

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Масалов Владимир Николаевич

Должность: ректор

Дата подписания: 16.07.2020 10:53:40

Уникальный идентификатор: f31e6db16690784ab6b50e564da269706b42

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.В. ПАРАХИНА»**

**Новикова Н.Е.**

## **ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ**

**Учебное пособие**

Орел – 2020

УДК 581.19(075.8)

Новикова Н.Е. Лабораторный практикум по биохимии растений:  
Учебное пособие. – Орел: Изд-во Орловского ГАУ, 2020. – 91 с.

Рецензенты:

С.В. Резвякова, доктор, сельскохозяйственных наук, зав. кафедрой  
защиты растений и экотоксикологии ФГБОУ ВО Орловский ГАУ

С.В. Бобков, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий  
лабораторией физиологии и биохимии растений ФГБНУ ФНЦ  
зернобобовых и крупяных культур

В учебном пособии изложены теоретические основы и методы качественного и количественного анализа различных групп биохимических соединений в растительном материале: белков (в том числе ферментов), углеводов, липидов и других веществ. Цель учебного пособия – формирование у обучающихся умений и навыков исследования биохимических показателей, используемых при оценке качества, безопасности продукции растениеводства и экологической устойчивости сельскохозяйственных растений.

Предназначено для обучающихся по направлению подготовки 35.03.03 Агрохимия и агропочвоведение. Также может быть использовано студентами магистратуры (35.04.04 Агрономия) и аспирантами.

## Содержание

	Введение.....	5
	Основные правила безопасности при проведении исследований в биохимической лаборатории.....	7
1	УГЛЕВОДЫ.....	10
	Определение редуцирующих сахаров.....	13
	Обнаружение редуцирующих сахаров по восстановлению окиси меди.....	13
	Колориметрический метод определения содержания сахаров.....	16
	Определение содержания крахмала.....	18
	Объемный метод определения крахмала.....	20
2	БЕЛКИ.....	24
	Качественные реакции на белки.....	25
	Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция).....	27
	Обнаружение в молекуле белка ароматических аминокислот (ксантопротеиновая реакция).....	27
	Нингидриновая реакция.....	28
	Обнаружение в белках серосодержащих аминокислот.....	29
	Определение изоэлектрической точки белка.....	30
	Определение содержания белков.....	32
	Определение содержания белков по биуретовой реакции... ..	33
	Определение содержания клейковины в зерне.....	35
	Определение гидратации клейковины.....	37
	Определение индекса деформации клейковины.....	38
3	ФЕРМЕНТЫ.....	41
	Изучение действия амилазы на крахмал.....	42
	Обнаружение дегидрогеназ в растениях по восстановлению метиленовой сини.....	43
	Обнаружение каталазы в растительных объектах.....	47
	Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину).....	48
	Обнаружение аспарагина, как продукта ферментативного гидролиза белков в растительных объектах.....	50
	Ферментативное превращение жиров при прорастании семян.....	52
4	ЖИРЫ.....	53
	Определение кислотного числа жиров.....	54
	Определение числа омыления.....	56

	Определение йодного числа.....	58
5	ВИТАМИНЫ.....	61
	Определение содержания аскорбиновой кислоты (витамина С).....	61
6	ВЕЩЕСТВА ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА.....	65
	Определение общей (титруемой) кислотности.....	66
	Обнаружение алкалоидов в растениях.....	68
	Обнаружение дубильных веществ в растениях.....	70
	Словарь терминов.....	73
	Тестовые задания.....	82
	Приложения.....	88
	Литература.....	91

## Введение

Биохимия растений изучает химический состав растений и на молекулярном уровне – превращение веществ и энергии, находящиеся в основе жизнедеятельности растительного организма. Знания в области биохимии позволяют лучше понять и объяснить процессы, которые протекают в отдельных органеллах, клетках и в целых растениях.

Благодаря разработке новейших методов анализа и созданию высокоточных приборов раскрыт химизм дыхания и брожения, фотосинтеза, обмена азотистых соединений, синтеза и распада жиров, образования и взаимных превращений углеводов, органических кислот, веществ вторичного обмена и других жизненно важных процессов в растительном организме. Биохимия находится в ряду фундаментальных наук, которые изучают жизнедеятельность растений в период их роста, развития, созревания, и хранения.

Цель выращивания сельскохозяйственных растений – получение высокого урожая с высоким качеством. Качество продукции определяется химическим составом – содержанием белков, жиров, крахмала, сахаров, клетчатки, витаминов, веществ вторичного обмена и других. Эти соединения определяют пищевую и кормовую ценность продукции растениеводства, служат сырьем для перерабатывающей промышленности, производства лекарственных препаратов и других потребностей.

Физиологические процессы, такие как фотосинтез, дыхание, рост, развитие, корневой питание и другие находятся в сильной зависимости от условий окружающей среды: температуры, влажности, количества и качества света, почвенных условий, технологических приемов, действия регуляторов роста. Эта зависимость находит отражение в изменении физиолого-биохимических процессов на разных уровнях организации – от молекул до целого растения. В результате изменяется содержание в конечной продукции химических веществ и их качественные характеристики (состав). Знание биохимических основ формирования урожая, влияния условий внешней среды на биохимические процессы позволяет специалистам прогнозировать качество получаемой продукции и корректировать технологические приемы для получения планируемых результатов.

В данном учебно-методическом пособии представлены работы, позволяющие обучающимся изучить химический состав растений,

семян, плодов, освоить методы идентификации и количественного определения отдельных химических веществ, определения активности ферментов, превращения веществ. В практикум включено подробное описание хода наиболее типичных работ по основным разделам биохимии: углеводам, белкам, ферментам, липидам, витаминам.

Для осмысленного выполнения лабораторной работы, обучающиеся должны ознакомиться с кратким теоретическим введением, которое приводится перед каждой темой. Описание лабораторной работы сопровождается представлением принципа метода исследования, необходимых материалов и правил приготовления реактивов, оборудования, техники выполнения анализа.

После выполнения работы обучающимся предлагается сформулировать основные выводы и ответить на контрольные вопросы.

Внимание обращается на приобретение студентами навыков самостоятельной работы: умению рассчитать концентрации необходимых растворов и приготовить их, освоить необходимые методы исследования.

В учебно-методическом пособии представлены словарь терминов и некоторые справочные материалы.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.03 Агрохимия и агропочвоведение. Может быть использовано студентами бакалавриата и магистратуры, обучающимися по направлению подготовки «Агрономия», а также аспирантами.

## **Основные правила безопасности при проведении исследований в биохимической лаборатории**

Перед началом работы в лаборатории необходимо ознакомиться с правилами техники безопасности, которые должны неукоснительно соблюдаться всеми обучающимися.

1. Опыты проводить в строгом соответствии с описанием.
2. В биохимической лаборатории необходимо пользоваться халатом. Длинные волосы должны быть аккуратно собраны и закреплены во избежание их попадания в пламя горелок или реактивы. Не загромождайте рабочее место портфелями, свертками, сумками.
3. Прежде чем приступить к лабораторной работе, внимательно ознакомьтесь с ее описанием; подготовьте необходимые приборы и реактивы. Прежде чем взять вещество для опыта, надо обратить внимание на этикетку, внимательно прочитать её. Химические реактивы нельзя брать руками. Нужно пользоваться специальными приспособлениями: шпателями, ложечками, лопатками. Не загрязняйте реактивы, используйте чистые пипетки и стеклянные палочки.
4. В помещениях лаборатории категорически запрещается принимать пищу, пить, класть пищевые продукты на рабочие столы. Запрещается пробовать на вкус или нюхать какие-либо вещества, пить воду из химической посуды.
5. Большинство реактивов, используемых в лаборатории биохимии вредны в той или иной мере для здоровья человека. Их применение требует осторожности. После использования все флаконы с реактивами должны быть возвращены на столы или полки, откуда они были взяты. Запрещается остатки неиспользованных реактивов сливать обратно в бутылки, выливать или выбрасывать остатки реактивов в канализацию.
6. При попадании реактивов (кроме концентрированных кислот) на кожу необходимо вымыть кожу с мылом в проточной воде. Если случайно на стол был пролит какой-либо раствор, то этот участок стола должен быть сначала вытерт сухой, а затем влажной тряпкой. После окончания выполнения лабораторной работы необходимо вымыть руки.
7. Необходимо осторожно обращаться со стеклянной посудой. Если обнаружен скол или трещина на стекле, то такой посудой нельзя пользоваться, ее надо отставить на место, указанное преподавателем. Если стеклянная посуда разбилась в процессе выполнения

лабораторной работы, то надо сообщить об этом преподавателю или лаборанту, затем аккуратно собрать осколки и выбросить их в мусорное ведро.

8. При нагревании вещества или реакционной смеси над спиртовкой необходимо выполнять следующие условия:

а) правильно держать колбу или пробирку – отверстие должно быть направлено в сторону от себя и окружающих;

б) не держать пробирку рукой, а пользоваться держателями;

в) разогревание вести осторожно, слегка встряхивая содержимое пробирки.

9. Концентрированные кислоты и щелочи, огнеопасные вещества требуют особенно осторожного обращения. Концентрированные кислоты следует хранить в толстостенной посуде в вытяжном шкафу. При использовании концентрированной серной кислоты для приготовления растворов следует кислоту вливать в воду по стенке колбы медленно и осторожно. Ни в коем случае нельзя наоборот вливать воду в концентрированную серную кислоту, так как вода легче серной кислоты, происходит закипание на поверхности кислоты и разбрызгивание горячего раствора. Это может привести к химическому ожогу.

Осторожного обращения требуют концентрированные растворы щелочи и сухие щелочи. При работе с сухими щелочами необходимо использовать средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, халат, защитные очки).

Также при работе с кислотами, щелочами и огнеопасными реактивами необходимо выполнять следующие правила:

– кислоты и щёлочи нельзя набирать в пипетку ртом – необходимо пользоваться стеклянной пипеткой с грушей, автоматической пипеткой или цилиндром;

– не выливать в раковину концентрированные кислоты и щёлочи без предварительного их разбавления;

– при работе с огнеопасными веществами (эфир, хлороформ и др.) работу проводить под тягой и вдали от нагревательных приборов.

В случае попадания концентрированного раствора кислоты или щелочи на кожу необходимо немедленно промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Затем на обожженное место накладывают примочку: при ожогах кислотой – из 2%-ного раствора пищевой соды, при ожогах щелочью – из слабого (0,5%-ного) раствора уксусной кислоты.



При термических ожогах обожженную поверхность необходимо обработать этиловым спиртом и смазать глицерином или мазью от ожогов.

10. Включать в сеть электрические приборы разрешается с указания преподавателя и в его присутствии. Перед включением убедитесь в исправности прибора.

11. По окончании занятия рабочее место должно быть приведено в порядок. Вымойте использованную посуду. Мытье производят водой, мыльными или слабощелочными растворами. После окончания работы выключите воду, электрические приборы. Приведенное в порядок рабочее место сдайте дежурному лаборанту или преподавателю.

## 1. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – это обширный класс органических соединений, неотъемлемый компонент всех клеток растений. Они составляют около 80 % сухой массы растений и выполняют многообразные функции. Изначально углеводы образуются в процессе фотосинтеза из диоксида углерода и воды. В дальнейшем, вовлекаясь в обмен веществ, они используются для образования всех других органических соединений растительного организма. Углеводы составляют основу клеточных стенок (целлюлоза, пектиновые вещества, гемицеллюлоза). Крахмал, инулин, сахараза являются запасными веществами семян, плодов, корнеплодов. Крахмал составляет основную часть эндосперма злаковых растений, кукурузы, у древесных растений – плодов дуба, каштана. Сахароза и другие моно- и олигосахариды выполняют защитную функцию, понижая точку замерзания воды в тканях у зимующих растений. Также углеводы являются основным субстратом дыхания. Рибоза и дезоксирибоза входят в состав нуклеиновых кислот, АТФ и других веществ, богатых энергией. Сахароза является основной транспортной формой углеводов в растении.

Углеводы делят на моносахариды, олигосахариды, полисахариды. Моносахариды представляют собой линейные или замкнутые цепочки, содержащие от трех до семи атомов углерода и включающие гидроксильные, альдегидные или кетонные группы. В зависимости от числа атомов углерода в молекуле выделяют триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы.

Молекулы олигосахаридов включают от двух до десяти остатков моносахаридов. Например, дисахарид сахароза образуется при взаимодействии одной молекулы глюкозы и одной молекулы фруктозы. Мальтоза (или солодовый сахар) состоит из двух остатков глюкозы. Моносахариды и олигосахариды хорошо растворяются в воде и называются сахарами.

Полисахариды представляют собой полимеры (линейные или разветвленные) и построены из десятков и тысяч моносахаридов. Их молекулярная масса может достигать очень больших значений. Например, крахмал и целлюлоза построены из остатков глюкозы. Разница между ними только в химической природе гликозидной связи (молекулы крахмала образуются с помощью  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) связи, а целлюлозы –  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) связи).

Наиболее интенсивно в обмене веществ участвуют моносахариды (как правило, в форме фосфорных эфиров).

Количественное содержание и качественный состав углеводов в растениях весьма разнообразен. Данные таблицы 1 дают представление об общей сахаристости и качественном составе сахаров у различных сельскохозяйственных культур.

Таблица 1 –Содержание сахаров у важнейших сельскохозяйственных культур, % к сухой массе (Из Ермакова А.И., Арасимовича В.В. и др., 1972)

Культура	Общее содержание сахаров	Содержание сахарозы	Преобладающий сахар
Сахарная свекла	16-23	16-23	сахароза
Морковь	6-8	2-6	
Репчатый лук	4,5-10,5	0,4-8,4	
Капуста	1,6-4	0-0,3	моносахариды
Томаты	1,6-5,5	0,2-0,8	
Огурцы	1,2-2,1	0-0,3	
Арбуз	6-11	1,2-3,2	фруктоза
Дыня	6-18	1,3-11	сахароза
Тыква	2,7-8,3	0,6-6	моносахариды
Яблоки	6-18	0,3-9,6	фруктоза
Груши	4-21	0-7,8	
Сливы	4,7-17	0,9-8,3	
Персики	5-2	6-15	сахароза или моносахариды
Абрикосы	5-23	3,7-17,3	
Апельсины	4,3-11,5	6-10	
Виноград	12-25	0-5	моносахариды
Черешня	9,7-17,8	0,15-2,2	
Земляника	4,6-10	0-4,6	
Малина	3,9-10,8	0-2,7	
Смородина черная	5,1-11,6	0-2,7	
Смородина красная	4,1-8,9	0-0,4	
Крыжовник	5,3-12	0,3-0,9	
Хурма	9-20	0-5	
Инжир	5-23	0-8	

Вкусовые достоинства плодов, ягод и овощей зависит от общего содержания и качественного состава сахаров.

В сахарной свекле, например, содержится в среднем около 17 % сахаров, представленных главным образом сахарозой. Ягоды винограда содержат 12–25 % сахара, состоящего почти исключительно из глюкозы и фруктозы (примерно в равных долях), а сахароза почти отсутствует. В арбузах и грушах преобладает фруктоза. В томатах, огурцах, капусте – моносахариды. Разные растворимые сахара различаются по сладости. Если сладость сахарозы принять за 1, то сладость глюкозы составит 0,7, а фруктозы 1,5.

На сладость плодов оказывает влияние также наличие других веществ, не относящихся к сахарам, но маскирующих истинную сахаристость плодов. Например, органические кислоты влияют на сладость томатов, слив, яблок, винограда; эфирные масла – на сладость лука, чеснока. Степень сладости фруктов и ягод обычно выражают отношением

$$\frac{\text{сахара(\%)}}{\text{органические кислоты (\%)}}$$

Кислый вкус не ощущается, когда это отношение составляет 25–30. Такое значение характерно для груш и винограда. При отношении 15–20 чувствуется слабо кислый вкус (персики, некоторые сорта яблок), 5–15 – умеренно кислый (апельсины, земляника, вишня), менее 5 – сильно кислый вкус (лимон).

Содержание сахаров в чесноке составляет в среднем 18%. Это значительно больше, чем у арбуза, дыни, моркови. Но сладость у чеснока не ощущается из-за жгучего вкуса аллицина, биологически активного соединения сульфоксида, которое образуется при механическом разрушении (раздавливании) клеток зубков чеснока.

Растворимые сахара находятся в основном в клеточном соке, поэтому чаще всего образцы оцениваются путем анализа сока, выжатого из растения. Сахара легко растворяются в воде, и на этом свойстве основано выделение их из растений в водную вытяжку.

Для количественного определения сахаров используют различные методы, основанные на физических и химических свойствах сахаров. В частности по показателю преломления на рефрактометре, по плотности сока с помощью ареометра, по удельному вращению с помощью поляриметра, по окрашиванию растворов с помощью фотометра. Методом хроматографии изучают качественный состав сахаров.

Определение содержания сахаров, которые обладают свободными альдегидными или кетонными группами в молекуле, основано на их способности восстанавливать в щелочной среде сернокислую медь в закись меди и учесть последнюю. Дисахариды определяют аналогично после их гидролиза соляной кислотой. Например, при гидролизе дисахарида сахарозы образуется глюкоза (альдоза) и фруктоза (кетоза), способные восстанавливать медь. По их содержанию в гидролизате судят о содержании исходной сахарозы.

### Определение редуцирующих сахаров

Моносахариды, в молекулах которых имеются свободные альдегидные или кетонные группы (например, глюкоза, фруктоза), а также некоторые дисахариды (мальтоза, лактоза) обладают восстанавливающими свойствами. Такие сахара называют редуцирующими.



D-глюкоза



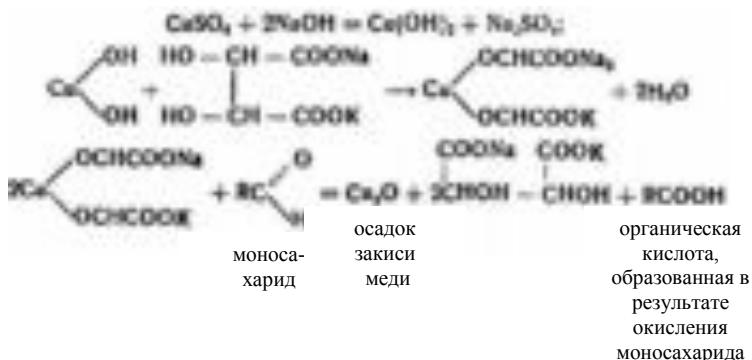
D-фруктоза

Редуцирующие сахара способны восстанавливать окиси металлов с образованием окрашенных веществ. Эта способность используется для обнаружения и количественного определения редуцирующих сахаров в органах и тканях растений. В щелочной среде в присутствии редуцирующих сахаров окись  $\text{Cu}^{2+}$  восстанавливается до закиси меди (выпадает осадок красно-коричневого цвета). Окись серебра в этих условиях восстанавливается до металлического серебра (реакция серебряного зеркала).

