процессов, протекающих

в организме. В клетках человека количество разных белков достигает 100 000. В молекуле белка аминокислоты соединены друг с другом пептидной связью, образуя полипептидные цепи.

Для обнаружения белков существуют цветные реакции и реакции осаждения. При взаимодействии с отдельными химическими веществами образуются окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено наличием в молекуле белка той или иной аминокислоты, имеющей в своем составе определенную химическую группировку. Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить белковую природу вещества.

### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт 1. Биуретовая реакция на пептидную связь**

Биуретовую реакцию способны давать вещества, содержащие не менее двух пептидных связей. При добавлении сульфата меди (II) к сильно щелочному раствору белка образуются комплексные соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в розово- или сине-фиолетовый цвет.

К 5 каплям водного раствора белка прибавляют 3 капли 2н раствора NaOH и 1 каплю 0,2н раствора  $\text{CuSO}_4$  и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

#### **Опыт 2. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты**

Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белке циклических аминокислот — триптофана, фениламина, тирозина, со-

державших в своем составе бензольное ядро. При наличии белков, содержащих циклические аминокислоты, с концентрированной азотной кислотой образуются нитропроизводные, окрашенные в желтый цвет.

К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли концентрированной  $\text{HNO}_3$  и осторожно кипятят. Вначале появляется осадок свернувшегося белка, который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку добавляют по каплям 2н раствор  $\text{NaOH}$  до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли нитросоединения.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 3. Реакция Фоя на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу**

Реакция Фоя указывает на присутствие в белке аминокислот: цистеина и цистина, содержащих слабосвязанную серу. Реакция состоит в том, что при кипячении белка со щелочью эти аминокислоты легко отщепляют серу в виде  $\text{Na}_2\text{S}$ , который с плюмбитом натрия образует черный или бурый осадок сульфида свинца:



К 5 каплям раствора белка прибавить 5 капель реактива Фоя, прокипятить и дать постоять 1–2 минуты. При этом появляется бурый или черный осадок сульфида свинца.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Общая формула аминокислоты.
2. Формулы глицина, аланина, валина.
3. Формулы цистеина, серина, лизина.
4. Формулы фенилаланина, тирозина.
5. Аминогруппа и карбоксильная группа.
6. Определение и функции белков.
7. Химический состав белка.
8. Свойства аминокислот.
9. Строение белков.
10. Классификация белков. Характеристика простых белков.

## **Модуль 2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

Практическое занятие 4. Белки. Реакции осаждения белков.

Практическое занятие 5. Сложные белки.

Практическое занятие 6. Ферменты.

Практическое занятие 7. Качественные реакции на водорастворимые витамины.

Практическое занятие 8. Качественные реакции на жирорастворимые витамины.

Практическое занятие 9. Гормоны, производные аминокислот.

Практическое занятие 10. Гормоны щитовидной железы.

### **Практическое занятие 4 Реакция осаждения белков**

*Цель:* изучение способов осаждения белков.

#### **Общие сведения**

Существует большое количество реакций осаждения белков. Эти реакции в зависимости от способа осаждения и осадителя могут быть как обратимыми, так и необратимыми. В случае обратимого осаждения белки не подвергаются глубоким изменениям и могут быть вновь растворены в воде. При необратимых реакциях осажденные белки подвергаются глубоким изменениям. Получаемые осадки не могут быть растворены в воде. Процесс необратимого осаждения белков называется денатурацией.

#### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

### **Опыт 1. Реакция осаждения белков нейтральными солями — высаливание**

Высаливанием называется осаждение белков с помощью больших концентраций нейтральных солей:  $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и др. Реакция высаливания обусловлена дегидратацией молекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда. Высаливающая способность  $\text{NaCl}$  слабее, чем  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . При высаливании белок обычно не теряет своих естественных свойств. Метод высаливания позволяет получить белки в кристаллическом виде и разделить белковые фракции.

В пробирку поместить 20 капель белка и прибавить тонкоизмельченный порошок  $\text{NaCl}$  до полного насыщения раствора. Через несколько минут появляется осадок белка. В другую пробирку поместить 15 капель раствора белка и 15 капель насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Через несколько минут появляется осадок белка. В обе пробирки добавить четырехкратный объем воды. Выпавший осадок при добавлении воды растворяется, что свидетельствует об обратимом осаждении белка.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов**

Осаждение белков солями тяжелых металлов происходит при небольших концентрациях солей. Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков.

