

А. Л. Новокшанова

БИОХИМИЯ ДЛЯ ТЕХНОЛОГОВ

Часть 1

УЧЕБНИК И ПРАКТИКУМ ДЛЯ АКАДЕМИЧЕСКОГО
БАКАЛАВРИАТА

2-е издание, исправленное

*Рекомендовано Учебно-методическим отделом высшего образования
в качестве учебника и практикума для студентов высших учебных
заведений, обучающихся по естественнонаучным направлениям*

*Рекомендовано Учебно-методическим объединением по образованию
в области технологии сырья и продуктов животного происхождения
в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся
по направлению подготовки «Продукты питания животного
происхождения» уровня бакалавриата и специальности «Технология
молока и молочных продуктов»*

Книга доступна в электронной библиотечной системе
biblio-online.ru

Москва ■ Юрайт ■ 2016

Автор:

Новокшанова Алла Львовна — доцент, кандидат технических наук, доцент кафедры химии и физики технологического факультета Вологодской государственной молочнохозяйственной академии имени Н. В. Верещагина.

Рецензенты:

Свириденко Ю. Я. — доктор биологических наук, профессор, академик РАСХН, директор ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии;

Абдуллаева Л. В. — кандидат технических наук, руководитель группы стандартизации Молочного союза России, ответственный секретарь ТК 470/МТК 532 «Молоко и продукты переработки молока», национальный секретарь Российского комитета Международной молочной федерации.

Новокшанова, А. Л.

Н74 Биохимия для технологов. В 2 ч. Часть 1 : учебник и практикум для академического бакалавриата / А. Л. Новокшанова. — 2-е изд., испр. — М. : Издательство Юрайт, 2016. — 211 с. — Серия : Бакалавр. Академический курс.

ISBN 978-5-9916-8943-4 (ч. 1)

ISBN 978-5-9916-8944-1

Современные достижения биохимии составляют основу любой пищевой технологии, поэтому специалисты по производству и переработке продуктов питания должны иметь целостное представление о процессах и явлениях, происходящих в природе, о компонентном составе живой клетки, роли белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и других биомолекул в функционировании организма. Главная цель учебника — сформировать у студентов твердые знания об особенностях и многообразии обмена веществ, о взаимосвязи метаболизма макромолекул на субстратном, энергетическом и генетическом уровнях, что позволит решать задачи, возникающие при выполнении профессиональных функций.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования.

Для студентов академического и прикладного бакалавриата, изучающих курс «Биохимия» по направлению подготовки «Продукты питания животного происхождения» и профилю «Технология молока и молочных продуктов», а также для студентов, обучающихся по направлениям подготовки «Биотехнология», «Продукты питания из растительного сырья», «Технология продукции и организация общественного питания», «Стандартизация и метрология», «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», специалистов при повышении квалификации, обучении в магистратуре и аспирантуре.

УДК 54(075.8)

ББК 28.072я73



Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

ISBN 978-5-9916-8943-4 (ч. 1)
ISBN 978-5-9916-8944-1

© Новокшанова А. Л., 2014
© Новокшанова А. Л., 2016, с изменениями
© ООО «Издательство Юрайт», 2016

Оглавление

Перечень принятых сокращений	5
Предисловие.....	7
Глава 1. Определение и предмет исследования биохимии	10
1.1. Предмет и задачи биохимии.....	10
1.2. История и современные тенденции развития биохимических исследований.....	12
1.3. Методы практической биохимии	17
1.4. Практические примеры.....	25
<i>Задания для самостоятельной работы</i>	27
Глава 2. Химический состав живых организмов.....	29
2.1. Элементный состав живых организмов	29
2.2. Молекулярный состав живых организмов	31
2.2.1. Вода.....	32
2.2.2. Неорганические вещества.....	40
2.2.3. Органические вещества	41
2.3. Практический пример	41
<i>Задания для самостоятельной работы</i>	42
Глава 3. Аминокислоты	46
3.1. Классификация аминокислот.....	52
3.2. Физико-химические свойства аминокислот	54
3.3. Пептиды.....	59
3.4. Практические примеры.....	63
<i>Задания для самостоятельной работы</i>	64
Глава 4. Белковые вещества.....	69
4.1. Строение белковых молекул.....	70
4.1.1. Первичная структура.....	70
4.1.2. Вторичная структура.....	74
4.1.3. Третичная структура	78
4.1.4. Четвертичная структура.....	80
4.2. Физико-химические характеристики белков	81
4.2.1. Амфотерные и буферные свойства.....	81
4.2.2. Гидрофильные свойства.....	83
4.2.3. Способы осаждения белков.....	84
4.2.4. Коллоидные свойства.....	85
4.3. Номенклатура и классификация белков	87
4.4. Особенности белков молока.....	91
4.4.1. Казеины.....	92
4.4.2. Сывороточные белки.....	96
4.4.3. Белки оболочек жировых шариков	98
4.4.4. Минорные белки.....	99
4.5. Практические примеры.....	99
<i>Задания для самостоятельной работы</i>	101
Глава 5. Нуклеиновые кислоты	107
5.1. Состав нуклеиновых кислот	108
5.2. Структуры нуклеиновых кислот	109