### Обнаружение редуцирующих сахаров по восстановлению окиси меди

**Принцип метода.** Редуцирующие сахара восстанавливают ион двухвалентной меди (сульфата меди,  $\text{CuSO}_4$ ) в щелочной среде до

нерастворимого оксида меди (I) ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) красно-коричневого цвета. При этом сахара окисляются до соответствующих кислот. Реакции протекают следующим образом:



**Цель работы.** Выявить наличие редуцирующих сахаров в корнеплодах моркови и свеклы, клубнях картофеля, в других растительных объектах.

**Ход работы.** Готовят вытяжку из моркови, сахарной свеклы, картофеля, прорастающих семян пшеницы или гороха. Для этого корнеплоды, клубни, семена измельчают на терке или растирают в ступке. По 5 г мезги помещают в колбочки на 50 мл, приливают в них по 10 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 5 мин. Затем вытяжки фильтруют через ватный фильтр или сложенную в несколько слоев марлю в чистые пробирки.

Шесть пробирок устанавливают в штатив. В первые четыре пробирки наливают по 2 мл подготовленной вытяжки из овощей или прорастающих семян, в пятую – 2 мл раствора глюкозы или фруктозы, в шестую – 2 мл раствора крахмального клейстера. Во все пробирки наливают такой же объем фелинговой жидкости. Затем пробирки осторожно доводят до кипения. Выпадение кирпично-красного осадка закиси меди свидетельствует о наличии редуцирующих сахаров.

Нельзя прерывать ход определения, его нужно проводить до конца, иначе осадок закиси меди может частично окислиться и тем самым исказить результаты анализа. Прокипяченную с фелинговой жидкостью пробу нельзя оставлять на воздухе продолжительное время (на 30 мин и более), так как, реактивы при длительном нахождении в

смеси и соприкосновении с воздухом могут образовывать некоторое количество закиси меди, что также искажает результаты анализа.

Результаты опыта записывают в таблицу 2, анализируют и делают выводы.

Таблица 2 – Результаты обнаружения редуцирующих сахаров

Номер пробирки	Вариант опыта	Результат реакции с фелинговой жидкостью	Вывод
1	Вытяжка из моркови		
2	Вытяжка из сахарной свеклы		
3	Вытяжка из картофеля		
4	Вытяжка из прорастающих семян пшеницы или гороха		
5	Раствор глюкозы или фруктозы		
6	Крахмальный раствор		

*Оборудование и реактивы:* 1) штатив с пробирками, спиртовка, стеклянные воронки, пипетки градуированные или мерные цилиндры на 10 мл, терка, ступка с пестиком, вата или марля.

2) фелингова жидкость. Готовят два раствора. А– 34,6 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 500 мл раствора; В – 175 г сегнетовой соли (тетрагидрата двойной натриево-калиевой соли винной кислоты) и 70 г гидроксида натрия в 500 мл раствора. Перед употреблением смешивают равные объемы первого и второго раствора

*Объекты:* корнеплоды моркови, сахарной свеклы, клубни картофеля, прорастающие семена пшеницы или гороха

### **Вопросы.**

1. Назовите моно-, олиго- и полисахариды, которые наиболее часто обнаруживаются в растениях? Какова их роль в жизни растений ?

2. Какие углеводы называют редуцирующими, почему их так называют?
3. Как можно выявить наличие редуцирующих сахаров в растениях?
4. Объясните, почему не во всех вариантах опыта наблюдался кирпично-красный осадок закиси меди?

### **Колориметрический метод определения содержания сахаров**

**Принцип метода.** Колориметрический метод определения сахаров основан на учете интенсивности окраски раствора глицерата меди при кипячении его с вытяжками из растительного материала, содержащими сахара.

**Цель работы.** Определить содержание сахаров в корнеплодах репы, сахарной, кормовой свеклы и в других продуктах.

**Ход работы.** Отвешивают из средней пробы  $5-10 \pm 0,01$  г материала, помещают в ступку и тщательно измельчают, приливают 10-кратный объем воды, нагретой до  $70$  °С. Полученный гомогенат фильтруют в сухую колбу.

Для определения общего количества моно- и дисахаридов, после охлаждения отбирают пипеткой  $0,5$  см<sup>3</sup> вытяжки в сухую пробирку и добавляют в нее  $0,5$  см<sup>3</sup> 1 % - го раствора соляной кислоты. После перемешивания смесь помещают на кипящую водяную баню на 15 мин, затем добавляют  $15$  см<sup>3</sup> глицерата меди и нагревают еще ровно 6 мин. После этого пробирки снимают с водяной бани и охлаждают в холодной воде. Смесь отстаивают, прозрачную жидкость переносят в пробирки и определяют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны 582 нм.

Для определения редуцирующих сахаров отбирают по  $1$  см<sup>3</sup> вытяжки, и прилив  $15$  см<sup>3</sup> глицерата меди, нагревают на кипящей водяной бане и далее поступают, как указано выше.

Концентрацию сахаров определяют по калибровочной кривой, построенной по растворам глюкозы известной концентрации (от  $0,5$  до  $10$  мг глюкозы в  $1$  см<sup>3</sup> раствора).

Для этого готовят исходный раствор глюкозы с концентрацией  $10$  мг в  $1$  см<sup>3</sup> раствора. Путем разбавления исходного раствора готовят растворы с концентрацией от  $0,5$  до  $9,5$  мг глюкозы в  $1$  см<sup>3</sup> согласно таблице 3.



Таблица 3 – Схема приготовления растворов для построения калибровочной кривой

№	Содержание глюкозы, мг/мл	Количество исходного раствора глюкозы, мл	Количество воды, мл	Оптическая плотность $D_{582}$
1	0,5	0,5	9,5	
2	1,0	1,0	9,0	
3	2,5	2,5	7,5	
4	5,0	5,0	5,0	
5	7,5	7,5	2,5	
6	10,0	10,0	0	

Для построения калибровочной кривой необходимо провести реакции полученных растворов с глицератом меди и определить оптическую плотность растворов, аналогично ходу определения редуцирующих сахаров в опытных образцах, описанному выше.

Количество сахаров (в %) вычисляют по формуле:

$$x = aV \cdot 100 / (n \cdot 1000) \%,$$

где  $a$  – содержание сахаров в пробе, найденное по калибровочной кривой, мг/см<sup>3</sup>;

$V$  – объем вытяжки, полученной из навески, см<sup>3</sup>;

$n$  – масса навески, г;

100 и 1000 – коэффициенты перевода в миллиграммы и в проценты.

Результаты записывают в табл.4. Делают выводы.

Таблица 4 – Результаты определения содержания сахаров

Объект	$D_{582}$ (для суммы сахаров)	$D_{852}$ (для восстанавливающих сахаров)	Содержание суммы моно- и олигосахаридов	Содержание восстанавливающих сахаров

*Оборудование и реактивы:* 1) весы, гомогенизатор или ступка, водяная баня, пробирки, пипетки на 1, 10 мл, мерные цилиндры на 50...100 мл, КФК-3.

2) 1 %-я соляная кислота; раствор глицерата меди.

Раствор глицерата меди: готовят два реактива. Реактив № 1 готовят растворением  $8 \pm 0,01$  г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в  $1 \text{ дм}^3$  дистиллированной воды. Реактив № 2 готовят растворением в воде 150 г едкого натра в мерной колбе на  $1 \text{ дм}^3$  и объем доводят до метки, перед анализом на  $40 \text{ см}^3$  реактива № 2 добавляют  $1 \text{ см}^3$  чистого глицерина). Смешивают объемы реактивов № 1 и № 2 в соотношении 2:1.

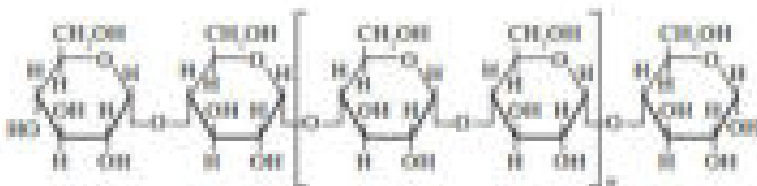
*Объекты:* корнеплоды репы, сахарной, кормовой свеклы и другие продукты.

### Вопросы.

1. Какие сахара относятся к моносахаридам, олигосахаридам?
2. Укажите содержание сахаров в плодах, ягодах, корнеплодах, фруктах.
3. По какой причине для определения суммы сахаров необходимо вначале провести гидролиз опытного образца соляной кислотой?
4. Для чего используется калибровочная кривая? Опишите технику его выполнения.

### Определение содержания крахмала

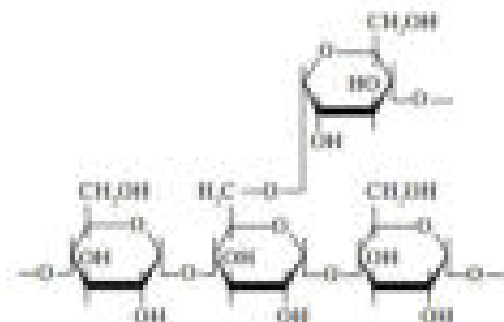
Крахмал – это главный полисахарид растений, который играет роль запасного вещества. Крахмал является биополимером. Он представляет две формы полисахаридов: амилозу и амилопектин. Обе формы построены из остатков глюкозы. Амилоза относится к линейным полисахаридам, имеющим молекулярную массу 300...1000 кДа. В составе амилозы остатки  $\alpha$ -D-глюкопираноз связаны между собой  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями в линейную полимерную цепь:



Формула структуры амилозы

Линейные молекулы амилозы имеют форму спирали. Каждый виток спирали состоит из шести остатков  $\alpha$ -D-глюкозы. Амилоза легко растворяется в теплой воде, образуя слегка вязкий раствор.

Амилопектин представлен разветвленной полисахаридной цепочкой, молекулярная масса которого может достигать нескольких сотен дальтон. Амилопектин при растворении в горячей воде образует вязкий коллоидный раствор (вязкость раствора амилопектина выше, чем раствора амилозы). Остатки D-глюкозы связаны в линейные структуры за счет формирования  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей, а в точках ветвления образуются  $\alpha$ -1,6-связи:



Формирование структуры амилопектина

У разных растений в крахмале содержится 10–30% амилозы и 70–90% амилопектина. У восковидных сортов ячменя кукурузы, риса крахмал состоит почти только из амилопектина. У других растений в крахмале содержание амилозы может быть высоким, например, в семенах мозгового гороха до 50–80%. Содержание амилозы и амилопектина в растениях может меняться в зависимости от условий выращивания и в процессе развития растений.

В клубнях картофеля может содержаться крахмала 12–20 %, в плодах томатов – 0,1–0,2 %, в капустном листе – 0,4–0,5 %, листьях салата, петрушки, укропа – до 1–2 %. В зерновках злаковых культур содержание крахмала может сильно зависеть от условий выращивания культур и от их сорта. Так, в зерновках пшеницы содержание крахмала может составлять 60–70 %, кукурузы – 65–75, риса – 60–80%.

Существует различные методы определения крахмала в растениях. Колориметрический метод основан на измерении интенсивности окрашивания крахмала йодом. Сине-фиолетовое окрашивание крахмала раствором йода является самой характерной

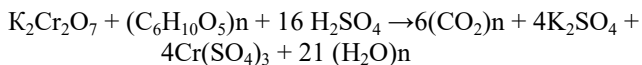
реакцией крахмала. Амилоза дает с йодом синее окрашивание, а амилопектин – красно-фиолетовое. Интенсивность окрашивания коррелирует с концентрацией крахмала в изучаемом объекте. Однако, колориметрический метод недостаточно точен, он пригоден для сравнительных определений.

При нагревании под действием кислот молекулы крахмала распадаются на полисахариды меньшей молекулярной массы – декстрины. Они гидролизуются дальше до дисахарида мальтозы и конечного продукта гидролиза – глюкозы. Это свойство лежит в основе метода количественного определения содержания крахмала в растениях с использованием кислотного гидролиза крахмала и последующего определения количества образовавшейся глюкозы. При использовании метода кислотного гидролиза необходимо вначале выделить чистый крахмал из растительного материала, так как при кислотном гидролизе наряду с крахмалом расщепляются целлюлоза, гемицеллюлозы и другие полисахариды, которых в растениях достаточно много.

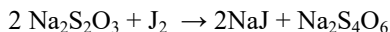
Более точные результаты получаются при ферментативном расщеплении крахмала амилазой и последующем определении образовавшейся глюкозы.

### Объемный метод определения крахмала

**Принцип метода.** Крахмал переводят в раствор и осаждают в виде комплексного соединения крахмала с йодом. Затем окисляют крахмал бихроматом калия до углекислого газа и воды. Окисление идет по следующему уравнению:



Избыток бихромата калия разрушают йодистым калием. В результате реакции выделяется йод, который титруют тиосульфатом натрия:



По количеству тиосульфата, пошедшего на титрование, вычисляют содержание крахмала.

**Ход работы.** Навеску свежего растительного материала, содержащего 20-200 мг крахмала (200-300 мг зерна, 1 г клубней картофеля, 3 г свежих листьев), растирают в фарфоровой ступке с 5

мл 80%-ного раствора  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Растертую до однородного состояния массу количественно переносят в коническую колбу емкостью 100 мл. При этом ступку несколько раз ополаскивают небольшими порциями 80%-ным азотнокислого кальция. Общий объем гомогената в колбе не должен превышать 30 мл. Колбу накрывают воронкой и осторожно кипятят на электрической плитке 3 мин. В результате этого крахмал переходит в раствор.

Колбу охлаждают, и содержимое ее переносят в мерную колбу на 50 мл, несколько раз ополаскивая. Затем доводят раствор до метки, перемешивают и фильтруют в сухой стакан или колбу.

5 мл фильтрата (при анализе листьев с низким содержанием крахмала – 10 мл) переносят в центрифужную пробирку, добавляют 2 мл раствора йода в йодистом калии и оставляют на 30 мин. При этом образуется нерастворимое соединение крахмала с йодом синего цвета, которое выпадает в осадок. Содержание йода в этом комплексе составляет около 15%.

Через 30 мин проводят центрифугирование. Прозрачный раствор сливают, а осадок несколько 3 раза промывают 5%-ным  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Каждый раз в пробирку добавляют 5 мл этого раствора, содержимое перемешивают стеклянной палочкой. После каждого перемешивания частицы осадка на палочке смывают в центрифужную пробирку несколькими каплями раствора. После каждого промывания проводят центрифугирование.

Промытый осадок комплекса крахмала с йодом переносят в коническую колбу емкостью 200 мл, несколько раз промывая осадок небольшими порциями воды (общий объем воды не должен превышать 3 мл) В колбу проливают 5 мл 0,25н раствора  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в 85%-ной серной кислоте, содержимое колбы перемешивают и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. В результате крахмал окисляется бихроматом калия.

После этого разрушают избыток бихромата. Для этого колбу охлаждают и прибавляют в нее 5 мл 20%-ного раствора йодида калия, который, реагируя с бихроматом, выделяет йод, и 120 мл воды. Выделившийся йод оттитровывают 0,1н раствором тиосульфата до появления желтой окраски. Затем в колбу прибавляют 1 мл 0,5%-ного крахмала и титруют до перехода сине-голубой окраски в очень слабо-голубую.

1 мл точно 0,1 Н раствора тиосульфата, пошедшего на титрование, соответствует 0,0675 мг крахмала.

Проводят контрольное титрование. Для этого в коническую колбу емкостью 200мл вносят 120 мл воды, точно 15 мл 0,25 н  $K_2Cr_2O_7$  и 5 мл 20%-ного КJ. Содержимое перемешивают и титруют 0,1 н  $Na_2S_2O_3$ .

#### **Вычисление результатов.**

Содержание крахмала рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{0,0675 \times b \times T \times (a - a_1) \times 100}{b_1 \times n}$$

где X – содержание крахмала, %

a – количество 0,1 н раствора тиосульфата, затраченного на контрольное титрование, мл

a<sub>1</sub> – количество 0,1 н раствора тиосульфата, затраченного на титрование опытного образца, мл

b – объем, в котором растворена навеска исследуемого вещества (50 мл)

b<sub>1</sub> – объем раствора, взятого для осаждения крахмала (5 мл)

T – поправка к титру 0,1н тиосульфата

n – навеска растительного материала, взятого для анализа.

*Оборудование и реактивы:* 1) центрифуга, водяная баня, ступки фарфоровые, колбы конические емкостью 100 и 200 мл, мерные колбы емкостью 50 мл, воронки, стаканы, пипетки, фильтры.

2) 80%-ный и 5%-ный растворы  $Ca(NO_3)_2$ ; 0,5%-ный раствор йода в йодистом калии, 20%-ный раствор КJ; 0,25 н раствор  $K_2Cr_2O_7$  в серной кислоте; 0,5%-ный раствор крахмала.

80%-ный  $Ca(NO_3)_2$ : 200 г  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$  растворяют в дистиллированной воде и доводят до 250 мл.

0,5%-ный раствор йода в йодистом калии: 10 г КJ и 5г  $J_2$  растирают в ступке вначале без воды, а затем с 10 мл воды, количественно переносят в мерную колбу емкостью 1 л и доводят водой до метки.

0,25 н раствор  $K_2Cr_2O_7$  в  $H_2SO_4$ : 12,3 г  $K_2Cr_2O_7$  растворяют в 250 мл воды в двухлитровой колбе и постепенно при охлаждении и помешивании прибавляют в колбу 800 мл концентрированной  $H_2SO_4$  с плотностью 1,84. После охлаждения переносят в темную склянку с притертой пробкой.

*Объекты:* зерно, клубни картофеля, листья растений.

### **Вопросы.**

1. Какие полисахариды входят в состав крахмала и какую долю составляют от общего его содержания? Чем они характеризуются?
2. У каких растений содержание амилопектина может достигать 70-80% общего содержания крахмала?
3. Сколько крахмала содержится в клубнях картофеля, в зерновках злаков, в овощной продукции?
4. Какой качественной реакцией можно выявить присутствие крахмала в растительных объектах?
5. Какие существуют методы определения содержания крахмала в продукции растениеводства?
6. В чем принцип определения содержания крахмала методом кислотного гидролиза?
7. В чем состоит принцип объемного метода определения содержания крахмала в растительных образцах?