К 5 каплям раствора яичного белка прибавить 1 каплю 10%-го раствора  $\text{CuSO}_4$ . Образуется бледно-голубой осадок, нерастворимый в воде. В этом можно убедиться, добавив 15–20 капель воды.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 3. Осаждение белков органическими кислотами**

Органические кислоты вызывают необратимое осаждение белков. Большое практическое применение получили кислоты трихлоруксусная  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  и сульфосалициловая  $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{COOH}\text{SO}_3\text{H}$ .

К 5 каплям раствора белка добавить 2 капли 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка. Убедиться в его нерастворимости в воде.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 4. Осаждение белков органическими растворителями**

В органических растворителях, таких как спирт, белки не растворяются и выпадают в осадок. При длительном воздействии спирта белок денатурирует.

К 5 каплям раствора белка добавить 15–20 капель этилового спирта. Раствор мутнеет. К полученному раствору добавить 1 каплю насыщенного раствора  $\text{NaCl}$ . При стоянии выпадает осадок белка. Убедиться в его нерастворимости в воде.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Определения дегидратации, денатурации и высаливания.
2. Влияние тяжелых металлов на растворы белков.
3. Влияние органических кислот на растворы белков.
4. Влияние спиртов на растворы белков.
5. Влияние органических растворителей на растворы белков.
6. Химические свойства белков.
7. Характеристика сложных белков.
8. Структурные элементы нуклеиновых кислот.
9. Строение ДНК.
10. Строение РНК.

## **Практическое занятие 5**

### **Сложные белки. Фосфолипиды**

*Цель:* изучение свойств сложных белков фосфопротеидов.

#### **Общие сведения**

Фосфопротеиды — сложные белки, содержащие в качестве небелковых групп остатки фосфорной кислоты.

К фосфопротеидам относятся казеиноген молока, виталин, витин из яичных желтков и др. Биологическая роль фосфопротеидов заключается в том, что они служат материалом для растущих организмов. Так, казеиноген молока содержит все незаменимые аминокислоты и фосфорную кислоту.

#### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт. Выделение казеиногена из молока**

Важнейший белок молока казеиноген содержится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При ферментативном свертывании молока казеиноген подвергается химическим изменениям с образованием из него казеина. В простокваше и других кисломолочных продуктах в свернутом состоянии находится казеиноген.

К 2 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды. Осаждают казеиноген добавлением 1 капли концентрированной уксусной кислоты. Выпавший осадок казеиногена отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой 2 раза. Часть осадка снимают с фильтра стеклянной палочкой и проводят с ним цветные реакции на белки: биуретовую (с растворами NaOH и  $\text{CuSO}_4$ ), ксантопротеиновую ( $\text{HNO}_3$  и NaOH) и реакцию Фоля.

### *Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Пептидная связь.
2. Связи, удерживающие вторичную и третичную структуру белка.
3. Биологическая роль ДНК и РНК.
4. Строение нуклеотидов и их роль в обмене веществ.
5. Общие представления об обмене белков.
6. Пищеварение белков.
7. Синтез белков.
8. Синтез нуклеиновых кислот.
9. Внутриклеточный распад белков.
10. Внутриклеточные превращения аминокислот.

## **Практическое занятие 6** **Ферменты**

*Цель:* изучение свойств ферментов.

### **Общие сведения**

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Синтезируются в клетках организма. Каталитические свойства ферментов связаны с их способностью специфически активировать химические реакции. Работа, которую выполняют ферменты в качестве биологических катализаторов, необычайно эффективна. В некоторых случаях реакции под действием ферментов протекают более чем в миллион раз быстрее, нежели в их отсутствие.

Высокая каталитическая активность ферментов связана с тем, что они временно соединяются с субстратами, образуя фермент-субстратные комплексы. Часть ферментного белка, которая активно взаимодействует с субстратом, называется *активным центром фермента*. Часть полипептидной цепи фермента, которая способствует

определенному пространственному расположению активного центра, называется *аллостерическим участком*.

Аллостерический участок может соединяться с различными веществами, но не с субстратами, и оказывать влияние на активный центр фермента, вызывая торможение или активирование его действия. Ферменты могут находиться в активном и неактивном состоянии.

### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядков проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт 1. Термолабильность ферментов**

Ферменты при нагревании до 60–80 °С утрачивают свои свойства биологических катализаторов. Степень инактивирования зависит и от длительности теплового воздействия. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается. В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия ферментов слюны — амилазы и мальтазы. Гидролиз крахмала под действием амилазы происходит через стадию образования декстринов. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, амилодекстрины — фиолетовое, эритродекстрины — красно-бурое, ахродекстрины — желтое (цвет йода в воде). Конечные продукты гидролиза — мальтоза и глюкоза — имеют свободные альдегидные группы и дают реакцию Троммера.

