

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет»

В.И. Полонский, Н.В. Фомина

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Практикум

Рекомендовано учебно-методическим советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный аграрный университет» для внутривузовского использования в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.03 – Агрохимия и агропочвоведение

Электронное издание

Красноярск 2022

ББК 28.572я73

П 52

Рецензенты:

*Н.А. Гаевский, доктор биологических наук,
профессор кафедры водных и наземных экосистем
Института фундаментальной биологии и биотехнологии
ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»*

*С.А. Герасимов, кандидат сельскохозяйственных наук,
ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией серых хлебов
Красноярского научного центра СО РАН, обособленного
подразделения Красноярского НИИСХ*

П 52 **Полонский, В.И.**
Биохимия растений [Электронный ресурс]: практикум /
В.И. Полонский; Н.В. Фомина; Красноярский государственный аграрный университет. – Красноярск, 2022. – 112 с.

Представлены лабораторные работы по основным темам курса «Биохимия растений».

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 35.03.03 – Агрохимия и агропочвоведение, может быть полезно аспирантам и преподавателям, специализирующимся в области эколого-биохимических исследований растений.

ББК 28.572я73

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 БЕЛКИ	6
1.1 Приготовление растворов белка	7
1.2 Качественные реакции на белки	8
1.3 Реакции осаждения белков	10
1.4 Определение изоэлектрической точки белка	14
1.5 Количественное определение белка	15
1.6 Спектрофотометрическое определение протеина в кормах	16
Контрольные вопросы.....	17
Тестовые задания.....	18
2 УГЛЕВОДЫ	20
2.1 Изучение физических и химических свойств моно-, ди- и полисахаридов	21
2.2 Реакции на моносахара	23
2.3 Реакции на сложные сахара.....	25
2.4 Определение моносахаров и олигосахаров по обесцвечиванию жидкости Фелинга	27
2.5 Определение содержания клетчатки	28
Контрольные вопросы.....	30
Тестовые задания.....	31
3 ФЕРМЕНТЫ	33
3.1 Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов..	35
3.2 Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны	36
3.3 Качественные пробы на наличие ферментов в растениях	37
3.4 Влияние рН среды на активность амилазы	38
3.5 Определение активности амилаолитических ферментов	39
3.6 Определение активности каталазы по Баху и Опарину	40
3.6 Гистохимическое выявление ферментов	41
Контрольные вопросы.....	44
Тестовые задания.....	45
4 ЛИПИДЫ.....	46
4.1 Качественные реакции на жиры	47
4.2 Омыление жира	48
4.3 Определение содержания суммарных липидов в биологическом материале.....	49
4.4 Определение констант жиров	52
4.5 Определение кислотного числа жиров	54

4.6 Определение содержания липидов весовым методом	56
Контрольные вопросы.....	57
Тестовые задания.....	57
5 ВИТАМИНЫ	59
5.1 Количественное определение витамина С	59
5.2 Определение рутина.....	62
6 МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА	66
6.1 Определение содержания золы в листьях и травянистых органах растений (по Ермакову)	67
6.2 Количественное определение кремниевой кислоты в золе (по Ермакову)	68
6.3 Фотометрический метод определения содержания фосфора.....	70
6.4. Определение серы в растениях спектрофотометрическим методом.....	72
6.5 Определение меди в растениях колориметрическим методом ...	73
Контрольные вопросы.....	75
7 ВЕЩЕСТВА ВТОРИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. АЛКАЛОИДЫ..	76
7.1 Определение содержания эфедрина (на примере эфедры хвощевой)	76
7.2 Определение кофеина в растительном материале.....	78
7.3 Определение содержания арбутина (на примере листьев брусники).....	80
7.4 Определение антоцианов.....	81
Контрольные вопросы.....	82
8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ЗЕРНА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР ...	84
Контрольные вопросы.....	87
ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ТЕРМИНЫ И ПОНЯТИЯ	90
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	112

ВВЕДЕНИЕ

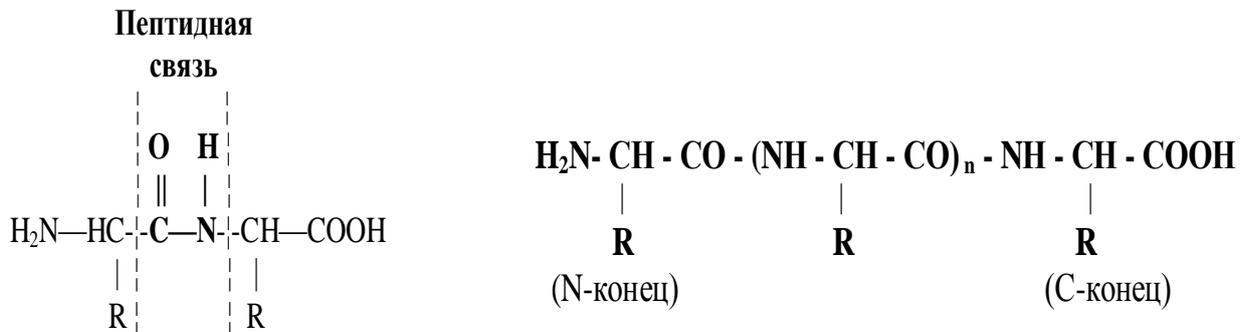
В составе живых клеток из 100 известных химических элементов постоянно обнаруживается чуть более 20, а обязательными для выполнения жизненных функций можно считать всего 16. В то же время с помощью этого ограниченного набора элементов построено огромное множество веществ. О соотношении органических веществ дает представление анализ цитоплазмы клеток листьев капусты: белки составляют 63,11 % сухой массы, липиды – 20,75, другие органические вещества – 9,69, а зола – 6,46 % сухой массы. Химический состав активно функционирующих растительных клеток весьма сходен. В клетках, выполняющих сугубо специфические функции, химический состав несколько иной. Это касается, например, клеток семян или других продуктивных частей растений, где хранятся запасные вещества, ради которых и возделывают сельскохозяйственные культуры. Так, в составе клеток семени пшеницы содержится 78 % углеводов, 16 – белков, 2 – жиров и 2 – золы. Белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды служат химической основой жизненных процессов, протекающих в клетках живых организмов.

Каждый раздел практикума «Биохимия растений» предусматривает не только качественное, но и количественное исследование содержания веществ в растительном организме. Значительное количество работ посвящено исследованию белка, а также углеводов и липидов.

После каждого раздела представлены контрольные вопросы, обуславливающие закрепление как практических, так и теоретических навыков. Используемые в пособии схемы способствуют лучшему восприятию практического материала.

1 БЕЛКИ

Белки – природные высокомолекулярные соединения (биополимеры), структурную основу которых составляют полипептидные цепи, построенные из большого количества остатков α -аминокислот. Каждую аминокислоту, входящую в состав белка, называют *аминокислотным остатком*. Аминокислотные остатки в молекуле белка соединены *пептидными связями*. Полипептидная цепь состоит из регулярно повторяющихся участков, образующих остов молекулы, и переменных участков – боковых радикалов аминокислотных остатков. Началом полипептидной цепи считают конец, несущий свободную аминогруппу (N-конец), а заканчивается полипептидная цепь свободной карбоксильной группой (C-конец).



Разнообразие существующих в природе белков зависит от природы входящих в молекулу аминокислот, относительного количества каждой аминокислоты и определенной аминокислотной последовательности полипептидной цепи.

По *сложности строения* белки делят на простые (протеины) и сложные (протеиды). Простые белки состоят только из белковой части. Сложные – из аминокислот и небелковых веществ (нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы и др.). По *форме белковой молекулы* белки делят на фибриллярные и глобулярные. Подавляющее количество природных белков относится к глобулярным. По *функциям* белки подразделяют на ферменты, гормоны, рецепторы, ингибиторы, транспортные, структурные, сократительные защитные и токсические белки.

Для обнаружения белков существуют две группы реакций: цветные реакции и реакции осаждения.

1.1 Приготовление растворов белка

Яичный альбумин

Белок куриного яйца, отделенный от желтка, взбивают и смешивают в колбе при встряхивании с десятикратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой смоченной водой марли или через один слой полотна, помещенный в воронку. Фильтрат представляет собой раствор яичного альбумина, а осадок на марле – *яичный глобулин*.

Яичный глобулин переносят в химический стакан и растворяют в небольшом количестве 10 %-го раствора NaCl. Полученный раствор глобулина фильтруют, фильтрат соединяют с половиной ранее полученного водного раствора яичного альбумина.

Получают два раствора: раствор чистого альбумина (1) и раствор альбумина и глобулина (2).

Растительный альбумин

25 г пшеничной муки смешивают со 100 мл дистиллированной воды и перемешивают в течение часа. Полученную взвесь муки центрифугируют (или отфильтровывают). Прозрачный раствор осторожно сливают из центрифужных пробирок в колбу. Полученный раствор содержит преимущественно альбумин пшеничных зерен (3).

Растительный глобулин

5 г гороховой муки помещают в ступку, заливают 30 мл 10 %-го сернокислого аммония, растирают пестиком в течение 5 мин и дают настояться в течение 10 мин. Полученную взвесь центрифугируют (или отфильтровывают). Прозрачный раствор осторожно сливают из центрифужных пробирок в колбу. Полученный раствор содержит преимущественно глобулин гороха (4).

Желатин

5 г желатина смешивают со 100 мл дистиллированной воды, выдерживают в течение 30 мин. для набухания. Нагревают, не доводя до кипения, при непрерывном помешивании до растворения. Полученный раствор фильтруют (5).

1.2 Качественные реакции на белки

Цветные реакции белков обуславливаются наличием в белковой молекуле определенных атомных группировок, образующих с соответствующими реактивами окрашенные соединения. Цветные реакции дают возможность судить о составе белков.

Каждую реакцию провести не менее чем с тремя растворами белка.

Оборудование и реактивы: лакмусовая бумага, пробирки, растворы белков, концентрированная азотная кислота, 1 %-й раствор медного купороса, 0,1 %-й раствор нингидрина, 10 %-й гидроксид натрия, 0,2 %-й спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, реактив Милона, ледяная уксусная кислота, глиоксиловая кислота, концентрированная серная кислота, 2,5 %-й формальдегид, концентрированная соляная кислота (плотность не менее 1,175), 0,5 %-й нитрит натрия, 1 %-й сульфаниловая кислота в 5 %-м растворе соляной кислоты, 10 %-й карбонат натрия, насыщенный раствор сульфата аммония, 5 %-й нитропруссид натрия, концентрированный аммиак.

Ксантопротеиновая реакция белков

Ксантопротеиновая реакция зависит от наличия в молекулах белков остатков ароматических аминокислот, таких как фенилаланин, тирозин, триптофан. Эти аминокислоты в результате нитрования бензольного кольца образуют желтоокрашенные нитросоединения. При добавлении щелочи в результате образования аммонийных солей нитроновых кислот, желтый цвет переходит в оранжевый. Желатина, не содержащая ароматических аминокислот, не дает этой реакции.

К 1 мл раствора белка (1–5) в пробирках добавляют 5–6 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося под действием азотной кислоты белка. Осторожно нагревают раствор и наблюдают изменение окраски осадка. Охлаждают смесь и осторожно добавляют к кислому раствору, не взбалтывая, по каплям избыток раствора щелочи (10 %-й NaOH) до щелочной реакции. Выпадающий в начале осадок растворяется, и жидкость меняет свою окраску. Отметьте цвет образующейся жидкости.

Биуретовая реакция

В пробирки наливают по 1–1,5 мл раствора белка (1–5) и добавляют равный объем раствора щелочи (10 %-й NaOH) и затем постепенно, по стенке пробирки 2–3 капли 1 %-го раствора медного купороса. Отметьте, в какой цвет окрашивается жидкость в пробирке.

Биуретовая реакция обусловлена наличием в молекулах белка пептидных группировок $-\text{CO}-\text{NH}-$, т. е. эту реакцию дают все белки, а также продукты их частичного гидролиза, начиная с тетрапептидов. Этой реакцией можно установить наличие белка при растворении его 1:10000. Окраска возникает в результате образования комплексных соединений, содержащих медь. Свое название эта реакция получила за способность биурета, содержащего пептидную группировку $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, вступать в эту реакцию (биурет не является белком). Биурет получают путем сплавления двух молекул мочевины.

Нингидриновая реакция

К 1 мл раствора белка (1–5) в пробирках прибавляют 4–5 капель 0,1 %-го раствора нингидрина и нагревают около минуты. Отметьте цвет раствора.

Нингидриновая реакция характерна для α -аминокислот, поэтому она получается и с белками, содержащими в своей молекуле карбоксильные и α -аминогруппы.

Восстановленный нингидрин, конденсируясь с аммиаком и окисленной молекулой нингидрина, образует раствор, который имеет фиолетово-синюю окраску.

Реакция на содержание в белке серы

Белки содержат серу в составе аминокислот – цистеина и метионина. При нагревании белка с щелочью и ацетатом свинца от аминокислот отщепляется сероводород, который дает черный осадок со свинцом.

В пробирки поместите по 1 мл раствора белка (1–5) и 1–2 капли 10 %-го раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешайте, и к полученному щелочному раствору добавьте 5 капель 5 %-го ацетата свинца (II). Отметьте появление серо-черного осадка.

Реакция на содержание в белке триптофана

В пробирки наливают по 1 мл раствора белка. В каждую пробирку добавляют по 1 мл концентрированной уксусной кислоты и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно приливают по 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. Отметьте появление красно-фиолетового кольца на границе двух слоев жидкости.

Реакция обусловлена присутствием в белке триптофана, который реагирует с глиоксиловой кислотой, находящейся в виде примеси в концентрированной уксусной кислоте, давая окрашенные продукты конденсации. Концентрированная серная кислота используется в качестве водоотнимающего средства.

1.3 Реакции осаждения белков

Существует большое количество реакций осаждения белков. В зависимости от применяемого осадителя они могут быть обратимыми и необратимыми. В случае обратимых реакций осаждения белки не подвергаются глубоким изменениям, и получаемые осадки могут быть растворены в первоначальном растворителе. При необратимых реакциях осажденные белки подвергаются глубоким изменениям, получаемые осадки не могут быть растворены в первоначальном растворителе, т. е. наступает *денатурация белка* – потеря белковыми веществами их естественных свойств (растворимости, гидрофильности и др.) вследствие нарушения структуры молекул при воздействии неблагоприятных факторов среды (облучение, повышенная температура, химические вещества).

Оборудование и реактивы: лабораторная центрифуга, воронка, фильтры, растворы белков, насыщенный раствор сернокислого аммония, хлористый натрий в порошке, сернокислый магний в порошке, 1 %-й и 10 %-й раствор гидроксида натрия, 5 %-й раствор сернокислой меди, 5 %-й раствор уксуснокислого свинца, ледяная уксусная кислота, пикриновая кислота, 10 %-й раствора танина, 5 %-я соляная кислота, 5 %-й раствор гексацианоферрата калия, раствор йодида ртути (II) в йодиде калия, насыщенный водный раствора фенола, формалин, 0,6 н раствор серной кислоты, 10 %-й раствор вольфрамата натрия

Высаливание белков сернокислым аммонием

В пробирку наливают 2–3 мл раствора белка (2), добавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и слегка встряхивают смесь до появления мути. Выпадает осадок глобулинов.

Мутную жидкость центрифугируют или фильтруют через сухой складчатый фильтр. К полученному прозрачному раствору добавляют кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, т. е. до момента, когда часть кристаллов солей перестают растворяться. При этом выпадает осадок альбуминов, который отделяют центрифугированием или фильтрованием.

К оставшемуся раствору добавляют 3 мл концентрированной азотной кислоты для определения полноты осаждения белка.

Высаливание белков хлористым натрием и сернокислым магнием

В две пробирки наливают по 2–3 мл раствора белка (2). Прибавляют при перемешивании до полного насыщения раствора в одну пробирку тонко измельченного хлористого натрия, а в другую – сернокислого магния, через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирок центрифугируют или отфильтровывают.

В растворах остаются альбумины, которые при нейтральной реакции среды в насыщенных растворах хлорида натрия и сульфата магния в осадок не выпадают. К фильтрату прибавляют несколько капель 1 %-й уксусной кислоты до слабокислой реакции. В слабокислой среде происходит выпадение фракции альбуминов.

В водном растворе белков их частицы являются заряженными и сильно гидратированными. Эти факторы обуславливают устойчивость белковых растворов. Но при высокой концентрации солей происходит разрушение водных оболочек белковых молекул за счет гидратации ионов соли, т. е. молекулы воды переходят из гидратной оболочки белка в гидратную оболочку соответствующих ионов и вслед за этим наступает снятие заряда с белковой молекулы в слабокислой среде адсорбирующимися на ней ионами соли, в результате этих двух процессов белковые растворы теряют устойчивость, частицы белка слипаются друг с другом и выпадают в осадок.