## 2. БЕЛКИ

Белки – это высокомолекулярные биополимеры, которые состоят из  $\alpha$ -аминокислот, соединённых в определенной последовательности пептидной связью. В состав белков входят 20 аминокислот и 2 амида. Теоретически эти аминокислоты могут составить  $2 \times 10^{18}$  комбинаций расположения их относительно друг друга, поэтому образуют огромное количество белков.

Белковые молекулы могут содержать только остатки аминокислот, их называют протеинами (простыми белками). Другие молекулы кроме белковой части могут включать химические группировки (протестические группы), не относящиеся к аминокислотам. Такие белки называют протеидами (или сложными белками). Протестическая группа может быть представлена металлами (металлопротеиды), углеводами (гликопротеины), липидами (липопротеиды), нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеиды).

Функции белков в клетках растений многообразны. Важнейшая из них – ферментативная. Ферменты – это биологические катализаторы белковой природы, которые ускоряют течение биохимических реакций, протекающих в живой клетке. Структурная функция белков определяется тем, что белки входят в состав мембран клетки, составляющих основу структуры протопласта. Регуляторная и транспортная функции белков также связаны с тем, что они входят в состав мембран. В этом случае белковые молекулы выполняют функцию каналов, через которые вещества перемещаются через липидную фазу мембран. Белки иммунной системы организма выполняют защитную функцию, например белки-лектины. Запасные белки откладываются во многих органах растений, чаще всего в семенах, корнях, корнеплодах и других запасующих органах. Они служат источником веществ и энергии для молодых растущих органов и тканей растений, например, при прорастании семян.

Количество и аминокислотный состав белков в значительной степени определяют пищевую, кормовую ценность и технологические свойства продукции растениеводства.

Содержание белков – важнейший показатель качества зерна зерновых и зернобобовых культур, семян масличных растений, клубней картофеля, корнеплодов, овощей, плодов и ягод, кормовых трав.

Из зерновых культур больше всего белков в зерне может накапливать пшеница (до 18%). Много белков накапливается в зерне



зернобобовых культур (горох, фасоль, чечевица и другие) – 23-30%, у сои и люпина 38-42%. В семенах масличных растений – 15-30% белков. Значительно меньше их в корнеплодах, клубнях картофеля, овощах, ягодах и другой сочной продукции.

Все белки имеют ряд общих характерных свойств. Так же, как и аминокислоты, белки являются амфотерными соединениями. В зависимости от аминокислотного состава белки проявляют кислотно-основные свойства. Для них характерна изоэлектрическая точка – величина рН, при которой белок как кислота и как основание имеет наименьшую степень диссоциации. При набухании белки образуют коллоидные растворы. Все белки являются очень чувствительными веществами к действию физических, химических и биологических факторов, воздействие которых может привести, утрате нативных (природных) свойств белка (денатурации).

Белки, благодаря большому числу разнообразных функциональных групп в молекуле, могут вступать в биохимические взаимодействия с определенными реактивами с образованием окрашенных продуктов. Такие качественные реакции являются основой для обнаружения белков в биологических объектах, а также для диагностирования наличия определенных аминокислот (тирозин, триптофан, цистеин) в молекулах белков.

### **Качественные реакции на белки**

Значение цветных (качественных) реакций состоит в том, что они дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях, растворах и установить наличие отдельных аминокислот в составе различных природных белков.

Существует два типа цветных реакций: 1) универсальные – биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все  $\alpha$ -аминокислоты и белки); 2) специфические – только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах, например ксантопротеиновая реакция – на ароматические аминокислоты в белке, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

*Приготовление растворов белков для проведения качественных реакций.*

*Разбавленный раствор яичного альбумина.* Белок одного куриного яйца после отделения от желтка хорошо взбивают и затем смешивают в колбе при встряхивании с 10-кратным объемом

дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой марли, смоченной водой и помещенной в воронку. Фильтрат используют как раствор яичного альбумина. Учитывая, что концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%, полученный разбавленный раствор яичного альбумина является примерно 0,5%-ным.

*Альбумин из зерна пшеницы.* 25 г пшеничной муки смешивают со 100 мл дистиллированной воды, и смесь встряхивают в течение 1 ч с помощью встряхивателя. Взвесь муки центрифугируют и надосадочную жидкость используют для проведения качественных реакций.

Вместо выделенного альбумина можно использовать исходную мучную суспензию, полученную путем смешивания муки с водой и энергичного продолжительного встряхивания.

*Оборудование:* штатив с пробирками, стеклянные стаканчики, капельницы, водяная баня, спиртовка.

Для оформления результатов выполнения работы при проведении цветных реакций на белки и аминокислоты необходимо составить таблицу 4:

Таблица 4 – Цветные реакции на белки (качественные реакции)

№	Название реакции	Применяемые реактивы	Появление окрашивания	Что выявляет реакция
1	Биуретовая			
2	Ксантопротеиновая			
3.	Нингидриновая			
4.	Реакция на серу			
	Выводы			

## **Обнаружение в молекулах белков пептидных связей (биуретовая реакция)**

Биуретовая реакция – это качественная реакция на все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза, которые содержат не менее двух пептидных связей.

*Реактивы:* 30%-ный раствор гидроксида натрия (NaOH); 1%-ный раствор сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>)

**Ход работы.** К 1-2 мл раствора белка или мучной суспензии прибавляют двойной объем 30%-ного гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди. Снова тщательно перемешивают. Развивается красно-фиолетовое окрашивание. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить, наслаивая на раствор белка в щелочи 1 мл 1%-ного раствора сульфата меди. При стоянии на границе двух слоев появляется фиолетовое кольцо.

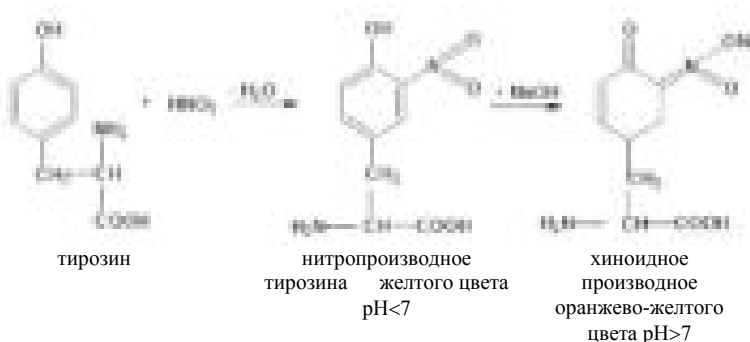
Окраска обусловлена комплексным соединением меди с пептидными группами (–CO–NH–). Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины – биурета, который как и белок дает эту реакцию.

## **Обнаружение в молекуле белка ароматических аминокислот (ксантопротеиновая реакция)**

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии в белке остатков ароматических аминокислот (фенилаланина, триптофана, тирозина). Белки, которые не содержат ароматических аминокислот, например, желатин, не окрашиваются.

При действии азотной кислоты на эти аминокислоты происходит образование нитропроизводных ароматических аминокислот ярко-желтой окраски. В щелочной среде нитропроизводные этих аминокислот дают соли, окрашенные в оранжевый цвет.

Схема реакций на примере тирозина:



**Реактивы:** концентрированная азотная кислота ( $\text{HNO}_3$ ); концентрированный раствор гидроксида натрия ( $\text{NaOH}$ ).

**Ход работы.** К 1 мл раствора белка или мучной суспензии добавляют 5-6 капль концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка. При осторожном нагревании раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При этом осадок почти полностью растворяется.

Охлаждают смесь и осторожно добавляют к раствору, имеющему кислую реакцию, не взбалтывая, по каплям избыток концентрированного гидроксида натрия до щелочной реакции. Выпадающий вначале осадок кислотного альбумината растворяется, и жидкость окрашивается в ярко-оранжевый цвет.

### Нингидриновая реакция

Нингидриновая реакция используется как для открытия отдельных аминокислот, так и определения их количества. Это реакция на присутствие в белке  $\text{NH}_2$ -групп в  $\alpha$ -положении аминокислот и является очень чувствительной.

**Реактивы:** 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

**Ход работы.** В пробирку наливают 1 мл разбавленного раствора белка куриного яйца и 1-2 мл 1%-го раствора нингидрина в ацетоне. Содержимое пробирки перемешивают и в течение 2-3 мин осторожно нагревают на водяной бане до появления сине-фиолетового

окрашивания, свидетельствующее о присутствии в белке  $\alpha$ -аминокислот.

### Обнаружение в белках серосодержащих аминокислот

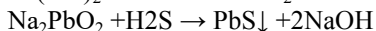
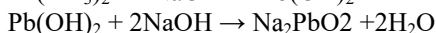
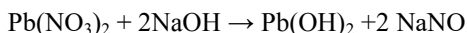
К серосодержащим аминокислотам относятся цистеин, цистин, метионин. Селен можно обнаружить, пользуясь свойством его давать с солями свинца черный осадок сернистого свинца. Если белок нагреть со щелочью и с уксуснокислым свинцом, то происходит отщепление от аминокислот сероводорода, который дает со свинцом черный осадок.

*Реактивы:* 10%-ный раствор гидроксида натрия (NaOH); 10%-ный раствор ацетат свинца  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  или  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

**Ход работы.** В пробирку наливают 1 мл альбумина куриного белка или мучной суспензии, прибавляют 2 мл 20%-го раствора гидроксида натрия. Смесь осторожно кипятят (чтобы смесь не выбросило из пробирки).

Образующийся незначительный осадок растворяется при кипении. Затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца (II) или нитрата свинца. Наблюдается выпадение серо-черного осадка сульфида свинца (II).

Происходящие химические превращения протекают по следующей схеме. Под действием щелочей белки подвергаются частичному гидролизу по пептидным связям, превращаясь в щелочные альбуминаты. Наряду с этим наблюдается отщепление части аминокислот в виде аммиака (реакция дезаминирования). Образование аммиака можно обнаружить по его запаху или с помощью лакмусовой бумажки, которая синее под влиянием аммиака. При наличии в белке аминокислот, содержащих серу (цистеина, цистина, метионина) от них отщепляется также сера в виде иона. Его образование обнаруживается с помощью тяжелых металлов, например ионов свинца, которые с ионами серы образуют черный нерастворимый сульфид свинца.



### Вопросы.

1. Что выявляется в белках биуретовой реакцией? Какая при этом развивается окраска?

2. Что выявляется в белках ксантопротеиновой реакция? Какая при этом развивается окраска? Почему она не дает окрашивания с желатином?

3. Какие группы в белке выявляются нингидрином? Какая при этом развивается окраска?

4. Какой качественной реакцией можно выявить в белке аминокислоты, содержащие серу?

### Определение изоэлектрической точки белка

Так как белки содержат кислые и основные аминокислоты, то в их составе всегда имеются свободные кислые ( $\text{COO}^-$ ) и основные ( $-\text{NH}_3^+$ ) группы. Суммарный заряд белка зависит от соотношения количества кислых и основных аминокислот. В водном растворе они могут диссоциировать как кислоты и как основания.

При добавлении к раствору белка слабой кислоты диссоциация карбоксильных групп в белковых молекулах подавляется и в итоге в белке будет достигнуто равенство положительных и отрицательных зарядов. В зависимости от числа основных и кислых групп в белке такое равновесие наступает при разных концентрациях водородных ионов. Кислотность среды (рН), при которой устанавливается равенство положительных и отрицательных зарядов и белок становится электронейтральным, называется изоэлектрической точкой (ИЭТ). Белки, у которых ИЭТ находится в кислой среде, называются кислыми. Белки, у которых значение ИЭТ находится в щелочной среде, называются основными. Для большинства растительных белков ИЭТ наблюдается в слабокислой среде. В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы, белок обладает наименьшей растворимостью и легко выпадает в осадок при воздействиях, снижающих гидратацию его молекул (добавлении органических растворителей или солей). При этом молекулы белка слипаются, образуют более крупные частицы, и выпадают из раствора в виде осадка. Значение рН, соответствующее изоэлектрической точке, является характерным для каждого белка.

**Ход работы.** В 8 пронумерованных пробирок приливают воду, 0,01 н. или 0,1 н. раствор уксусной кислоты в количествах, указанных в таблице 5 и тщательно перемешивают, получая растворы с различными значениями рН. В каждую пробирку приливают по 1 мл раствора белка и содержимое пробирок перемешивают. Затем в пробирки добавляют по 2 мл ацетона или спирта, снова перемешивают содержимое и оставляют на 30...40 мин при комнатной температуре.

При значении рН, равном или близком к ИЭТ белка, раствор мутнеет или из него выпадает осадок. В таблице 5 отмечают интенсивность помутнения раствора (+), выпадение осадка (++) или его отсутствие (-). ИЭТ белка устанавливают по кислотности среды в пробирке, в которой выпадает больше осадка, либо в которой интенсивность помутнения раствора наибольшая.

Таблица 5 – Схема приготовления растворов с различными значениями рН и результаты опыта

Номер пробирки	Внесено в пробирки, мл			рН	Помутнение (+), образование осадка (++) или отсутствие осадка (-)
	воды	0,001 н $\text{CH}_3\text{COOH}$	0,1 н $\text{CH}_3\text{COOH}$		
1	8,4	0,60	-	5,9	
2	7,75	1,25	-	5,6	
3	8,75	-	0,25	5,3	
4	8,5	-	0,50	5,0	
5	8,0	-	1,0	4,7	
6	7,0	-	2,0	4,4	
7	5,0	-	4,0	4,1	
8	1,0	-	8,0	3,8	

После выполнения работы сравнивают значения изоэлектрической точки анализируемых белков и делают выводы об их аминокислотном составе и свойствах.

*Оборудование и реактивы:* 1) штатив с пробирками, пипетки градуированные, препараты белков (альбумин куриного яйца, желатин, казеин);

2) 0,1 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (6 мл ледяной уксусной кислоты разбавляют водой до литра), 0,01 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,1 н. раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  разбавляют в 10 раз), этиловый спирт или ацетон.

### Вопросы.

1. Назовите функции белков в растительной клетке.
2. Чем определяется суммарный заряд белка?
3. Что понимают под изоэлектрической точкой белка?
4. Почему в изоэлектрической точке белки легко выпадают в осадок?

5. В чем принцип метода определения изоэлектрической точки белка?

### Определение содержания белков

Количественное содержание белков в растительном материале наиболее точно можно определить методом Кьельдаля. Для этого белки отделяют от других (небелковых) азотистых соединений осаждением 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Затем осадок минерализуют серной кислотой в присутствии катализатора с образованием сульфата аммония. Затем сульфат аммония разрушается щелочью с выделением аммиака. Аммиак отгоняется водяным паром в раствор серной или борной кислоты с последующим титрованием остатка кислоты щелочью. Отгонка аммиака производится с помощью аппарата Кьельдаля (рис. 1).

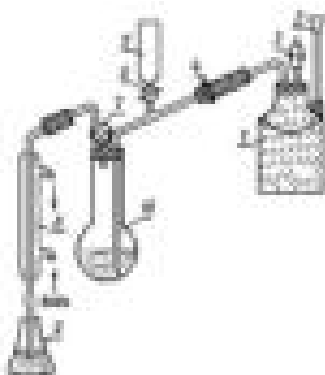


Рис. 1. Аппарат Кьельдаля для отгонки аммиака с водяным паром

1– парообразователь; 2 и 5 – воронки; 3 и 6 – краны; 4–зажим; 7– каплеуловитель; 8 – холодильник; 9 – приемная колба; 10 – отгонная колба.

Полученное значение по содержанию белкового азота переводят в белок путем умножения его на коэффициент пересчета. Этот коэффициент для культур разный: 5,7 – для зерна пшеницы, овса и продуктов их переработки; 5,6 – для ржи и продуктов ее переработки;



6,0 – для риса и продуктов его переработки; 6,25 – для семян бобовых культур, продуктов их переработки и пивоваренного ячменя.

### **Определение содержания белков по биуретовой реакции**

Часто при оценке химического состава растительной продукции используют более простые и быстрые методы определения белков, в которых используются цветные реакции на белки. Одним из них является биуретовый метод, который основан на образовании комплексных соединений меди с белками по месту пептидных групп ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) сине-фиолетового или красно-фиолетового цвета. Интенсивность окраски коррелирует с содержанием белка в растворе.

Количество белков в растворе определяют по калибровочной кривой путем сравнения оптической плотности анализируемого окрашенного раствора и оптической плотности ряда окрашенных растворов с известной концентрацией белков. Зная объем раствора, концентрацию белков и массу муки, взятой для анализа, рассчитывают содержание белков.

**Цель работы.** Определить содержание белков в зерне злаковых культур.

**Ход работы.** Для приготовления белкового раствора 200 мг муки тонкого помола из зерна пшеницы (ржи, ячменя) заливают 5 мл 0,2 н. раствором NaOH, приготовленным на 20 %-м спирте в центрифужной пробирке и выдерживают в течение 30 минут. Затем проводят центрифугирование, осадок вновь обрабатывается 5 мл этого же раствора в течение 10 минут. Также повторяют центрифугирование, и все надосадочные жидкости объединяют. Для определения содержания белка берут 0,2 мл полученной вытяжки.

В пробирку наливают 0,2 мл белкового раствора, 4,8 мл раствора мочевины, 10 мин выдерживают и после этого добавляют 5 мл биуретового реактива. Смесь тщательно перемешивают, и пробирку помещают в водяную баню с температурой 40°C на 10 мин. Температура водяной бани должна быть  $40^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ , при более высокой температуре происходит восстановление биуретового реактива. После охлаждения раствор колориметрируют при 670 нм. В ходе определения можно брать меньше или больше, чем 0,2 мл белкового раствора, но необходимо объем доводить раствором мочевины до 5 мл.

Количество белка высчитывают на основании предварительно составленной калибровочной кривой по белку альбумину.

Построение калибровочной кривой.

Вначале готовят исходный раствор: 1 г альбумина растворяют в 100 мл воды. В 10 мл данного раствора содержится 100 мг белка. Далее

путем разбавления исходного раствора готовят ряд других растворов с содержанием 80, 60, 40, 20, 10, 5 мг белка в 10 мл.

Из полученных растворов отбирают в пробирки по 0,2 мл, добавляют 4,8 мл раствора мочевины, выдерживают 10 мин и добавляют 5 мл биуретового реактива, дальше поступают так и, как при определении содержания белка в вытяжке из муки. Количество белка в растворах рассчитывают в мг / мл.

Результаты записывают в таблицу 6.