Реакция Троммера основана на способности углеводов при нагревании восстанавливать гидрат окиси меди (голубого цвета) в гидрат закиси меди желтого цвета. При дальнейшем нагревании гидрат закиси переходит в красную закись меди.

О расщеплении крахмала можно судить на основании двух реакций:

- 1) реакции на крахмал с йодом;
- 2) реакции Троммера.

Слюну разводят в мерном цилиндре в 5 раз. В чистую пробирку отливают 2–3 мл разведенной слюны и кипятят ее в течение 5–8 минут, после чего охлаждают. В 3 пробирки наливают по 10 капель 1%-ного раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 10 капель слюны, разведенной в 5 раз, во вторую — 10 капель прокипяченной слюны, в третью — 10 капель воды (в качестве контроля). Все пробирки помещают в водяную баню при температуре 38° на 10 минут. После чего проводят качественные реакции на крахмал и продукты расщепления.

**РЕАКЦИЯ НА КРАХМАЛ:** к 5 каплям исследуемого раствора приливают 1 каплю раствора йода в йодистом калии. В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

**РЕАКЦИЯ ТРОММЕРА:** к 5 каплям исследуемой жидкости прибавляют 5 капель 2н раствора едкого натра и 5 капель 1%-го раствора сернокислой меди, нагревают. В присутствии глюкозы и мальтозы выпадает желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

## **Опыт 2. Специфичность ферментов**

Одно из наиболее характерных свойств ферментов — их высокая специфичность. Ферменты специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов, на которые они воздействуют. Некоторые ферменты обладают абсолютной специфичностью, действуя только на какой-либо один субстрат. Высокая специфичность ферментов определяется тем, что только некоторые, строго определенные функциональные группы, входящие в состав ферментов, могут участвовать в образовании ферментсубстратных комплексов.

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на дисахариды. Мальтаза слюны ускоряет гидро-

лиз дисахарида мальтозы, образующегося при гидролизе крахмала, но не оказывает никакого действия на другой дисахарид — сахарозу.

Сахароза не имеет свободной альдегидной или кетонной группы, поэтому не дает реакции Троммера. Реакция Троммера может быть положительной только в том случае, если сахароза расщепится на свои составные части — глюкозу и фруктозу.

В две пробирки приливают по 5 капель слюны, разведенной в 5 раз. В первую пробирку добавляют 10 капель 1%-го раствора крахмала, во вторую — 10 капель 1%-го раствора сахарозы. Обе пробирки помещают на 10 минут в водяную баню при температуре 38°, после чего с их содержимым проделывают реакцию Троммера на углеводы.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 3. Влияние активаторов и парализаторов на активность амилазы слюны**

Активность некоторых ферментов зависит от природы и концентрации ионов, присутствующих в реакционной среде, некоторые ионы абсолютно необходимы для нормального развития ряда ферментов. Вещества, усиливающие действие ферментов, называются *активаторами*. Активаторы стимулируют действие ферментов, но в отличие от коферментов не принимают участия в реакции, возможно, активаторы нужны для сохранения конформации белка, обуславливающей его оптимальные каталитические возможности.

*Ингибиторами (парализаторами)* называются вещества, снижающие скорость ферментативных реакций. Ингибирование действия ферментов может происходить в том случае, если с активным центром фермента вместо специфического субстрата соединяется близкий структурный аналог субстрата, т. е. вещество, близкое по строению к субстрату (это называется конкурентным торможением). Активность амилазы слюны усиливается в присутствии хлористого натрия — специфического активатора амилазы. Сернокислая медь оказывает тормозящее действие на активность амилазы. Если добавить к смеси, содержащей слюну и крахмал, в одном случае хлористый натрий, в другом — сернокислую медь и в третьем — воду (кон-

трольная проба), то за один и тот же промежуток времени в первой пробирке произойдет полное расщепление крахмала, в третьей — распад его только до декстринов, а во второй обнаружится нерасщепленный крахмал. Крахмал и декстрины открывают реакцией с раствором йода.

В три пробирки приливают по 3 мл раствора слюны, разведенной в 1:3. В первую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора NaCl, во вторую — 1 каплю 1%-го раствора  $\text{CuSO}_4$ , в третью — 1 каплю воды. После этого в каждую пробирку приливают по 5 капель 1%-ного раствора крахмала. Все три пробирки оставляют при комнатной температуре на 1—3 минуты. С содержимым каждой пробирки проделывают реакцию на крахмал, приливая по одной капле раствора йода в йодистом калии.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Химическая природа ферментов.
2. Что называется термолабильностью и специфичностью ферментов?
3. Классификация ферментов.
4. Кинетика ферментативных реакций.
5. Структура фермента.
6. Общие представления об обмене углеводов.
7. Превращения углеводов в пищеварительной системе.
8. Синтез гликогена из глюкозы (гликогенез).
9. Гликогенолиз.
10. Гликолиз.