Свертывание белков при нагревании

В три пробирки наливают по 2 мл растворов белка (1, 2, 3):

- а) нагревают содержимое первой пробирки;
- б) добавляют во вторую пробирку 0,5 мл 10 %-го раствора уксусной кислоты и нагревают;
- в) добавляют в третью пробирку около 0,5 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и нагревают.

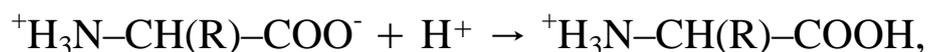
Выпадение белков в осадок при нагревании (свертывание) характерно почти для всех белков (исключение составляет желатина). Особенно легко и полно происходит осаждение белков в слабокислой среде, вблизи от изоэлектрической точки. В сильнокислой среде осаждение белков идет значительно хуже, а в щелочной среде вообще не наблюдается. Белки как амфотерные электролиты могут диссоциировать как кислоты и как основания. Схематично молекулу белка можно представить следующим образом:



В водной среде, особенно вблизи изоэлектрической точки, молекулы белка представляют нейтральный, биполярный ион:



В кислой среде подавляется кислотная диссоциация белка и молекула заряжается положительно:



а в щелочной среде подавляется основная диссоциация белка и молекулы его несут отрицательный заряд. Наличие заряда препятствует осаждению белка, поэтому в кислых и щелочных растворах белок находится в растворенном состоянии даже при кипячении.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

В две пробирки наливают по 1–1,5 мл раствора белка (3) и медленно, по каплям, при встряхивании прибавляют в одну из них раствор сернистой меди, а в другую – раствор уксуснокислого свинца. В обоих случаях образуются хлопьевидные осадки солей тяжелых металлов.

соединений не растворимых в воде. Отметьте цвет осадков в обеих пробирках.

После образования осадков добавьте в обе пробирки избыток соответствующих солей (2–2,5мл).

Соли тяжелых металлов (Hg, Ag, Cu, Pb и др.) вызывают необратимое изменение структуры белков, денатурацию. Вследствие этого белки применяют в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

В три пробирки наливают по 2 мл раствора белка (3) и прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты (проба Геллера). Образуется белый хлопьевидный осадок, не растворяющийся в избытке кислоты. Эта качественная реакция лежит в основе количественного определения белка в моче.

Аналогичным образом проводят реакции осаждения белка с концентрированными серной и соляной кислотами.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка. Выпадение белка в виде осадка связано с дегидратацией белковых частиц и образованием комплексных солей.

Осаждение белков органическими кислотами

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка (3) и добавляют в одну из них несколько капель 10 %-го раствора трихлоруксусной кислоты, в другую – несколько капель 20 %-го раствора сульфосалициловой кислоты. В обоих случаях наблюдается выпадение осадка.

Сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты являются чувствительными и специфичными реактивами на белок.

Осаждение белков органическими растворителями

К 2 мл раствора белка добавляют щепотку хлористого натрия, взбалтывают. Постепенно приливают 3 мл охлажденного ацетона и снова взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка. При добавлении воды белок снова растворяется, так как происходит разбавление ацетона.

Реакция белка с органическими растворителями (ацетон, спирт) обусловлена обезвоживанием коллоидных частиц. Осаждение происходит из нейтральных или слабокислых растворов и лучше в присутствии электролитов (хлористый натрий). Если реакция проводится при низкой температуре (0 °С) и не слишком долгим воздействием спирта или ацетона, то осаждение обратимо. Получение препаратов белка путем его осаждения органическими растворителями при низких температурах является одним из распространенных методов выделения и очистки (от липидов, фенольных соединений, смол) белков из растительных и животных объектов с целью сохранения их ферментной активности.

1.4 Определение изоэлектрической точки белка

Белки как амфотерные электролиты содержат в своем составе кислые и основные группы и могут диссоциировать как кислоты и как основания. При добавлении к раствору белка слабой кислоты диссоциация карбоксильных групп в белковых молекулах подавляется и, в конечном счете, в белке будет достигнуто равенство положительных и отрицательных зарядов. В зависимости от числа и природы основных и кислых групп в белке такое состояние наступает при разных концентрациях водородных ионов. Кислотность раствора, при которой в белках наблюдается равенство положительных и отрицательных зарядов, получила название *изоэлектрической точки* (ИЭТ). Для большинства белков ИЭТ наблюдается в слабокислой среде. При изоэлектрической точке белки обладают наименьшей растворимостью, а их растворы – самой низкой вязкостью, белки не удерживаются в растворе и выпадают в осадок при очень слабых внешних воздействиях.

Для определения ИЭТ готовят серию растворов с разными реакциями среды, добавляют раствор исследуемого белка. ИЭТ белка устанавливают по выпадению в осадок наибольшего количества белка в пробирке, значение рН которой обеспечивает равенство положительных и отрицательных зарядов белковой молекулы.

Оборудование и реактивы: градуированные пипетки, колбы емкостью 25 мл, штативы с пробирками, 0,5 %-й раствор желатина, 0,1 н раствор уксусной кислоты, 0,01 н раствор уксусной кислоты, этиловый спирт.

Ход работы: для определения изоэлектрической точки растворенного белка берут 8 пробирок, в каждую вносят по 1 мл 0,5 %-го раствора желатина и добавляют воду и 0,01 н или 0,1 н растворы уксусной кислоты в количествах, указанных в таблице. Содержимое пробирок осторожно перемешивают. Коагуляция желатина не наблюдается, так как желатин – белок, обладающий двумя факторами устойчивости: зарядом и водной оболочкой. Затем во все пробирки приливают по 1 мл этилового спирта. При значении рН, равном или очень близком к ИЭТ белка, он выпадает в осадок, что устанавливают по появлению небольшой мути в соответствующей пробирке.

Соотношение объемов воды, раствора уксусной кислоты и величины рН

Реактив, мл	Номер пробирки								Результат
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Вода	8,4	7,75	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0	
0,01 н CH_3COOH	0,6	1,25	–	–	–	–	–	–	
0,1 CH_3COOH	–	–	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	
рН	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8	

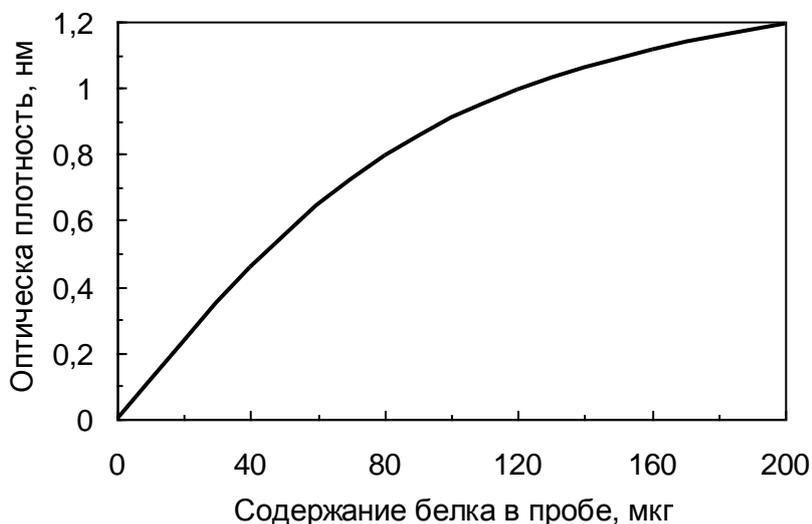
1.5 Количественное определение белка

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди. Биуретовая реакция белков не отличается высокой чувствительностью. Поэтому ее применяют в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже 1 мг/мл).

Оборудование и реактивы: фотоэлектроколориметр, пипетки, пробирки, биуретовый реактив, стандартный раствор белка, например, сывороточного альбумина, желатина или казеина, содержащий 10 мг в 1 мл.

Ход работы: к 1 мл исследуемого раствора белка, взятому в пробирку, прибавляют 4 мл биуретового реактива, смесь перемешивают.

вают и оставляют стоять 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени смесь фотометрируют при длине волны 540–650 нм против контроля (вместо раствора белка берут 1 мл дистиллированной воды). Содержание белка рассчитывают по калибровочной кривой, составленной для альбумина, желатина или казеина. Для построения калибровочной кривой из стандартного раствора белка готовят серию растворов с содержанием белка от 1 до 10 мг в миллилитры. Берут по 1 мл каждого раствора в отдельные пробирки, приливают в каждую по 4 мл биуретового реактива, оставляют на 30 мин при комнатной температуре и фотометрируют при условиях, аналогичных опыту. По полученным значениям оптической плотности строят калибровочную кривую.



1.6 Спектрофотометрическое определение протеина в кормах

Оборудование и реактивы: спектрофотометр; весы лабораторные; электроплитка; колба Къельдаля; кислота серная, концентрированная; аммоний серноокислый; реактив Несслера; вода дистиллированная; основной стандартный раствор сульфата аммония (0,236 г реактива растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 500 мл); перекись водорода 33 %; исследуемый корм.

Ход работы:

1. Постройте градуированный график. Для этого в мерные колбы вместимостью 50 мл внесите 0,25; 0,5; 1; 1,5; и 2,0 мл основного

стандартного раствора сульфата аммония, что соответствует 0,025; 0,05; 0,1; 0,15 и 0,2 мг азота. Добавьте 25–30 мл дистиллированной воды и 4 мл реактива Несслера, доведите водой до метки.

2. Фотометрируйте через 30 мин при длине волны 440 нм, используя в качестве раствора сравнения дистиллированную воду. Градуировочный график постройте, откладывая по оси абсцисс содержание азота (мг) в 50 мл раствора, а по оси – ординат соответствующее значение оптической плотности.

3. Навеску корма массой 0,2–0,5 г поместите в колбу Кьельдаля, добавьте 10–20 мл концентрированной серной кислоты, 5 мл пероксид водорода и поставьте на электроплитку.

4. Нагревание ведите осторожно, добавляя пероксид водорода периодически взбалтывая жидкость. Минерализацию закончите, когда жидкость в колбе станет прозрачной.

5. Раствор перенесите в мерную колбу вместимостью 100 мл, доведите до метки дистиллированной водой и перемешайте.

6. 0,5–1 мл полученного раствора перенесите в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавьте 25–30 мл дистиллированной воды и 4 мл реактива Несслера, доведите объем до метки дистиллированной водой и перемешайте.

7. Фотометрируйте через 30 мин при длине волны 440 нм, используя для сравнения дистиллированную воду. Количество азота определите по градуировочному графику.

8. Массовую долю протеина (%) определите по формуле

$$C = ((m_1 \cdot 6,25 \cdot 100) / (m_2 \cdot V \cdot 1000)) \cdot 100,$$

где m_1 – масса азота, найденная по градуировочному графику, мг;

m_2 – масса навески, г;

V – аликвотный объем минерализата, взятый для анализа, мл.

Контрольные вопросы

1. Какие органические соединения называют аминокислотами?
2. Какие классификации аминокислот вам известны?
3. Какие химические свойства характерны для аминокислот?
4. На примере аспарагиновой кислоты покажите амфотерность аминокислот.
5. Какие органические соединения называют белками?

6. В чем состоит отличие понятий «аминокислотный состав» и «первичная структура» белка?

7. Охарактеризуйте первичную структуру белка и его основные свойства.

8. Что понимают под вторичной структурой белка?

9. Что понимают под третичной структурой белка?

10. Какие типы взаимодействий поддерживают третичную структуру белка?

11. Что такое четвертичная структура белка?

12. Что такое изоэлектрическая точка белка?

13. Какие группы белков выделяют: а) по функциям; б) по сложности строения; в) по форме белковой молекулы?

14. Назовите качественные реакции на белок.

15. Какие способы выделения белка из растительного материала вам известны?

16. Назовите известные вам способы разделения белка на фракции.

17. Что такое денатурация белка? Какие типы денатурации вам известны?

18. Какие гистохимические реакции можно использовать для обнаружения белка и аминокислот в растительных объектах?

Тестовые задания

1. Белки – биополимеры, мономерами которых являются:

а) карбоновые кислоты;

б) углеводы;

в) β -аминокислоты;

г) α -аминокислоты.

2. Аминокислотные остатки в белках связаны между собой:

а) сложноэфирными связями;

б) водородными связями;

в) пептидными связями;

г) ангидридными связями;

д) гликозидными связями.

3. Заряд пептидов в изоэлектрической точке:

а) отрицательный;

б) положительный;

в) нулевой.

4. Заряд дипептида лизилпролина в кислой среде равен:
- а) 2^+ ;
 - б) 3^+ ;
 - в) 2^- ;
 - г) 3^+ .
5. Между остатками треонина и глутамина при формировании третичной структуры белка возникает:
- а) ионная связь;
 - б) ковалентная связь.
6. Если ИЭТ белка имеет низкое значение, то белок богат:
- а) кислыми аминокислотами;
 - б) основными аминокислотами.
7. Серосодержащие аминокислоты:
- а) глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин;
 - б) серин, треонин;
 - в) цистеин, метионин;
 - г) лизин, аргинин;
 - д) триптофан, гистидин.
8. Вторичная структура глобулярных белков представлена преимущественно:
- а) α -спиралью;
 - б) β -структурой.
9. Вторичная структура белка стабилизируется:
- а) водородными связями;
 - б) ковалентными связями;
 - в) ионными связями.

2 УГЛЕВОДЫ

Углеводы наряду с белками – наиболее распространенные соединения, участвующие в построении клетки и используемые в процессе ее жизнедеятельности. Они входят в состав всех живых организмов. Самым богатым источником углеводов служат растения: до 80 % сухой массы тканей растений составляют углеводы.

Углеводы – полигидроксикарбонильные соединения и их производные. Углеводами называют очень большое число соединений, обладающих различной химической структурой и биологическими функциями.

Классификация углеводов основана на их способности гидролизаться. Углеводы разделяют на *простые* и *сложные*. Простые углеводы иначе называются *моносахаридами*, они не подвергаются гидролизу. Сложные подразделяют на *олигосахариды* и *полисахариды*. В состав олигосахаридов входят от двух до десяти моносахаридов. В зависимости от числа моносахаридов, входящих в структуру, олигосахариды называют ди-, три-, тетрасахаридами и т. д. К полисахаридам относятся углеводы, в состав которых входят более 10 моносахаридных остатков. Сложные углеводы при гидролизе распадаются с образованием простых.

Моносахариды иначе называют *монозами*. Моносахариды, в состав которых входит альдегидная группа, называют *альдозами*, а кетонная – *кетозами*. Характерной особенностью класса углеводов является наличие не менее двух гидроксильных групп и одной карбонильной (альдегидной или кетонной) группы. Простейший углевод должен содержать три атома углерода. По числу атомов углерода моносахариды называют *триозами*, *тетрозами*, *пентозами*, *гексозами* и т. д.

Олигосахариды. Наиболее распространенными в природе олигосахаридами являются дисахариды. *Мальтоза* образуется из полисахаридов как промежуточный продукт. Она состоит из двух остатков глюкозы, соединенных между собой α -1,4-гликозидной связью. *Лактоза* содержится в молоке животных и человека. В состав лактозы входит остаток галактозы и глюкозы; эти монозы связаны между собой β -1,4-гликозидной связью. *Сахароза* – наиболее распространенный и важный дисахарид, встречающийся в растительном мире. Сахароза является ценным питательным веществом для человека.

Сахароза состоит из остатков α -D-глюкозы и β -D-фруктозы, связанных, α , β -1,2-гликозидной связью.

Полисахариды являются биополимерами, мономерами которых служат моносахариды. Если в составе полисахарида содержатся остатки моносахарида одного вида, его называют *гомополисахаридом*, если разных – *гетерополисахаридом*. К физиологически важным гомополисахаридам относят крахмал и гликоген. *Крахмал* – гомополисахарид, состоящий из остатков глюкозы. Крахмал состоит из двух фракций, отличающихся строением и свойствами: *амилазы* – 15–25 % и *амилопектина* – 75–85 %. К числу важнейших гетерополисахаридов – гиалуроновую кислоту, хондротинсульфат и гепарин.

2.1 Изучение физических и химических свойств моно-, ди- и полисахаридов

Моно- и дисахариды, имеющие в составе молекулы альдегидную или кетонную группу способны восстанавливать окись меди, содержащуюся в реактиве Фелинга до закиси меди. Последняя выпадает в осадок кирпично-красного цвета.