Таблица 6 – Результаты количественного определения белка в семенах зерновых и зернобобовых культур

Наименование анализируемого образца	Оптическая плотность раствора	Концентрация белка по калибровочной кривой, мг/мл	Содержание белка (сырого протеина) в зерне, %

На основании полученных данных рассчитывают содержание белка в муке по формуле:

$$X = \frac{A \cdot B}{H} \cdot 100 \%,$$

где  $A$  – концентрация белка в опытном растворе, определенная с помощью калибровочной кривой, мг в 1 мл.

$B$  – объем раствора белка, окрашенного биуретом, мл;

$H$  – масса навески муки, мг;

100 – коэффициент для пересчета содержания белка в проценты.

*Материалы и оборудование:* 1) фотоэлектроколориметр КФК-3, центрифуга, ступки, пипетки, мерные цилиндры на 25 мл, пробирки;

2) спиртовая щелочь – 4 %-ный раствор NaOH в 20 %-ном растворе этилового спирта, 3,1 %-ный раствор сульфата меди (5 г  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  в 95 мл воды).

*Объекты:* мука из семян злаковых и зернобобовых культур

### **Вопросы.**

1. Сколько белка содержится в зерне злаковых, бобовых культур?
2. На чем основан метод определения белков в растительных образцах методом Кьельдаля?
3. На чем основан метод определения содержания белков биуретовым методом?
4. Для чего используют калибровочный график, какова методика его составления?

8. Как проводится расчет процентного содержания белков в анализируемой растительной пробе по результатам колориметрирования окрашенных белковых растворов с использованием биуретового реактива?

### Определение содержания клейковины в зерне

Клейковина – это пластично-эластичное вещество, образующееся при отмывании теста, замешанного из муки хлебных злаков (пшеницы, ячменя, ржи). Химический состав клейковины не постоянен, но основную массу (не менее 80%) составляют спирторастворимые и щелочерастворимые белки – глиадины и глютелины. Также содержатся крахмал, жиры и сахара, которые прочно связаны с белками

Белки клейковины представляют собой вязкую, упругую массу. Количество клейковины, отмываемой из определенной навески муки или размолотого зерна, называют *выходом клейковины*. Различают выход сырой и сухой клейковины. Сырая клейковина обычно содержит примерно 2/3 воды и 1/3 сухого вещества.

Содержание клейковины в муке и ее физико-химические свойства определяют характер использования и качество получаемых из муки изделий. Для получения хлебобулочных изделий используют муку с высоким содержанием белка и клейковины. Количество клейковины в зерне пшеницы колеблется от 20 до 50% и зависит от сортовых особенностей пшеницы и условий выращивания растений. «Сила» муки и ее хлебопекарные качества зависят в основном от количества и качества клейковины. Для изготовления кондитерских изделий можно использовать муку с более низким содержанием клейковины.

**Принцип метода.** Белки клейковины способны набухать в воде, образуя вязкие массы или сгустки. На этом основаны методы извлечения клейковины из муки. Сначала из муки получают тесто, которое тщательно отмывают водой от крахмала и других веществ. В результате получают сырую клейковину и взвешивают ее. Содержание сухой клейковины получают путем высушивания до постоянной массы в сушильном шкафу.

**Цель работы.** Выделить клейковину и определить ее содержание в зерне пшеницы.

**Ход работы.** 10 г тонко размолотого зерна пшеницы или хлебопекарной муки помещают в фарфоровую чашку и приливают 5,5

мл водопроводной воды с температурой  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ . Шпателем замешивают тесто в один комок до однородной массы. Приставшие к шпателю или чашке частицы теста очищают скальпелем или ножом и присоединяют к основному комку. Комок тщательно разминают руками, формируют его в виде шара, кладут в чашку, закрывают стеклом и оставляют на 20 мин на отлежку для гидратации и образования внутри- и межмолекулярных связей в веществах, образующих клейковину (главным образом, белках – глиадине и глютенине).

После этого тесто переносят в фарфоровую чашку большего размера, полностью заливают холодной водопроводной воды. Клейковину отмывают, опуская тесто в воду и разминая его пальцами. Вначале это делают очень осторожно, перекладывая тесто с одной руки на другую, чтобы не терять частицы клейковины. Промывную воду по мере накопления в ней крахмала и других веществ меняют, каждый раз процеживая ее через густое сито для сбора отделившихся кусочков клейковины и присоединения ее к основной массе. Когда клейковина станет вязкой и упругой, а промывная вода прозрачной, дальнейшее ее отмывание можно вести более энергично под слабой струей водопроводной воды над густым ситом. Отмывание ведут до тех пор, пока вода, стекающая при обжати клейковины, не будет содержать крахмал. Полноту отмывки определяют по реакции крахмала на йод, который окрашивает крахмал в синий цвет. Для этого в промывную воду капают 1...2 капли раствора йода в йодиде калия. Отсутствие окрашивания свидетельствует, что клейковина отмыта полностью.

Для массовых определений содержания клейковины используют специальное устройство для механического отмывания клейковины.

Отмытую клейковину хорошо отжимают от излишней воды, сжимая ее между ладонями и вытирая ладони время от времени сухим полотенцем. Затем клейковину скатывают ладонями в шарик и взвешивают с точностью до 0,01 г. Содержание сырой клейковины, выраженное в процентах к массе исходного продукта, равно

$$\frac{m \cdot 100}{10} = 10m$$

где  $m$  – масса сырой клейковины, г

Для определения содержания сухой клейковины производят высушивание и взвешивание шарика полученной сырой клейковины

в сушильном шкафу при температуре 105 °С и высушивают до постоянной массы. Для ускорения сушки через 2 часа высушивания делают 3-4 параллельных надреза на частично высушенной клейковине с помощью скальпеля или ножа.

Содержание сухой клейковины в процентах к массе продукта будет равно

$$\frac{m_1 - m_0}{m} \cdot 100$$

где  $m$  - масса навески муки, взятая для определения сырой клейковины, г (т.е. 10 г)

$m_0$  - масса бюкса, г;

$m_1$  - масса бюкса и сухой клейковины, г.

### Определение гидратации клейковины

Степень гидратации клейковины характеризует способность клейковины набухать и удерживать воду. Этот важный показатель качества определяется в процентах количества воды, способной поглощаться сухой клейковиной. Значение данного показателя обычно находится в пределах 160-240%, но может колебаться в очень широких пределах – от 120 до 340%. Клейковина из муки высших сортов муки имеет более высокие показатели гидратации, чем клейковина из низших сортов муки.

Степень гидратации вычисляют исходя из содержания в муке сырой и сухой клейковины по формуле:

$$\frac{(\% \text{ сырой клейковины} - \% \text{ сухой клейковины}) \times 100}{\% \text{ сухой клейковины}}$$

Результаты работы заносят в таблицу 7.

Таблица 7 – Содержание сырой и сухой клейковины в муке из зерна злаков

Культура	Сорт муки	Содержание клейковины, %		Степень гидратации клейковины, %
		сырой	сухой	

--	--	--	--	--

*Оборудование:* весы, сушильный шкаф, шпатель, скальпель, фарфоровая чашка, пипетка или мерный цилиндр емкостью 10 мл, сосуд для отмывания клейковины диаметром 10-15 см, капроновое сито, бюкс.

*Объекты:* мука разных сортов пшеницы,

### **Вопросы.**

- 1.Что такое клейковина? Каков её химический состав?
- 2.Какое значение имеет клейковина для хлебопечения?
- 3.Как получают клейковину? Какими свойствами она обладает? Каково содержание сырой клейковины в зерне хлебных злаков?
- 4.Что характеризует показатель гидратации клейковины? Как он определяется?

### **Определение индекса деформации клейковины**

Качество клейковины определяется совокупностью реологических свойств (растяжимость, упругость, эластичность). Эти свойства отражаются в величине деформации сжатия шарика клейковины, которая выражается в условных единицах прибора ИДК (рис. 2).

Индекс деформации клейковины соответствует способности клейковины сопротивляться деформирующей нагрузке определенной величины при сжатии ее между двумя плоскостями в течение определенного времени. Согласно ГОСТ выделяют следующие группы качества клейковины (табл.8).

Таблица 8 – Группы качества клейковины по показателю ед. ИДК

Группа качества	Характеристика клейковины	Показания прибора в единицах ИДК (ед. ИДК)
Крошащаяся		Не определяется
III	Неудовлетворительная крепкая	От 0,0 до 17,0
II	Удовлетворительная крепкая	От 18,0 до 42,0
I	Хорошая	От 43,0 до 77,0
II	Удовлетворительная слабая	От 78,0 до 102,0
III	Неудовлетворительная слабая	103,0 и более
Неотмывающаяся		Не определяется

**Цель работы.** Определить качество клейковины, полученной из муки различных сортов зерновых культур.

**Подготовка прибора.** Перед работой прибор ИДК-1 прогревается в течение 15–20 мин., затем проводится проверка его калибровки. Для этого в центр опорного столика (1) устанавливают мерную плитку толщиной 10,55 мм, соответствующую нулевой отметке шкалы микроамперметра. Придерживая пуансон (2), нажимают кнопку «Пуск» и плавно опускают пуансон на мерную плитку. Стрелка микроамперметра (3) прибора должна устанавливаться против отметки «0». Если она отклоняется от отметки «0», необходимо, вращая ось потенциометра «Калибровка 0», добиться правильного положения стрелки.

Для калибровки максимальной отметки шкалы «120» необходимо в центр опорного столика установить мерную плитку толщиной 2,15 мм и в том же порядке добиться соответствия показания стрелки значению «120» микроамперметра.

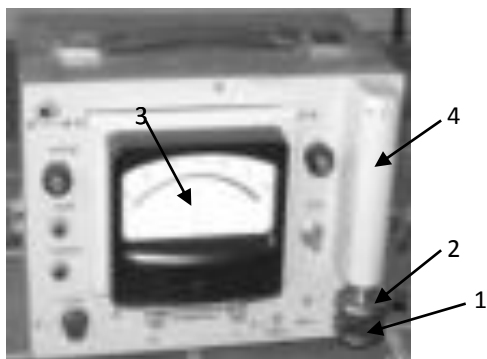


Рис. 2. Индикатор деформации клейковины (ИДК-1)

**Ход работы.** Из окончательно отмытой клейковины выделяют навеску 4 г, обминают пальцами и формируют шарик. Затем его помещают на 15 мин на отлежку в чашку с водой, имеющей температуру  $18 \pm 2$  °С. Если клейковина крошащаяся, не формируется в шарик, то её относят к 3 группе без определения качества на приборе. После отлёжки навеску помещают в центр опорного столика (1) и нажимают кнопку «Пуск» (удерживать 1...2 сек). Пуансон опускается на клейковину и осуществляет ее сжатие с усилием  $120 \pm 2,5$  г. При этом жестко связанный с ним сердечник также перемещается внутри соленоидного дифференциального датчика (4).

Разница потенциалов в плечах моста, возникающая в результате перемещения пуансона-сердечника, поступает на миллиамперметр (3), отражая упругие свойства определяемого образца клейковины. По истечении 30 секунд пуансон автоматически затормаживается, а стрелка микроамперметра останавливается на определенном делении шкалы.

Показания прибора записывают и устанавливают группу качества клейковины. Результаты определения заносят в таблицу 9.

Таблица 9 – Качество клейковины пшеничной муки

Сорт муки	Значение ИДК	Группа качества

Для определения индекса деформации клейковины следующего образца нажимают кнопку «Тормоз», поднимают пуансон вверх, затем отпускают кнопку «Тормоз» и снимают используемую клейковину с опорного столика прибора. Диски столика и пуансона протирают сухой мягкой тканью.

*Оборудование:* прибор ИДК-1, весы.

*Объекты:* отмытая сырая клейковина пшеницы или других культур.

### **Вопросы.**

1. Назовите группы качества клейковины и критерии их оценки.
2. Назовите методы определения качества клейковины.
3. Что означает показатель ед. ИДК?

## **3. ФЕРМЕНТЫ**

Ферменты – это органические катализаторы белковой природы, которые обладают высокой специфичностью, синтезируются в клетках и многократно ускоряют протекающие в них реакции. При этом сами они не претерпевают химические превращения и не входят в состав образующихся продуктов. Синтез ферментов находится под контролем ДНК ядра, хлоропластов и митохондрий. Они катализируют все реакции обмена веществ в растениях. В клетках содержание отдельных ферментов может составлять от долей процента до нескольких процентов от общего количества растворимого белка.



Ферменты определяют скорость и направленность многих биохимических процессов, в том числе энергетики клетки. С их действием связаны многие хозяйственные признаки: устойчивость к стрессовым факторам среды, скороспелость, урожайность, качество получаемой продукции.

Ферменты построены по типу простых или сложных белков. Простые состоят только из белка, а сложные имеют кроме белковой части – небелковую часть (простетическую группу), которая может быть представлена веществами неорганической природы (ионы металлов) или органической (углеводы, витамины).

Активность ферментов зависит от многих факторов: концентрации субстрата, pH среды, температуры, наличия тяжелых металлов и многих других. При изучении активности ферментов необходимо учитывать, что каждый фермент характеризуется определенным интервалом pH и температуры, при которых проявляет наибольшую активность и устойчивость.

Действие ферментов наблюдают путем учета появления продуктов реакции или исчезновения вещества, на которое фермент действует. За единицу любого фермента принимают такое его количество, которое при оптимальных условиях для реакции превращает 1 микромоль (мкМ) субстрата за одну минуту.

В связи с высокой лабильностью ферментов и зависимостью активности от многих факторов необходимо соблюдать ряд предосторожностей при работе с ними. Работа с термолабильными ферментами должна проводиться в специальной холодной комнате при температуре от 0 до +4°C. Должна поддерживаться на уровне оптимальных значений кислотность среды. Химические реактивы должны быть чистыми, т.е. не содержать химические примеси, подавляющие работу ферментов.

Активность ферментов у растений сильно изменяется в зависимости от воздействия на растения условий внешней среды, наследственных свойств растений, фазы развития, условий питания и увлажнения, технологических приемов выращивания. Эти изменения в активности ферментов отражаются в интенсивности и направленности биохимических процессов и в итоге – в изменении урожайности и химического состава растений.

### **Изучение действия амилазы на крахмал**

Ферментативный гидролиз крахмала осуществляется группой ферментов класса гидролаз, которые получили название амилазы. Известно три вида амилаз:  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза и глюкоамилаза.  $\alpha$ -амилаза гидролизует внутренние  $\alpha$ -1,4-глюкозидные связи в субстратах, приводя к образованию различных низкомолекулярных продуктов с разветвленной цепью (декстринов) и небольшого количества мальтозы.

$\beta$ -амилаза и глюкоамилаза гидролизует наружные концы цепей полисахаридов, отщепляя последовательно мальтозные и глюкозные остатки. Действие их прекращается вблизи первой точки ветвления полисахаридов. Поэтому кроме мальтозы и глюкозы образуются декстрины высокой молекулярной массы (рис.3).

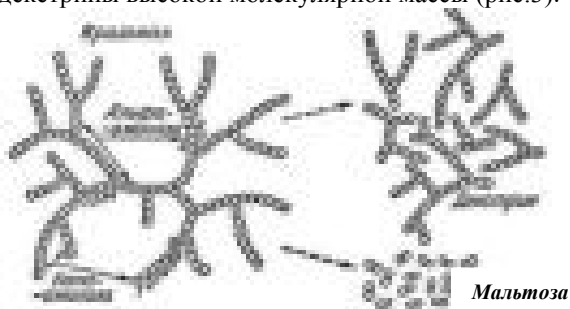


Рис.3. Схема расщепления молекулы крахмала амилазами

Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание, а декстрины, в зависимости от величины своих частиц, дают с йодом фиолетовую, красно-бурую, бурую окраску или вообще не окрашиваются.

Поэтому, если к раствору крахмала прибавить раствор амилазы и через определенные промежутки времени добавлять в пробы раствор йода, то жидкость приобретает вначале синий цвет, а затем – фиолетовый, красный, оранжевый и желтый. Это объясняется тем, что амилаза расщепляет крахмал через ряд промежуточных продуктов. Конечные продукты гидролиза крахмала – мальтоза и глюкоза не окрашиваются йодом, но могут быть обнаружены реактивом Фелинга.

В солоде (проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя) содержатся активные  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы. Они хорошо растворяются в воде, поэтому их можно получить в виде водной вытяжки.

**Принцип метода.** Промежуточные продукты гидролиза крахмала амилазой окрашиваются йодом в цвета, переходящие от синего в фиолетовый, красно-бурый и бурый. Конечные продукты гидролиза йодом не окрашиваются, но с реактивом Фелинга дают красно-бурый осадок закиси меди. Наблюдение за изменением окраски позволяет проследить образование промежуточных и конечных продуктов гидролиза крахмала.

**Цель работы:** провести гидролиз амилазой крахмала прорастающих семян и проанализировать состав полученных продуктов гидролиза.

**Ход работы.** В штатив поставить 10 пробирок. В каждую пробирку налить по 5 мл воды и 2 капли раствора йода в йодистом калии.

В качестве субстрата используют 1%-ный раствор картофельного крахмала.

*Приготовление раствора амилазы.* 5 г проросших семян ячменя или пшеницы растирают с 1%-ным NaCl в соотношении 1:5 переносят в колбочку на 100 мл, выдерживают в холодильнике 1-1,5 часа, доводят раствором до метки, перемешивают и фильтруют через ватный фильтр. Фильтрат используют в качестве ферментного препарата.

В колбочку берут 20 мл раствора крахмала и добавляют 2 мл приготовленной амилазы. Быстро перемешивают взбалтыванием. Сразу же из этой колбочки берут пипеткой 1 мл крахмала и вносят в одну из десяти пробирок. Эта пробирка контрольная. Она показывает, в какой цвет окрашивается крахмальным клейстером йодом.

Колбочку помещают в стакан с водой, имеющей температуру 40° С. Из этой колбочки через каждые 3-5 мин берут по 1 мл раствора и вносят по очереди в приготовленные пробирки.

При выполнении этой задачи необходимо создать такие условия гидролиза крахмала, чтобы можно было установить спектр цветных переходов разложения крахмала через ряд промежуточных продуктов по схеме:

Крахмал - Амилодекстрин – Эритродекстрин – Ахродекстрин – Мальтоза – Глюкоза  
(синий) (фиолетовый) (красно-бурый) (бурый) (бесцветный)

Чтобы достичь этой цели, необходимо регулировать температуру воды и продолжительность времени между взятием проб. Например, если гидролиз протекает медленно, то следует в стакан подлить горячей воды, доведя ее до 50°, увеличить количество

фермента, пробы брать через 5 мин или более. При быстром гидролизе воду необходимо охладить, а пробы брать чаще.