5.2.1. Структурные звенья нуклеиновых кислот.....	110
5.2.2. Первичная структура нуклеиновых кислот.....	112
5.2.3. Вторичная структура ДНК.....	113
5.2.4. Третичная структура ДНК.....	116
5.3. Виды РНК.....	118
5.4. Практические примеры.....	121
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>123</i>
Глава 6. Ферменты.....	126
6.1. Строение ферментов.....	127
6.2. Кинетика ферментативных реакций.....	130
6.3. Механизм ферментативного действия.....	134
6.3.1. Механизм действия простых ферментов.....	134
6.3.2. Механизм действия сложных ферментов.....	135
6.4. Регуляция активности ферментов.....	139
6.5. Свойства ферментов.....	141
6.5.1. Специфичность ферментативного действия.....	142
6.5.2. Термоллабильность ферментов.....	142
6.5.3. Влияние pH среды на активность ферментов.....	144
6.5.4. Влияние посторонних веществ на активность ферментов.....	145
6.6. Иммуобилизованные ферменты.....	146
6.7. Номенклатура и классификация ферментов.....	147
6.7.1. Оксидоредуктазы.....	148
6.7.2. Трансферазы.....	155
6.7.3. Гидролазы.....	157
6.7.4. Лиазы.....	162
6.7.5. Изомеразы.....	163
6.7.6. Лигазы (синтетазы).....	165
6.8. Практические примеры.....	166
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>169</i>
Глава 7. Витамины.....	174
7.1. Жирорастворимые витамины.....	176
7.2. Водорастворимые витамины.....	181
7.3. Витаминоподобные соединения.....	189
7.4. Содержание витаминов в молоке и молочных продуктах.....	192
7.5. Практические примеры.....	193
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>194</i>
Глава 8. Гормоны.....	199
8.1. Уровни гормональной регуляции.....	199
8.2. Классификация и механизм действия гормонов.....	200
8.3. Гормоны гипоталамуса.....	201
8.4. Гормоны гипофиза.....	201
8.5. Гормоны периферических желез.....	202
8.5.1. Щитовидная железа.....	202
8.5.2. Паращитовидные железы.....	203
8.5.3. Поджелудочная железа.....	203
8.5.4. Надпочечники.....	204
8.5.5. Половые железы.....	205
8.5.6. Гормоны желудочно-кишечного канала.....	206
8.6. Гормоноподобные соединения.....	206
8.7. Экзогенные гормоны.....	207
8.8. Практические примеры.....	208
<i>Задания для самостоятельной работы.....</i>	<i>209</i>

Перечень принятых сокращений

АДГ	— антидиуретический гормон
АДФ	— аденозиндифосфат (аденозиндифосфорная кислота)
АКТГ	— адренокортикотропный гормон
АМФ	— аденозинмонофосфат (аденозинмонофосфорная кислота)
АО	— азотистые основания
АПБ	— ацилпереносящий белок
АТФ	— аденозинтрифосфат (аденозинтрифосфорная кислота)
АФК	— активные формы кислорода
ВЖК	— высшая жирная кислота
ВМС	— высокомолекулярные соединения
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ГМО	— генетически модифицированные организмы
ГМП	— гликомакропептид
ДАГ	— диацилглицерид (диглицерид)
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКК	— желудочно-кишечный канал
ИДЗ	— иоддефицитные заболевания
ИЭТ	— изоэлектрическая точка
КоА	— кофермент А
ЛП	— липопротеины
ЛПВН	— липопротеины высокой плотности
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	— липопротеины очень низкой плотности
МАГ	— моноацилглицерид (моноглицерид)
ММФ	— Международная молочная федерация
МНЖК	— моновенасыщенные жирные кислоты
НАД ⁺	— никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НЖК	— низшая жирная кислота
НК	— нуклеиновая кислота
НП	— нуклеопротеин
ПВК	— пировиноградная кислота
ПОЛ	— пероксидное окисление липидов
ПНЖК	— полиненасыщенные высшие жирные кислоты
ПФЦ	— пентозофосфатный цикл
РНК	— рибонуклеиновая кислота
СЖК	— свободные жирные кислоты
СОД	— супероксиддисмутаза
ССЗ	— сердечно-сосудистые заболевания
T ₃	— трийодтиронин
T ₄	— тироксин (тетрайодтиронин)
ТАГ	— триацилглицерид (триглицерид)
ТПФ	— тиаминпирофосфат
УВТ	— ультравысокотемпературный

УМФ	— уридинмонофосфат
ФГА	— фосфоглицериновый альдегид
(3-ФГА)	
ФГК	— фосфоглицериновая кислота
ФМН	— флаavinмононуклеотид
ФАД	— флаvинадениндинуклеотид
цАМФ	— циклический аденозинмонофосфат
ЦМФ	— цитидинмонофосфат
ЦНС	— центральная нервная система
ЦПЭ	— цепь переноса электронов
ЦТК	— цикл трикарбоновых кислот
ЩУК	— щавелевоуксусная кислота
ЭПС	— эндоплазматическая цепь
ЭТЦ	— электронотранспортная цепь
$\bar{e}$	— электрон
H^+	— ион водорода (протон)
Нб	— гемоглобин
NANA	— N-ацетилнейраминовая кислота

Предисловие

Биологическая химия — наука о качественном составе, количественном содержании и преобразованиях в жизненных процессах соединений, образующих живую материю.

Изначально находясь на стыке двух наук, сегодня биохимия все больше расширяет область научных интересов и постоянно наращивает свой потенциал, который служит фундаментальной базой для многих наук. Современная биохимия успешно интегрируется в такие области знания, как физиология, генетика, цитология, микробиология, медицина, молекулярная биология, нутрициология и др.

Реальность последних десятилетий отличается интенсивной химизацией сельского хозяйства, промышленности, быта и пищевых технологий. Возрастание антропогенных нагрузок, значительное вмешательство в природу, ускорение ритма жизни, стрессы, нарушения питания привели к тому, что, по данным ВОЗ, треть всех заболеваний человека являются алиментарно-зависимыми.

В связи с этим студентам, обучающимся по любому из направлений подготовки, которое связано с производством пищевых продуктов, при изучении биохимии крайне важно получить конкретные представления о компонентах живой клетки, их химическом строении, физических свойствах, функциях, а также о механизмах различного химического воздействия на живой организм.