Качественная реакция на полисахарид крахмал происходит при добавлении раствора йода, появляется характерное синее окрашивание.

Цель работы: получить из растительного материала растворы углеводов и изучить их физические и химические свойства.

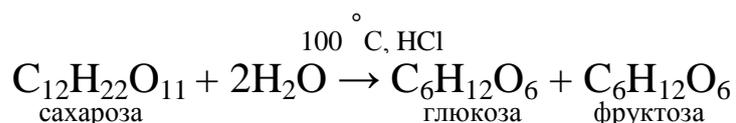
Ход работы

1. Моносахариды ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Из корнеплода моркови получить водную вытяжку моносахаридов. При добавлении к вытяжке реактива Фелинга обнаруживают восстанавливающие моносахариды (в частности, глюкозу).

2. Дисахариды ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Из тщательно измельченных проросших семян ячменя получить водную вытяжку мальтозы. С вытяжкой проводят реакцию Фелинга. Наблюдают образование большого количества осадка закиси меди.

Из корнеплода сахарной свеклы получить вытяжку сахарозы (можно использовать для этой цели обыкновенный пищевой сахар). Проводят реакцию с фелинговой жидкостью, регистрируют очень небольшой осадок закиси меди. Последний образуется из-за наличия примеси моносахаров. Раствор химически чистой сахарозы жидкость Фелинга не восстанавливает.

Выполнить кислотный гидролиз сахарозы. Химическая реакция превращения дисахарида в моносахариды происходит по следующему уравнению:

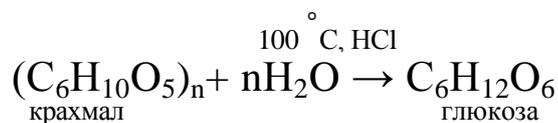


После выполнения гидролиза прилить к продуктам реакции фелинговой жидкости. Фиксируют выпадающий в большом количестве кирпично-красный осадок закиси меди.

3. Полисахариды $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. Из клубней картофеля получить крахмал. В опыте убеждаются, что крахмал нерастворим в холодной воде, он оседает на дно. В горячей воде крахмала образует коллоидный раствор (клейстер). Добавить в пробирку с крахмалом несколько капель раствора йода. Наблюдают характерное синее окрашивание.

Провести реакцию с фелинговой жидкостью. Убеждаются, что крахмал не способен восстанавливать медь из ее окиси.

Провести кислотный гидролиз крахмала. Реакция идет по уравнению:



В том, что в результате получилась глюкоза, убеждаются, проводя реакцию с жидкостью Фелинга. Наблюдают выпадение обильного осадка закиси меди.

Все результаты необходимо записать в сводную таблицу и сделать выводы о физических и химических свойствах глюкозы, сахарозы, мальтозы и крахмала.

Сводные результаты опытов

Название углевода	Формула	Растворимость в воде	Химическая реакция	
			с йодом	Фелинговой жидкостью
Глюкоза				
Сахароза				
Мальтоза				
Крахмал				

2.2 Реакции на моносахара

Оборудование и реактивы: два химических стакана на 100–200 мл и часовое стекло для его накрывания, стеклянная палочка; пробирки; асбестовая сетка; микроскоп, покровное и предметное стекло; щелочной раствор сегнетовой соли; раствор 69,26 г медного купороса в 1 л воды; глюкоза; солянокислый фенилгидразин; уксуснокислый натрий; 10 %-й раствор уксусной кислоты; 5 н растворы соляной кислоты и едкого натра; концентрированная серная и соляная кислоты; углекислая медь; 2 %-й раствор сульфата меди (II) CuSO_4 ; 10 %-й раствор гидроксида натрия NaOH ; 5 %-й нитрат раствор серебра AgNO_3 .

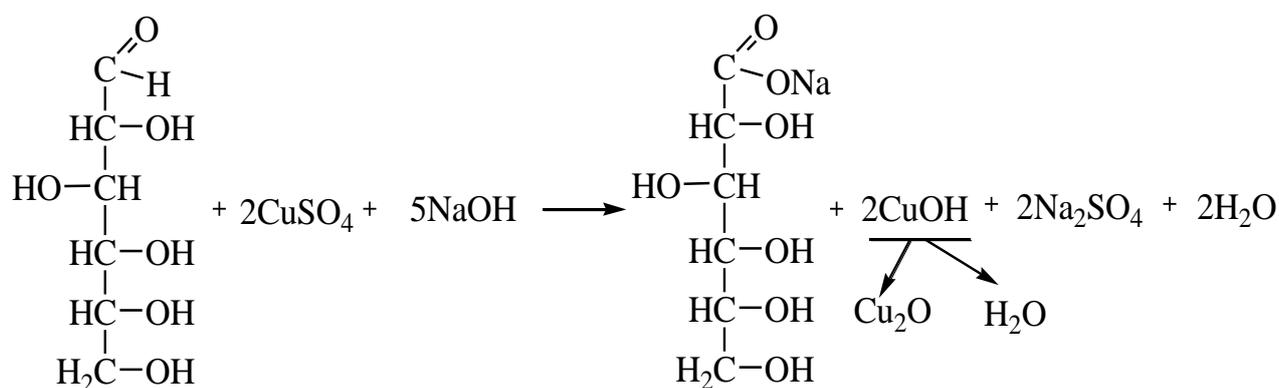
Приготовление раствора Фелинга. К 3 мл щелочного раствора сегнетовой соли прилить 3 мл раствора медного купороса. Описать внешний вид полученной жидкости Фелинга. Написать уравнение реакции ее получения.

Реакция моносахаридов с реактивом Фелинга

К 1 мл 0,15 %-го раствора глюкозы в пробирке прилить около 2 мл жидкости Фелинга. Нагреть раствор до кипения и кипятить 1 минуту. Отметить эффект, написать уравнение реакции.

Проба Троммера

В пробирку поместите 1 каплю 0,5 %-го раствора глюкозы и 6 капель 10 %-го гидроксида натрия NaOH . К полученной смеси добавьте 1 каплю 2 %-го раствора сульфата меди (II) CuSO_4 . Образуется осадок гидроксида меди (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2$; он быстро растворяется, и получается прозрачный раствор синего цвета.



К полученному синему раствору добавьте несколько капель воды до высоты слоя жидкости в пробирке 18–20 мм. Нагрейте ее над пламенем горелки, держа пробирку наклонно так, чтобы нагревалась только верхняя часть раствора, а нижняя оставалась для контроля (без нагревания). Доведите до кипения, но не кипятите. При нагревании цвет верхней части раствора изменяется от синего до желто-красного.

Эта реакция называется пробой Троммера и используется для обнаружения глюкозы в моче.

Восстановление аммиачного раствора гидроксида серебра глюкозой

В пробирку поместите 1 каплю 5 %-го нитрата серебра AgNO_3 , прибавьте 2 капли 10 %-го гидроксида натрия NaOH и 3–4 капли 10 %-го водного раствора аммиака до растворения образующегося осадка гидроксида серебра. Полученный прозрачный аммиачный раствор гидроксида серебра является реактивом, окисляющим глюкозу (реактив Толленса). Добавьте к полученному реактиву 1 каплю 0,5 %-го раствора глюкозы и слегка подогрейте пробирку над пламенем горелки до начала побурения раствора. Далее реакция идет без нагревания, и металлическое серебро выпадает либо в виде черного осадка, либо осаждается на стенках пробирки в виде блестящего зеркального налета (отсюда название – реакция серебряного зеркала).

Реакция Селиванова на фруктозу

В пробирку поместите крупинку сухого резорцина и 2 капли концентрированной соляной кислоты. Добавьте 2 капли 0,5 %-го

раствора фруктозы и нагрейте до начала кипения. Постепенно жидкость приобретает красное окрашивание. Реакция обусловлена образованием нестойкого соединения – гидроксиметилфурфуrolа. Под действием концентрированной соляной кислоты гидроксиметилфурфуrol конденсируется с резорцином, давая окрашенное соединение.

2.3 Реакции на сложные сахара

Оборудование и реактивы: два химических стакана на 100–200 мл и часовое стекло для его накрывания, стеклянная палочка; 10 пробирок; асбестовая сетка; фарфоровый тигель на 20 мл; реактив Фелинга; сахароза; уксуснокислый натрий; 10 %-й раствор серной или соляной кислот; сахароза; 5 н растворы соляной кислоты и едкого натра; растворимый крахмал; концентрированная серная; вата; раствор 0,127 г йода и 0,2 г йодистого калия в 100 мл воды; углекислая медь; 25 %-й раствор аммиака; крепкая азотная кислота (удельный вес 1,4); смесь спирта и эфира (1:1).

Гидролиз сложных сахаров

Налить в пробирку 1 мл 0,15 % раствора сахарозы. Прибавить 2 мл жидкости Фелинга. Смесь нагреть и кипятить не более минуты. Отметить и объяснить эффект.

В пробирку налить 1 мл 0,15 % раствора сахарозы и 3 капли 5 н. раствора соляной кислоты. Смесь нагреть до кипения, сейчас же охладить, влить в нее 3 капли 5 н. раствора едкого натра, 1 мл жидкости Фелинга, довести до кипения и кипятить 1 минуту. Отметить эффект, объяснить его уравнениями реакций, сравнить с эффектом предыдущего опыта, объяснить разницу.

Гидролиз крахмала

Цель работы: исследовать реакцию гидролиза крахмала под действием солодовой вытяжки.

Принцип метода: для обнаружения в растворе крахмала, декстринов и мальтозы используют характерные цветные реакции с йодом – на крахмал и декстрины; и фелинговой жидкостью – на восстанавливающие сахара.

1 вариант. В пробирку поместите 5 капель 0,5 %-го крахмального клейстера и 1 каплю сильно разбавленного раствора йода. Раствор окрашивается в синий цвет. Нагрейте раствор, он обесцвечивается; при охлаждении окраска восстанавливается.

В стакан налить 20 мл 1 %-го раствора крахмала и 6 капель концентрированной серной кислоты, накрыть ее часовым стеклом и содержимое кипятить. Через каждые 10 минут отбирать пипеткой в чистую пробирку по 1 мл раствора. Пробу охладить и добавить к ней 1–2 капли раствора йода. Так продолжать до тех пор, пока проба с йодом окажется отрицательной. Описать результаты и объяснить их. Написать уравнение соответствующих реакций.

К 3–5 мл 1 %-го раствора крахмала в пробирке добавить равное количество собственной слюны, зажать пробирку в кулаке (для нагревания), через каждые 5 минут отбирать приблизительно по 1 мл для реакций с йодом. Отметить эффект, объяснить его, сравнить скорость биохимического (ферментативного) гидролиза с химическим гидролизом. Написать уравнение реакции ферментативного гидролиза крахмала.

2 вариант. *Получение солодовой вытяжки (диастаза).* Взять 2 г проросших семян ячменя, тщательно измельчить, залить в колбочке 15 мл воды (35 °С). Перемешать, дать настояться 30 мин, отфильтровать. В вытяжке будет находиться фермент амилаза и другие растворимые вещества, которые легко экстрагируются.

Гидролиз крахмала. В две пробирки налить по 10 мл 2 %-ого крахмального клейстера и по 1 мл солодовой вытяжки. Смесь в каждой пробирке тщательно встряхнуть. Одну пробирку оставить при комнатной температуре (18–20 °С), другую подогреть на водяной бане до температуры 50–55 °С. С этого момента фиксировать начало опыта. В ходе опыта содержимое периодически помешивают пипеткой.

Контроль скорости гидролиза. До заливки амилазы в клейстер необходимо приготовить пробирки с йодной водой. Для этого к 18–20 мл дистиллированной воды добавить 6–7 капель 10 %-го раствора йода в КJ. Вода окрасится в золотисто-желтый цвет. Приготовленную йодную воду разлить поровну в 16 пробирок в штативе, служащих далее для контроля хода гидролиза.

Сводные результаты опытов

Условия гидролиза		Окраска декстринов по контрольным пробам										Время полного гидролиза, мин
Температура, °С	Интервал между отбором проб, мин	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
18–20												
50–55												

2.4 Определение моносахаров и олигосахаров по обесцвечиванию жидкости Фелинга

Оборудование и реактивы: реактив Фелинга (см. прил. Б); колбы мерные на 500, 100 и 50 мл стаканы или конические колбы на 50–100 мл, фарфоровые чашки, воронки, фильтры, широкие пробирки диаметром 16–20 мм, пипетки, фотоэлектроколориметр; 1 %-й раствор фенола, серная кислота концентрированная, 96 % и 80 %-й этанол, сахароза; водяная баня, 20 % раствор HCl, сода.

Ход определения. Получение экстракта. 1 г хорошо измельченного растительного материала помещают в стакан или коническую колбу емкостью 50–100 мл и заливают 10 мл 96 %-го этанола. После этого колбу или стакан помещают на водяную баню и содержимое их трижды доводят до кипения при помешивании стеклянной палочкой. Затем охлаждают и после осаждения растительного материала раствор фильтруют в фарфоровую чашку емкостью 50 мл. При фильтровании необходимо сливать лишь прозрачный спиртовой раствор и избегать перенесения осадка на фильтр.

После этого в стакан или колбу с растительной массой приливают 10 мл 80 %-го этанола, содержимое тщательно перемешивают, дважды нагревают на водяной бане до кипения и после охлаждения вновь сливают раствор через фильтр в ту же фарфоровую чашку. Такую экстракцию повторяют дважды. Затем осадок из стакана или колбы переносят на фильтр и промывают 2 раза небольшими порциями (по 1 мл) теплого 80 %-го этанола.

Этанол из фарфоровой чашки удаляют выпариванием на слабо нагретой (40 °С) водяной бане. Содержимое чашки после удаления этанола растворяют в 5 мл горячей дистиллированной воды, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и аккуратно переносят в

мерную колбу емкостью 50 мл. Чашку несколько раз ополаскивают небольшими порциями воды, сливая воду в ту же колбу. Затем колбу доводят водой до метки, закрывают пробкой, перемешивают и, если появляется небольшой осадок, дают ему отстояться. Далее проводят 10-кратное разбавление полученного раствора. Для этого 5 мл полученного раствора переносят в другую мерную колбу емкостью 50 мл, доводят колбу водой до метки и содержимое перемешивают. При большом количестве сахаров проводят 20-кратное разбавление (5 мл разбавляют в колбе на 100 мл).

Определение содержания моносахаров. В три пробирки поместить по 4 мл полученного раствора и добавить в каждую по 2 мл жидкости Феллинга. Одну пробирку отставить и использовать в качестве контроля, две другие поместить в кипящую водяную баню на 10 минут и затем быстро охладить на протоке холодной водопроводной водой. Образовавшуюся в результате кипячения закись меди удалить из раствора центрифугированием при 3000 g в течение 10 минут или отфильтровать. Раствор после центрифугирования (или фильтрат) колориметрировать при 440 нм по сравнению с контролем, не подвергнувшемуся нагреванию.

Определение содержания олигосахаров. Определение олигосахаров проводят после гидролиза. В коническую колбу поместить 10 мл водной вытяжки, добавить 1 мл 20 %-го раствора HCl и 9 мл дистиллированной воды. Колбу закрыть пробкой с обратным холодильником и поместить в кипящую водяную баню на три часа. После гидролиза и охлаждения раствор нейтрализовать сухой содой до прекращения выделения CO₂. Далее провести определение в растворе моносахаров по методу, описанному выше. В этом случае определяется сумма моно- и олигосахаров, которые распались на моносахара в результате гидролиза. Содержание олигосахаров рассчитывают по разности концентраций между полученной после гидролиза и до гидролиза. Калибровочную кривую строят по глюкозе.

2.5 Определение содержания клетчатки

Клетчатка (целлюлоза), представляет собой наиболее широко распространенный полисахарид растений, образующий главную составную часть клеточных стенок. Основные источники клетчатки – волокно хлопчатника, волокнистые растения (лен, конопля, джут), со-

лома и древесина. Хлопковое волокно содержит 95–98 % клетчатки, лен – 80–90 %, древесина – 40–50 %, сено и солома – обычно 20–40 %.

В растениях клетчатка прочно связана с лигнином, гемицеллюлозами, пектиновыми веществами, смолами, липидами. Клетчатка не растворима в воде, а также в разбавленных кислотах и щелочах. Для определения клетчатки нужно удалить все вещества, с которыми она связана, и получить ее в чистом виде.

Оборудование и реактивы. Бюретки, водяные бани, пробирки со стеклянными пробками, стаканы на 100 мл, центрифуга. Смесь уксусной и азотной кислот, 0,5 н раствор бихромата калия в серной кислоте, серная кислота концентрированная, 0,1 н раствор соли Мора, 0,2 %-й раствор фенилантраниловой кислоты.