## **Практическое занятие 7**

### **Качественные реакции на водорастворимые витамины**

*Цель:* изучение свойств водорастворимых витаминов.

#### **Общие сведения**

К витаминам относятся вещества различного химического строения. Всех их объединяет то, что они необходимы для нормального течения процессов обмена веществ и не синтезируются в организме человека (а если некоторые из них и синтезируются, то в недостаточном количестве).

Водорастворимые витамины — это витамины, которые поступают в организм с пищей, растворяются в воде и выводятся из организма. По этой причине наш организм не может хранить избыточное количество таких витаминов для последующего использования и их нужно постоянно пополнять.

Основными источниками витаминов являются ягоды, фрукты, овощи, грибы, дрожжи, а также молочные продукты, мясо, рыба, другие пищевые вещества.

Отсутствие витаминов в пище приводит к развитию различных заболеваний, которые называются авитаминозами. Витамины делятся на растворимые в воде и растворимые в жирах.

#### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт 1. Качественная реакция на тиамин (витамин В<sub>1</sub>)**

Тиамин состоит из производных пиримидина и тиазола. Тиамин (солянокислый) — бесцветное кристаллическое вещество. Содержится тиамин в хлебе из муки грубого помола, в крупах, горохе, фасоли и многих других продуктах. Очень много тиамина в пивных

и пекарских дрожжах. Качественная реакция на витамин  $B_1$  основана на окислении его в щелочной среде железосинеродистым калием. В результате реакции образуется тиохром, обладающий голубой флюоресценцией.

Небольшое количество тиамина — на кончике стеклянной палочки — растворяют в очень небольшом объеме воды, приливают 5 капель 5%-го раствора железосинеродистого калия, 5 капель 30%-го раствора едкого натра и перемешивают. Приливают 15 капель изобутилового спирта, хорошо взбалтывают. Верхний спиртовой слой при помощи пипетки переносят в сухую пробирку и наблюдают голубую флюоресценцию раствора в ультрафиолетовых лучах.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 2. Качественная реакция на рибофлавин (витамин $B_2$ )**

Рибофлавин распространен во всех животных и растительных тканях, находится в них как в свободном состоянии, так и в виде комплексов с белками, разрушающимися под действием ферментов. Большое количество рибофлавина содержится в бобовых растениях, в печени, почках, сердечной мышце млекопитающих. Особенно много рибофлавина в дрожжах, имеется он и в коровьем молоке, молочных продуктах, яйцах, крупах, хлебе из муки грубого помола. Определенное количество рибофлавина образуется в кишечнике человека под действием микроорганизмов. Реакция на витамин  $B_2$  основана на способности его легко восстанавливаться. Раствор витамина  $B_2$ , обладающий желтой краской, при восстановлении приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витамина  $B_2$  бесцветна.

В пробирку наливают 10 капель раствора витамина  $B_2$ , добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают зернышко металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

**Опыт 3. Качественная реакция на витамин В<sub>6</sub>**

Пиридоксол (или пиридоксин) — бесцветное кристаллическое вещество. Содержится в мясе, рыбе, горохе, яичном желтке и в зеленой части растений. Витамин В<sub>6</sub> с хлорным железом образует соединение типа фенолята железа, окрашенное в красный цвет.

К 5 каплям 1%-го раствора витамина В<sub>6</sub> приливают такое же количество 1%-го раствора хлорного железа, перемешивают. Развивается красное окрашивание.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

**Опыт 4. Качественная реакция на аскорбиновую кислоту (витамин С)**

Аскорбиновая кислота содержится в ягодах, фруктах, овощах. Реакция на аскорбиновую кислоту основана на ее способности окисляться и восстанавливать такие вещества, как железосинеродистый калий, молекулярный йод и другие. При помощи качественной реакции на аскорбиновую кислоту можно установить, содержится ли этот витамин в лекарственных препаратах, в продуктах питания.