Данный учебник отличается комплексным подходом к изучаемой дисциплине.

В теоретическом разделе (главы 1—14) излагается информация, соответствующая содержанию дисциплины «Биохимия». Для облегчения восприятия материалов текст сопровождается таблицами, схемами и иллюстрациями, а большинство описываемых процессов подтверждается уравнениями реакций.

Рассмотрение механизмов действия ферментов позволит студентам увидеть те же закономерности химических превращений веществ, с которыми они знакомились при изучении реакций в органической химии. Но знание биологического окисления, нуклеиновых кислот и их функционирования показывает совершенно другой, высочайший уровень упорядоченности живой материи на уровне биомолекул. Сведения о гормонах демонстрируют механизм тончайшей согласованности систем всего организма. Понимание закономерностей процессов метаболизма, приводящих к глубокой деструкции макромолекул (катаболизм) или к синтезу их из простейших соединений (анаболизм), позволяет проследить тесную взаимосвязь метаболизма макромолекул на субстратном, энергетическом и генетическом уровнях.

С целью реализации компетентностного подхода каждая теоретическая глава содержит практические примеры решения задач или использования знаний биохимии в технологическом процессе производства пищевых продуктов. Все теоретические главы включают задания для самостоятельной работы, в большинстве своем имеющие прямое отношение к технологии молока и других пищевых продуктов.

Раздел «Лабораторный практикум» непосредственно связан с основными теоретическими положениями, излагаемыми в лекциях, и направлен на то, чтобы максимально расширить научный кругозор студентов по изучаемому предмету. Опыт показывает, чем больше теоретических вопросов охватывает практикум, тем выше уровень усвоения материала. Поэтому обучающимся предлагается достаточно широкий спектр объектов и методов исследования.

В зависимости от темы занятия это могут быть образцы растительных или животных тканей, разные биологические жидкости. В зависимости от подхода к объекту исследования возможно статическое изучение качественного или количественного состава образцов и наблюдение за изменением этих показателей в динамическом развитии.

В практикуме студенты обучаются различной технике лабораторных работ: пробирочным, приборным, расчетным и другим умениям.

Пробирочные работы используются, как правило, в методах качественного анализа. Такие опыты можно проводить небольшими количествами реактивов без ущерба для наглядности. В то же время, операции с небольшими порциями веществ развивают такие навыки, как аккуратность, тщательность, осторожность, соблюдение чистоты, что, несомненно, пригодится в их последующей работе.

Важное место на практических занятиях отводится методам количественного анализа: титриметрическим, электрохимическим, оптическим и др. Овладение классическими химическими методами количественного анализа требует от студентов знания химизма процесса, умения готовить реактивы, рассчитывать концентрации, подбирать индикаторы и пр. Данные работы готовят студентов анализировать и идентифицировать самые разные химические соединения и биологические объекты, что, несомненно, важно для технологов пищевой промышленности.

В качестве инструментальных методов лабораторный практикум содержит примеры использования спектральных, оптических, электрохимических, хроматографических и других методов исследования. Прежде чем работать с приборами, необходимо знать их устройство, принцип работы, освоить инструкцию по эксплуатации.

Целый ряд лабораторных занятий можно проводить с элементами научного практикума, если анализировать различные объекты в разных условиях проведения опытов. К таким занятиям относятся работы к главам: «Химический состав живых организмов», «Аминокислоты», «Белковые вещества», «Ферменты», «Витамины», «Углеводы и их обмен» и др. В таких работах студенты учатся грамотно планировать и проводить эксперимент, а затем тщательно анализировать полученные данные.

Выполнение лабораторных работ не только способствует расширению представлений о роли эксперимента в биохимических исследованиях,

но и четко ориентирует на будущую профессиональную деятельность, а знание биохимии полезно любому грамотному специалисту, имеющему отношение к питанию населения.

Студент, успешно освоивший дисциплину «Биохимия», должен:

знать

- элементный и молекулярный состав живых организмов;
- особенности строения, свойств и функций биомолекул и биополимеров;
- закономерности и тесную взаимосвязь метаболизма белков, липидов, углеводов на субстратном, энергетическом и генетическом уровнях;

уметь

- разъяснять смысл структурных формул биологически активных веществ;
- составлять уравнения химических реакций деструкции и синтеза различных биомолекул;

владеть

- знаниями об особенностях и многообразии обмена веществ и нарушениях в метаболизме белков, липидов, углеводов и т.д.;
- правилами работы с биологическими объектами, химическими веществами и оборудованием биохимической лаборатории.

Автор выражает благодарность своим рецензентам: директору ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии, доктору биологических наук, профессору, академику РАСХН Ю. Я. Свириденко и руководителю группы стандартизации Молочного союза России, национальному секретарю Российского комитета Международной молочной федерации, кандидату технических наук Л. В. Абдуллаевой, сделавшим ценные пожелания при рассмотрении рукописи.

Автор признателен редактору издательства «Юрайт», кандидату физико-математических наук А. Н. Евсеевичевой за высококвалифицированную помощь в подготовке рукописи к печати.

Отдельная благодарность научному редактору журнала «Вопросы питания», старшему научному сотруднику лаборатории витаминов и минеральных веществ ФГБУ «НИИ питания» РАМН, кандидату биологических наук О. А. Вржесинской за консультирование по витаминизации пищевых продуктов.

Также автор считает своим долгом выразить слова благодарности самому известному российскому маслоделу — доктору технических наук, профессору, почетному академику Международной академии холода, лауреату премии Совета министров СССР и Государственной премии России Ф. А. Вышемирскому. Став моим научным руководителем более 20 лет назад, Франц Адамович продолжает оставаться вдохновляющим примером Ученого, Наставника, Человека.