После исчезновения специфической йодной реакции необходимо удостовериться в наличии восстанавливающих сахаров. Для этого в чистую пробирку наливают 2 мл реактива Фелинга, 1 мл жидкости из колбочки и кипятят. При нагревании окисное соединение меди восстанавливается за счет окисления гексоз до закиси меди, выпадающей в виде красно-бурого осадка. Это будет свидетельствовать о полном разложении крахмала до редуцирующих сахаров.

Результаты занести в таблицу 10. Спектр цветных переходов зарисовать цветными карандашами. Сделать выводы.

Таблица 10 – Результаты гидролиза крахмала амилазой

№ пробирки	Время инкубации, мин	Окраска
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

*Оборудование и реактивы:* 1) весы, штатив с пробирками, воронка, колба для фильтрации, электрическая плитка или водяная баня, фарфоровая ступка, колба на 100 мл, пипетки.

2) 2%-ный раствор крахмала, 1%-ным NaCl, реактив Фелинга. Для реактива Фелинга готовят два раствора. А– 34,6 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 500 мл раствора; В – 175 г сегнетовой соли (тетрагидрата двойной натриево-калиевой соли винной кислоты) и 70 г гидроксида натрия в 500 мл раствора. Перед употреблением смешивают равные объемы первого и второго раствора.

*Объекты:* прорастающие семена ячменя или пшеницы.

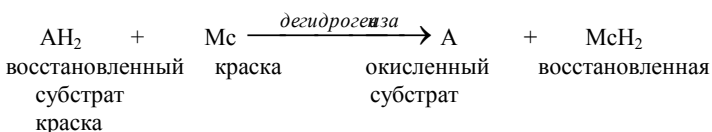
### **Вопросы.**

1. Какие ферменты участвуют в разложении крахмала? Каковы особенности их действия?
2. Каковы промежуточные продукты ферментативного гидролиза крахмала?
3. Как можно обнаружить промежуточные продукты гидролиза крахмала?
4. Как можно доказать, что крахмал в ходе опыта разложился полностью?

### **Обнаружение дегидрогеназ в растениях по восстановлению метиленовой сини**

Дегидрогеназы – это ферменты класса оксидоредуктаз (окислительно-восстановительных ферментов), катализируют отщепление водорода от дыхательного субстрата и перенос его к промежуточным продуктам или конечным акцепторам водорода.

**Принцип метода.** Обнаружение дегидрогеназ основано на изменении окраски метиленовой сини (Mc), которая в окисленной форме имеет синий цвет, а при восстановлении переходит в бесцветную лейкоформу. Восстановление краски происходит по следующей схеме:



**Цель работы.** Выявить наличие дегидрогеназ в прорастающих семенах.

**Ход работы.** Начинающие прорастать семена гороха очищают от семенной кожуры. Наполняют ими две пробирки почти до верха. Первую – семенами, убитыми кипячением в течение 5 мин в стакане на электрической плитке, вторую – живыми. В обе пробирки наливают раствор метиленовой сини так, чтобы полностью закрыть семена и оставляют на 3 мин. Затем краску сливают, водопроводной водой промывают семена. После промывания семена имеют темно-синюю окраску. Семена заливают до верха водой. Пробирки закрывают пробками (так создаются анаэробные условия) и ставят в термостат на 0,5 часа при температуре 28–30°C. Обращают внимание на окраску

семян в начале и в конце получасового периода. Семена, которые не подвергались кипячению, теряют синюю окраску. Это происходит потому, что дегидрогеназы, участвующие в дыхании живых клеток семян, катализировали передачу водорода от дыхательных субстратов на метиленовую синь, которая восстановилась и обесцветилась. Затем горох из пробирок высыпает в чашки Петри и оставляют на воздухе, наблюдают за изменением окраски. Обесцвеченные живые семена снова синют, так как в присутствии кислорода лейкоформа метиленовой сини окисляется.

Результаты опыта записывают в табл. 11. Делают выводы

Таблица 11– Результаты обнаружения дегидрогеназ в семенах

Вариант опыта	Окраска семян		
	в начале получасового периода	в конце получасового периода	после воздействия воздуха
Контроль – семена гороха, убитые кипячением			
Опыт – живые семена гороха			

*Оборудование и реактивы:* 1) пробирки с пробками, штатив, стеклянный термостойкий стакан на 250 см<sup>3</sup> электроплитка, чашки Петри, термостат;

2) 0,005%-ный раствор метиленовой сини.

*Объект:* прорастающие семена гороха.

### **Вопросы.**

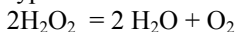
1. Какие реакции катализируют дегидрогеназы?
2. На чем основан метод обнаружения дегидрогеназы с помощью метиленовой сини?
3. Назовите причину изменения окраски живых семян до и после помещения их в термостат.
4. Назовите причину разной окраски семян в контроле и опыте?

### **Обнаружение каталазы в растительных объектах**

Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Он представляет собой железопротеид. Деятельность каталазы в живой клетке сопряжена с активностью флавопротеидов – важнейшего звена

электронно-транспортной цепи дыхания. Каталаза расщепляет токсичную для живой клетки перекись водорода и является ферментативным компонентом системы защиты клеток от окислительных повреждений.

В процессе дыхания перекись водорода образуется в качестве побочного продукта окисления веществ. Каталаза разлагает ее на воду и молекулярный кислород по уравнению:



**Принцип метода.** Об активности каталазы судят по выделению кислорода, образующегося при разложении перекиси водорода.

**Цель работы.** Выявить каталазу в прорастающих семенах.

**Ход работы.** 3 г листьев или прорастающих семян растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком и добавлением на кончике скальпеля  $\text{CaCO}_3$  или мела для создания щелочной реакции. Во время растирания вливают небольшими порциями 20 мл дистиллированной воды. Экстракт отфильтровывают в чистую пробирку. Фильтрат делят на две пробирки. Фильтрат в одной пробирке (контрольной) доводят до кипения над пламенем спиртовки. В обе пробирки добавляют по 3 мл 3%-ной перекиси водорода. В результате разложения перекиси водорода ферментом выделяются пузырьки кислорода, дающие хорошо заметную пену. Наблюдают выделение газа в опытной пробирке, подносят к ней тлеющую лучинку. В присутствии кислорода лучинка ярко загорится. Сравнивают с контрольной пробиркой. Наблюдаемые изменения записывают в таблицу 12 и делают выводы. Объясните различия, наблюдаемые в опытной и контрольной пробирках.

Таблица 12 – Результаты обнаружения каталазы в прорастающих семенах

Вариант опыта	Наблюдаемая реакция после добавления в пробирку $\text{H}_2\text{O}_2$
Контроль – (фильтрат после кипячения)	
Опыт	

*Оборудование и реактивы:* 1) фарфоровые ступки, мерный цилиндр на 25 мл, лабораторный штатив, пробирки, воронки, фильтры, спиртовка;

2)  $\text{CaCO}_3$ , 3%-ный  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

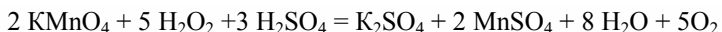
*Объекты:* прорастающие семена пшеницы или других культур.

**Вопросы.**

1. К какому классу ферментов относится каталаза?
2. Какую реакцию каталаза ускоряет и какую роль играет в жизнедеятельности клетки?
3. Как можно выявить каталазу в прорастающем зерне?
4. Выделяются ли пузырьки газа в контрольной пробирке и почему?
5. Почему в сухом зерне каталаза не определяется, а в проросшем ее активность очень высока?

### Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

**Принцип метода.** Метод основан на учете изменения количества пероксида водорода, который расщепляется под действием каталазы из экстракта растительной ткани. Количество пероксида водорода в контрольном и опытном образцах определяется путем титрования перманганатом калия. Реакция идет по уравнению:



**Цель работы.** Определить и проанализировать активность каталазы в различных растительных объектах (овощи, корнеплоды, листья растений, прорастающие семена и другие). Объяснить различия по активности каталазы в сухих и прорастающих семенах.

**Ход работы.** 2 г сырого картофеля или овощей, 1 г проросших семян растирают с кварцевым или стеклянным песком в фарфоровой ступке до однородной массы, приливая небольшое количество дистиллированной воды (2-3 мл). Растертую массу количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят водой до метки. Содержимое колбы тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для извлечения ферментов. Затем содержимое колбы снова перемешивают и фильтруют.

В две конические колбы (контрольная и опытная) объемом 200 мл берут по 5 мл ферментной вытяжки. В контрольной колбе каталазу инактивируют путем добавления 5 мл 10%-ного раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Затем в обе колбы добавляют по 25 мл 0,1 н. раствора пероксида водорода. По истечении ровно 15 минут действие фермента в опытной колбе прекращают добавлением 5 мл 10%-ного раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Далее



содержимое контрольной и опытной колб титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до образования устойчивого в течение примерно одной минуты розового окрашивания. Записывают количество миллилитров раствора 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ , пошедшего на титрование контрольной и опытной колб. Разница между количеством 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ , пошедшим на титрование контрольной и опытной колб эквивалентна количеству пероксида водорода, разложенного катализом в опытном образце, при этом 1 мл 0,1 н. раствора  $\text{KMnO}_4$  соответствует 1,7 мг разложенного пероксида водорода.

**Примечание.** В зависимости от объекта исследования активность каталазы может существенно различаться. Поэтому при выполнении работы может быть необходимым уменьшить или увеличить объем вытяжки, взятой для инкубации, и/или время инкубации. Эти изменения должны быть учтены при расчетах активности фермента.

Исходные данные для расчета активности фермента заносят в таблицу 13.

Таблица 13 – Результаты определения активности каталазы в прорастающих семенах

Наименование исследуемого материала	Навеска растительного материала, г	Общий объем вытяжки, мл	Объем вытяжки, взятой для инкубации, мл	Время инкубации, мин.	Кол-во мл 0,1 н $\text{KMnO}_4$ , пошедшего на титрование		Активность каталазы, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$ сырой массы $\times$ мин
					контрольного образца	опытного образца	

Активность каталазы выражают в мкмоль пероксида водорода, разложенного ферментом в расчете на 1 г исследуемого материала (или на 1 мг вытяжки из него) за 1 мин. Вычисление ведут по формуле:

$$E = \frac{(k - o) \times 1,7 \times 100}{v \times n \times t \times 0,034},$$

где

$E$  – активность каталазы, мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$  сырой массы  $\times$  мин;

$k$  – количество 0,1 н  $\text{KMnO}_4$ , пошедшего на контрольное титрование, мл;

$o$  – количество 0,1 н  $\text{KMnO}_4$ , пошедшего на титрование опытного образца, мл;

100 – общий объем вытяжки, мл;  
 $v$  – объем вытяжки ферментов, взятой для инкубации из колбы на 100 мл;  
 $n$  – навеска материала, г;  
 $t$  – время инкубации ферментной вытяжки с раствором пероксида водорода.

*Оборудование и реактивы:* 1) фарфоровая ступка с пестиком, мерные колбы емкостью 100 мл, конические колбы емкостью 200 мл, мерные пипетки на 5, 25 мл, бюретка для титрования на 50 мл, кварцевый или стеклянный песок.

2) перманганат калия (0,1н); пероксид водорода (0,1н), 10%-ный раствор серной кислоты.

*Объекты:* клубни, овощи, прорастающие семена пшеницы или других культур, листья комнатных растений и другие.

### **Вопросы.**

1. К какому классу ферментов относится каталаза?
2. Как происходит обезвреживание перекиси водорода каталазой в живых клетках?
3. На чем основано определение активности каталазы методом А.Н. Баха и А.И. Опарина?
4. Для чего нужен контрольный вариант при определении активности каталазы по методу А.Н. Баха и А.И. Опарина?

### **Обнаружение аспарагина, как продукта ферментативного гидролиза белков в растительных объектах**

При прорастании семян запасные белки переводятся в транспортные формы азота при участии протеолитических ферментов. При этом накапливаются легко растворимые аминокислоты, которые могут перемещаться в точки роста и участвовать в построении конституционных белков.

Некоторые аминокислоты остаются не использованными и распадаются на аммиак и безазотистые соединения. Накопление в молодом растении аммиака грозило бы растению отравлением, но этого не происходит, так как аммиак связывается аспарагиновой кислотой с образованием аспарагина (амида)  $\text{CO}(\text{NH}_2)\text{CHNH}_2\text{COOH}$ . Аспарагин используется в дальнейшем в белковых синтезах (с

помощью реакций переаминирования). Кристаллы аспарагина можно обнаружить в прорастающих семенах бобовых, богатых запасными белками. Аспарагин легко извлекается этиловым спиртом из проростков, выращенных в темноте. На свету аспарагин используется для синтеза белков с использованием углеводов, продуктов фотосинтеза, и поэтому в проростках, выросших на свету, не обнаруживается.

**Принцип метода.** Из проростков высокобелковых культур (люпин), выращенных в темноте, аспарагин извлекается путем раздавливания ткани в капле спирта на предметном стекле. После высыхания спирта препарат рассматривают в микроскоп. Аспарагин обнаруживается по наличию ромбических кристаллов.

**Цель работы.** Выявить наличие в проростках люпина аспарагина, как продукта протеолиза белков.

**Ход работы.** Семена желтого или белого люпина проращивают в темноте 12-14 дней, после чего в проростках обнаруживают аспарагин по методу Бородин.

Из подсемядольного колена выдавливают на предметное стекло каплю сока и наносят на нее каплю 96<sup>0</sup> этилового спирта.

После высыхания спирта образуются ромбические кристаллы аспарагина, хорошо видимые в микроскоп.

Зарисовать кристаллы. Сделать выводы.

**Оборудование и реактивы:** 1) предметные стекла, капельницы, микроскоп. Пророщенные в темноте семена желтого или белого люпина;

2) спирт 96%-ный.

*Объект:* пророщенные в темноте двухнедельные растения люпина.

### **Вопросы.**

1. Какие биохимические реакции катализируют протеолитические ферменты?

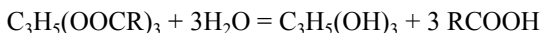
2. Какова роль аспарагина в обезвреживании аммиака в клетках?

3. В чем принцип обнаружения аспарагина в проростках бобовых культур методом Бородин?

4. Почему кристаллы аспарагина не обнаруживаются в проростках, если семена проращиваются на свету?

## Ферментативное превращение жиров при прорастании семян

Запасные жиры – это сложные эфиры глицерина и жирных кислот. В процессе прорастания семян запасные жиры семян переводятся в растворимое состояние в результате гидролиза. В этом процессе участвует фермент липаза. В результате гидролиза происходит распад жира на глицерин и жирные кислоты:



**Принцип метода.** Количество образовавшихся при прорастании жирных кислот (свободных) определяют путем титрования экстракта из семян масличной культуры (например, подсолнечника) раствором щелочи. Контролем служат сухие (не проросшие) семена, из которых также готовят экстракт и титруют щелочью.

**Цель работы.** Изучить действие липазы на жиры в прорастающих семенах масличных культур.

**Ход работы.** Отбирают по 50 шт. семян подсолнечника – сухих и проросших. Семена очищают от лузги и каждую порцию растирают в ступке с кварцевым или стеклянным песком, добавляя 10 мл воды. Содержимое ступки переносят в колбочки, ступку и пестик промывают в 10 мл воды, промывные воды также сливают в колбочку и добавляют 1-2 капли фенолфталеина. Смесь титруют 0.1 Н NaOH или КОН до появления розовой окраски. Сравнивают результаты титрования экстрактов из сухих и проросших семян подсолнечника. Результаты записывают в таблицу 14. Делают выводы.

Таблица 14 – Результаты изучения действия липазы на жиры при прорастании семян масличных растений

Вариант	Пошло на титрование 0.1 Н NaOH, мл
1. Сухие семена (контроль)	
2. Проросшие семена	

*Материалы и оборудование:* 1) ступки фарфоровые, кварцевый или стеклянный песок, пипетки Мора на 10 мл (или мерные цилиндры), кварцевый или стеклянный песок, колбочки для титрования;

2) 0.1 Н NaOH или КОН, фенолфталеин, дистиллированная вода.

*Объекты:* Сухие и проросшие семена подсолнечника;

## ЖИРЫ

Жиры (липиды) составляют около 1/5 сухих веществ протоплазмы. По химическому составу это смесь триглицеридов – сложных эфиров глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

Липиды являются основой клеточных мембран, выполняют энергетическую функцию, связанную с тем, что при окислении (распаде) жиров выделяется большое количество энергии – больше, чем при окислении белков и углеводов.

Главное место локализации липидов – семена. Например, в семенах подсолнечника содержится 30-50% жира, а у клешевины до 60% массы семян составляют жиры, меньше всего жира в семенах злаковых – 2-3 %.

Общую формулу молекулы жира можно представить в следующем виде:



где  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  – остатки высших жирных кислот

В состав жиров входят как насыщенные жирные кислоты, так и ненасыщенные (или непредельные). Всего в состав жиров может входить до 50 различных жирных кислот. Из насыщенных жирных кислот наиболее часто встречаются

пальмитиновая:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ,

стеариновая:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ,

арахиновая:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ .

Из ненасыщенных жирных кислот:

олеиновая:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ,

линолевая:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ,

линоленовая:

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

От состава жирных кислот зависит консистенция жира и его физические свойства. Жидкое состояние растительных масел, по сравнению с твердыми животными жирами, определяется присутствием в растительных маслах большого количества ненасыщенных жирных кислот. В животных жирах преобладают насыщенные жирные кислоты. Из растительных жиров твердыми являются кокосовое масло и масло какао бобов.

Основные полевые культуры умеренного климата содержат в маслах от 70 до 93% ненасыщенных кислот. Это дает им большие преимущества в условиях холодного стресса. Чем больше ненасыщенных жирных кислот содержится в клетках, тем растения более холодоустойчивы. Это связано с тем, что липиды являются основой структуры мембран. В условиях низких положительных температур такие масла остаются в жидком состоянии и мембраны сохраняют свои функциональные свойства.

Каждый вид культурных растений характеризуется свойственным ему соотношением жирных кислот, а также наличием значительных количеств конкретных или специфических жирных кислот. Например, в семенах крестоцветных содержится эруковая кислота, клешевины – рициновая, в семенах зонтичных – петрозелиновая.

Растительные жиры всегда содержат кроме триглицеридов и другие вещества в небольшом количестве. Это свободные жирные кислоты, моно- и диглицериды, фосфатиды и некоторые другие.

Для характеристики масел используется ряд констант. Основными являются кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное и перекисное число. Значения этих чисел характеризуют качество и чистоту жиров.

### **Определение кислотного числа жиров**

При гидролизе и окислении жиров происходит накоплением свободных жирных кислот. Показателем, характеризующим содержание в жирах свободных жирных кислот, является кислотное число.