Принцип метода. Растительный материал обрабатывают при нагревании смесью уксусной и азотной кислот. При этом происходит удаление крахмала, лигнина, гемицеллюлоз, пектиновых и красящих веществ, а также других соединений, с которыми клетчатка связана в растениях. Все эти примеси удаляют, и клетчатку затем окисляют бихроматом калия в присутствии серной кислоты до углекислоты и воды. По количеству бихромата калия, которое было затрачено на окисление клетчатки, определяют ее содержание. Количество бихромата калия устанавливают титрованием солью Мора, используя в качестве индикатора 0,2 %-й раствор фенилантраниловой кислоты.

Ход определения. 50 мг тщательно измельченного растительного материала (соломы) помещают в пробирку, приливают 5 мл смеси уксусной и азотной кислот, закрывают стеклянной пробкой и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически помешивая содержимое пробирки стеклянной палочкой. При этом происходит расщепление посторонних веществ, с которыми была связана клетчатка. После этого раствор центрифугируют (или дают ему отстояться в течение 5–10 мин), надосадочную жидкость осторожно сливают, к осадку добавляют 10–15 мл дистиллированной воды, перемешивают и вновь центрифугируют или отстаивают. Такое промывание осадка клетчатки водой повторяют 3 раза. К промытому осадку клетчатки приливают из бюретки точно 10 мл 0,5 н бихромата калия в серной кислоте, перемешивают стеклянной палочкой и пробирку помещают на кипящую водяную баню на 10 мин, периодически помешивая содержимое. В результате происходит окисление клетчатки бихроматом калия.

Затем пробирку охлаждают, содержимое ее выливают в стакан для титрования. Пробирку ополаскивают 3–5 мл воды, которые также выливают в стакан. Раствор охлаждают, прибавляют 5 капель 0,2 %-го раствора фенилантраниловой кислоты и титруют 0,1 н раствором соли Мора до перехода вишнево-фиолетовой окраски в зеленую. Параллельно таким же образом титруют 10 мл 0,5 н раствора бихромата калия (контроль), предварительно добавив в него 3-5 мл дистиллированной воды и 5 капель 0,2 %-го раствора фенилантраниловой кислоты. 1 мл 0,1 н раствора соли Мора соответствуют 0,675 мг клетчатки.

Вычисление результатов проводят по формуле

$$x = \frac{0,675 \times T \times (V_2 - V_1)}{m},$$

где x – содержание клетчатки, %;

V_1 – количество 0,1 н раствора соли Мора, затраченного при определении клетчатки, мл;

V_2 – количество 0,1 н раствора соли Мора, затраченного при контрольном титровании 10 мл бихромата калия, мл;

T – поправка к титру соли Мора;

m – навеска растительного материала, г.

Определение T (поправки к титру соли Мора). 25 мл 0,1 н раствора бихромата калия наливают в стакан, добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты, а затем титруют 0,1 н раствором соли Мора до перехода окраски из вишнево-фиолетовой в зеленую. Поправку к титру раствора соли Мора вычисляют по формуле

$$T = \frac{25 \times 0,1}{V},$$

где T – поправка к титру соли Мора;

V – объем раствора соли Мора, затраченный на титрование бихромата калия.

Контрольные вопросы

1. Какие органические вещества называют углеводами?
2. Каковы основные функции углеводов в растениях?
3. Какие функциональные группы входят в состав альдогексоз?

4. Объясните, на чем основана классификация углеводов.
5. Напишите структурные формулы ди- и трикарбоновых кислот, функционирующих в цикле Кребса.
6. Какие качественные реакции используют для обнаружения углеводов в растительном материале?
7. Как обнаружить присутствие глюкозы в растительном экстракте?
8. Почему лактоза и сахароза обладают восстанавливающей способностью?
9. Как обнаружить присутствие крахмала в растительном экстракте?
10. Какие гистохимические реакции можно использовать для обнаружения моносахаров и дисахаров в растительных объектах?
11. Какие гистохимические реакции можно использовать для обнаружения крахмала в растительных объектах?
12. Какие гистохимические реакции можно использовать для обнаружения нерастворимых полисахаридов в растительных объектах?

Тестовые задания

1. Углеводы, в состав которых входят более 10 моносахаридных остатков:
 - а) олигосахариды;
 - б) монозы;
 - в) полисахариды.

2. Продукты гидролиза сахарозы:
 - а) α -D-глюкоза;
 - б) α -D-глюкоза и β -D-фруктоза;
 - в) β -D-фруктозы и α -D-галактоза;
 - г) β -D-фруктоза.

3. Пентозой является:
 - а) глюкоза;
 - б) рибоза;
 - в) эритроза;
 - г) фруктоза.

4. Дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы:
- а) сахароза;
 - б) мальтоза;
 - в) лактоза.
5. Гексозой не является:
- а) глюкоза;
 - б) манноза;
 - в) арабиноза;
 - г) галактоза;
 - д) фруктоза.
6. Дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и галактозы:
- а) сахароза;
 - б) мальтоза;
 - в) лактоза.
7. Фракции крахмала: _____ и _____.
8. Гетерополисахарид:
- а) крахмал;
 - б) гликоген;
 - в) гепарин.
9. Установите соответствие:
- | | |
|-----------------------|---------------|
| 1) гетерополисахарид; | а) галактоза; |
| 2) гомополисахарид; | б) ксилоза; |
| 3) пентоза; | в) крахмал; |
| 4) гексоза; | г) сахароза; |
| 5) дисахарид. | д) гепарин. |
10. Специфическая реакция на пентозы:
- а) реакция Билля;
 - б) реакция Ниландера;
 - в) реакция Селиванова;
 - г) проба Троммера.

3 ФЕРМЕНТЫ

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы.

Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- 1) катализируют только энергетически возможные реакции;
- 2) не изменяют направление реакции;
- 3) не расходуются в процессе реакции;
- 4) не участвуют в образовании продуктов реакции.

По строению ферменты делят на *простые (однокомпонентные)* и *сложные (двухкомпонентные)*. Простой фермент состоит только из белковой части; в состав сложного входят белковая и небелковая составляющие. Иначе сложный фермент называют *холоферментом*. Белковую часть в его составе называют *апоферментом*, а небелковую – *коферментом*. Роль некоторых коферментов играют витамины или вещества, построенные с участием витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₁₂, Н, Q и др. Особенностью сложных ферментов является то, что отдельно апофермент и кофермент не обладают каталитической активностью.

В составе как простого, так и сложного фермента выделяют *субстратный, аллостерический и каталитический* центры. Каталитический центр простого фермента представляет уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, расположенных на разных участках полипептидной цепи. Субстратный центр простого фермента – это участок белковой молекулы фермента, который отвечает за связывание субстрата. Субстратный центр образно называют якорной площадкой, где субстрат прикрепляется к ферменту за счет различных взаимодействий между определенными боковыми радикалами аминокислотных остатков и соответствующими группами молекулы субстрата. Субстрат с ферментом связывается посредством ионных взаимодействий, водородных связей; иногда субстрат и фермент связываются ковалентно. Гидрофобные взаимодействия также играют определенную роль при связывании субстрата с ферментом. В простых ферментах субстратный центр может совпадать с каталитическим; тогда говорят об активном центре фермента.

Аллостерический центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому какого-то низкомолекулярного вещества изменяется третичная структура белковой молекулы фермента, что влечет за собой изменение его активности.

Аллостерический центр является регуляторным центром фермента. В сложных ферментах роль каталитического центра выполняет кофермент, который связывается с апоферментом в определенном участке – кофермент связывающем домене. Понятия субстратного и аллостерического центров для сложного фермента и для простого аналогичны.

В настоящее время известно более 2000 ферментов. Все ферменты разделены на шесть классов, каждый имеет строго определенный номер:

1. *Оксидоредуктазы* катализируют окислительно-восстановительные процессы.

2. *Трансферазы* катализируют реакции переноса функциональных групп и молекулярных остатков с одной молекулы на другую.

3. *Гидролазы* катализируют реакции гидролиза.

4. *Лиазы* катализируют реакции отщепления (кроме атомов водорода) с образованием двойной связи либо присоединения по двойной связи, а также негидролитический распад органических соединений либо синтез без участия макроэргических веществ.

5. *Изомеразы* катализируют процессы изменения геометрической или пространственной конфигурации молекул.

6. *Лигазы* катализируют реакции синтеза, сопровождающиеся гидролизом богатой энергией связи (как правило, АТФ).

Специфичность действия ферментов – одно из главных их свойств – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Различают несколько видов специфичности. Стереохимическая субстратная специфичность – фермент катализирует превращение только одного стереоизомера субстрата. Абсолютная субстратная специфичность – фермент катализирует превращение только одного субстрата. Групповая субстратная специфичность – фермент катализирует превращение группы субстратов сходной химической структуры.

К числу факторов, повышающих активность ферментов, относят катионы металлов и некоторые анионы. Чаще всего активаторами ферментов являются катионы Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , K^+ и Co^{2+} , а из анионов – Cl (хлор). Ингибиторы тормозят действие ферментов. Ингибиторами могут быть как эндогенные, так и экзогенные вещества.

Биологические катализаторы по ряду признаков резко отличаются от неорганических:

- по сравнению с неорганическими катализаторами ферменты работают в очень мягких условиях (низкая температура, нормальное давление, невысокие значения рН среды и т. д);
- ферменты обладают высокой специфичностью действия, что не наблюдается у катализаторов неорганической природы. Каждый фермент ускоряет, как правило, только одну химическую реакцию или, в крайнем случае, группу реакций одного типа;
- связано с белковой природой ферментов. Сюда относятся термолабильность, зависимость активности от рН среды и наличия активаторов и ингибиторов;
- процесс ферментативного катализа строжайшим образом организован в пространстве и во времени. Кооперативность и жесткая запрограммированность этапов действия – отличает механизм биокатализа от действия катализаторов иной природы.

3.1 Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Оборудование и реактивы: баня водяная; термометр лабораторный; штатив лабораторный с пробирками стеклянными химическими; пипетки с одной меткой по 1 мл (3 шт); крахмал (1 %-й) в хлориде натрия (0,3 %-м); соляная кислота (10 %-я); йод (0,3 %-й) в иодиде калия (3 %-м); гидроксид натрия (10 %-й); сульфат меди (3 %-й).

В три пробирки наливают по 5 мл 1 %-го раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую – 1 мл 10 %-й соляной кислоты, а в третью – 1 мл слюны.

Пробирки 1 и 3 после перемешивания помещают в водяную баню при 38 °С, а пробирку 2 – в кипящую водяную баню. Через 15–20 мин все пробирки вынимают из водяной бани, охлаждают и из каждой берут пробы для определения в них крахмала и глюкозы: первого – по реакции с йодом, второй – по реакции Троммера (схема опыт приведена ниже в таблице).

Стеклянной палочкой наносят по капле раствора из каждой пробирки на фарфоровую пластинку рядом с ранее нанесенной каплей раствора йода в иодиде калия, после чего капли соединяют и перемешивают.

По интенсивности окраски пробы делают заключение о степени гидролиза крахмала. Для определения глюкозы из каждой пробирки

берут по 3 мл раствора, добавляют 1 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и несколько капель 1 %-го раствора сульфата меди. Верхний слой жидкости нагревают до кипения.

Появление желтого осадка оксида меди (I) или красного металлической меди указывает на наличие глюкозы. Результаты опыта заносят в таблицу.

Номер пробирки	Субстрат	Катализатор	После инкубации	
			Проба с йодом	Проба Троммера
1	Крахмал	Соляная кислота		
2	Крахмал	Амилаза слюны		
3	Крахмал			

3.2 Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны

Оборудование и реактивы: мерный цилиндр на 25 мл, химические стаканы, воронки для фильтрования, вата, пробирки, водяная баня, термометры до 100 °С, пластинки стеклянные, стеклянные палочки, ступка с пестиком, раствор крахмального клейстера, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, предметные стекла.

Приготовление разбавленной слюны

Дистиллированной водой 2–3 раза ополаскивают рот, чтобы удалить остатки пищи. Затем отмеряют цилиндром 20 мл дистиллированной воды, сливают в стакан и ополаскивают этой водой рот в течение 1–2 мин., выливают жидкость в другой стакан.

Эту операцию повторяют 2–3 раза. Собранную жидкость (примерно 50–60 мл) фильтруют через вату, и прозрачный фильтрат употребляют для проведения следующих опытов.

Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны

В две пробирки наливают по 5 мл крахмального клейстера и в одну из них 5 мл воды, а в другую 5 мл раствора слюны. Обе пробирки одновременно помещают в водяную баню, в которой поддерживают температуру 40 °С. В каждую пробирку помещают стеклянную палочку. Наблюдение за ходом гидролиза осуществляют с помощью йодной реакции.

Для этого наносят на стеклянную пластинку, положенную на лист белой бумаги, несколько капель раствора йода в йодистом калии и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из пробирок, где идет гидролиз. Через минуту с момента нагревания пробирок в водяной бане от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают ее с каплей раствора йода на стекле. Повторяют подобное исследование через 2, 4, 6, и 8 минут. После 10 минут выдержки смеси в водяной бане к оставшейся в каждой пробирке жидкости добавьте 1–2 мл Фелинговой жидкости и нагрейте. Что происходит при этом в пробирках? Объясните результаты наблюдений.

3.3 Качественные пробы на наличие ферментов в растениях

Обнаружение уреазы (карбамид-амидогидролаза) в соевой муке

Оборудование и реактивы: термостат; пипетки с одной меткой на 2 мл (2 шт); соевая мука; мочевины (1 %-я); фенолфталеин (1 %-й спиртовой раствор).

К 2 мл 1 %-го раствора мочевины добавляют две капли фенолфталеина и 2 мл раствора уреазы (1:10). Смесь хорошо перемешивают и ставят в термостат при 38 °С на 30 мин. Параллельно ставят такой же опыт с прокипяченным раствором уреазы. Содержимое первой пробирки становится малиново-красным вследствие смещения рН-раствора в щелочную зону за счет образовавшегося аммиака.

Обнаружение пероксидазы в картофеле

Оборудование и реактивы: терка; сырой картофель; пирогаллол (1 %-й); пероксид водорода (2 %-й).

Картофель натирают на терке. Небольшое его количество, не отжимая, переносят в пробирку, добавляют 1–2 мл 1%-го раствора пирогаллола и 1–2 капли 2 %-го раствора пероксида водорода. При стоянии выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина. Образование пурпурогаллина выражает следующая схема:

Многократное дегидрирование (окисление) пирогаллола и ряда промежуточных продуктов на пути к пурпурогаллину осуществляется с участием пероксидазы, каждый раз передающей снятые атомы водорода на пероксид водорода.

Обнаружение дегидрогеназ в семенах гороха

Материалы: слегка проросшие семена гороха.

Оборудование и реактивы: водяная баня, пробирки, спиртовки, зажимы для бирок, спички, 2 стаканчика на 50 мл, чашка Петри, метиленовая синь.

Ход работы. Снять с семян гороха кожуру, разделить семена на 2 порции по 8–10 штук. Одну порцию поместить в пробирку, залить обычной водой и хорошо прокипятить 8–10 минут, слить воду и охладить. Обе порции семян поместить в две пробирки, произвести окрашивание водным раствором метиленовой сини 3–5 минут. Затем промыть семена обычной водой, залить дистиллированной, закрыть пробками и поставить в водяную баню с температурой 30–35 °С. Наблюдать за изменением окраски в пробирках.

3.4 Влияние рН среды на активность амилазы

Оборудование и реактивы: термостат, микробюретки, пипетки, пробирки, штативы, 0,5 %-й раствор крахмала, 0,2 М раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия, 0,1 М раствор лимонной кислоты, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-м растворе йодистого калия, 1 %-й раствор хлористого натрия, слюна в разведении 1:100.

Принцип метода. Оптимум рН для амилазы определяют по интенсивности расщепления крахмала в разных по кислотности средах.

Ход работы. В 7 пробирок наливают растворы 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице. Получают буферные растворы с рН от 5,6 до 8,0. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5 %-го раствора крахмала и 1 %-го раствора хлористого натрия и по 10 капель слюны, разведенной в 100 раз.

Содержание пробирок перемешивают и помещают в термостат при 30 °С на 10 мин. Затем во все пробирки добавляют по 1 капле раствора йода в йодистом калии, перемешивают, наблюдают окраску и определяют рН, при котором амилаза действует наиболее активно. Оптимум рН для действия амилазы устанавливают по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (при реакции с раствором йода получается красная или желтая окраска). Результаты работы фиксируют в таблице.