Глава 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ

В результате изучения материала данной главы студент должен:

знать

- основные признаки живой материи;
- этапы развития биохимии;
- деление биохимии с точки зрения подхода и объекта;
- важнейшие методы исследования, применяемые в биохимии;
- теоретические успехи и практические достижения биохимии;
- роль отечественных ученых в развитии биохимии;

уметь

- объяснять сущность методов, используемых в биохимических исследованиях;
- привести примеры достижений биохимии, используемых в народном хозяйстве и в частности — в пищевых технологиях;

владеть

- правилами техники безопасности, простейшими методами и приемами работы в биохимической лаборатории;
 - техникой работы с важнейшим оборудованием, используемым в биохимической лаборатории (весы лабораторные технические и аналитические, бюретки и микро-бюретки, бани водяные, рефрактометры, фотоэлектроколориметры и др.).
-

1.1. Предмет и задачи биохимии

Биохимия изучает качественный и количественный состав и динамические превращения соединений, образующих живые организмы.

Из определения ясно, что биохимия охватывает широкую область научного познания. Живой мир чрезвычайно многообразен. По современным представлениям, на Земле насчитывается около 2 млн видов различных организмов. Все они представляют интерес как объекты исследования для биохимика. В силу такого большого многообразия и больших различий между видами биохимия дифференцировалась на разделы в зависимости от объекта исследования. В настоящее время выделяют биохимию человека, животных, растений, микроорганизмов и др.

С точки зрения химического состава и живые, и неживые объекты образованы атомами и молекулами. Но в живых организмах и маленькие, и большие молекулы, а также целые структуры непрерывно обновляются: распадаются и синтезируются вновь. Только живые организмы способны воспроизводить организмы, подобные своему, и обладают набором характерных признаков:

- высокий уровень структурной организации или высокая степень упорядоченности;
- способность к эффективному использованию и преобразованию различных видов энергии;
- постоянный обмен веществ с окружающей средой;
- самовоспроизведение и передача наследственных свойств.

Поэтому для биохимика недостаточно знать просто набор атомов и молекул, из которых построены организмы.

Предметом исследования биохимии являются качественный и количественный химический состав живых организмов и превращения биологических молекул в процессе жизнедеятельности.

В современной жизни биохимия — одна из самых бурно развивающихся областей знания. Эта относительно молодая наука широко интегрировалась со смежными дисциплинами, такими как биология, физиология, химия, медицина и др. Биохимия берет на вооружение самые новейшие методы исследования и достижения других наук и изучает свой предмет на разных уровнях.

На уровне целостного организма выполняются балансовые эксперименты по поступлению веществ и выведению их в виде продуктов распада. *На уровне отдельных органов и тканей* разработаны многочисленные методы исследования обмена веществ в тканевых срезах или биологических жидкостях (крови, слюне, молоке и др.). Много ценной информации о составе живых организмов и обмене веществ в них получено *на уровне клетки*. Современные методы позволяют использовать *субклеточные структуры и отдельные молекулы*. То есть в настоящее время это тончайшая область исследований — почти молекулярная биология.

Достижения биохимии находят применение в различных прикладных областях и народном хозяйстве в целом, создают прочную базу для решения многих частных проблем. Привлечение знаний биохимии успешно используется в повышении урожайности сельскохозяйственного производства, для увеличения рентабельности пищевой промышленности, получения новых препаратов фармацевтической отрасли. Современная медицина, здравоохранение, экология целиком опираются на биохимические разработки.

Например, исследования, выполненные ВОЗ, о влиянии питания на здоровье населения в качестве аргументов используют новейшие достижения биохимии. По данным этих материалов, около трети всех бюджетов здравоохранения европейских стран тратится на лечение алиментарно-зависимых заболеваний. Такие выводы сделаны на базе обширных эпидемиологических¹ исследований населения европейского региона.

В связи с этим на данном этапе развития общества для биохимии человека и биохимии питания выдвигаются следующие задачи.

¹ Эпидемиологическими называют исследования больших групп населения (несколько десятков тысяч), которые наблюдаются в течение нескольких лет на предмет взаимосвязи потребления какого-либо продукта (или компонента продукта) с частотой заболевания; такие исследования не позволяют судить о причинно-следственных связях, но позволяют оценить риски.

- Определение строения, физико-химических свойств и функций отдельных биологических молекул.
- Изучение механизмов синтеза и распада биологических молекул в организме.
- Исследование механизмов поступления различных веществ во внутреннюю среду организма и выведения продуктов распада из организма.
- Выявление взаимосвязей между отдельными компонентами продуктов и биохимическими показателями организма человека.
- Изучение механизмов преобразования, накопления и использования энергии в клетке.
- Определение механизмов передачи наследственных признаков и воспроизведения подобных себе организмов.
- Изучение влияния антропогенных, алиментарных и других внешних факторов на обмен веществ в организме.

1.2. История и современные тенденции развития биохимических исследований

Само название дисциплины «биохимия» говорит о соединении двух начал — биологии и химии. Каждая из этих наук имеет глубокие корни. Из дошедших до нас документов известно имя Алкмеона, который в VI в. до н. э. описал развитие цыпленка внутри яйца, нервы глаза и тонкие трубочки, соединяющие среднее ухо с глоткой. Следующие поколения анатомов упустили из виду эту информацию и заново открывали ее через две тысячи лет.

Гораздо большую известность получило имя Гиппократ, жившего спустя полтора века после Алкмеона. Основанная Гиппократом медицинская школа пережила его на столетия. В представлении Гиппократа организм сам имеет корректирующие устройства, позволяющие ему работать. Главное — не навреди. Содержи тело в чистоте, питайся простой и здоровой пищей, избегай излишеств.

Одним из самых знаменитых анатомов нашей эры стал Леонардо да Винчи (1452—1519), который делал рассечения животных и человека и, самое главное, умел их художественно иллюстрировать.