Кислотное число жира – это количество миллиграммов гидроксида калия, которое необходимо для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Чем выше кислотное число, тем ниже качество жира. Величина этого показателя изменяется при созревании, прорастании семян,

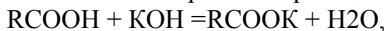
хранении жиров. По мере хранения жира (масла) в неблагоприятных условиях происходит гидролиз сложноэфирных связей в глицеридах. Так, повышенные температуры и свет способствуют активации сложноэфирных связей, а наличие влаги – развитию микроорганизмов. Высокой липолитической активностью обладают плесени, дрожжи, многие микроорганизмы. В результате гидролиза освобождаются свободные жирные кислоты, содержание которых и характеризует кислотное число.

Наличие свободных жирных кислот ухудшает вкусовые качества растительного жира и вызывает в нем окислительные процессы. В результате этого накапливаются пероксиды и гидропероксиды жирных кислот, альдегиды и кетоны, которые являются основными продуктами процесса прогоркания жира. Кислотное число, таким образом, определяет степень свежести жира.

Для определения кислотного числа жиров их растворяют в смеси спирта с эфиром, а затем титруют 0,1 н. гидроксидом калия в присутствии фенолфталеина. Для свежего очищенного растительного жира кислотное число обычно находится в пределах 0,5-2, а в ходе его длительного хранения может увеличиваться до 3-3,5. Если кислотное число жира превышает 3,5, то его используют на технические цели, а если превышает 5 – такой жир направляется на повторную очистку.

В незрелых или прорастающих семенах кислотное число многократно выше, может достигать 20-40. В незрелых семенах это связано с незавершенным процессом формирования жиров и накоплением не вовлеченных в синтез жиров свободных кислот, а в прорастающих – с гидролитическим распадом жиров с высвобождением жирных кислот.

**Принцип метода.** Свободные жирные кислоты в маслах нейтрализуют раствором КОН. Между щелочью и свободными жирными кислотами протекает реакция:



где ROON – жирная кислота.

По количеству щелочи КОН, пошедшей на титрование, рассчитывают кислотное число.

**Цель работы:** определить кислотное число жиров различных культур и различных сроков хранения.

**Ход работы.** В сухую взвешенную колбу на 50 мл вносят около 1 г жира (масла) и взвешивают на аналитических весах. Точную навеску масла определяют по разности между вторым (колба + жир) и первым (пустая колба) взвешиваниями.

В колбу приливают 30 мл нейтрализованной смеси спирта с эфиром, закрывают корковой пробкой и перемешивают до растворения масла. Затем к раствору масла прибавляют 4-5 капель 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. водным раствором КОН до ярко-розовой окраски. При анализе темно-окрашенного масла используют 1 %- ный спиртовой раствор тимолфталеина и титруют до появления синего окрашивания. Одновременно производят контрольное титрование 30 мл смеси спирта с эфиром.

Полученные результаты заносят в табл. 15.

Таблица 15– Определение кислотного числа жиров

Вид жира	Срок хранения	Навеска, г	Количество мл КОН, пошедшей на титрование		Кислотное число
			опытной пробы	контрольной пробы	

Кислотное число жира вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \times T \times 5.61}{H}$$

где  $X$  – кислотное число, мг КОН на 1г жира;

$a$  – объем 0,1 н. раствора КОН, пошедшего на титрование навески жира, мл;

$b$  – объем 0,1 н. раствора КОН, пошедшего на контрольное титрование (смеси спирта с эфиром), мл;

$T$  – поправка к титру КОН;

$H$  – масса навески жира, взятой для анализа, г;

5,61 – 0,1 молекулярной массы КОН.

*Оборудование и реактивы:* 1) мерные цилиндры на 50 мл, конические колбы на 100 мл, весы, бюретки для титрования;

2) нейтрализованная смесь 96 %-ного этилового спирта с серным эфиром (1:2), 0,1 н. водный раствор КОН (5,61 г КОН растворяют в 1 л воды), 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина (тимолфталеина).

*Объекты:* растительные масла, животный жир (разных сроков хранения).





Объект изучения	Навеска, г	Количество 0,5н НСІ, пошедшей на титрование		Число омыления
		опытной пробы	контрольной пробы	

Число омыления вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a-b) \times T1 \times 28,055 \times T2}{n},$$

где X – число омыления;

a – количество 0,5н НСІ, израсходованной на титрование контроля, мл;

b – количество 0,5н НСІ, израсходованной на титрование опытной пробы, мл;

T1 – поправка к титру НСІ;

28,055 – ½ молекулярной массы КОН;

T2 – поправка к титру КОН;

n – навеска жира, г.

*Оборудование и реактивы:* 1) водяная баня, колбы емкостью 100 мл с обратным холодильником, весы аналитические;

2) 0,5 н спиртовой раствор КОН, 0,5 н НСІ, фенолфталеин.

*Объекты:* масла различных культур.

### Определение йодного числа

Йодное число служит для характеристики непердельности жирных кислот, входящих в состав жиров (масел). Высокое йодное число указывает на высокое содержание непердельных (ненасыщенных) кислот. Такие масла являются ценными для пищевого и технического использования. Высокими йодными числами характеризуется льняное и конопляное масло, а низкими – масло сои, хлопчатника и других растений южных широт. По величине йодного числа можно судить о склонности его к высуханию, прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических масел. Уменьшение йодного числа в процессе хранения масла является индикатором его порчи.



При расчетах учитывают, что 1 мл 0,1 н. тиосульфата натрия соответствует 1 мл 0,1 н. раствора йода. Йодное число (ИЧ) вычисляют по формуле

$$\text{ИЧ} = \frac{V_k - V_o}{m} \cdot 100$$

где  $V_k$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование контрольного опыта, мл;

$V_o$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата, пошедшее на титрование опытного образца, мл;

$k$  – поправочный коэффициент к титру приблизительно 0,1 н. раствора тиосульфата;

$m$  – навеска масла, г.

*Оборудование и реактивы:* 1) весы аналитические, конические колбы емкостью 250 мл с пробками, водяная баня, бюретки для титрования;

2) этиловый спирт, 0,1 н. раствор тиосульфата натрия, 0,2 н. спиртового раствора йода, 1%-ный раствор крахмала.

*Объекты:* масла различных культур.

### **Вопросы:**

1. Какие вещества называются липидами? Какие жирные кислоты входят в состав растительных жиров?
2. Какие функции выполняют липиды в растениях?
3. Почему жиры (масла) у большинства растений жидкие?
4. Назовите константы жиров. Какие свойства жиров они характеризуют?
5. В чем состоит принцип метода определения кислотного числа жира?
6. Какое значение для качества жира имеет содержание в нем свободных жирных кислот?
7. В чем принцип метода определения числа омыления?
8. Что характеризует йодное число жира?

## **5. ВИТАМИНЫ**

Витамины – это группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной

химической природы, которые объединяются по признаку абсолютной необходимости для животных и растительных организмов. По химической природе они могут быть углеводородами, спиртами, кислотами.

В растениях витамины широко распространены. Они играют роль биокатализаторов в качестве коферментов или их предшественников, участвуют в различных процессах обмена веществ.

Растения способны сами синтезировать все необходимые им витамины, человек получает их с пищей, животные – с кормами.

Отдельные виды растений, а также их органы существенно различаются по содержанию витаминов. Например, овощные, плодовые ягодные культуры накапливают повышенные количества витамина С (аскорбиновой кислоты), фолиевой кислоты, каротина (предшественника витамина А). Витамины группы В накапливаются в зерне зерновых и зернобобовых культур.

Количество витаминов обычно выражают в мг на 100 г массы продукта (мг %), или мкг на 100 г массы продукта. Содержание витаминов – важный показатель биологической ценности продуктов питания и кормов.

Накопление витаминов в растениях определяется генетическими особенностями и условиями выращивания. Это влияние факторов должно учитываться для создания условий, способствующих накоплению в продукции растениеводства отдельных групп этих биологически активных веществ.

Количественное содержание витаминов в растениях очень невелико, по сравнению с содержанием углеводов, белков и жиров. Это определяет необходимость очень точных методов их определения и строгое соблюдение методики анализа.

### **Определение аскорбиновой кислоты (витамина С)**

Витамин С (аскорбиновая кислота) – один из важнейших водорастворимых витаминов. В наибольших количествах он содержится в зеленых растениях, свежих плодах, ягодах и овощах. В зрелых зерновках злаков он отсутствует.

Содержание витамина С в плодах и овощах, мг%

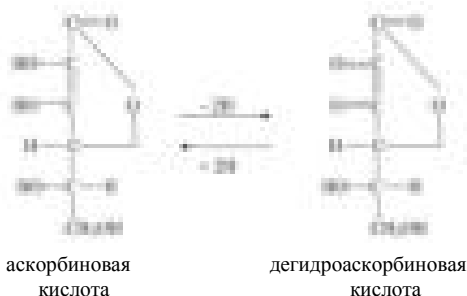
Яблоки	5-30	Картофель	10-20
--------	------	-----------	-------

Вишня	5-15	Капуста белокочанная	10-40
Виноград	0-5	Капуста цветная	50-150
Черная смородина	100-400	Морковь	5-10
Лимон	40-60	Томаты	20-40
Шиповник	1000-4000	Зеленый горошек	30-50
Актинидия	600-800	Лук репчатый	5-20

Содержание аскорбиновой кислоты является показателем восстановительной активности тканей растений. Это определяет ее роль как антиоксиданта, способного к нейтрализации перекисей. Благодаря этому повышается устойчивость организмов к неблагоприятным условиям среды и болезням. Отсутствию витамина С вызывает кровоточивость десен, расшатывание и выпадение зубов (цинга), поэтому витамин называют антицинготным.

Аскорбиновая кислота хорошо растворяется в воде. В растворах легко разрушается, особенно при высокой температуре. Поэтому овощи, которые подвергаются тепловой обработке, теряют значительную ее часть. Следы железа, меди, щелочная реакция также действуют на нее разрушительно.

Роль аскорбиновой кислоты в окислительно-восстановительных процессах связана с тем, что она существует в двух формах – собственно аскорбиновой кислоты и легко образующейся из нее окисленной формы – дегидроаскорбиновой кислоты. Эти превращения связаны со способностью молекулы отдавать или принимать протоны водорода:



**Принцип метода.** Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее редуцирующих свойствах. Производится экстракция витамина раствором кислоты (соляной, щавелевой) с последующим титрованием раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (краска Тильманса) до установления светло-розовой окраски.

**Цель работы.** Определить содержание аскорбиновой кислоты в различных растительных объектах: листьях, хвое, плодах, ягодах, овощах и других объектах.

**Ход работы.** 5–10 г растительного материала, помещают в ступку и растирают. Приливают 5 мл 1 %-ного раствора HCl и снова растирают до однородной массы. Во время растирания приливают еще 15 мл 1 %-ного раствора HCl и всю смесь без потерь переносят в мерную колбу на 100 мл, ополаскивая несколько раз ступку и пестик 2 %-ным раствором щавелевой кислоты. Объем раствора в колбе доводят щавелевой кислотой до метки 100 мл, хорошо перемешивают и оставляют для экстракции аскорбиновой кислоты на 10 мин. Затем полученную смесь фильтруют через сухой фильтр в колбу на 100 мл.

В стаканчик на 50 мл переносят 10 мл фильтрата и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления слабо розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин. Одновременно проводят контрольное титрование для учета кислот, применяемых при экстракции витамина С из растительных тканей. Для этого в сухой стаканчик на 50 мл вносят 2 мл соляной и 8 мл щавелевой кислоты и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до такого же окрашивания. Полученные результаты записывают в таблицу 18.

Таблица 18 – Определение содержания аскорбиновой кислоты в растительном материале

Объект	Масса взятой навески, г	Объем вытяжки, полученной из взятой навески, мл	Объем вытяжки, взятой для титрования, мл	Объем 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл		Содержание аскорбиновой кислоты, мг/100 г
				опытной пробы	контрольной пробы	

Расчет содержания витамина С в материале ведут по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot C \cdot 100}{V \cdot H}$$

где  $X$  – содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г исследуемого материала, мг %;

$a$  – объем краски, пошедшей на титрование опытного раствора, мл;

$b$  – объем краски, пошедшей на контрольное титрование, мл;  
 $T$  – титр краски 2,6–дихлорфенолиндофенола;  
 $C$  – объем вытяжки, полученной из взятой навески (100 мл);  
 $V$  – объем вытяжки, взятой для титрования (10 мл);  
 $H$  – масса навески исследуемого материала, г;  
100 – коэффициент для перевода результатов на 100 г растительного материала.

*Оборудование и реактивы:* а) весы, бюретки титровальные, мерные пипетки на 10 мл, мерные цилиндры на 25 мл, мерные колбы на 100 мл, конические колбы на 100 мл, ступки с пестиками.

б) 1 %-ный раствор соляной кислоты; 2 %-ный раствор щавелевой кислоты; 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.

**0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола:** 60 мг 2,6-дихлорфенолиндофенола переносят в мерную колбу на 200 мл, приливают 100...150 мл теплой дистиллированной воды и 4...5 капель 0,01 н. раствора NaOH. Колбу взбалтывают в течение 10 мин. После охлаждения доливают водой до метки 200 мл, хорошо перемешивают и фильтруют через плотный фильтр в сухую колбу. Раствор может быть использован в течение 8 дней при хранении в холодильнике и при проверке титра в день употребления. Титр краски устанавливают аскорбиновой кислотой.

*Объекты:* листья, хвоя, плоды, ягоды, овощи.

### **Вопросы:**

1. Дайте определение витаминам. Какую роль они выполняют в растениях, организме человека и животных?
2. Какова химическая природа витамина С, какие функции выполняет в растительном организме?
3. Каковы проявления недостатка в витамина С организме человека?
4. Чем обусловлена способность аскорбиновой кислоты участвовать в окислительно-восстановительных процессах у растений?
5. Почему овощи и фрукты лучше употреблять в свежем виде без термической обработки?
6. В чем принцип определения содержания витамина С в растительных объектах?

## **6. ВЕЩЕСТВА ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА**



Под метаболизмом, или обменом веществ, понимают совокупность химических реакций в организме, обеспечивающих его веществами для построения тела и энергией для поддержания жизнедеятельности.

Часть реакций оказывается сходной для всех живых организмов (растений, животных, микроорганизмов). В каждой их клетке происходит образование и распад белков, нуклеиновых кислот, углеводов. Эти процессы относят к реакциям первичного метаболизма, или первичного обмена.

Кроме реакций первичного обмена существует значительное число реакций, которые приводят к образованию соединений, присутствующих не у всех, а иногда у очень немногих групп организмов. Эти реакции объединяют названием вторичный метаболизм, или вторичный обмен. Продукты этих реакций называют продуктами вторичного метаболизма (обмена), или вторичными соединениями, вторичными метаболитами. Вторичные соединения, как правило, не участвуют в таких основополагающих процессах растений, как дыхание, фотосинтез, синтез белков, нуклеиновых кислот и липидов. Но есть исключения, поэтому различия между первичным и вторичным метаболизмом в определенной мере условны.

Создание современных высокоразрешающих аналитических приборов и новых химических методов анализа позволило идентифицировать несколько десятков тысяч вторичных соединений, и число их продолжает расти.

К основным группам (классам) вторичных метаболитов относятся:

1. Органические кислоты алифатического ряда (муравьиная, уксусная, масляная, молочная, янтарная, пировиноградная, лимонная, аскорбиновая и многие другие).

2. Гидроароматические соединения (инозит, хинная кислота, шикимовая кислота и др.).

3. Фенольные соединения (ванилин, кумарины, катехины, антоцианы, флавоны, дубильные вещества, лигнин, меланины и др.).

4. Гликозиды (амигдалин, синигрин, синальбин, соланины, сапонины и др.).

5. Эфирные масла и смолы.

6. Каучук и гуттаперча.

7. Алкалоиды (кофеин, люпинин, никотин, морфин, кокаин, кураре и др.).

8. Регуляторы роста и антибиотики.

Природные вторичные метаболиты растений, обладают защитными свойствами против биотических и абиотических факторов среды и формируют физиологические механизмы, осуществляющие ответные реакции растений на изменение условий окружающей среды.

Любое растительное сырьё содержит сложный состав первичных и вторичных соединений, которые определяют возможность использования различных видов растений в питании людей и кормлении животных, для промышленной переработки, а также многообразный характер действия лекарственных растений.

### **Определение общей (титруемой) кислотности**

Кислотность клеточного сока, плодов и овощей определяется количественным и качественным составом органических кислот, которые в них содержатся. Наиболее часто в растениях встречаются яблочная, лимонная, янтарная, винная, фумаровая, щавелевоуксусная, щавелевая кислоты.

Органические кислоты образуются в ходе различных биохимических процессов, в первую очередь в цикле ди- и трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле. Многие органические кислоты являются исходными соединениями для биосинтеза аминокислот, липидов, витаминов, сахаров, фитогормонов. Также они могут служить дыхательными субстратами, как источник энергии в клетке.

Органические кислоты могут накапливаться в листьях, корнях, плодах и ягодах. При этом разные растения различаются по составу накапливаемых органических кислот. В яблоках, рябине, барбарисе преобладает яблочная кислота, в лимонах – лимонная, в винограде – винная. Количество кислот в растениях зависит от сорта, степени зрелости плодов и овощей, от условий выращивания. На кислотность растений оказывают влияние формы удобрений. Например, в случае питания нитратным азотом кислот накапливается обычно больше, чем при питании аммонийным азотом.

Органические кислоты отличаются хорошей растворимостью в воде, это свойство используется для их выделения из растительных тканей.

**Принцип метода.** Кислоты извлекают из растительных тканей горячей водой (80-90°C), и водный экстракт титруют 0,1 н. раствором NaOH. Общее количество кислот пересчитывают обычно на яблочную кислоту, так как по содержанию она преобладает у большинства

плодов и овощей. Метод пригоден для определения кислотности плодов и овощей с неокрашенным или слабоокрашенным соком.

**Цель работы.** Определить содержание органических кислот в овощах, плодах, ягодах, листьях растений.

**Ход работы.** Навеску растительного материала (свежие плоды, овощи) массой 10 г измельчают на терке или растирают в ступке. Без потерь переносят в широкогорлую колбу на 200 мл, обмывая несколько раз ступку и пестик дистиллированной водой. Объем смеси в колбе доводят дистиллированной водой до 150 мл. Затем колбу нагревают в водяной бане при температуре 80-90 °С в течение 30 мин, периодически взбалтывая содержимое колбы.