Влияние рН среды на активность амилазы слюны

Номер пробы	Кол-во 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия, мл	Кол-во 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл	рН смеси	Кол-во 0,5 % раствора крахмала и 1% хлористого натрия, капель	Кол-во разведенной слюны (амилаза), капель	Окрашивание (реакция с йодом)
1	0,58	0,42	5,6	10	10	
2	0,63	0,37	6,0	10	10	
3	0,69	0,31	6,4	10	10	
4	0,77	0,23	6,8	10	10	
5	0,87	0,13	7,2	10	10	
6	0,94	0,06	7,6	10	10	
7	0,97	0,03	8,0	10	10	

3.5 Определение активности амилазы слюны

Оборудование и реактивы: фотоэлектроколориметр, термостат, водяная баня, холодильник, фильтры, стаканы, колбы мерные емкостью 40 мл, воронки, градуированные пипетки, пробирки, 1 %-й раствор хлористого натрия, 0,2 н ацетатный буфер рН 5,5, 2 %-й раствор крахмала, 1 н соляная кислота, 0,1 н соляная кислота, 0,3 %-й раствор йода в 3 %-м растворе йодистого калия.

Принцип метода: амилазы извлекают из растительного сырья раствором хлористого натрия, количество нерасщепленного ферментами субстрата (крахмала) определяют фотометрически после обработки раствором йода.

Ход работы: навеску муки 3 г растирают в фарфоровой ступке с 30 мл 1 %-го раствора хлористого натрия, переносят в стакан и ставят в холодное место на 1 ч для выделения белков. Смесь периодически помешивают стеклянной палочкой. Затем содержимое стакана фильтруют через плотный фильтр. Полученная прозрачная жидкость используется в качестве ферментного препарата для определения амилаз.

В две сухие пробирки (контрольную и опытную) вносят по 3 мл 0,2 н ацетатного буфера рН 5,5 и по 3 мл 2 %-го раствора крахмала. Смесь нагревают до 40 °С, в опытную пробирку приливают 1 мл ферментного препарата, в контрольную – 1 мл воды. После перемешивания содержимое пробирки ставят в термостат при 40 °С на 30 мин.

За это время под действием амилаз крахмал гидролизуеться. Закончив инкубацию, в каждую пробирку вносят по 2 мл 1 н раствора соляной кислоты для прекращения действия фермента. Затем из каждой пробирки берут по 0,5 мл смеси и вносят в мерные колбочки на 50 мл, в которые предварительно налито 40 мл воды, 1 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и 5 капель 0,3 %-го раствора йода в 3 %-м растворе йодистого калия. Колбы доводят до метки водой, тщательно перемешивают и колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре (690 нм).

Вычисление результатов проводят по формуле

$$A = \frac{D_2 - D_1}{D_2} \cdot C,$$

где A – активность амилазы в мг гидролизованного крахмала за 1 ч одним миллилитром ферментного раствора (так как время инкубации составляло 30 мин, полученный результат умножают на 2);

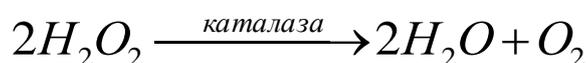
D_1 – оптическая плотность раствора;

D_2 – оптическая плотность контрольного раствора;

C – количество внесенного крахмала (3 мл 2 %-го раствора крахмала = 60 мг), мг.

3.6 Определение активности каталазы по Баху и Опарину

Каталазу относят к сложным ферментам, состоящим из белковой части и простетической группы, содержащей железо. Каталаза разлагает образующуюся в тканях растений и животных в процессе окисления ряда веществ перекись водорода на воду и кислород:



Оборудование и реактивы: бюретки, пипетки, фарфоровые ступки, электроплитки, фильтры, песочные часы, различные органы растений, 1 %-й раствор перекиси водорода, 10 %-й, раствор серной кислоты, 0,1 н раствор перманганата калия.

Принцип метода. Активность фермента определяется по количеству разложенной перекиси водорода.

Ход работы: 3 г навески исследуемого сырого материала растирают в ступке и настаивают с 50 мл воды при температуре +4°C в течение 1 ч. Затем жидкость быстро отфильтровывают. Для работы

берут две порции фильтрата по 20 мл, помещая их и стаканчики емкостью 100 мл. Одна проба – опытная, вторая кипятится на водяной бане и течение 2 мин и служит контролем. К опытной и контрольной пробам прибавляют по 20 мл воды и по 3 мл 1 %-го раствора перекиси водорода. Обе пробы оставляют на 15 мин при комнатной температуре, после чего к ним прибавляют по 5мл 10 %-го раствора серной кислоты для прекращения реакции. Оставшуюся перекись водорода, не разложенную ферментом, титруют 0,1н раствором перманганата калия до исчезающей в течение 2-3 мин слабо-розовой окраски раствора. Титрование идет по уравнению:



Вычисление результатов проводят по формуле

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot 50 \cdot 1,7}{20 \cdot m \cdot t},$$

где А – активность каталазы в мг перекиси водорода, разложенной ферментом в пересчете на 1 г навески за 1 мин действия;

V_1 – количество перманганата калия, пошедшее на титрование опытной пробы, мл;

V_2 – количество перманганата калия, пошедшее на титрование контрольной пробы, мл;

50 – объем всей вытяжки, мл;

20 – объем вытяжки, взятой для определения, мл;

1,7 – количество перекиси водорода, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия, мг;

t – время, мин;

m – навеска растительного материала, г.

Результаты расчета сводят в таблицу и делают выводы об активности каталазы различных растений и органов.

3.6 Гистохимическое выявление ферментов

Оборудование и реактивы: микроскоп, водяная баня, набор для микропрепарирования, пробирки, 25 %-я уксусная кислота, 0,03 %-я и 20 %-я перекись водорода, 0,7 %-й гваякол, 0,85 %-й р-р поваренной соли, молибденовокислый аммоний, бензидин, «нади»-

реактив, 0,1 % тетразолия, 10 %-й формалин, 15 %-й спирт, глицерин, 0,05 %-й метиленовый синий, сульфид аммония, 2 %-й раствор уксуснокислого свинца, 0,5 %-й раствор хлорида магния, 0,1 М ацетатный буфер, 2 %-й β -глицерофосфат натрия, 3 %-й р-р АТФ, 2 %-й веронал или мединал, 2 %-й хлорид кальция, 5 %-й сульфид магния.

Реакции на фосфатазы

Реакции по выявлению фосфатаз, как и других ферментов, лучше всего проводить на свежем живом материале.

Реакции на неспецифическую щелочную фосфатазу. Механизм реакции состоит в образовании фосфата кальция из ионов кальция и фосфорной кислоты, освободившейся под воздействием фосфатазы объекта на различные фосфорные эфиры. Для обнаружения щелочной фосфатазы срез погружают в среду, содержащую органический фосфорный эфир (например, АТФ), кальциевую соль (хлорид кальция), а также соль магния, так как ионы магния активируют действие фермента. Среда должна иметь рН не ниже 9. В дальнейшем образовавшийся осадок фосфата кальция превращают в более заметный темно-коричневый осадок сульфида кобальта, количество которого пропорционально степени активности фермента.

Для приготовления среды, содержащей фосфорный эфир, смешивают 10 мл 3 %-го раствора АТФ, 10 мл 2 %-го раствора веронала или мединала, 5 мл дистиллированной воды, 20 мл 2%-го раствора хлорида кальция и 1 мл 5 %-го раствора сульфида магния.

Срезы помещают в приготовленную среду на срок от 0,5 до 16 ч при 37 °С. Затем их промывают водой, обрабатывают 2 %-м раствором азотнокислого или уксуснокислого кобальта (3–5 мин), снова промывают водой и обрабатывают разведенным раствором сульфида аммония (1–2 мин). Срезы заключают в глицерин. В местах скопления фосфатазы наблюдается выпадение темно-коричневого осадка.

Реакция на неспецифическую кислую фосфатазу. Принцип реакции, также, как и для щелочной фосфатазы, основан на освобождении ионов фосфорной кислоты и образовании нерастворимого фосфата свинца. Выпавший в осадок бесцветный фосфат свинца после обработки сульфидом аммония превращается в коричневый сульфид свинца.

Для приготовления среды, содержащей фосфат, смешивают 2 мл 2 %-го раствора β -глицерофосфата натрия, 1 мл 0,1 М ацетатного буфера (смесь растворов уксусной кислоты и уксуснокислого на-

трия в отношении 4:1), 1 мл 2 %-го раствора уксуснокислого свинца, 1 мл 0,5 %-го раствора хлорида магния.

Срезы из свежего материала помещают в приготовленную среду при 37 °С на несколько часов, далее споласкивают дистиллированной водой, переносят в разведенный раствор сульфида аммония на 1–2 мин, промывают водой, заключают в глицерин и наблюдают выпадение коричневого осадка.

Реакции на аэробные дегидрогеназы

Наиболее старым методом обнаружения неспецифических дегидрогеназ (недостаточно специфичный и точный) является метод с обесцвечиванием метиленового синего. Наиболее новый и совершенный – метод с применением солей тетразолия (не всегда может быть применен ввиду дефицитности реактива). Субстратом, от которого дегидрогеназы отрывают водород, являются вещества тканей объекта. Реакции на дегидрогеназы следует проводить на свежем материале.

Реакции на аэробные дегидрогеназы с метиленовым синим. Сущность метода состоит в том, что окисленная форма метиленового синего, имеющая синюю окраску, при соединении с водородом, отнятым от субстрата дегидрогеназой, переходит в восстановленную бесцветную лейкоформу. Поскольку лейкоформ метиленового синего легко окисляется кислородом воздуха, причем раствор ее снова окрашивается, следует ограничить доступ кислорода к препарату (например, окантовав края покровного стекла парафином).

Срезы погружают на 15 мин в 0,05 %-й раствор метиленового синего, находящийся на предметном стекле. Желательно края покровного стекла окантовать парафином. Наблюдают обесцвечивание объекта, проходящее с различной быстротой в различных тканях.

Для проверки специфичности реакции срезы подогревают в пробирке с водой до 90 °С в течение 5 мин, не доводя до кипения для удаления дегидрогеназ, после чего проводят реакцию с метиленовым синим. Сохранение окраски метиленового синего указывает на отсутствие дегидрогеназ.

Реакция на аэробные дегидрогеназы с солями тетразолия. Принцип реакции состоит в восстановлении бесцветных солей тетразолия под действием дегидрогеназ в окрашенные соединения – формазапы. Для гистохимических целей признаны наилучшими неотетразолий синий, дитетразолий и нитросиний тетразолий. Реакция

на неспецифические дегидрогеназы идет без добавления к объекту специального субстрата.

Срезы помещают в 0,1 %-й раствор тетразолия, приготовленного на фосфатном буфере (рН 7,7), на 5–30 мин при 37 °С. После выпадения синего осадка формазана срезы фиксируют 10 %-м формалином в течение 10 мин, промывают в 15 %-м спирте 5 мин и заключают в глицерин.

Контрольные вопросы

1. Какова химическая природа и биологическая роль ферментов?
2. В чем сходство и различие ферментов и неорганических катализаторов?
3. На какие группы делят ферменты по строению молекулы?
4. Какие центры выделяют в составе ферментов? Охарактеризуйте каждый центр простого и сложного фермента.
5. Что такое аллостерический и каталитический центры фермента?
6. Что понимают под фермент-субстратным комплексом? Какими связями связаны фермент и субстрат в фермент-субстратном комплексе?
7. Каким образом влияет температура на образование фермент-субстратного комплекса?
8. Что такое кофермент? Какие соединения могут играть роль коферментов? Приведите примеры.
9. В состав какого кофермента входит витамин В₆?
10. Какие витамины входят в состав коферментов НАД, ФАД, СоА?
11. Назовите по рациональной номенклатуре ферменты, катализирующие гидролиз: а) дипептида; б) лактозы; в) сахарозы; г) амилозы.
12. На какие классы делят ферменты по катализируемой ими реакции?
13. Какие реакции катализируют ферменты класса оксидоредуктаз? Приведите пример процесса, катализируемого дегидрогеназой.
14. Что такое специфичность действия ферментов? Какие виды специфичности Вы знаете? Охарактеризуйте их.

Тестовые задания

1. Ферменты – это:
 - а) катализаторы углеводной природы;
 - б) катализаторы белковой природы;
 - в) катализаторы неорганической природы;
 - г) катализаторы липидной природы.

2. Холоферментом называют:
 - а) мультиэнзимный комплекс;
 - б) простой фермент;
 - в) сложный фермент;
 - г) фермент-субстратный комплекс.

3. Пантотеновая кислота входит в состав кофермента:
 - а) НАД;
 - б) ФАД;
 - в) коэнзима А;
 - г) тиаминпирофосфата.

4. Клеточные ферменты, локализованные в цитоплазме, проявляют максимальную активность при рН:
 - а) 7;
 - б) 2–3;
 - в) 4–5;
 - г) 9–10.

5. Ферменты, катализирующие синтез биологических молекул с участием АТФ, относят к классу:
 - а) трансфераз;
 - б) лигаз;
 - в) гидролаз;
 - г) лиаз;
 - д) изомераз.

6. Ферменты, катализирующие процессы декарбоксилирования органических веществ, относят к классу:
 - а) изомераз;
 - б) лиаз;
 - в) лигаз;
 - г) трансфераз.

4 ЛИПИДЫ

Липидами называют природные неполярные соединения, нерастворимые в воде, но растворимые в неполярных растворителях, бензине, петролейном эфире, серном эфире, ацетоне, хлороформе, сероуглероде, метиловом и этиловом спиртах, бензоле. В класс липидов попадает обширная группа соединений, имеющих разную структуру и биологические функции. В структурном отношении все липиды являются сложными эфирами жирных кислот и разнообразных спиртов. В зависимости от строения липиды разделяют на простые и сложные.

1. Простые липиды представлены двухкомпонентными веществами – сложными эфирами высших жирных кислот с глицерином, высшими или полициклическими спиртами. Сюда относят жиры (триглицериды) – сложные эфиры высших жирных кислот и трехатомного спирта – глицерина; воски – сложные эфиры высших жирных кислот и высших спиртов; стериды – сложные эфиры высших жирных кислот и полициклических спиртов – стеролов.

2. Сложные липиды имеют молекулы, компоненты которых соединены химическими связями различного типа. К ним принадлежат фосфолипиды, состоящие из остатков высших жирных кислот, глицерина или других многоатомных спиртов, фосфорной кислоты и азотистых оснований той или иной природы; гликолипиды, включающие наряду с многоатомным спиртом и высшей жирной кислотой также углеводы; диольные липиды – простые и сложные эфиры двухатомных спиртов с высшими спиртами и высшими жирными кислотами, содержащие в ряде случаев фосфорную кислоту, азотистые основания и углеводы; орнитолипиды, построенные из остатков высших жирных кислот, аминокислоты орнитина (или лизина) и включающие в некоторых случаях двухатомные спирты.

Липиды участвуют в построении и деятельности мембранного аппарата клетки. Широко известно значение липидов, особенно жиров, как субстрата для окисления и обеспечения организма энергией. Главный запасной продукт семян большинства растений – растительные жиры или масла, представляющие смесь триглицеридов – сложных эфиров глицерола и высших жирных кислот. При окислении липидов возникают метаболиты, широко вовлекаемые в биосинтез других соединений.

Для общей характеристики растительных жиров и входящих в их состав жирных кислот принят ряд констант – кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное и перекисное число. Важной задачей анализа растительных масел является определение их общего содержания в растительных объектах и выявление химического состава.

4.1 Качественные реакции на жиры

Оборудование и реактивы: фильтровальная бумага, писчая бумага, штатив с пробирками; растительное масло (подсолнечное, льняное, хлопковое или другое), твердый жир (бараний, говяжий), воск пчелиный, семечки, орехи (кедровый, грецкий, арахис и др.); диэтиловый эфир, ацетон, этиловый спирт, дистиллированная вода, 2 %-й углекислый натрий, 2 %-й раствор мыла, желчь, кристаллический кислый серноокислый калий или натрий, кристаллическая борная кислота, 30 %-й спиртовой раствор гидроксида калия

Ход работы:

1. Образование масляного пятна. На кусочек бумаги стеклянной палочкой нанести каплю масла. Между двумя листами бумаги раздавить семечку, кусочек ореха. Образуются пятна, не исчезающие при нагревании.