К 5 каплям 1%-го раствора витамина С приливают 1 каплю 10%-го раствора едкого натра и 1 каплю 5%-го раствора железосинеродистого калия, перемешивают, после чего добавляют 3 капли 10%-го раствора соляной кислоты и 1 каплю 1%-го раствора хлорного железа. Выпадает синий осадок берлинской лазури. Для контроля проделывают те же реакции, добавляя вместо раствора витамина С дистиллированную воду. В этом случае берлинская лазурь не образуется.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Общая характеристика витаминов. Роль витаминов.
2. Классификация витаминов.
3. Водорастворимые витамины и их биохимические названия.
4. Жирорастворимые витамины и их биохимические названия.
5. Причины возникновения дефицита витаминов в организме.
6. Основные источники витаминов в питании.
7. Пентозный цикл окисления углеводов.
8. Глюконеогенез.
9. Превращение липидов в процессе пищеварения.
10. Окисление глицерина.

### **Практическое занятие 8**

#### **Качественные реакции на жирорастворимые витамины**

*Цель:* изучение свойств жирорастворимых витаминов.

#### **Общие сведения**

**Жирорастворимые витамины** — это А, Е, D и К. Избыток этих веществ может быть вреден из-за их свойства откладываться в жировых клетках и в печени и при определенных условиях провоцировать гипervитаминозы. Основными источниками жирорастворимых витаминов являются молочные продукты, мясо, рыба, другие пищевые вещества.

Отсутствие витаминов в пище приводит к развитию различных заболеваний, которые называются авитаминозами.

#### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

### **Опыт 1. Качественная реакция на ретинол (витамин А) с концентрированной серной кислотой**

Известны два вида витамина А: витамин А<sub>1</sub> — из печени морских рыб и витамин А<sub>2</sub> — из печени пресноводных рыб, из каротина, содержащегося в растениях и овощах.

Витамин А накапливается в печени. Много витамина А содержится в рыбьем жире, в печени трески, палтуса, морского окуня, других рыб, в говяжьей печени, желтках яиц, коровьем масле.

Присутствие витамина А в рыбьем жире можно открыть при помощи реакции с концентрированной серной кислотой. Если рыбий жир содержит витамин А, то при добавлении серной кислоты, обладающей водоотнимающим свойством, возникает фиолетово-красное окрашивание, быстро переходящее в бурое. Реакция неспецифична.

В сухую пробирку внести 5 капель раствора рыбьего жира в хлороформе и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Образуется красно-фиолетовое окрашивание.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 2. Качественная реакция на кальциферол (витамин Д)**

Витамин Д существует в виде нескольких изомеров. Различные кальциферолы отличаются друг от друга своей биологической активностью. Наиболее распространены эргокальциферол и холекальциферол (витамины Д<sub>2</sub> и Д<sub>3</sub>).

Наибольшее количество витамина Д содержится в рыбьем жире, икре рыб, имеется он в коровьем масле, желтках яиц и некоторых других продуктах.

Реакцией на витамин Д можно установить содержание его в данном препарате, например в рыбьем жире. При добавлении раствора брома в хлороформе к рыбьему жиру, содержащему витамин Д, наблюдается зеленовато-голубоватое окрашивание.

В сухую пробирку внести 2 капли концентрата витамина Д (или рыбьего жира) и 4 капли раствора брома в хлороформе. Содержимое

пробирки перемешать. Через некоторое время наблюдается зеленоватое окрашивание. Реакция неспецифична.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 3. Качественная реакция на токоферол (витамин Е)**

Витамин Е существует в виде нескольких изомеров:  $\alpha$ - и  $\beta$ -токоферолов. Изомеры отличаются друг от друга в основном порядком расположения метильных групп в бензольном кольце. Токоферолы — маслянистые жидкости, растворимые в растительных маслах и в жировых растворителях. Растительные масла — подсолнечное, кукурузное, оливковое и др. — являются хорошим источником витамина Е.

Спиртовой раствор витамина Е в присутствии концентрированной азотной кислоты окисляется до хиноидного соединения, окрашенного в красный цвет.

В сухую пробирку внести 5 капель 0,1%-го раствора витамина Е, добавить несколько крупинок сахарозы и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Перемешать стеклянной палочкой. Постепенно развивается красное окрашивание.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Пути устранения из организма аммиака.
2. Биологическая роль минеральных веществ.
3. Обмен минеральных веществ и его регуляция.
4. Биологическая роль и состояние воды в организме.
5. Обмен воды и его регуляция.
6. Взаимосвязь процессов обмена углеводов, жиров, белков.
7. Нервная и гормональная регуляция обмена веществ.
8. Ресинтез АТФ в креатинфосфокиназной реакции.
9. Ресинтез АТФ в миокиназной реакции.
10. Ресинтез АТФ в аэробном процессе.

## **Практическое занятие 9**

### **Качественные реакции на гормоны, производные пептидов**

*Цель:* изучение свойств гормонов.