После открытия книгопечатания, в 1543 г. была опубликована книга бельгийского анатома Андреаса Везалия «О структуре человеческого тела». Она была проиллюстрирована учеником Тициана Яном Стивенсоном Ван-калкармом. Хотя многие авторитеты того времени восприняли этот труд как еретический, книга демонстрировала не воображаемые, а реальные формы и устройство органов.

Примерно в то же время итальянский анатом Бартоломео Еустахио (1500—1574) вновь открыл узкие трубочки, ведущие от уха к горлу, описанные Алкмеоном, но известные теперь как евстахиевы трубы.

Многие термины, которыми мы пользуемся сейчас, имеют корни в анатомических исследованиях. В том, что сердце — насос, качающий кровь, греческие врачи были правы. Но поскольку в трупах артерии обычно пусты, эти сосуды были названы воздуховодами, что на греческий переводится как артерия.

И все-таки было доказано, что артерии, как и вены, проводят кровь. Английский врач Уильям Гарвей (1578—1657) провел уникальный эксперимент.

Зная, что кровь выходит из сердца через артерии и не может возвращаться обратно из-за сети односторонних клапанов, он перевязал артерию, и ее сторона, направленная к сердцу, переполнялась кровью. Если перевязывал вену, то кровью переполнялась сторона, направленная от сердца. Из этого следовал вывод, что поток крови не прекращается и движется в одном направлении. Далее он рассчитал количество крови, перекачиваемое сердцем, за единицу времени. Это было революционное исследование для того периода. Во-первых, Гарвей не ограничился только анатомическими подробностями в описании сосудов, связанных с сердцем, а использовал экспериментальный метод. Во-вторых, применил математические знания в области биологии. И в-третьих, сделал абсолютно грамотный вывод по результатам своего эксперимента, а в 1628 г. опубликовал книгу «О движениях сердца и крови».

Именно в эти годы итальянец Галилео Галилей (1564—1642) призывал к внедрению экспериментальных методов в науку. В развитии науки начался новый период. До того времени прогресс в области биологии и химии существовал, но находился, пожалуй, ближе к состоянию анабиоза.

Первый эксперимент на границе биологии и химии проведен фламандским химиком Яном Батистом ван Хельмонтом (1577—1644). Он взвесил почву и стал выращивать на ней дерево, которое поливал. За пять лет масса растения увеличилась на 74 кг, а масса почвы уменьшилась только на 60 г. На основании этого ван Хельмонт сделал вывод о том, что основным веществом для увеличения организма растения служила вода. Ирония судьбы заключалась в том, что именно ван Хельмонт открыл газ, который назвал «духом дерева». Как выяснилось позднее, этот газ — диоксид углерода, являлся основным веществом для синтеза различных структур растительных организмов. Но, несмотря на ошибочный вывод, эксперимент ван Хельмонта положил начало химии живых организмов, т.е. биохимии.

Большой вклад в развитие биохимии внесла физика, например эксперименты Галилея, которые он проводил с телескопом. Подобные приборы — микроскопы (от греч. «видеть малое») были разработаны для рассмотрения невидимого глазом.

Теперь удалось рассмотреть сосуды, которые, как предполагал Гарвей, соединяют артерии и вены. Эти сосуды называли *капиллярами* (от лат. «волосоподобный»). Английский ученый Роберт Гук (1635—1703) рассматривал в микроскоп растительные объекты. В 1665 г. он опубликовал книгу «Микрография» с собственными иллюстрациями. Именно Р. Гук впервые ввел термин «клетка».

Голландский торговец Антони ван Левенгук (1632—1723), для которого микроскопия была только увлечением, увидел в застойной воде из канавы мельчайшие существа, обладающие признаками жизни животных. За что они получили название *простейшие*, или *protozoa* (от греч. «первые животные»). А в 1663 г., благодаря усовершенствованию линз в своем микроскопе, Левенгук увидел существа еще более мелкие, чем простейшие. Эти объекты называли *бактериями*.

На протяжении XIX в. с помощью микроскопа были сделаны многие исследования в разных областях естественных наук. Они открыли огромные неизведанные ранее пласты информации в биологии и химии. Микроскоп, который есть теперь в каждом классе биологии обычной школы, позволил

за короткий промежуток времени сделать качественно новый прорыв в научном познании по сравнению с предыдущей эрой, длившейся тысячелетия. Но вопросы возникновения жизни, обмена веществ и энергии, передачи наследственных свойств и многие другие оставались открытыми.

Поразительно, как иногда научная мысль может соединить, казалось бы, несовместимые понятия. Например, интенсивное изучение разных газов приоткрыло тайну обмена веществ и энергии в живом организме.

Английский ботаник и химик Стефан Хейлз (1677—1761) в экспериментах с растениями установил, что CO_2 вносит основной вклад в их питание. Почти столетие спустя другой английский химик Джозеф Пристли (1733—1804) открыл O_2 , которым, как оказалось, легко дышится.

За этим было установлено, что растения увеличивают концентрацию O_2 в воздухе. А голландский физиолог Жан Ингенхуз (1730—1799) доказал, что растения поглощают CO_2 и выделяют O_2 только на свету.

Изучая состав воздуха, Антуан Лоран Лавуазье (1743—1794) обнаружил в нем два основных газа, O_2 и N_2 , и выяснил, что O_2 поддерживает горение. Горящую свечу он поместил под купол и наблюдал, что со временем пламя гаснет, а под куполом обнаруживается новый газ, CO_2 .

Практически такой же результат происходит с животным организмом. Мышь, помещенная под купол, вдыхает O_2 и выделяет CO_2 . Когда содержание O_2 становится минимальным, животное погибает.

Сопоставив эти эксперименты, Лавуазье сделал два важных вывода. Во-первых, дыхание — это своеобразная форма горения. И во-вторых, потребление кислорода сопровождается выделением тепла.