2. Растворимость жиров. Поставить два ряда пробирок по 4 в каждом. В пробирки первого ряда внести по несколько капель растительного масла, в пробирки второго ряда – по кусочку твердого жира. В первую пробирку каждого ряда налить 2 мл дистиллированной воды, во вторую – столько же диэтилового эфира, в третью – ацетона, четвертую – спирта. Все пробирки взболтать и наблюдать растворимость жиров в различных растворителях. Пробирки со спиртом рекомендуется подогреть на водяной бане. Записать результаты опыта.

3. Эмульгирование жирных масел. В четыре пробирки внести по 5 капель масла. В первую пробирку добавить 2 мл дистиллированной воды, во вторую – 2 мл 2 %-го раствора углекислого натрия (сода), в третью – столько же 2 %-го раствора мыла, в четвертую – 2 мл воды и несколько капель желчи. Все пробирки взболтать и наблюдать образование в первой пробирке неустойчивой эмульсии масла в воде, быстро расслаивающейся при стоянии, а в остальных – устойчивой эмульсии благодаря действию добавленных эмульгаторов.

ров, которые адсорбируются в наружном слое жировых капель и понижают их поверхностное натяжение.

4. Акролеиновая реакция. С помощью пробы на акролеин определить наличие глицерина в жирах. При нагревании жира с кислым серноокислым калием (KHSO_4), натрием (NaHSO_4) или борной кислотой (H_3BO_3) происходит отщепление от молекулы глицерина двух молекул воды и образование акрилового альдегида, или акролеина, обладающего резким раздражающим запахом пригоревшего сала.

В сухую пробирку внести несколько капель растительного масла или кусочек животного жира, добавить немного порошка кислого серноокислого калия (или натрия) или борной кислоты и осторожно подогреть. Появляются белые пары акролеина, обладающие резким запахом. Повторить реакцию с воском – акролеин не образуется, так как глицерин не входит в состав восков.

4.2 Омыление жира

При взаимодействии жиров со щелочами происходит их гидролиз с образованием солей высших жирных кислот (мыла) и глицерина. Натриевые соли представляют твердые мыла, калийные – жидкие. Кальциевые и магниевые соли жирных кислот нерастворимы в воде.

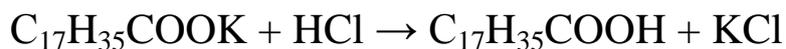
Оборудование и реактивы: штатив с пробирками; растительное масло (подсолнечное, льняное, хлопковое или другое), твердый жир (бараний, говяжий), 30 %-й спиртовой раствор гидроксида калия, раствор мыла, раствор соляной кислоты (1:1 по объему), 5–10 %-й раствор хлористого кальция

Ход работы:

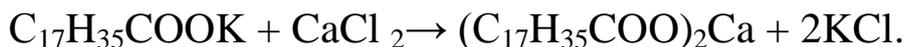
1. Омыление жира. В широкую пробирку внести 0,5 мл растительного масла или около 0,5 г животного жира и добавить 10 мл спиртового раствора едкого калия. Пробирку закрыть пробкой с воздушным холодильником и нагреть на кипящей водяной бане в течение 30 мин., после чего в пробирку налить горячую воду и растворить в ней мыло.

2. Выделение свободных жирных кислот. К 5 мл раствора мыла добавить 1–2 мл раствора соляной кислоты. При взаимодействии сильной кислоты с мылом выделяются свободные жирные ки-

слоты, которые всплывают на поверхность жидкости. Реакция идет по следующему уравнению:



3. Образование нерастворимых мыл. К 2–3 мл раствора калийного мыла (получено в первом опыте) добавить 1 мл раствора хлористого кальция. Выпадает нерастворимый в воде осадок стеарата кальция:



4.3 Определение содержания суммарных липидов в биологическом материале

Обычно липиды извлекают из высушенных (обезвоженных) тканей соответствующими органическими растворителями (спирты, эфиры, бензол, толуол, бензин, ацетон, пиридин, хлороформ, четыреххлористый углерод, сероуглерод, петролейный эфир и др.). Для разделения липидов пользуются неодинаковой растворимостью их в различных растворителях: одни из них хорошо растворимы в эфире, но плохо в ацетоне (например, фосфолипиды), другие растворимы в бензоле, но нерастворимы в спирте (холестерол, цереброзиды и др.) и т. д.

Резервный жир (масло) извлекается легко. Извлечь связанные липиды можно лишь после разрушения белково-липидных комплексов. Липиды из связанного состояния в свободное переводят либо путем применения гидролизующих средств, либо путем предварительного кипячения материала со спиртом. В последнем случае липиды выделяются в неизменном виде.

Наиболее простым методом определения суммарных липидов в тканях является метод длительного настаивания навесок ткани в хлороформ-метанольной смеси. По разности масс образца до и после экстракции находят процентное содержание липидов. Определение липидов можно проводить в абсолютно сухом или воздушно-сухом материале. При использовании воздушно-сухого материала в нем параллельно с извлечением липидов определяют содержание воды, чтобы выполнить расчеты на абсолютно сухое вещество. Для получения надежных результатов ставят два параллельных определения.

Оборудование и реактивы: термостат на 105 °С; баня водяная; весы аналитические; весы аптечные; шпатель (длина 150 мм);

колба коническая на 250 мл; ступка (диаметр 90 мм) с пестиком (высота 90 мм); цилиндр мерный на 100 мл; чашка кристаллизационная; стаканчики для взвешивания (бюксы); эксикатор без крана; бумага фильтровальная плотная; семена (подсолнечник, грецкий орех, мак и т. п.); метанол; хлороформ.

Ход работы. 1,0–1,5 г материала ядер орехов (грецких, фундука) или семян (мака, подсолнечника) отвешивают на аптечных весах, растирают в ступке, затем переносят в высушенные (при 105°C) и взвешенные на аналитических весах пакеты из плотной фильтровальной бумаги (их делают из листов размером 10x18 см по типу обычных аптечных пакетов для порошков). Взвешивают материал вместе с пакетом на аналитических весах и по разности между полученной массой и массой пустого пакета вычисляют величину навески.

Количество материала зависит от содержания в нем масла. Семян мака, клещевины, грецких орехов и других, содержащих больше 50 % масла, берут от 1 до 1,5 г. При содержании в семенах масла от 30 до 50 % их отвешивают до 2,0–2,5 г, при количестве масла ниже 30 % – 3,0–3,5 г. Пакет с навеской вкладывают в пакет большего размера (его делают из фильтровальной бумаги размером 20×12 см) и помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, заливают 35–40 мл метанола и затем приливают в нее 35–40 мл хлороформа. Содержимое колбы перемешивают, закрывают корковой пробкой и оставляют до следующего занятия (на неделю) в темном месте. Пакеты с навесками из одного и того же материала можно помещать в общую склянку.

На следующем занятии пакет с обезжиренным материалом извлекают из колбы, промывают 2–3 раза хлороформом, затем помещают в широкий кристаллизатор и ставят в вытяжной шкаф, чтобы испарился растворитель. После чего сушат в течение 2,5 ч в термостате при 100–105 °С. Затем пакет помещают в бюкс, охлаждают в эксикаторе в течение 45 мин и взвешивают. Если после высушивания на пакетах проступают желтые или коричневые полосы, то это объясняется окислением масла, которое было плохо извлечено. В этом случае анализ повторяют, увеличивая объем растворителя и продолжительность извлечения масла.

Определение содержания воды. Данное определение в воздушно-сухом биологическом материале ставят параллельно с обезжириванием. В сухие взвешенные бюксы для двух параллельных определений, доведенные до постоянной массы, берут по 1 г измельченно-

го материала с точностью до 0,0002 г. После взвешивания бюксы ставят в термостат, крышки с бюксов снимают и оставляют их там же. Сушат 4–6 ч при 100–105 °С. Бюксы закрывают крышками и переносят в эксикатор для охлаждения па 45 мин. После охлаждения бюксы взвешивают на тех же весах. Затем повторяют высушивание по 2 ч, охлаждение и взвешивание, пока не доведут разность между предыдущим и последующим взвешиванием до 0,0002 г. Вычисление процентного содержания воды производят по формуле

$$C = 100(a - a_1) / a,$$

где С – процентное содержание воды;

а – масса навески до высушивания;

а₁ – масса навески после высушивания.

Записывают результаты работы по определению содержания воды в образце по схеме:

Масса пустого бюкса (г)	Масса бюкса с навеской (г)	Навеска (г)	Масса бюкса с навеской после первого и последующих высушиваний (г)	Масса навески после последнего высушивания (г)	Содержание воды (%)

Вычисление процентного содержания липидов осуществляют по разности в массе навески до и после экстракции. Расхождения между двумя параллельными определениями не должны превышать 1–1,5 %. Результаты опыта записывают в приведенную ниже таблицу.

Масса возд. сух. материала с пакетом до экстракции (г)	Масса пустого (сухого) пакета (г)	Навеска воздушно-сухого материала (г)	Содержание воды (%)	Навеска абс. сух. материала (г)	Масса материала без пакета после экстракции (г)	Масса материала с пакетом после экстракции (г)	Содержание липидов в абс. сухой навеске (г)

Для расчета процентного содержания липидов в исследуемом материале (на абсолютно сухое вещество) прежде всего, необходимо сделать пересчет воздушно-сухой навески на абсолютно сухую.

Например, установлено, что в исследованном материале содержится 4,3 % воды, а воздушно-сухая навеска составляет 1,25 г. содержание воды в навеске $1,25 \cdot 4,3/100 = 0,05$ г.

Отсюда абсолютно сухая навеска равна $1,25 - 0,05 = 1,20$ г.

Теперь находим массу липидов, извлеченных из навески, по потере в массе навески после проведения экстракции. Например, навеска абсолютно сухого материала до экстракции равна 1,20 г, после экстракции – 0,42 г. Масса липидов в навеске равна $1,20 - 0,42 = 0,78$ г.

Исходя из этого, рассчитывают процентное содержание липидов в исследуемом материале (на абсолютно сухое вещество):

$$C = 0,78 \cdot 100 / 1,20 = 65,0 \%$$

4.4 Определение констант жиров

Определение насыщенности жиров

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных, жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют по два атома галогена по месту каждой двойной связи. Обычно степень ненасыщенности определяют йодным числом. Йодное число измеряется количеством граммов йода, которое присоединяется к 100 г жира.

Йодное число является одним из наиболее важных химических показателей для масел (жиров). Оно позволяет судить о степени ненасыщенности масла (жира), о его склонности к высыханию, прогоранию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых и технических масел.

С двойными связями, кроме йода, реагируют также и другие галогены – хлор и бром. Однако они не только присоединяются по двойным связям, но и замещают атомы водорода в радикале. Йод же в определенных условиях реагирует преимущественно с двойными связями.

Оборудование и реактивы: весы торсионные; микробюретка; пробирки стеклянные химические; пипетка с одной меткой на 3 мл; хлороформ; йод (0,001 н) в хлороформе; различные жиры (коровье масло, свиное сало, подсолнечное масло, маргарин).

Ход работы. В пробирке взвешивают по 0,5 г различных жиров (свиное сало, коровье масло, маргарин, подсолнечное масло). Растворяют каждый жир в 3 мл хлороформа и титруют из микробюретки 0,001 н раствором йода в хлороформе до отчетливо розовой окраски. Записывают объем раствора йода, пошедшего на насыщение каждого вида жира. Располагают исследованные жиры по убывающей степени насыщенности.

Определение йодного числа

Оборудование и реактивы: весы аналитические; пробирки стеклянные химические; пипетка градуированная на 10 мл; колбы конические на 250 мл с пробками (2 шт); колбы конические на 250 мл с пробками (2 шт); бюретка с краном на 25 мл; цилиндр мерный на 100 мл; растительное масло; спирт этиловый; раствор йода (0,2 н) в спирте (96 %-м): (25,4 г йода переносят в мерную колбу на 1000 мл и растворяют в спирте); раствор гипосульфита (0,1 н); крахмал (0,5 %-й).

Ход работы. В сухую коническую колбу емкостью 250 мл с пришлифованной стеклянной пробкой помещают исследуемое масло. Навеску берут на аналитических весах следующим образом: взвешивают склянку (из-под пенициллина) с маслом и пипеткой в пробке, отмеривают из нее пипеткой в колбу 3–4 капли масла и снова взвешивают склянку. По разности масс определяют величину навески масла. В колбу добавляют 25 мл спирта для растворения навески. Если масло плохо растворяется, можно подогреть колбу на водяной бане. Во второй колбе ставят слепой опыт (контроль), т. е. берут в нее 25 мл спирта. В каждую колбу (опыт и контроль) прибавляют по 12,5 мл 0,2 н спиртового раствора йода (из бюретки), смешивают, приливают по 100 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают, закрыв пробкой. Через 5 мин содержимое колб оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата сначала до появления слабожелтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

Разность между количеством 0,1 н раствора тиосульфата, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества йода, связанного навеской масла. Йодное число (в г) вычисляют по формуле

$$\text{Йодное число} = ((V_1 \cdot V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100) / a,$$

где V_1 – количество 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедшее на титрование контроля (в мл);

V_2 – количество 0,1 н раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедшее на титрование в опыте (в мл);

0,0127 – титр тиосульфата по йоду;

a – навеска жира (в г).

Расхождения в параллельных опытах допускаются лишь в десятых долях получаемых йодных чисел.

4.5 Определение кислотного числа жиров

Кислотное число характеризует кислотность жира и изменяется количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же из незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла наблюдается гидролиз глицеридов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т. е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровывают 0,1 н. раствором КОН. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы в условиях опыта.

Оборудование и реактивы: весы аналитические; колба коническая на 50 или 100 мл; цилиндры мерные на 10 или 25 мл; пипетка с одной меткой на 1 или 2 мл; бюретка с краном на 25 или 50 мл; смесь спирта с серным эфиром (1:1); гидроксид калия (0,1 н) в спирте (96 %-м); масло растительное или жир животный.

Навеску масла для определения берут на аналитических весах по разности. Для определения кислотного числа навеску жира (масла) в 2–3 г, взвешенную на аналитических весах, помещают в коническую колбу емкостью 50–100 мл и растворяют в 10–15 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). Для нейтрализации к смеси спирта и эфира (1:1) прибавляют 3–4 капли фенолфталеина и затем 0,1 н. спиртовой раствор гидроксида калия по каплям, до появления

слабого розового окрашивания. После растворения жира вносят 1-2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5–1 мин. Кислотное число вычисляют по формуле

$$\text{Кислотное число} = (V \cdot T) / a,$$

где V – количество (в мл) 0,1 н раствора КОН, израсходованное на титрование взятой навески жира;

T – титр 0,1 н раствора гидроксида калия, мг;

a – навеска жира, г.

Ход работ: в колбу отвесить 5 г масла, прибавить 30 мл смеси спирта с эфиром (1:2) и растворить масло. Затем добавить 5 капель фенолфталеина и титровать 0,1 н раствором КОН до появления розовой окраски. Одновременно провести контрольное титрование смеси спирта с эфиром (30 мл смеси + 5 капель фенолфталеина).

Вычислить кислотное число по формуле

$$X = \frac{56,11 \cdot T(a-b)}{H} \text{ мг,}$$

где H – навеска масла;

T – поправка к титру КОН;

a – количество 0,1 н КОН, пошедшее на титрование пробы;

b – количество КОН, пошедшее на контрольное титрование;

56,11 – молекулярная масса КОН.

Полученные результаты заносят в таблицу.

Сводные результаты

Объект	Количество КОН, пошедшее на титрование пробы, мл	Кислотное число масла

Определение числа омыления жиров

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме глицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом (см. выше), а содержание связанных в виде эфиров кислот – эфирным числом, т. е. количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот в 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Оборудование, реактивы: весы аналитические; баня водяная; колбы конические по 50 мл с обратными холодильниками (2 шт.); пипетки с одной меткой на 1 мл; бюретки с краном на 25 или 50 мл (2 шт.); гидроксид калия (0,5 н) в спирте (96 %-м) (см. прил. Б); соляная кислота (0,5 н титрованная); фенолфталеин (1 %-й).

В одну колбу емкостью 50 мл вносят 0,5 г жира, отвешенного на аналитических весах, а в другую – 0,5 мл воды. Затем в обе колбы добавляют из бюретки по 15 мл 0,5 н. спиртового

4.6 Определение содержания липидов весовым методом

Количественное определение липидов основано на экстракции их из определяемых навесок и последующем взвешивании обезжиренного остатка после удаления растворителя.