#### **Общие сведения**

Гормоны — биологически активные вещества, оказывающие регуляторное влияние на обмен веществ в ничтожно малых количествах и обладающие высокой специфичностью.

Влияние гормонов на обмен веществ проявляется различными путями. Гормоны могут изменять скорость ферментативных реакций, влиять на биосинтез белков-ферментов, на проницаемость клеточных структур и т. п. Гормоны способствуют поддержанию постоянства внутренней среды (гомеостаза), например сахара крови, минеральных веществ, воды и т. п. Гормоны участвуют в размножении и росте, в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т. п. Гормоны принадлежат к различным классам органических соединений, синтезируемых в эндокринных железах внутренней секреции.

#### **Алгоритм выполнения**

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### **Опыт 1. Гормон поджелудочной железы — инсулин**

Гормон поджелудочной железы — инсулин получил свое название потому, что он вырабатывается в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса (лат. *insula* — остров). Инсулин является простым белком.

1. Реакция Геллера. К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем (10 капель) раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом  $45^\circ$

так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

2. Биуретовая реакция. К 10 каплям инсулина добавляют 5 капель 10%-ного раствора едкого натра и 1 каплю 1%-ного раствора сернокислой меди. Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

3. Реакция Фоля. К 5 каплям раствора инсулина приливают 5 капель реактива Фоля и кипятят. Через 1–2 минуты при стоянии появляется бурый или черный осадок сернистого свинца.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Опыт 2. Качественная реакция на адреналин с хлорным железом**

Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адrenoхрома, вследствие чего раствор окрашивается в красный цвет. Адреналин с нитритом дает желто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом — красное и с хлорным железом — зеленое.

Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина.

В пробирку наливают 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю хлорного железа. Наблюдается зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. Добавив одну каплю 10%-го раствора едкого натра, наблюдаем вишневое окрашивание.

*Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Определение гормонов.
2. Общая характеристика гормонов. Роль гормонов.
3. Гормоны гипофиза и эпифиза.
4. Гормоны щитовидной, парашитовидной и вилочковой желез.
5. Гормоны надпочечников, половых и поджелудочной желез.

## Практическое занятие 10

### Качественные реакции на гормоны щитовидной железы

*Цель:* изучение свойств гормонов.

#### Общие сведения

Влияние гормонов на обмен веществ проявляется различными путями. Гормоны могут изменять скорость ферментативных реакций, влиять на биосинтез белков-ферментов, на проницаемость клеточных структур и т. п. Гормоны способствуют поддержанию постоянства внутренней среды (гомеостаза), например сахара крови, минеральных веществ, воды и т. п. Гормоны участвуют в размножении и росте, в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т. п. Гормоны принадлежат к различным классам органических соединений, синтезируемых в эндокринных железах внутренней секреции.

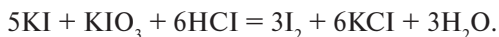
#### Алгоритм выполнения

1. Изучить материал по заданной теме (цель, общие вопросы, порядок проведения опытов).
2. Ответить на контрольные вопросы.
3. Провести эксперимент (опыты).
4. Оформить письменно отчет, где отразить: название работы, ход проведения эксперимента (опытов), полученные результаты в виде реакций, таблиц и схем, выводы.

#### Опыт 1. Гормон щитовидной железы — тироксин

В щитовидной железе вырабатывается гормон тироксин, оказывающий сильное гормональное действие. Гормон содержит свыше 60 % йода. В организме тироксин образуется из аминокислоты тирозина, через стадию образования двух молекул дийодтирозина. Качественная реакция на тироксин связана с открытием в нем йода.

При разрушении тироксина образуется йодистый калий, из которого йод легко вытесняется йодноватым калием. Выделившийся свободный йод дает синее окрашивание с крахмалом:



### 1. Щелочной гидролиз тиреоидина.

В ступку помещают 5 таблеток тиреоидина и тщательно их растирают. Растертую массу пересыпают в колбочку для гидролиза, добавляют 5 мл 10%-го раствора  $\text{NaHCO}_3$  и 5 мл дистиллированной воды. Колбочку помещают на асбестовую сетку и содержимое колбочки кипятят в течение 10–15 минут.

### 2. Открытие йода в полученном гидролизате.

К 24 каплям охлажденного гидролизата прибавляют 10%-ный раствор серной кислоты до кислой реакции на лакмус. После подкисления добавляют 3 капли 1%-го раствора крахмала и 5–10 капель 2%-го раствора йодноватого калия (не следует добавлять с избытком). Выделившийся йод дает синее окрашивание с крахмалом.