Тепло может совершать работу (вращать колесо, поднимать груз), и поэтому в 1807 г. английский физик Томас Янг (1773—1829) предложил для обозначения таких явлений использовать термин «энергия» (от греч. «работа, совершаемая изнутри»).

К вопросам образования энергии при окислении органических веществ вернулись лишь столетие спустя, когда стали известны структуры многих органических соединений. А вплотную к вопросам окисления веществ в живых организмах подошли только тогда, когда открыли катализаторы этих процессов — *ферменты*. На это еще ушло почти столетие.

В этот период в лабораторных условиях синтезированы многие органические вещества. Начало было положено немецким химиком Фридрихом Веллером (1800—1882). В 1828 г., исследуя различные цианиды, и в частности, нагревая цианат аммония, неожиданно для себя Веллер обнаружил мочевины — вещество органической природы.

Этот успех подтолкнул и других органиков. Французский химик Пьер Марселен Бертло (1827—1907) синтезировал ацетилен, бензол, метан, метанол, этанол из неорганических соединений. К середине XIX в. органический синтез активно развивался. Многие из полученных соединений были окрашенными и положили начало индустрии органических красителей.

Как это часто бывало, случайно выяснилось, что попадая на биологическую ткань, органические красители окрашивают ее неравномерно. Немецкий цитолог Вальтер Флеминг (1843—1905) обнаружил, что внутри ядра клетки есть участки, которые хорошо адсорбируют краситель и поэтому ярко выделяются на общем фоне. Он назвал этот материал *хроматином*.

Продолжая свои исследования, Флеминг заметил, что в процессе деления клетки из хроматина образовались короткие нитевидные тельца. Поэтому их и назвали *хромосомами* (от греч. «окрашенные тела»).

Так органическая химия проникла в ядро клетки. А вскоре стала известна химия важнейших биологических молекул — нуклеиновых кислот, и это один из приоритетных объектов исследования биохимии.

Как самостоятельная дисциплина биохимия оформилась к середине XIX в., после издания в 1842—1846 гг. первых учебников. В этот период биохимия отделяется от физиологии и органической химии в отдельную науку, которая дифференцируется в зависимости от объекта и цели исследования. Разрабатываются новые методы биохимического анализа, и химический состав живой материи изучается на уровне организма, органов, тканей и клеток. Параллельно исследуются закономерности синтеза и распада соединений в живых организмах при разных условиях.

Основоположником отечественной биохимии справедливо считается физиолог Александр Яковлевич Данилевский (1838—1923), создавший первую в России физиолого-химическую школу и организовавший первые кафедры физиологической химии в университетах Казани, Харькова и Военно-медицинской академии Петербурга. Им проведены фундаментальные исследования в области биохимии белков, ферментов и пищеварения. Актуальность этих трудов сохраняется и в наше время. А. Я. Данилевским разработаны основы полипептидной теории строения белков, показана коллоидная природа ферментов, разработаны адсорбционные методы выделения ферментов, которые широко применяются в современной биохимии.

Современная биохимия сформировалась на рубеже XIX—XX вв. Это результат взаимодействия обширной области знаний целого ряда естественных наук: общей биологии, цитологии, гистологии, физиологии, органической, физической, коллоидной химии и др.

Успехи в развитии динамической биохимии связаны с работами известного физиолога Ивана Михайловича Сеченова (1829—1905) по химии дыхания и влиянии на эти процессы различных внешних факторов, включая питание. Он придавал большое значение изучению обмена веществ, о чем образно написал: «Проследить судьбу внешнего вещества при его странствовании по телу — значит описать всю историю жизни».

Исследования отечественного ученого-физиолога Ивана Петровича Павлова (1849—1936) были заслуженно оценены Нобелевским комитетом. В 1904 г. ему присуждена премия по физиологии и медицине «За труды по физиологии пищеварения, расширившие и изменившие понимание жизненно важных аспектов этого вопроса».

Химик и физиолог Марцеллий Вильгельмович Ненцкий (1848—1901) доказал химическое родство хлорофилла и гемоглобина. Большой вклад в развитие биохимии растений и теорию фотосинтеза сделан Клементом Аркадьевичем Тимирязевым (1843—1920). Биохимики Владимир Иванович Палладин (1859—1922) и Алексей Николаевич Бах (1857—1946) входят в число создателей современной теории биологического окисления.

А. Н. Бах совместно с Александром Ивановичем Опариным (1894—1980) являются основателями современной отечественной школы биохимии.

В 1935 г. ими был организован Институт биохимии АН СССР. Крупнейшими биохимиками нашей страны являются А. Н. Бах, Б. И. Збарский, А. В. Палладин, В. А. Энгельгардт, А. Н. Белозерский, А. И. Опарин, С. Е. Северин, А. А. Баев, А. С. Спирин и др.

На существенно новый путь биохимия вступила с реализацией проекта «Геном человека», который осуществляется совместными усилиями нескольких международных научно-исследовательских организаций. В настоящий момент около 99% ДНК человека секвенировано («прочитано»). Остались наиболее сложные участки — центральные и хвостовые фрагменты хромосом и др.

Данный проект — это колоссальный научный опыт исследования генетического материала. На базе этого опыта рождаются новые направления развития биохимии и прикладных областей. К ним относят геномику, биоинформатику, метаболомику и др.

Геномика призвана анализировать геном и выяснять взаимозависимости между экспрессией генов и функционированием клетки. Результаты таких исследований уже находят применение в медицине, а также распространяются на некоторые биотехнологии, в основном в области биотехнологии растений.

Биоинформатика занимается статистической обработкой данных, полученных при секвенировании геномов бактерий, растений и человека. Систематизация и анализ этой информации с применением алгоритмических методов позволит прогнозировать, например, структуры белков, анализировать количественные признаки в популяции и т.д.