Оборудование и реактивы: 1. Термостат, аналитические весы, колба коническая на 250 мл с пробкой, фарфоровая ступка, цилиндр мерный на 100 мл, чашка кристаллизационная, бюксы, эксикатор, бумага фильтровальная. 2. Семена (подсолнечник, орехи, мак), этанол, хлороформ, серный эфир.

Ход работы. 1 г растительного материала взвешивают, растирают в ступке, затем переносят в высушенные и взвешенные пакеты из фильтровальной бумаги (их делают из листов размером 10×18 см по типу обычных аптечных пакетов для порошков). Взвешивают материал вместе с пакетом и по разности между полученной массой и массой пустого пакета вычисляют величину навески. Пакет с навеской вкладывают в пакет большего размера (его делают из фильтро-

вальной бумаги размером 20×12 см) помещают в коническую колбу емкостью 250 мл, приливают 35 мл этанола и 35 мл хлороформа (или 60 мл только серного эфира). Содержимое колбы перемешивают, закрывают пробкой и оставляют в темноте на 10 дней. Пакеты с навесками из одного и того же материала можно помещать в общую колбу.

На следующем занятии пакет с обезжиренным материалом извлекают из колбы, промывают хлороформом или серным эфиром, помещают в широкий кристаллизатор и ставят в вытяжной шкаф, чтобы растворитель испарился. После этого пакет сушат в течение 2 ч в термостате при 100–105°C, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержимое липидов в воздушно-сухом растительном материале рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_1},$$

где x – содержание липидов в исследуемом материале, %;
 m_1 – навеска воздушно-сухого материала до экстракции;
 m_2 – навеска воздушно-сухого материала после экстракции.

Контрольные вопросы

1. Какие органические вещества называются липидами?
2. Дайте общую характеристику липидам.
3. Какие химические компоненты входят в состав фосфатидов?
4. Какие триглицериды входят в группу простых, а какие – смешанных триглицеридов?
5. Какие основные физико-химические константы жиров вам известны?
6. О какой особенности масла свидетельствует его йодное число?
7. Дайте определение кислотного числа жира? Что характеризует этот показатель?
8. Какие группы липидов вам известны?
9. Какая реакция лежит в основе омыления жиров?
10. Какие методы выделения и анализа липидов вам известны?
11. В чем отличие растительных и твердых жиров?

Тестовые задания

1. Сложные эфиры ВЖК с глицерином и полициклическими спиртами составляют группу:

- а) сложных липидов;
- б) простых липидов;
- в) фосфатидов;
- г) диольных липидов.

2. Липиды в виде комплексов с белками входят в состав:

- а) мультиэнзимных комплексов;
- б) рибосом;
- в) синтетазы ВЖК;
- г) биологических мембран.

3. Главными липидами мембран являются:

- а) диольные липиды;
- б) триглицериды;
- в) гликолипиды;
- г) фосфолипиды
- д) воски.

4. α -сложноэфирные связи в молекулах триглицеридов подвергаются гидролизу при участии:

- а) фосфолипазы;
- б) ацетилхолин-эстеразы;
- в) липазы;
- г) алиэстеразы;
- д) фосфоорилазы.

5. Высшие жирные кислоты в процессе их катаболизма разрушаются преимущественно путем:

- а) процессов восстановления;
- б) α -окисления;
- в) β -окисления;
- г) декарбоксилирования;
- д) гидролиза.

6. Процесс биосинтеза ВЖК локализован

- а) во внешней мембране митохондрий;
- б) во внутренней мембране митохондрий;
- в) в клеточной мембране;
- г) в ядерной мембране;
- д) в мембране эндоплазматического ретикулума.

5 ВИТАМИНЫ

5.1 Количественное определение витамина С

Аскорбиновая кислота является сильным восстановителем. Количественное определение витамина С в исследуемом материале осуществляют с помощью 2,6-дихлорфенолиндофенола, используя его титрованный раствор. По количеству реактива, израсходованного на окисление витамина С, определяют содержание последнего в анализируемом материале. Аскорбиновая кислота может быть так же определена йодметрически при определенном значении рН раствора. При титровании йодом аскорбиновая кислота окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту.

Количественное определение аскорбиновой кислоты титрованием 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Оборудование и реактивы: бюретки прямые с краном на 5 мл (2 шт.); пипетки с одной меткой на 2,5 и 20 мл; колбы конические на 50 и 100 мл; стаканы стеклянные лабораторные на 100 мл (4 шт.); колбы мерные на 100 мл (2 шт.); цилиндр измерительный с носиком на 250 мл; ступка фарфоровая с наружным диаметром 110 мм; стекло часовое; песок кварцевый; картофель; морковь; томатный сок; шиповник; соляная кислота (5 %-я); 2,6-дихлорфенолиндофенол (0,001 н) (см. прил. Б); метафосфорная кислота (2 %-я и 4 %-я); аскорбиновая кислота (0,1 %-я); йодат калия (0,001 н) (см. прил. Б); иодид калия; крахмал (1 %-й); иодид калия (5 %-ый); пероксид водорода (3 %-й).

Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Установку титра приблизительно 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола проводят по аскорбиновой кислоте в день работы. Берут 2 мл 0,1 %-го раствора аскорбиновой кислоты и растворяют в 50 мл 2 %-го раствора метафосфорной кислоты (или серной кислоты); 5 мл этого раствора титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания. Отмечают затраченный на титрование объем реагента. Тотчас же после этого такой же объем раствора аскорбиновой кислоты титруют из другой микробюретки титрованным раствором йодата калия (0,001 н). К раствору аскорбиновой кислоты перед титрованием до-

бавляют несколько кристаллов (не более 0,1 г) иодида калия и 5-капель 1 %-го раствора крахмала. Титрование ведут осторожно до появления едва заметного синего окрашивания и отмечают затраченный на титрование объем йодата калия. Так как в первом и во втором случае оттитрованы одинаковые объемы аскорбиновой кислоты, то, следовательно, количества затраченных йодата калия и реагента эквивалентны друг другу. Так как 1 мл 0,001 н раствора йодата калия эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты, то титр раствора 2,6-дихлорфенолиндифенола (в миллиграммах аскорбиновой кислоты) равен

$$T = 0,088 \cdot V_2/V_1,$$

где V_1 и V_2 – объемы растворов 2,6-дихлорфенолиндифенола и йодата калия, соответственно затраченные на титрование равных объемов раствора аскорбиновой кислоты.

Приготовление экстракта из растительного материала. Нарезают исследуемый материал (картофель, морковь, капусту) мелкими кусочками. 10 г материала переносят в ступку и тщательно растирают с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя маленькими порциями 4 %-й раствор метафосфорной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 4 %-м раствором метафосфорной кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл метафосфорной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2 %; в случае отсутствия метафосфорной кислоты ее заменяют 5 %-м раствором соляной кислоты с конечной ее концентрацией в 2,5 %.) После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте. В две конические колбочки на 50 мл берут пипеткой по 10 мл полученного экстракта растительного материала. В одной из проб разрушают витамин С кипячением в присутствии нескольких капель пероксида водорода. Содержимое колб титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндифенола. При наличии в экстракте витамина С раствор обесцвечивается, а при дальнейшем прибавлении индикатора

окрашивается в розовый цвет, так как вся аскорбиновая кислота в пробе уже окислена и краска более не восстанавливается. В пробе, где витамин С был разрушен, от прибавления нескольких капель индикатора появляется розовое окрашивание. Результаты титрования записывают и повторяют работу с новой порцией того же экстракта. На основании средней величины титрования, полученной из 2–3 определений, вычисляют количество витамина С

$$C = (100 \cdot V_1 \cdot V \cdot T) / a \cdot V_2,$$

где С – содержание аскорбиновой кислоты, мг %;

Т – титр 2,6-дихлорфенолиндофенола в миллиграммах аскорбиновой кислоты (см. выше);

V – объем экстракта, мл;

a – масса исследуемого материала, г;

V₁ – затраченный объем реагента при титровании, мл;

V₂ – объем титруемого раствора, мл.

В результате находят количество витамина С в миллиграммах на 100 г исследуемого продукта. По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

Количественное определение аскорбиновой кислоты методом йодометрического титрования

Оборудование и реактивы: капуста или картофель, вата, воронка, колба, бюретка, терка, ступка, пестик, кварцевый песок, дистиллированная вода, 2 %-й раствор соляной кислоты, 0,5 %-й раствор крахмала, 0,003 н раствор йода.

Ход работы: 2 г капусты или картофеля натереть на терке в чашке Петри или мелко порезать и растереть в ступке с небольшим количеством толченого стекла или песка. В ступку добавить 10 мл 2 %-го раствора HCl. Хорошо перемешанную массу отфильтровать через стеклянную воронку с ватой в коническую колбу на 50-100 мл. Массу на фильтре промыть несколькими каплями воды. В фильтрат прилить 1 мл 0,5 %-го раствора крахмала и титровать рабочим раствором 0,003 н I₂ до появления синего окрашивания.

При расчете содержания витамина С в продукте использовать формулу определения массы при помощи титра по определяемому веществу

$$M = \frac{nЭ}{1000} \times V,$$

где n – молярная концентрация эквивалента йода;

$Э$ – молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты в г, равная в данном случае 88 г;

V – объем использованного на титрование йода, мл.

Для пересчета на содержание витамина С в 100 г продукта использовать формулу

$$X = (M \cdot 1000) / 2.$$

Полученный результат сравнить с нормой: содержание витамина С в капусте – 45 мг %, в картофеле – 20 мг %.

5.2 Определение рутина

Рутин и его агликон-кверцетин являются основными компонентами комплекса витамина Р. Под витамином Р подразумевается целая группа веществ, обладающих сходным биологическим действием, в частности способность укреплять стенки кровеносных сосудов и предохранять организм человека от заболевания цингой.

Оборудование и реактивы: фотоэлектроколориметр, ступки фарфоровые, чашки фарфоровые, колбы мерные на 100 мл и 50 мл, пробирки, воронки, фильтры, стаканы, пипетки, микропипетки, делительные воронки, водяные бани, термометр, хроматографические пластины «Силуфол», хроматографические камеры, ультрахимический аппарат, колбы с обратными холодильниками, рутин, этиловый спирт, этилацетат, четыреххлористый углерод, 2 %-й раствор хлорида алюминия, 8 %-й уксуснокислый натрий, 0,1 %-й раствор рутина, 0,1 %-й раствор кверцетина, н-бутанол, уксусная кислота, аммиак.

Принцип метода. Рутин извлекают из растительного материала водно-спиртовой экстракцией, очищают от примесей и в очищенном спиртовом экстракте содержание рутина определяют методом колориметрирования по изменению интенсивности окраски с хлористым алюминием в присутствии избытка уксуснокислого натрия. Для качественной идентификации используется метод хроматографии на бумаге или в тонком слое сорбента.

Ход работы. Измельченное растительное сырье 1 г помещают в колбу с обратным холодильником, добавляют 30 мл 80 %-го этанола и экстрагируют на водяной бане при 50 °С в течение 3 ч. Затем экстракт охлаждают, фильтруют и, поместив в фарфоровую чашку на водяную баню (температура 50 °С, отгоняют спирт (до исчезновения запаха). Водную фазу количественно переносят в делительную воронку и очищают четыреххлористым углеродом от неполярных соединений (хлорофилл, жирные масла, эфирные масла и др.). Очищенный водный экстракт далее обрабатывают 20 мл этилацетата, дожидаясь полного расслоения фаз. При этом рутин переходит в этилацетат. Этилацетатный экстракт выпаривают досуха на водяной бане в фарфоровой чашке на 50 мл и сухой остаток количественно переносится 90 %-м этанолом в мерную пробирку емкостью 1 мл. Полученный экстракт используется для количественного и качественного определения рутина.

Количественное определение рутина. Для этого 0,5 мл конечного экстракта наливают в широкую пробирку, добавляют 4,5 мл 60 %-го этанола, 5 мл 2 %-го раствора хлорида алюминия и 15 мл 8 %-го раствора уксуснокислого натрия. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют стоять 2 часа в темном месте. За это время раствор приобретает устойчивое желтое окрашивание. Одновременно готовят контрольный раствор. Для этого в пробирку берут 5 мл воды (вместо хлорида алюминия), остальные компоненты – те же, что и в опыте, перемешивают и оставляют стоять 2 часа.

Для колориметрирования используют кювету с толщиной слоя 10 мм. Колориметрирование проводят напротив контроля при синем светофильтре (420 нм). Содержание рутина вычисляют по калибровочному графику.

Составление калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовят стандартный раствор рутина, растворяя 20 мг рутина в 100 мл 80 %-го этанола. Для лучшего растворения рутина раствор можно слегка подогреть. Затем в широкие пробирки вносят следующие количества стандартного раствора рутина (в мл): 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 и объем каждого раствора доводят до 5 мл 80 %-м этанолом. В полученном объеме каждой пробирки, соответственно содержится 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,9; 0,9; 1,0 мг рутина. Затем в каждую пробирку добавляют по 5 мл 2 %-го раствора хлорида алюминия, по 15 мл 8 %-го раствора уксуснокислого натрия и далее проводят определение, как описано выше. Для построения

калибровочного графика на оси абсцисс откладывают миллиграммы рутина, на оси ординат – оптическую плотность окрашенных растворов.

Содержание рутина (x), выраженное в процентах, рассчитывают по формуле

$$X (\text{мг } \%) = (a \cdot V \cdot 100 \cdot 100) / m \cdot V_1 \cdot (100 - w),$$

где a – количество рутина, определенное по калибровочному графику в исследуемом объеме экстракта, мг;

V – общий объем спиртового экстракта, мл;

V₁ – объем экстракта, взятого для колориметрирования, мл;

m – масса растительного сырья, г;

w – влага, % (учитывается при работе со свежим материалом).

Контрольные вопросы

1. Дайте общую характеристику витаминам. На чем основана их классификация?
2. Какие витамины синтезируются в организме: а) растений; б) животных?
3. Как называются заболевания, связанные с недостатком или избытком витаминов?
4. Назовите жирорастворимые витамины.
5. Назовите водорастворимые витамины.
6. Принцип метода количественного обнаружения витамина С в пищевых продуктах.

Тестовые задания

1. Жирорастворимый витамин:
 - а) аскорбиновая кислота;
 - б) рибофлавин;
 - в) кальциферол;
 - г) пиридоксин.
2. Водорастворимый витамин:
 - а) токоферол;
 - б) ретинол;
 - в) кальциферол;
 - г) тиамин.

3. Установите соответствие между названием витамина и его обозначением:

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| 1) аскорбиновая кислота; | а) РР; |
| 2) тиамин; | б) В ₆ ; |
| 3) пиридоксин; | в) С; |
| 4) никотинамид; | г) В ₁ . |

4. Установите соответствие между названием витамина и его обозначением:

- | | |
|-----------------|---------------------|
| 1) ретинол; | а) D; |
| 2) токоферол; | б) В ₂ ; |
| 3) кальциферол; | в) E; |
| 4) рибофлавин; | г) A. |

5. Установите соответствие:

- | | |
|------------------------------|---|
| 1) водорастворимые витамины; | а) D, A, E, K; |
| 2) жирорастворимые витамины; | б) В ₂ , В ₁₂ , В ₆ , С, РР. |

6. Установите соответствие между названием витамина и его обозначением:

- | | |
|--------------------|----------------------|
| 1) цианокобаламин; | а) D; |
| 2) никотинамид; | б) В ₁₂ ; |
| 3) кальциферол; | в) РР; |
| 4) рибофлавин; | г) В ₂ . |

6 МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Элементы минерального питания играют в растительном организме субстратную и регуляторную роль. Субстратная роль элементов заключается в том, что они входят в состав органических веществ, являющихся, в свою очередь, строительным материалом клетки и ее органелл. Как составная часть мембран, ферментов, электронно-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза, аппарата синтеза белка элементы минерального питания регулируют скорость основных функций растения.

В растительном организме все процессы тесно взаимосвязаны. Исключение из питательной среды какого-либо необходимого элемента быстро вызывает изменение во многих, если не во всех, процессах метаболизма. В связи с этим выделить первичный эффект бывает чрезвычайно трудно.

Содержание золы в растениях колеблется в широких пределах, в зависимости от вида растений. Например, в составе листьев картофеля 5–13 % золы, свеклы – 11–15 %, репы – 8–15 %. Содержание золы колеблется и в зависимости от органа растения. В семенах содержание золы составляет в среднем около 3–5 %, в корнях и стеблях – 4–5 %, в листьях – 3–15 %, меньше всего содержится золы в мертвых клетках древесины (0,4–1 %). Зольные элементы сосредоточены в тех органах и клетках, уровень жизнедеятельности которых достаточно высок. Большое значение имеют и условия выращивания. Как правило, чем богаче почва и суше климат, тем выше содержание золы в растении.