### *Задачи:*

1. Провести опыт согласно описанию.
2. Оформить результаты опыта в виде реакций, схем или таблиц.
3. По результатам опыта сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Характеристика гормонов производных аминокислот.
2. Характеристика стероидных гормонов.
3. Биосинтез триглицеридов.
4. Окисление жирных кислот.
5. Обмен холестерина. Синтез жирных кислот.

## **Вопросы для итогового контроля по дисциплине**

1. Определение и роль биохимических методов исследований.
2. Химический состав организма.
3. Общая характеристика и классификация углеводов.
4. Строение и химические свойства моносахаридов.
5. Строение и химические свойства олигосахаридов.
6. Строение и химические свойства полисахаридов.
7. Общая характеристика и классификация липидов.
8. Биологическое значение липидов.
9. Характеристика жирных кислот.
10. Строение и физико-химические свойства глицеридов.
11. Фосфолипиды и их роль в животном организме.
12. Характеристика стероидов.
13. Определение и функции белков.
14. Химический состав белка.
15. Строение и свойства аминокислот.
16. Строение белков.
17. Классификация белков. Характеристика простых белков.
18. Химические свойства белков.
19. Характеристика сложных белков.
20. Структурные элементы нуклеиновых кислот.
21. Строение ДНК.
22. Строение РНК.
23. Биологическая роль ДНК и РНК.
24. Строение нуклеотидов и их роль в обмене веществ.
25. Характеристика ферментов. Кинетика ферментативных реакций.

26. Структура фермента.
27. Классификация ферментов.
28. Общая характеристика витаминов.
29. Классификация витаминов.
30. Характеристика основных витаминов и их роль в обмене веществ.
31. Причины возникновения дефицита витаминов в организме.
32. Основные источники витаминов в питании.
33. Общая характеристика гормонов.
34. Характеристика гормонов производных аминокислот.
35. Характеристика стероидных гормонов.
36. Понятие об обмене веществ. Возрастные изменения обмена веществ.
37. Адаптационные изменения обмена веществ.
38. Основные разновидности обмена веществ.
39. Методы изучения обмена веществ.
40. Основные положения регуляции обмена веществ.
41. Биологическое окисление и процессы энергетического сопряжения.
42. Роль АТФ в процессе накопления и переноса энергии.
43. Образование АТФ в процессах биологического окисления.
44. Митохондрии — внутриклеточные биохимические машины.
45. Общие представления об обмене углеводов.
46. Превращения углеводов в пищеварительной системе.
47. Синтез гликогена из глюкозы (гликогенез).
48. Гликогенолиз.
49. Гликолиз.

50. Пентозный цикл окисления углеводов.
51. Анаэробное образование янтарной кислоты.
52. Глюконеогенез.
53. Превращение липидов в процессе пищеварения.
54. Окисление глицерина.
55. Биосинтез триглицеридов.
56. Окисление жирных кислот.
57. Обмен холестерина. Синтез жирных кислот.
58. Общие представления об обмене белков.
59. Пищеварение белков.
60. Синтез белков.
61. Синтез нуклеиновых кислот.
62. Внутриклеточный распад белков.
63. Внутриклеточные превращения аминокислот.
64. Пути устранения из организма аммиака.
65. Биологическая роль минеральных веществ.
66. Обмен минеральных веществ и его регуляция.
67. Биологическая роль и состояние воды в организме.
68. Обмен воды и его регуляция.
69. Взаимосвязь процессов обмена углеводов, жиров, белков.
70. Нервная и гормональная регуляция обмена веществ.
71. Ресинтез АТФ в креатинфосфокиназной реакции.
72. Ресинтез АТФ в миокиназной реакции.
73. Ресинтез АТФ в аэробном процессе.