Протеомика изучает протеом — совокупность всех белков организма. Гены, на которых синтезируются белки, постоянны и не зависят от типа клетки и ее возраста. Протеом же различен в разных клетках, разных тканях, изменяется с возрастом, зависит от внешних воздействий. Эти изменения изучаются на уровне генома.

Метаболомика ставит задачей выяснение особенностей метаболизма человека во взаимосвязи с его геномом. Это позволит корректировать состояние здоровья, поможет уберечь организм от серьезных заболеваний, корректировать лекарственную терапию.

Нутригеномика исследует уникальные генетические особенности человека с целью создания индивидуальной модели питания, чтобы обеспечить оптимальное состояние здоровья. Эта область новейшей биохимии будет развиваться совместно с пищевыми технологиями, что позволит создавать биологически полноценные, полезные продукты с учетом генотипа человека.

С разработкой новейших методов исследования, таких как рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, различные виды хроматографии, спектрофотометрии, метод меченых атомов, накоплен огромный банк данных, благодаря чему биохимия сделала невероятный скачок в своем развитии и гигантский прорыв в научном мире вообще.

В последние десятилетия биохимия находится на острие научного познания и служит практической и теоретической базой для биоорганической и бионеорганической химии, биофизики, молекулярной биологии, медицинской биохимии, биотехнологии и других областей науки.

1.3. Методы практической биохимии

Объектом биохимических исследований служат различные материалы, полученные от вирусов, бактерий, растений, животных и человека. Это могут быть биологические жидкости, субклеточные структуры, отдельные клетки, органы или ткани, а также продукты их жизнедеятельности.

С химической точки зрения все это — сложные объекты, представляющие собой различные полидисперсные системы. Во-первых, исследуемое вещество в биологических материалах, как правило, находится в связанном с другими соединениями состоянии и для его отделения следует применять специальные способы. Во-вторых, большинство биологических молекул разрушаются в присутствии растворителей, которые обычно используют в органической химии. Поэтому в биохимических исследованиях, даже таких, которые хорошо усовершенствованы, процесс пробоподготовки требует немалых усилий и знаний, а иногда и времени.

Образцы для исследования нежелательно хранить, а если это неизбежно, то обычно используют температуру 0—4°C или замораживание. Твердый материал (кусочки тканей и органов) измельчают до гомогенной массы вручную (в ступке с кварцевым песком), механическим способом (блендером) или одним из физических методов (ультразвуком, резким перепадом давления). Дальнейшая подготовка образца различается в зависимости от потребностей исследования. Это может быть разделение гомогената на фракции, экстрагирование определенного компонента, озоление и пр.

Число методов, применяемых в теоретической и прикладной биохимии, огромно. Существует несколько видов их классификации. Наиболее распространенный вариант подразделяет методы практической биохимии по различным физико-химическим характеристикам, положенным в основу метода исследования.

Методы объемно-весового анализа

Основаны на количественном определении объема или массы исследуемого вещества путем взвешивания (для сухих проб) или титрования (для растворов).

Методы объемно-весового анализа, основанные на титровании, подразделяют на четыре группы.

Разновидность метода	Раствор, используемый для титрования
Ацидометрические	Кислота
Алкалиметрические	Основание
Оксидометрические	Окислители
Осаждения	Соли тяжелых металлов

Количественное содержание сухого вещества определяют гравиметрическим методом. Навеску пробы растворяют, малорастворимый осадок промывают, высушивают или прокаливают до постоянной массы, а затем определяют ее величину.

По количеству пробы методы объемно-весового анализа различают:

- макрометоды — исследуется 40—50 мл раствора или около 500 мг сухого вещества;

- полумикрометоды — исследуется 1—10 мл раствора или от 10 до 100 мг сухого вещества;
- микрометоды — объем исследуемого раствора составляет несколько десятых долей миллилитра или несколько миллиграммов сухого вещества.

Элементный анализ

Для неизвестного соединения определение его молекулярной формулы — первая ступень в выяснении строения и свойств. Если соединение удалось выделить в чистом виде, его молекулярную формулу можно определить методом сжигания (озоления). Для ускорения процесса и обеспечения полного сгорания используют различные катализаторы.

Если известна молекулярная масса вещества, то используя эмпирическую формулу, можно вывести и молекулярную формулу соединения.

Большой вклад в области элементного анализа и разработка первых аппаратов для этого метода были сделаны австрийским химиком и врачом Фрицем Преглем (1869—1930). В 1923 г. он был удостоен Нобелевской премии по химии «За изобретение метода микроанализа органических веществ».

В настоящее время на практике пользуются небольшими количествами исследуемых веществ (3—4 мг), а количества выделяющихся CO_2 и H_2O определяются автоматически.

Оптические методы

Эти методы отличаются специфичностью, точностью и высокой чувствительностью, так как позволяют определять содержание вещества в концентрации меньше 0,001 мг. К оптическим методам относят: адсорбционные, нефелометрические и турбидиметрические, люминесцентные, спектральные, поляриметрические.

Адсорбционные методы основаны на способности исследуемого вещества поглощать световую энергию. Интенсивность поглощения зависит от концентрации растворенного вещества. В зависимости от вида световой энергии различают фотометрию и спектрофотометрию. Это очень распространенные методы исследования в лабораторной практике.

Нефелометрические и турбидиметрические методы основаны на измерении светового потока в суспензиях и коллоидных растворах. В нефелометрических исследованиях измеряют интенсивность света, рассеянного взвешенными частицами. В турбидиметрических методах измеряют интенсивность света, прошедшего через анализируемый раствор. Эти методы просты в применении и используются в исследованиях растворов белков, витаминов и других веществ, например для определения содержания альбуминов и глобулинов в сыворотке крови.