После охлаждения объем жидкости в колбе доводят водой до 200 мл, содержимое колбы взбалтывают и фильтруют в сухой стакан или колбу. Полученный фильтрат используют для определения общей кислотности. Для этого 50 мл фильтрата переносят в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки 0,1 н. раствором NaOH до розовой окраски. Вместо фенолфталеина можно использовать тимолфталеин. В таком случае ведут титрование до появления синего окрашивания раствора. Для сильно окрашенных растворов при титровании используют лакмусовую бумагу, по которой определяют переход окраски.

Результаты записывают в таблицу 19.

Таблица 19 – Определение кислотности растительных тканей

Объект	Навеска, г	Общий объем вытяжки, мл	Объем фильтрата, взятого для титрования, мл	Объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование, мл	Содержание органических кислот	
					м-экв/1г	%

Содержание органических кислот в растительном материале рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot 200 \cdot 100}{H \cdot 50 \cdot 10}$$

где  $X$  – количество кислот в растительном образце, м-экв на 1 г;

$a$  – объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование, мл;

$T$  – поправка к титру щелочи;

200 – общий объем вытяжки, мл;

50 – объем фильтрата, взятый для титрования, мл;

$H$  – масса навески материала, г.

10 – перевод в м-экв кислот (1 мл 0,1 н. раствора NaOH соответствует 0,1 м-экв кислоты);

Содержание органических кислот часто рассчитывают не в м-экв на 1 г, а в процентах. Для этого число миллиэквивалентов умножают на массу 1 м.-экв. кислоты (в граммах): 1 м.-экв. яблочной кислоты равен 0,067 г, лимонной – 0,064 г, винной – 0,065 г, щавелевой – 0,045 г.

*Оборудование и реактивы:* 1) ступки с пестиками, колбы с широким горлом на 200 мл, водяная баня, стаканчики на 200 мл, конические колбочки на 100 мл, бумажные фильтры, бюретки для титрования, мерные цилиндры на 50 мл, капельницы;

2) 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор NaOH.

*Объекты:* клубни картофеля, яблоки, листья капусты или комнатных растений.

### **Вопросы:**

1. Назовите наиболее распространенные органические кислоты растений.
2. В каких процессах у растений органические кислоты являются промежуточными соединениями?
3. В каких растительных объектах преобладают кислоты яблочная, лимонная, винная?
4. В чем принцип метода определения общей (титруемой) кислотности плодов и овощей?

### **Обнаружение алкалоидов в растениях**

Алкалоиды – большая группа азотсодержащих вторичных природных соединений основного характера, обладающих физиологической активностью. Они найдены примерно у 20% видов высших растений. Больше всего их содержат растения покрытосеменных, особенно семейств пасленовых, бобовых, маковых, мареновых, лютиковых, кутровых. Локализуются алкалоиды в разных органах растений в разных количествах. У чая и табака – в основном в

листьях, у хинного дерева – в коре, у люпина – в семенах, у снотворного мака – в плодах, у лилейных – в луковичах, у крестовника – в корневищах, у белладонны – во всех органах в разных концентрациях. Содержание алкалоидов в растениях обычно составляет от 0,1 до 1–3%, а у некоторых (махорка, хинное дерево) достигает 10% массы. Растение считается хорошим алкалоидным сырьем, если содержание алкалоидов составляет 1–2%.

Накопление алкалоидов в семенах люпина ограничивает возможности использования семян в кормовых рационах животных. Общее содержание алкалоидов у люпина обычно варьирует от 0,5% до 3 %. В результате селекционной работы выведены кормовые и продовольственные сорта этой культуры, которые почти не накапливают в семенах алкалоидов.

Некоторые алкалоиды применяются в медицине для лечения различных заболеваний человека и животных (алкалоиды спорыньи, атропин, кодеин, эфедрин), используются в качестве тонизирующих веществ (кофеин), как средства борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений (анабазин).

С некоторыми реактивами алкалоиды образуют цветные реакции или нерастворимые осадки. Эти свойства алкалоидов лежат в основе методов их определения

**Принцип метода.** Алкалоиды в растительном материале можно выявить с помощью цветной реакции с йодом в йодистом калии, в результате которой наблюдается образование красновато-бурой окраски.

**Цель работы.** Выявить наличие или отсутствие алкалоидов в семенах у различных видов растений.

**Ход работы.** По 5-10 семян многолетнего, желтого, узколистного, белого люпина, а также фасоли или сои разделить на семядоли. На поверхность каждой семядоли нанести 1–2 капли йода в йодистом калии. Определить наличие (+ или -) и интенсивность (слабая - +, средняя- ++, сильная - +++) красновато-бурой окраски на поверхности семядолей. Полученные результаты занести в таблицу 20. Сделать вывод о наличии или отсутствии алкалоидов в семенах различных видов растений.

Таблица 20 – Выявление алкалоидов в семенах

Растение	Интенсивность окраски	Наличие алкалоидов
----------	-----------------------	--------------------


*Оборудование и реактивы:* 1) скальпель, капельница;  
 2) 0,5%-ный раствор йода в KI (10 г KJ в 5г J<sub>2</sub> растирают в ступке вначале без воды, а затем с 10 мл воды, количественно переносят в мерную колбу емкостью 1 л и доводят водой до метки).

*Объекты:* семена многолетнего, желтого, узколистного, белого люпина, фасоли, сои.

### **Вопросы.**

1. Какие вещества относят к алкалоидам? Назовите представителей.
2. В каких растениях содержатся алкалоиды и в каком количестве? В каких органах растений накапливаются алкалоиды?
3. Какое значение алкалоиды имеют для человека и животных?
4. Почему использование семян люпина в кормовых рационах животных ограничивается?
5. С помощью какого реактива можно выявить наличие алкалоидов в растительных образцах? Какая окраска при этом развивается?

### **Обнаружение дубильных веществ в растениях**

Дубильные вещества (таннины) представляют собой полифенольные соединения. Свое название таннины (от кельт. tan-дуб) получили благодаря способности превращать шкуры животных в дубленую кожу, устойчивую к нагреву, высокой влажности и микроорганизмам. Дубящее действие таннинов связано с их способностью образовывать прочные связи с белками, полисахаридами и другими биополимерами.

Много дубильных веществ в коре и древесине дуба, каштана, эвкалипта, в листьях сумаха, в корнях ревеня и щавеля. Особенно богаты дубильными веществами (до 50–70%) галлы, которые образуются на листьях дуба и других древесных растений при повреждении их орехотворкой, а также кожура гранатов. Дубильные вещества – это сложная смесь близких по химическому составу соединений с молекулярной массой от 500 до 5000.

На воздухе дубильные вещества окисляются и приобретают темно-коричневый цвет (например, дубильные вещества яблок окисляются до образования флобафенов – соединений темно-коричневого цвета, безвредных для организма человека). Процесс окисления протекает быстро и является одной из причин потемнения плодов, часто наблюдающегося во время подготовки плодов к переработке.

Растительные танины используют в производстве пластмасс, связующих веществ при изготовлении фанеры и плит из опилок, в качестве протравы при крашении, для регулирования вязкости растворов при бурении скважин. В виноделии виноградные танины и препараты из древесины дуба, каштана используют для стабилизации и сохранения цвета вина. В медицине дубильные вещества используют как вяжущие, бактерицидные, противовоспалительные и кровоостанавливающие средства. У растений танины в основном выполняют защитную функцию против поедания травоядными животными, повреждения грибами и бактериями.

**Принцип метода.** Дубильные вещества (танины) в растительном материале можно выявить с помощью цветной реакции со слабым раствором хлорного железа. В результате реакции наблюдается почернение ткани. Это свойство характерно в целом для веществ фенольной природы, не только для танинов.

**Цель работы.** Определить наличие дубильных веществ в листьях дуба, комнатных растений, коре ивы, в зеленом чае.

**Ход работы.** Измельченную массу коры ивы, листьев дуба, комнатных растений или зеленого чая поместить в коническую колбочку, залить водой и кипятить на электрической плитке 5 минут. В пробирку налить примерно 1-2 мл полученной вытяжки и добавить по каплям раствор хлорного железа  $FeCl_3$  или любой другой соли  $Fe(III)$ . Появление черной окраски раствора свидетельствует о наличии дубильных веществ, которые с железом (III) образуют окрашенные комплексы.

Результаты наблюдений заносят в таблицу 21. Делают выводы.

Таблица 21 – Выявление дубильных веществ у различных растений

Объект	Реакция на хлорное железо	Наличие дубильных веществ

*Материалы и оборудование:* 1) конические колбы на 100 мл, пробирки, капельницы, фарфоровые чашки;

2) 1%-ный раствор хлорного железа.

*Объекты:* кора ивы, листья дуба, комнатных растений, кожура гранатов, зеленый чай.

### **Вопросы.**

1. Какие вещества называются дубильными? Какова их химическая природа?
2. Какая цветная реакция может быть использована для выявления танинов в растительном материале?
3. Какие функции выполняют дубильные вещества в растениях?
4. Как используются дубильные вещества (танины) человеком?

### **Словарь терминов**

*Автотрофный организм* – организм, способный синтезировать органические вещества из простых неорганических путем фото- или хемосинтеза.



*Аденозинтрифосфат (АТФ)* – макроэргическое вещество, являющееся главным переносчиком химической энергии в живой клетке.

*Активаторы ферментов* – вещества, увеличивающие скорость ферментативной реакции. Чаще всего активаторами служат ионы металлов, такие, как железо, медь, кобальт, магний и др.

*Активный (каталитический) центр фермента* – участок молекулы фермента, который непосредственно участвует в химических преобразованиях субстрата в ходе ферментативной реакции.

*Акцептор электронов* – химическое соединение, принимающее электроны в ходе окислительно-восстановительной реакции.

*Алкалоиды* – азотсодержащие вторичные природные соединения основного характера, имеющие в своем составе гетероциклические, ароматические и стероидные группировки. Обладают сильным физиологическим действием на организмы человека и животных.

*Альбумины* – белки, растворимые в воде.

*Амилаза* – фермент класса гидролаз, расщепляет  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи амилозы и амилопектина.

*Амилоза* – полисахарид крахмала, имеющий неразветвленную цепь моносахаридных остатков  $\alpha$ -D-глюкозы.

*Амилопектин* – полисахарид крахмала, образованный разветвлёнными цепочками остатков глюкозы, которые соединяются  $\alpha(1\rightarrow4)$  – связями в линейной цепи и  $\alpha(1\rightarrow6)$  – связями в точках ветвления.

*Аминокислоты* – низкомолекулярные органические соединения, относящиеся к группе карбоновых кислот, в составе которых присутствует  $\text{NH}_2$  – группа.

*Анаболизм* – энергозависимый процесс синтеза более сложных веществ из относительно простых.

*Антоцианы* – обширная группа пигментов растений, окрашивающая цветки, плоды, другие органы в разнообразные оттенки от розового до черно-фиолетового.

*Аскорбиновая кислота (витамин С)* – водорастворимый витамин, проявляющий биологическую активность в виде L-формы.

*Аспарагин* – протеиногенный амид аспарагиновой кислоты.

*Ацилглицерины* – сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

*Аэробное окисление глюкозы* – полное окисление глюкозы до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , включает подготовительный этап – образование двух триоз, гликолитическую оксидоредукцию, окислительное декарбоксилирование пирувата и цикл трикарбоновых кислот.

*Белки* – биополимеры, молекулы которых образуются из остатков протеиногенных  $\alpha, \text{L}$ -аминокислот, соединенных пептидными связями.

*Биологическая ценность белка* – показатель сбалансированности белка по содержанию незаменимых аминокислот.

*Биосинтез белка* – процесс, включающий транскрипцию, активацию аминокислот, трансляцию и посттрансляционную модификацию белковых молекул.

*Вещества вторичного происхождения (вторичные метаболиты)* – чаще всего низкомолекулярные биологически активные вещества, которые необязательно присутствуют у всех растений, синтезируются из небольшого числа исходных соединений и обладают биологической активностью. К ним относятся фенольные соединения, алкалоиды, цианогенные гликозиды, глюкозинолаты, терпеноиды и другие.

*Витамины* – биологически активные вещества, строго необходимые для жизнедеятельности организмов в небольших количествах. Входят в качестве активных группировок в состав ферментов.

*Вторичная структура белка* – характеризует форму полипептидной цепи, которая может быть спиралевидной ( $\alpha$ -структура), складчатой ( $\beta$ -структура) или неупорядоченной.

*Гидролиз* – разложение молекул сложных веществ на более простые с участием молекул воды.

*Гидролазы* – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, заключающиеся в расщеплении сложных органических соединений с участием воды.

*Ген* – участок молекулы ДНК, кодирующий синтез определенного белка.

*Глобулин* – растворимый в разбавленных растворах солей и слабо растворимый в воде белок.

*Глобулярные белки* – белки, в молекулах которых полипептидные цепи плотно свернуты в компактные шарообразные структуры (глобулы).

*Глютацион* – биологически активный пептид, образующийся из остатков аминокислот глутаминовой кислоты, цистеина и глицина.

*Дегидрогеназы* – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие перенос электронов и протонов от субстрата на окисленный кофермент и от восстановленной формы кофермента на субстрат.

*Декстрины* – промежуточные продукты гидролитического разложения крахмала под действием амилаз.

*Денатурация белка* – необратимое изменение пространственной структуры белковых молекул, которое сопровождается потерей их природных свойств. При этом аминокислотная последовательность белка не изменяется

*Дисахарид* – углевод, состоящий из двух остатков моносахаридов (например, сахароза, мальтоза).

*Дисульфидная связь* – прочная ковалентная связь, образующаяся при окислении двух сульфгидрильных групп молекул цистеина. Участвует в образовании и стабилизации третичной структуры белка.

*Дыхательная цепь* – система переноса электронов с субстратов на кислород во внутренних мембранах митохондрий.

*Дубильные вещества* – сложные высокомолекулярные природные растительные фенольные соединения, способные осаждать белки и алкалоиды и дубить невыделанную шкуру животных, превращая ее в кожу.

*Жирные кислоты* – алифатические одноосновные карбоновые кислоты, входящие в состав жиров; содержат, как правило, неразветвленную цепь из четного числа атомов углерода (C4-24), и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными.

*Жиры* – запасные липиды, представляющие собой смесь сложных эфиров глицерина и жирных кислот.

*Изомеразы* – класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные перемещения различных групп, в том числе и реакции взаимного превращения различных изомеров.

*Изоэлектрическая точка, pI* – значение pH, при котором молекула не несёт электрического заряда

*Изоферменты* – множественные молекулярные формы фермента, которые катализируют одну и ту же биохимическую реакцию, обладают одним типом субстратной специфичности, но различаются по первичной структуре и физико-химическим свойствам их белковых молекул.

*Ингибиторы ферментов* – вещества, замедляющие скорость ферментативной реакции.

*Ионная связь* – прочная химическая связь, образующаяся между атомами с большой разностью электроотрицательностей, при которой общая электронная пара полностью переходит к атому с большей *электроотрицательностью*.

*Йодное число жира* – показатель, характеризующий содержание в жире ненасыщенных жирных кислот.

*Карбоангидраза* – фермент, катализирующий обратимую реакцию образования угольной кислоты из диоксида углерода и воды.

*Каротиноиды* – жирорастворимые пигменты, включающие оранжевые каротины и их кислородсодержащие производные – желтые ксантофиллы.

*Катаболизм* – процесс разложения какого-либо вещества на более простые, обычно протекает с высвобождением энергии (тепло, АТФ).

*Каталаза* – фермент, катализирующий разложение пероксида водорода на кислород и воду.

*Кислотное число жира* – показатель, характеризующий содержание в жире свободных жирных кислот.

*Клейковина* – белковая часть пшеничной муки, остающаяся в виде эластичного сгустка после вымывания крахмала из теста водой. Основу клейковины составляют запасные белки глиадин и глутенин. От содержания и свойств клейковины зависят хлебопекарные качества пшеничной муки.

*Коагуляция (денатурация)* – процесс нарушения нормальных свойств белков, их свертывания под действием различных факторов: физических, химических и биологических.

*Кофермент А (коэнзим А, КоА, СоА, HSKoA)* – один из важнейших коферментов, принимающий участие в реакциях переноса ацильных групп при синтезе и окислении жирных кислот, окислении пировиноградной кислоты в процессе аэробного дыхания.

*Коферменты* – активные группировки в составе каталитических центров двухкомпонентных ферментов.

*Крахмал* – смесь резервных полисахаридов растений; состоит из амилозы (30%) и амилопектина (70%), мономером которых является остатки  $\alpha$ -D-глюкозы.

*Кребса цикл (цикл трикарбоновых кислот)* – центральная часть общего пути катаболизма, циклический биохимический аэробный процесс, в ходе которого происходит окисление ацетил-коэнзима А до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  и освобождается энергия, эквивалентная 12 АТФ.

*Лигазы (синтетазы)* – ферменты, катализирующие реакции синтеза с затратой энергии

*Лигнин* – сложное полимерное соединение фенольной природы, мономерами являются гидроксикоричные кислоты. Лигнин содержится в клеточных оболочках сосудистых растений и некоторых водорослей. Накапливается в процессе одревеснения клеточных стенок.

*Липаза* – фермент класса гидролаз, катализирует расщепление и синтез сложных эфирных связей в триглицеридах.

*Липопротеиды* – разновидности белков, содержащие в своем составе липидные группировки.

*Макроэргические соединения* – специализированные формы органических веществ, при гидролизе которых происходит значительное выделение свободной энергии, при стандартных условиях более 30 кДж/моль (например АТФ, АДФ и др.)

*Мальтоза* – природный дисахарид, состоящий из остатков  $\alpha$ ,D-глюкозы, соединённых  $\alpha$ -гликозидными связями.

*Метаболизм (обмен веществ)* – совокупность биохимических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его жизнеспособность.

*Метионин* – протеиногенная незаменимая серосодержащая аминокислота.

*Митохондрии* – внутриклеточные органеллы, содержащие системы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования; имеют собственный геном.

*Нативная конформация белковой молекулы* – устойчивая в физиологической среде пространственная структура белковой молекулы, обеспечивающая выполнение свойственной данному белку биологической функции.

*Незаменимые аминокислоты* – необходимые для жизнедеятельности аминокислоты, которые не могут быть синтезированы в том или ином организме и должны быть получены с питанием или кормом.

*Незаменимые жирные кислоты* – полиненасыщенные жирные кислоты (имеют в молекуле две или три двойные связи), которые не синтезируются в организмах человека и животных

*Никотинамидадениндинуклеотид (НАД, NAD)* – кофермент, входит в состав ферментов группы дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции; выполняет функцию переносчика электронов и протонов.

*Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ, NADP)* – кофермент дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. В восстановленном виде участвует в реакциях восстановительного синтеза.

*Нитратредуктаза* – фермент, катализирующий восстановление нитратов в нитриты.

*Нитритредуктаза* – фермент, катализирующий восстановление нитритов в аммонийную форму азота.

*Нуклеиновая кислота* – высокомолекулярное органическое соединение, биополимер (полинуклеотид), образованный остатками нуклеотидов. Известно два типа нуклеиновых кислот – ДНК и РНК.

*Нуклеотид* – фосфорный эфир нуклеозида. Свободные нуклеотиды, в частности АТФ, АДФ, играют важную роль в энергетических процессах, а также являются составляющими частями нуклеиновых кислот и коферментов. Состоит из азотистого основания (пуринового или пиримидинового), сахара пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты.

*Оксигеназы* – окислительно-восстановительные ферменты, катализирующие присоединение кислорода к различным субстратам.

*Олигосахариды* – углеводы, содержащие в молекуле от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидной связью (например, сахароза, мальтоза, целлобиоза).

*Олигомерный белок* – белок, состоящий из двух или нескольких полипептидных цепей.

*Пептидная связь* – вид амидной связи, возникающей при образовании белков и пептидов в результате взаимодействия а-аминогруппы ( $-NH_2$ ) одной аминокислоты с  $\alpha$ -карбоксильной группой ( $-COOH$ ) другой аминокислоты.

*Пероксидазы* – ферменты, катализирующие реакции окисления различных субстратов с участием пероксида водорода.

*Полисахариды* – линейные или разветвленные полимеры, включающие остатки многих моносахаридов (от 10 до 10 тыс.)

*Прогоркание жиров* – химический процесс, сопровождающий порчу жира, при котором происходит распад жира и окисление с образованием альдегидов и кетонов.

*Пролин (пирролидин- $\alpha$ -карбоновая кислота)* – протеиногенная гетероциклическая иминокислота

*Простетическая группа* – небелковый компонент, связанный с белком, который выполняет важную роль в биологической активности соответствующего белка. Простетические группы могут быть

органическими (витамины, углеводы, липиды) или неорганическими (например, ионы металлов).

*Протеазы (протеолитические ферменты)* – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление пептидных связей в молекулах белков.

*Протеиды* – белки, содержащие, кроме аминокислотных остатков, другие группировки не аминокислотной природы.

*Протеиногенные аминокислоты* – аминокислоты, участвующие в синтезе белков; состав аминокислот в структуре белков кодируется в молекулах ДНК.

*Протеины* – белки, молекулы которых включают только аминокислотные остатки, соединенные пептидными связями, и не содержат других группировок не аминокислотной природы.

*Протеолитические ферменты (пептидазы)* – ферменты класса гидролаз, которые расщепляют пептидные связи в белках или пептидах.

*Растительные масла* – растительные жиры, имеющие обычно жидкую консистенцию вследствие того, что образуются преимущественно с участием ненасыщенных жирных кислот

*Редуцирующие сахара* – моносахариды и олигосахариды, имеющие свободные альдегидные или кетонные группы и способные вступать в окислительно-восстановительные реакции.

*Сахара* – растворимые в воде моносахариды и олигосахариды.

*Сахароза* – дисахарид, молекулы которого образуются из остатков  $\alpha$ -D-глюкозы и  $\beta$ -D-фруктозы.

*Свободные радикалы* – соединения с одним свободным электроном, с помощью которого они присоединяются к любым веществам в клетке, окисляют их и нарушают внутриклеточный баланс.

*Субстраты ферментов* – вещества, которые претерпевают изменения в процессе биохимических реакций, катализируемых ферментами.

*Супероксиддисмутаза* – антиоксидантный фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий реакцию дисмутации супероксида до кислорода и пероксида водорода

*Супероксид (супероксидный радикал, анион)* – короткоживущий ион молекулы кислорода с неспаренным электроном, относится к активным формам кислорода, участвует в окислительном стрессе.

*Сырой протеин* – показатель химического состава растительных продуктов. Выражает содержание белков и небелковых азотистых веществ. Определяется по содержанию общего азота с использованием установленного для данной культуры коэффициента пересчета.

*Терпен* – кислородосодержащее органическое соединение, углеродный скелет которого образован из изопреновых звеньев. Это основной компонент смол и бальзамов (камфора, эфирные масла).

*Токоферолы* – биологически активные соединения фенольной природы, в совокупности называются витамином Е.

*Третичная структура белка* – пространственная конформация, способ укладки полипептидной цепи в пространстве. По форме третичной структуры белки делятся на глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки имеют эллипсоидную форму или форму шара, а фибриллярные белки – вытянутую (форма палочки, веретена).

*Фенольные соединения* – органические вещества, содержащие ароматические группировки, в которых один или больше атомов водорода замещены на гидроксильные группы.

*Ферменты* – биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие биохимические реакции в живом организме.

*Фибриллярные белки* – белки, образованные полипептидными цепями, которые расположены параллельно друг другу вдоль одной оси и образуют длинные волокна (фибриллы) или слои. Фибриллярные белки нерастворимы в воде и растворах солей. Фибриллярные белки являются основными структурными элементами соединительной ткани.

*Флавинадениндинуклеотид (ФАД)* – кофермент оксидоредуктаз, содержащий рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>) и адениловую кислоту.

*Флавиномононуклеотид (ФМН)* – кофермент оксидоредуктаз, содержащий рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>) и остаток фосфорной кислоты.

*Фосфолипиды* – липиды, включающие остатки глицерина, жирных кислот, ортофосфорной кислоты и специфических азотистых или других соединений. Являются основой биологических мембран клетки.

*Фруктоза* – моносахарид гексоза; входит в состав сахарозы, в свободном виде содержится в мёде. Преобладает в арбузах, грушах.

*Цистеин* – протеиногенная алифатическая, полярная, серосодержащая аминокислота.



*Цитохром* – железосодержащий белок, который является промежуточным переносчиком электронов в окислительно-восстановительных процессах в ходе фотосинтеза и дыхания.

*Целлюлоза* – полисахарид, построенный из остатков глюкозы. Является основным компонентом клеточных оболочек растений. Самая чистая природная форма целлюлозы – волоски семян хлопчатника.

*Четвертичная структура белка* – ассоциация отдельных белковых субъединиц в единой структуре. Для неё характерен кооперативный эффект и специализация субъединиц.

*Эфирные масла* – легколетучие маслоподобные жидкости, имеющие характерный запах. Представляют сложные смеси моно- и сесквитерпенов и их кислородсодержащих производных, а также нетерпеновые спирты, альдегиды, некоторые карбоновые кислоты и углеводороды, сложные эфиры, кетоны. Определяют вкус и запах растений и их частей.

### Тестовые задания

1. Термин «обнаружение» используется
  - а) в количественном анализе
  - б) титрометрических определениях
  - в) в качественном анализе
  - г) в весовом анализе

2. Термин «определение» в биохимии означает
- а) качественное открытие веществ
  - б) количественный результат- концентрацию, массу, активность и т.д.
  - в) образование осадка
  - г) цвет раствора
3. Элементный анализ используют в основном
- а) в электрофоретическом анализе
  - б) в изотопном анализе
  - в) в аминокислотном анализе
  - г) в анализе состава органического вещества
4. Для препаративного выделения функционально активных органелл растительных клеток используют метод
- а) центрифугирования
  - б) высаливания
  - в) изотопный
  - г) электрофорез
5. Цветные реакции на белки позволяют судить о :
- а) наличии белков в биологических жидкостях,
  - б) первичной структуре белка,
  - в) присутствии некоторых аминокислот в белках,
  - г) функциях белков
6. Хроматография – это метод
- а) разделения смесей веществ на отдельные вещества.
  - б) количественного анализа
  - в) изотопного анализа
  - г) элементного анализа вещества
7. Центрифугирование – это метод
- а) разделение веществ на фракции по плотности.
  - б) гомогенизация объекта исследования
  - в) разделение веществ по молекулярной массе и заряду
  - г) элементный анализ вещества
8. Диализ – это метод
- а) выявления реакционноспособных групп белков

- б) выделения ферментов
- в) отделения белков от низкомолекулярных солей
- г) активации ферментов

9. Метод разделения заряженных молекул белков под действием внешнего электрического поля

- а) электрофорез
- б) гель-фильтрация
- в) центрифугирование
- г) гомогенизация

10. Первый этап выделения белков из ткани:

- а) выделение индивидуальных белков из смеси
- б) диализ
- в) гомогенизация
- г) осветление экстракта

11. Узловая схема приборов для фотометрии не включает:

- а) измерительный и вспомогательный электроды
- б) источник излучения
- в) светофильтр или монохроматор
- г) кювету

12. Принципиальное отличие спектрофотометра от фотоэлектроколориметра состоит в:

- а) большей стабильности работы
- б) большем диапазоне длин волн
- в) большей чувствительности
- г) наличием монохроматора

13. Характерной особенностью редуцирующих сахаров является наличие в молекуле

- а)  $\alpha$ -гликозидных связей
- б) линейной полисахаридной цепи
- в) разветвленной полисахаридной цепи
- г) свободных альдегидных и кетонных групп

14. Характерной реакцией на крахмал является

- а) сине-фиолетовое окрашивание крахмала йодом

- б) реакция «серебряного зеркала»
  - в) выпадение кирпично-красного осадка при реакции с фелинговой жидкостью.
  - г) появление черного осадка при взаимодействии с солями свинца
15. Серусодержащие аминокислоты в белках можно выявить по
- а) сине-фиолетовому окрашиванию при реакции с нингидрином
  - б) образованию черного осадка при реакции с солями свинца
  - в) сине-фиолетовому окрашиванию при реакции с йодом
  - г) ксантопротеиновой реакции, дающей ярко-желтое окрашивание
16. Ароматические аминокислоты в белках можно выявить по
- а) образованию черного осадка при реакции с солями свинца
  - б) сине-фиолетовому окрашиванию при реакции с нингидрином
  - в) сине-фиолетовому окрашиванию при реакции с йодом
  - г) ксантопротеиновой реакции, дающей ярко-желтое окрашивание
17. Для очистки раствора белка от низкомолекулярных примесей можно использовать метод
- а) высаливания
  - б) центрифугирования
  - в) электрофореза
  - г) диализа
18. Высаливание белков вызывает:
- а) избыток белков в растворе
  - б) низкая температура
  - в) высокая концентрация нейтральных солей
  - г) органические растворители
19. Денатурация белков – это:
- а) разрушение четвертичной, третичной и частично вторичной структуры
  - б) разрушение структур всех уровней
  - в) уменьшение растворимости

- г) распад белка на пептиды
20. У денатурированных белков сохраняются
- а) водородные связи
  - б) вторичная и третичная структуры
  - в) хорошая растворимость в воде
  - г) пептидные связи
21. Для обнаружения белков можно использовать цветные реакции
- а) биуретовую
  - б) ксантопротеиновую
  - в) нингидриновую
  - г) крахмальную
22. Определение аминокислотного состава белков после их кислотного гидролиза и хроматографического разделения проводится с помощью
- а) нингидриновой реакции
  - б) биуретовой реакции
  - в) ксантопротеиновой реакции
  - г) реакции «серебряного зеркала»
23. Состояние белка, при котором число основных функциональных групп равно числу кислотных групп, называется:
- а) амфотерным
  - б) изоэлектрическим
  - в) изоферментным
  - г) изостатическим
24. Липиды растворяются
- а) в воде
  - б) в буферных растворах
  - в) в неполярных растворителях
  - г) в неорганических кислотах
25. Вещества, повышающие активность ферментов:
- а) катализаторы
  - б) ингибиторы
  - в) изоферменты
  - г) активаторы

26. Увеличение скорости реакции при использовании катализатора происходит в результате:
- а) увеличения теплового эффекта
  - б) увеличения концентрации реагирующих веществ
  - в) увеличения энергии активации
  - г) уменьшения энергии активации молекул
27. При высокой температуре (более 40 С°) активность ферментов
- а) изменяется в зависимости от реакции
  - б) повышается
  - в) снижается
  - г) не изменяется
28. Источником аналитических ошибок при определении активности ферментов может быть:
- а) изменение рН инкубационной смеси
  - б) нестабильность температуры в ходе инкубации
  - в) использование реактивов с просроченным сроком годности
  - г) все перечисленное
29. Растворимость белков определяют:
- а) метильная группа
  - б) дисульфидные связи
  - в) наличие полярных группировок на поверхности белка
  - г) молекулярная масса
30. Растворимый в воде белок:
- а) глютелин
  - б) проламин
  - в) глобулин
  - г) альбумин
31. Международная классификация разделяет ферменты на шесть классов в соответствии с их
- а) молекулярной массой
  - б) эффективностью катализа
  - в) типом катализируемой реакции
  - г) органной принадлежностью

32. Скорость ферментативной реакции зависит от:

- а) температуры
- б) рН
- в) концентрации субстрата
- г) всего перечисленного

32. Крахмал гидролизуется ферментом:

- а) сахаразой
- б) амилазой
- в) протеазой
- г) липазой

33. Липиды гидролизуются ферментом

- а) амилазой
- б) протеазой
- в) инвертазой
- г) липазой

34. Показатель, характеризующий содержание в жире свободных жирных кислот

- а) кислотное число
- б) йодное число
- в) температура плавления
- г) перекисное число

35. Алкалоиды можно обнаружить с помощью

- а) реакции серебряного зеркала
- б) реакции с йодом
- в) реакции с нингидрином
- г) реакции с азотной кислотой

## ***ПРИЛОЖЕНИЯ***

### 1. Атомные массы некоторых элементов

Название элемента	Порядковый номер	Символ	Атомная масса	Название элемента	Порядковый номер	Символ	Атомная масса
Азот	7	N	14,000	Мышьяк	33	As	74,91
Алюминий	13	Al	26,98	Молибден	42	Mo	95,95

Барий	56	Ba	137,36	Натрий	11	Na	22,991
Бор	5	B	10,82	Олово	50	Sn	118,70
Ванадий	23	V	50,95	Ртуть	80	Hg	200,61
Водород	1	H	1,008	Свинец	82	Pb	207,21
Железо	26	Fe	55,85	Селен	34	Se	78,96
Йод	53	I	126,91	Сера	16	S	32,066
Калий	19	K	39,10	Серебро	47	Ag	107,88
Кальций	20	Ca	40,08	Углерод	6	C	12,011
Кислород	8	O	16,00	Фосфор	15	P	35,975
Кобальт	27	Co	58,94	Фтор	9	F	19,00
Кремний	14	Si	28,09	Хлор	17	Cl	35,457
Магний	12	Mg	24,32	Хром	24	Cr	52,01
Марганец	25	Mn	54,94	Цинк	30	Zn	65,38
Медь	29	Cu	63,54				

## 2. Важнейшие кислотно-основные индикаторы

Наименование индикатора	Изменение цвета в среде		Переход окраски в интервале рН	Рабочий раствор
	кислой	щелочной		
Фенолфталеин	бесцветный	красный	8,0-9,6	0,1% в 50%-ном этиловом спирте
Тимолфталеин	бесцветный	синий	9,3-10,5	0,1% в 80%-ном этиловом спирте
Тимоловый синий	желтый	синий	8,0-9,6	0,1%-ный водный раствор
Бромтимоловый синий	желтый	синий	6,0-7,6	0,1%-ный водный раствор
Метиловый красный	красный	желтый	4,2-6,2	0,2%-ный водный раствор
Метиловый	красный	оранжевый	3,1-4,4	0,1%-ный



оранжевый				водный раствор
-----------	--	--	--	-------------------

### 3. Объемы концентрированных кислот для приготовления процентных растворов этих кислот, мл/л

Кислота	Удельная плотность при 15 °С	Массовая доля исходного вещества, %	Процентный раствор, который необходимо приготовить					
			25%	20%	10%	5%	2%	1%
Соляная	1.19	37.23	634.8	496.8	236,4	115,4	45,5	22,6
Серная	1.84	95.60	167.7	129,9	60,6	29,3	11,5	5,6
Уксусная	1.05	99.50	247.8	196,4	97,6	48,2	19,2	9,5

### 4. Разведение концентрированных кислот для приготовления титрованных растворов

Кислота	Удельная плотность	Нормальность раствора, который необходимо приготовить							
		2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01
		Необходимо взять нижеследующее количество (миллилитров) концентрированной кислоты и довести в мерной колбе дистиллированной водой до 1 л.							
Соляная	1.19	164	82	41	16,4	8,2	4,1	1,64	0,82
Серная	1.84	56	28	14	5,6	2,8	1,4	0,56	0,28

### 5. Расчет для приготовления титрованных растворов

Растворы	Нормальность раствора, который необходимо приготовить			
	0,1	0,005	0,02	0,01
	навеска вещества в граммах в 1 л раствора			
$C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$	6,3030	3,1515	1,2606	0,6303
$KMnO_4$ (в кислой среде)	3,1605	1,5802	0,6320	0,3160

AgNO <sub>3</sub>	16,9888	8,4944	3,3977	1,6988
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O (для йодометрических определений)	24,8206	12,4103	4,9764	2,4820
NaCl	5,8454	2,9227	1,1690	0,5845
FeSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	39,20	19,60	7,84	3,92

#### 6. Приготовление ацетатной буферной смеси с заданной рН.

Для получения раствора с указанными значениями рН при 18°С смешивают 0,2М растворы уксуснокислого натрия (CH<sub>3</sub>COONa) и уксусной кислоты в следующих соотношениях (при расчете на 10 частей)

рН	0,2М растворы		рН	0,2М растворы	
	CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH		CH <sub>3</sub> COONa	CH <sub>3</sub> COOH
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

#### Литература

1. Методы биохимического исследования растений. Изд. 2-е. перераб. и доп. Под ред. А. И. Ермакова. Л.: Колос. Ленингр. отделение, 1972.
2. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. – 2 издание, перераб.. – М.: Просвещение, 1982.
3. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1985.
4. Новиков Н.Н. Биохимия растений. – М.: КолосС, 2012 г.

5. Рогожин В. В., Рогожина Т.В. Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции : учеб. пособие для вузов.– СПб. : ГИОРД, 2016.

6. Хелдт Г.-В. Биохимия растений. Пер с англ. – М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011.

7. Биохимия растений: вторичный обмен : учебное пособие для вузов / Г. Г. Борисова, А. А. Ермошин, М. Г. Малева, Н. В. Чукина. — Москва : Издательство Юрайт, 2020