## Библиографический список

1. Авдеева, Л.В. Биохимия : учебник / Л.В. Авдеева, Т.Л. Алейникова, Л.Е. Андрианова. — М. : ГЭОТАР-МЕД, 2013. — 768 с.
2. Артемова, Э.К. Биохимия : учеб. пособие для самост. работы студентов институтов физической культуры / Э.К. Артемова. — М. : Советский спорт, 2006. — 72 с.
3. Баишев, И.М. Биохимия. Тестовые вопросы : учеб. пособие / Д.М. Зубаиров, И.М. Баишев, Р.Ф. Байкеев ; под ред. Д.М. Зубаирова. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 960 с.
4. Чиркин, А.А. Биохимия филогенеза и онтогенеза : учеб. пособие / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, С.Б. Бокуть ; под общ. ред. А.А. Чиркина. — М. : ИНФРА-М ; Минск : Нов. знание, 2012. — 288 с.
5. Бородин, А.П. Биохимия животных : учеб. пособие / А.П. Бородин. — СПб. : Лань, 2015. — 384 с.
6. Гидранович, В.И. Биохимия : учеб. пособие / В.И. Гидранович, А.В. Гидранович. — Минск : ТетраСистемс, 2012. — 528 с.
7. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов : учебник / К.К. Горбатова. — СПб. : ГИОРД, 2015. — 336 с.
8. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова. — СПб. : ГИОРД, 2010. — 336 с.
9. Гунькова, П.И. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова ; под общ. ред. К.К. Горбатовой. — СПб. : ГИОРД, 2010. — 336 с.
10. Данилова, Л.А. Биохимия : учеб. пособие / Л.А. Данилова, Н.А. Чайка. — СПб. : СпецЛит, 2012. — 62 с.
11. Димитриев, А.Д. Биохимия : учеб. пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. — М. : Дашков и К, 2013. — 168 с.
12. Ершов, Ю.А. Биохимия человека : учебник для академич. бакалавриата / Ю.А. Ершов. — Люберцы : Юрайт, 2016. — 374 с.
13. Зезеров, Е.Г. Биохимия (общая, медицинская и фармакологическая) : курс лекций / Е.Г. Зезеров. — Ереван : МИА, 2014. — 456 с.
14. Капилевич, Л.В. Биохимия человека : учеб. пособие для вузов / Л.В. Капилевич, Е.Ю. Дьякова, Е.В. Кошельская. — Люберцы : Юрайт, 2016. — 151 с.

15. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман. — М. : Бином. Лаборатория знаний, 2011. — 469 с.
16. Комов, В.П. Биохимия : учебник / В.П. Комов, В.Н. Шведова. — Люберцы : Юрайт, 2015. — 640 с.
17. Конопатов, Ю.В. Биохимия животных : учеб. пособие / Ю.В. Конопатов, С. Васильева. — СПб. : Лань, 2015. — 384 с.
18. Лаундес, Л. Биохимия / Л. Лаундес. — М. : Добрая книга, 2016. — 320 с.
19. Марри, Р. Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри. — М. : Мир, 2009. — Т. 1, 2. — 795 с.
20. Маршалл, В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл. — М. : Бином, 2011. — 408 с.
21. Михайлов, С.С. Спортивная биохимия : учебник для вузов и колледжей физич. культуры / С.С. Михайлов. — М. : Сов. спорт, 2012. — 348 с.
22. Новиков, Н.Н. Биохимия растений / Н.Н. Новиков. — М. : Ленанд, 2014. — 680 с.
23. Новокшанова, А.Л. Биохимия для технологов : учебник и практикум для академического бакалавриата / А.Л. Новокшанова. — Люберцы : Юрайт, 2015. — 508 с.
24. Репников, Б.Т. Биохимия рыбных товаров : учеб. пособие / Б.Т. Репников. — М. : Дашков и К, 2013. — 220 с.
25. Рогожин, В.В. Биохимия сельскохозяйственной продукции : учебник / В.В. Рогожин. — СПб. : ГИОРД, 2014. — 544 с.
26. Рогожин, В.В. Биохимия животных / В.В. Рогожин. — СПб. : ГИОРД, 2009. — 552 с.
27. Рогожин, В.В. Биохимия мышц и мяса : учеб. пособие для вузов / В.В. Рогожин. — СПб. : ГИОРД, 2009. — 240 с.
28. Рогожин, В.В. Биохимия растений : учебник / В.В. Рогожин. — СПб. : ГИОРД, 2012. — 432 с.
29. Рогожин, В.В. Практикум по биохимии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / В.В. Рогожин. — СПб. : Лань, 2013. — 539 с.
30. Северин, Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. — М. : МЕДИЦИНА +, 2000. — 168 с.
31. Таганович, А.Д. Патологическая биохимия / А.Д. Таганович. — М. : Бином, 2013. — 448 с.

32. Хельд, Б. Биохимия растений / Б. Хельд. — М. : Бином. Лаборатория знаний, 2011. — 471 с.
33. Чиркин, А.А. Биохимия : учеб. руководство / А.А. Чиркин. — Витебск : Медицинская литература, 2010. — 624 с.
34. Щербаков, В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья / В.Г Щербаков, В.Г. Лобанов. — СПб. : Профессия, 2012. — 392 с.
35. Щербаков, В.Г. Биохимия / В.Г. Щербаков. — СПб. : ГИОРД, 2009. — 472 с.
36. Яржомбек, А.А. Биохимия сырья водного происхождения / А.А. Яржомбек, Л.С. Байдалинова. — М. : МОРКНИГА, 2011. — 506 с.