Люминесцентный анализ основан на способности веществ сначала поглощать, а затем излучать световую энергию. Некоторые вещества обладают первичной люминесценцией (витамин А, амилоиды), некоторые — вторичной, то есть свойство возникает только после обработки флуорохромами. Метод обладает высокой чувствительностью, позволяя обнаруживать вещества в концентрации от 0,0001 до 1000 мкг.

Поляриметрический анализ основан на способности оптически активных веществ вращать плоскость поляризованного света. Оптически активными являются вещества, имеющие в молекуле хотя бы один асимметричный углеродный атом. Метод используется для определения сахаров в различных продуктах, например сгущенном молоке.

Электрофорез

Это метод разделения соединений, способных к ионизации. Электрофорез широко применяется в исследовательской практике при изучении аминокислот, белков, нуклеиновых кислот. Наибольшее распространение получил электрофорез в поддерживающей среде, где роль носителя веществ играют бумага, ацетат-целлюлозная подложка или разного рода гели, например агаровый или полиакриламидный (ПААГ).

Перед проведением анализа исследуемые вещества растворяют в буферном растворе с таким значением pH, чтобы разделяемые частицы имели определенный заряд, и наносят на носитель. Края носителя приводят в контакт с источником электрического тока. В результате создания электрического поля заряженные частицы движутся в направлении противоположно заряженного электрода. Поскольку каждое индивидуальное соединение имеет определенную скорость перемещения в данных условиях электрофореза, то даже одинаково заряженные частицы можно отделить друг от друга.

Если разделяемые вещества не окрашены, по окончании электрофореза их проявляют подходящим красителем, например нингидрином. Носитель с видимыми зонами компонентов называют *электрофореграммой*. Необходимое вещество с носителя может быть изъято, экстрагировано и подвергнуто дальнейшим исследованиям.

В настоящее время метод электрофореза значительно усовершенствован. Наибольшими возможностями обладает разновидность капиллярного электрофореза. Для него необходима современная аппаратура. Разделение происходит в кварцевых капиллярах диаметром 25—100 мкм и длиной 0,2—1,0 м. Процесс протекает значительно быстрее, чем в случае традиционного электрофореза, а идентификация осуществляется непосредственно в капиллярах, преимущественно оптическими методами.

Методами электрофореза тщательно изучены белки молока и в настоящий момент пересмотрены представления об их классификации. Например, установлено, что считавшаяся ранее индивидуальной протеозо-пептонная фракция является фрагментом β-казеина.

Хроматографические методы

Хроматография — это простой способ разделения сложных веществ. Впервые метод распределительной хроматографии применил русский ученый Михаил Семенович Цвет в 1903 г. Название метода происходит от двух греческих слов *chroma* — цвет и *grapho* — пишу.

Разделение смесей органических соединений методом хроматографии основано на различном распределении их компонентов между двумя фазами — неподвижной и подвижной (*элюентом*). Если разделяемые вещества имеют характерную окраску, то при хроматографии участки их адсорбции

будут видимые, а в случае бесцветных веществ неподвижную фазу обрабатывают специальными реактивами, дающими с исследуемыми веществами цветные комплексы.

Хроматографические методы подразделяются по физическим принципам на распределительные (разделение смеси между двумя растворителями), адсорбционные (разделение между растворителем и адсорбентом) и вытеснительные (вытеснение вещества, захваченного адсорбентом, другим веществом).

По используемой методике различают хроматографию колоночную, хроматографию на бумаге, тонкослойную, газовую, жидкостную, ионообменную, на молекулярных ситах или гелях (*гель-фильтрация*).

Газовая хроматография. В газовой хроматографии подвижной фазой является нерекционноспособный газ, обычно азот или гелий. Неподвижной фазой может быть твердый адсорбент или пленка вязкой жидкости, отложенная на поверхности инертного твердого вещества или нанесенная на стенки тонкой капиллярной колонки. Часто колонка свернута в спираль, что значительно уменьшает занимаемую ею площадь и позволяет поместить колонку в небольшую камеру, чтобы поддерживать температуру, необходимую для максимально полного разделения образца за короткое время.

Анализируемый образец, как правило, растворяют в подходящем растворителе и с помощью шприца впрыскивают через резиновую перегородку в основании колонки прямо в поток газа.

Поскольку каждый компонент смеси обладает разным сродством к выбранному растворителю, то в разное время связывается и увлекается растворителем. Благодаря этому по мере движения через колонку исследуемая смесь разделяется на индивидуальные компоненты.

На выходе из колонки все компоненты появляются в разное время, проходят через детектор, который дает электронный сигнал и регистрирует его в виде пика на ленте самописца. Для каждого компонента характерен свой пик, а площадь, им образованная, характеризует количество образца. Обычно применяют пламенно-ионизационный детектор. Принцип его действия основан на том, что ионы, образующиеся при сгорании вещества, увеличивают электрическое сопротивление газа.

Все хроматографические методы находят широкое применение в пищевой промышленности. Они используются при оценке биологической безопасности пищевого сырья на отсутствие антибиотиков, пестицидов, консервантов, токсинов и других загрязнителей. Хроматографический анализ применяют для идентификации как состава сырья, так и готовых продуктов, а также с целью выявления фальсифицированной продукции. Например, на рис. 1.1 приведена хроматограмма смеси β -лактоглобулина и α -лактальбумина, используемая при оценке подлинности сывороточных белков молока¹.

Аминокислотный состав белков молока и набор жирных кислот молочного жира и молочной продукции также исследованы методами хроматографии. В частности, при защите особых свойств вологодского масла уни-

¹ Методические указания по оценке подлинности и выявлению фальсификации молочной продукции : Методические указания МУ 4.1./4.2.2484—09. М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.