Состав золы разнообразен. Почти нет элементов, даже из числа самых редких, включая золото, ртуть, уран, которые не были бы найдены в золе того или иного растения. Многие элементы, рассеянные в земной коре, накапливаются в растении в значительном количестве.

Необходимыми считаются элементы, без которых организм не может завершить свой жизненный цикл. Все необходимые для жизни растений элементы в зависимости от их количественного содержания в растении принято разделять:

- 1) на макроэлементы (содержание более 0,01 %): N, P, S, K, Ca, Mg, Fe;
- 2) микроэлементы (содержание менее 0,01 %): Mn, Cu, Zn, B, Mo, Cl.

Питательные элементы имеют следующее значение:

- входят в состав органических веществ;
- участвуют в создании определенной ионной концентрации, стабилизации макромолекул и коллоидных частиц (электрохимическая роль);
- участвуют в каталитических реакциях, входя в состав или активируя отдельные ферменты.

Во многих случаях один и тот же элемент может играть разную роль. Некоторые элементы выполняют все три функции.

6.1 Определение содержания золы в листьях и травянистых органах растений (по Ермакову)

Зола – это остаток, получаемый после сжигания и прокаливания природных материалов. При сжигании вещества биологического происхождения на воздухе углерод, водород и частично кислород переходят в углекислый газ и пары воды, которые улетучиваются. Удаляется также и азот. В виде золы остаются нелетучие оксиды химических элементов: Ca, Mg, Si, Al, Fe, P, K, Na и др. Для обеспечения свободного доступа воздуха сжигание проводят медленно, причем часто добавляют разрыхляющие навеску вещества (ацетат кальция или карбонат магния, смесь равных частей спирта и глицерина и т. п.). При прокаливании материала часть соединений фосфора, серы, галогенов и щелочных металлов улетучивается. Поэтому для количественного определения этих элементов применяют так называемое мокрое сжигание, т. е. сжигание в серной или азотной кислоте, а иногда в их смеси.

Суммарное количество золы в составе биологических объектов после сжигания определяют гравиметрическим методом.

Оборудование и реактивы: печь муфельная; щипцы тигельные; весы аналитические; эксикатор без крана с хлоридом кальция; тигель высокий (диаметр 45 мм) с крышкой; стаканчик для взвешивания (бюкс); палочки стеклянные (толщина 2–2,5 мм); бюретка прямая с краном на 10 мл; ацетат магния в этаноле (96 %-м) .

Ход работы. На аналитических весах отвешивают 1,5–2 г измельченных сухих листьев в фарфоровый тигель с крышкой, заранее прокаленный и доведенный до постоянной массы. Для ускорения озоления и предотвращения сплавления золы навеску в тигле смешивают тонкой стеклянной палочкой с 3 мл (из бюретки) спиртово-

го раствора ацетата магния, содержащего примерно 0 мг оксида магния в 1 мл раствора. После этого тигель осторожно нагревают пламенем горелки; при этом иногда наблюдается сильное вспучивание. После образования корки на поверхности сжигаемой навески тигель прикрывают крышкой и ставят в муфельную печь с открытой дверкой для большего доступа воздуха. Нагрев печи в первое время сжигания не должен быть сильным, и навеска не должна воспламеняться. Через 5–10 мин после того как тигель перестал дымить, нагрев муфельной печи усиливают, постепенно доводя его до красного каления. Для озоления достаточно нагревания в течение 45–60 мин.

Полученная зола может иметь самые разнообразные цвета и оттенки в зависимости от анализируемого материала. Часто она получается почти белого цвета, иногда слегка сероватого, буро-красного (от оксида железа (III), зеленоватого (от оксида марганца) и т. д.

После прокаливания тигель вынимают из муфельной печи и ставят в эксикатор. После охлаждения в течение 45 мин тигли взвешивают на аналитических весах. Для поправки на внесенный ацетат магния в прокаленный и взвешенный тигель наливают из бюретки 5 мл его спиртового раствора, выпаривают, прокаливают и подсчитывают, какое количество оксида магния содержится в 1 мл приготовленного раствора.

Расчет количества золы в навеске проводят по уравнению

$$C = ((a - b) \cdot 100) / p,$$

где C – содержание золы, %;

a – масса золы, г;

b – поправка на содержание оксида магния, г;

p – навеска листьев, г.

6.2 Количественное определение кремниевой кислоты в золе (по Ермакову)

Оборудование и реактивы: шкаф сушильный; весы аналитические; печь муфельная; эксикаторы (без крана) с хлоридом кальция; щипцы тигельные; тигли фарфоровые высокие; баня водяная; стаканчики для взвешивания (бюксы); колбы конические на 50–100 мл; воронка стеклянная; чашка выпарительная на 50 мл; цилиндр измерительный на 50 мл; палочка стеклянная; пластинка стеклянная

(10x10 см); бумага фильтровальная; азотная кислота (концентрированная); соляная кислота (концентрированная); смесь азотной (концентрированной) и соляной (концентрированных) кислот (1:1); пероксид водорода (30 %-й); роданид аммония (5 %-й).

Ход работы. Озоляют от 10 до 30 г грубо измельченного материала. Озоление проводят в больших фарфоровых тиглях. Берут навеску, как указано в предыдущей работе, и на небольшом пламени горелки обугливают материал, прикрыв тигель крышкой. Затем пламя горелки усиливают или помещают тигель в муфельную печь.

Для ускорения сжигания к обугленному материалу добавляют 5 мл 30 %-ого раствора пероксида водорода или азотной кислоты (плотностью 1,4). Если необходимо, материал обрабатывают окислителями несколько раз. Перед добавлением окислителя тигель охлаждают, после добавления окислителя нагревают его вначале при 80–100 °С, а затем нагрев муфельной печи усиливают и доводят ее до красного каления, при котором тигель держат не менее 30 мин. После озоления тигель охлаждают в эксикаторе с хлоридом кальция в течение 45 мин и взвешивают для определения количества золы.

Золу переносят в фарфоровую чашку, куда приливают 50 мл смеси концентрированных соляной и азотной кислот (1:1). Если тигель достаточно велик, растворение ведут прямо в нем. Содержимое тщательно перемешивают, чашку или тигель накрывают стеклом и нагревают на водяной бане около 1 ч. Затем стекло снимают и содержимое чашки выпаривают досуха. Остаток сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 120 °С (во избежание перевода кремниевой кислоты в растворимое состояние), растворяют в кипящей воде, подкисленной соляной кислотой, и отфильтровывают через плотный фильтр. Осадок на фильтре, состоящий из кремниевой кислоты, промывают горячей водой, подкисленной соляной кислотой, до исчезновения в промывных водах реакции на железо (проба с роданидом аммония). Фильтр сжигают в предварительно взвешенном тигле, прокаливают до постоянной массы (2–3 ч) и взвешивают. Процентное содержание оксида кремния SiO в сухой навеске и в золе вычисляют по формулам:

$$C_1 = (A_1 \cdot 100) / A \text{ (в навеске);}$$

$$C_2 = (A_1 \cdot 100) / A_2 \text{ (в золе),}$$

где C_1 – процентное содержание кремниевой кислоты в навеске;

C_2 – процентное содержание кремниевой кислоты в золе;

A – навеска сухого материала, г;

A_1 – масса кремниевой кислоты, г;

A_2 – масса золы, г.

Например, при анализе картофеля навеска сухого материала для озоления была 30 г; после озоления получено 1,2734 г золы; масса кремниевой кислоты равна 0,0605 г, что составляет 0,20 % в пересчете на сухую навеску, или 4,75 % от массы золы.

6.3 Фотометрический метод определения содержания фосфора

Сущность метода заключается в минерализации пробы способом мокрого озоления с образованием солей ортофосфорной кислоты и последующем фотометрическом определении фосфатов в виде окрашенного в желтый цвет соединения – гетерополикислоты, образующегося в кислой среде в присутствии ванадат и молибдат ионов.

Оборудование и реактивы: весы лабораторные; фотоколориметр; плитка электрическая; пипетки градуированные; колбы мерные; аммоний молибденовокислый; аммоний ванадиевокислый; серная кислота концентрированная; пероксид водорода; калий фосфорнокислый однозамещенный; вода дистиллированная; стандартный раствор фосфата (4,393 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют в колбе емкостью 1000 мл и доводят объем до метки.

В 1 мл содержится 1 мг фосфора). Раствор № 1: 2,5 г ванадиевокислого аммония растворяют в нагретой до кипения дистиллированной воде, добавляют 20 мл концентрированной азотной кислоты и доводят объем раствора водой до 1000 мл; раствор № 2: 50 г молибденовокислого аммония растворяют в горячей воде, охлаждают и доводят объем раствора водой до 1000 мл; раствор № 3 – вода дистиллированная. Окрашивающую смесь готовят, смешивая в равных количествах эти растворы.

Ход работы:

1. Навеску материала массой 0,2–0,3 г поместите в колбу Кьельдаля, прилейте 10 мл концентрированной серной кислоты, 1–2 мл пероксида водорода и поставьте на плитку. Минерализацию проводите до тех пор, пока жидкость не станет прозрачной.

2. Жидкость количественно перенесите в мерную колбу на 100 мл и доведите водой до метки.

3. Приготовьте растворы сравнения: в мерные колбы вместимостью 100 мл внесите стандартный раствор в объеме, указанном в таблице. В каждую колбу налейте до половины дистиллированную воду и добавьте 30 мл концентрированной серной кислоты. Доведите водой до метки (см. табл.).

4. Из приготовленных растворов сравнения, а также из исходных анализируемых растворов возьмите 25 мл раствора и добавьте 10 мл окрашивающего раствора.

Приготовление растворов сравнения

Номер колбы	Объем раствора фосфора, мл	Масса фосфора в 100 мл раствора сравнения
1	0	0
0	2	0,2
3	5	0,5
4	10	1,0
5	15	1,5
6	20	2,0
7	25	2,5
8	30	3,0
9	35	3,5

5. Окрашенные растворы необходимо колориметрировать через 30 мин, используя синий светофильтр, против нулевого раствора шкалы. Порядок работы на спектрофотометре смотрите в приложении Д.

6. Рассчитайте массовую долю фосфора:

$$X = (m_1/m) \cdot 100,$$

где m_1 – масса фосфора в навеске, найденная по графику, мг;
 m – масса навески, мг.

6.4. Определение серы в растениях спектрофотометрическим методом

Принцип метода заключается в том, что сера осаждается в растворе в форме сульфата бария, а затем оптическую плотность раствора, содержащего мелкодисперсный осадок BaSO_4 , измеряют на спектрофотометре и с помощью калибровочного графика рассчитывают содержание серы в исследуемой пробе.

Оборудование и реактивы: спектрофотометр электрический, исходный раствор серы: 0,272 г сульфата калия, высушенного в течение 1 ч при 105 °С, растворяют и доливают до метки дистиллированной водой до 1 л; хлорид бария; нитрат магния: 954 г растворяют и доливают водой до 1 л; гидроксилламин солянокислый: 25 г растворяют в 0,5 л дистиллированной воды; магний хлористый 200 г растворяют в 1 л 0,1н HCl ; гуммиарабик, свежеприготовленный 0,2 %-й раствор. Вместо гуммиарабика можно взять 0,25–0,5 %-й канцелярский клей; соляная кислота 0,1 н и 2 н, стеклянная мерная посуда.

Ход работы:

1. Постройте градуировочный график. В мерные колбы вместимостью 25 мл внесите по 1, 2, 4, 8, 10 и 20 мл исходного стандартного раствора, что отвечает 50, 100, 200, 400, 500 и 1000 мкг серы. Добавьте во все пробирки по 3 мл раствора гидроксилламина, 2 мл гуммиарабика, 250 мг сухого хлорида бария, долейте до метки водой, взболтайте 1 мин. Измерьте оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 460 нм. Порядок работы на спектрофотометре смотрите в приложении Д. По полученным данным постройте калибровочный график на миллиметровой бумаге.

2. 0,5 г мелкоизмельченной сухой пробы поместите в кварцевый стаканчик, залейте 4 мл раствора $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, оставьте на ночь.

3. Раствор выпарите до появления белых пятен на вздувшейся массе.

4. Прокалите в муфельной печи при 520 °С в течение 40–45 мин до полного побеления массы, дайте ей остыть и прилейте около 25 мл 2н HCl .

5. Раствор профильтруйте в мерную колбу вместимостью 50 мл, многократно промывая водой осадок. Фильтрат долейте до метки дистиллированной водой.

6. 10 мл полученного раствора пипеткой поместите в мерную колбу объемом 25 мл, добавьте 1 мл раствора гидроксилamina, 2 мл гуммиарабика и 250 мг хлорида бария. Доведите до метки дистиллированной водой.

7. Раствор взболтайте в течение 1 мин и затем измерьте оптическую плотность на спектрофотометре при $\lambda = 460$ нм. Если вытяжка сильно окрашена, то ее разбавляют.

8. Результат анализа рассчитайте по формуле

$$C_s = 0,01 \cdot C_x,$$

где C_s – содержание серы в пробе, мг/кг;

C_x – количество серы в 25 мл раствора, найденное по калибровочному графику;

0,01 – постоянная величина.

По окончании работы сделайте вывод.

6.5 Определение меди в растениях колориметрическим методом

Принцип метода: из фильтрата, полученного после озоления биологического материала, медь извлекают раствором дитизона в четыреххлористом углероде, с которым медь образует окрашенный комплекс. Цвет комплекса сравнивают со шкалой стандартных растворов и делают заключение о наличии меди в объекте.

Оборудование и реактивы: лабораторная мельница, муфельная печь, электрическая плитка, колбы мерные, обеззоленные фильтры, индикаторная бумага, стеклянные пробирки, хлороводородная кислота, раствор аммиака 25 %-й, раствор цитрата натрия или аммония 25 %-й, растворы для приготовления шкалы:

20 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл воды;

9,5 г $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл воды;

0,1 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ растворяют в 100 мл воды.

Раствор дитизона: 0,01 г дитизона растворяют в 50 мл четыреххлористого углерода (CCl_4). Рабочую концентрацию готовят путем приливания по каплям концентрированного раствора в четыреххлористый углерод до тех пор, пока интенсивность окраски этого раствора не будет соответствовать интенсивности окраски нулевого деления стандартной шкалы.

Ход работы

1. Приготовьте шкалу стандартных растворов в соответствии с таблицей.

Раствор	Нумерация пробирок						
	0	1	2	3	4	5	6
1	7,0	6,2	5,4	4,6	3,8	3,0	2,2
2	0,7	1,2	1,7	2,2	2,7	3,2	3,7
3	2,0	1,7	1,4	1,1	0,8	0,5	0,2
Вода	0,3	0,9	1,5	2,1	2,7	3,3	3,9
С _и , мкг/мл	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6

2. Материал высушите до постоянного веса, размелите в мельнице и озолите в муфельной печи при температуре не более 500–600 °С.

3. Навеску золы от 2 до 3 г растворите в 5 мл 6 н хлороводородной кислоты, добавьте 20–30 мл дистиллированной воды, профильтруйте через обеззоленный фильтр и доведите водой до 50 мл.

4. Из фильтрата, полученного после озоления вещества, возьмите 2–4 мл раствора цитрата натрия и установите рН раствора до 2,0 по универсальной индикаторной бумаге, прибавляя по каплям раствор соляной кислоты (1:1).

5. Добавьте 1–2 мл раствора дитизона в четыреххлористом углероде и сильно взболтайте в течение минуты.

6. Окрашенный раствор сравните со стандартной шкалой.

7. Проведите расчет количества меди по формуле

$$C_{\text{меди}} (\text{мкг}\%) = (A \cdot V \cdot P) / (m \cdot p),$$

где A – количество меди в 1 мл стандартного раствора, определенное по стандартной шкале, мкг;

V – объем израсходованного для экстракции раствора дитизона, мл;

P – объем раствора золы после минерализации, мл;

m – количество исследуемого вещества, взятого для анализа, г;

p – объем раствора золы, взятого для анализа, мл.

Контрольные вопросы

1. Понятие о макро- и микроэлементах.
2. Физиологическая роль микроэлементов в растении.
3. Физиологическая роль макроэлементов в растении.
4. Опишите метод определения содержания золы в растениях.
5. Каким образом можно определить в растительном материале содержание фосфора?
6. Каким образом можно определить в растительном материале содержание меди?
7. Каким образом можно определить в растительном материале содержание марганца?
8. Каким образом можно определить в растительном материале содержание серы?

7 ВЕЩЕСТВА ВТОРИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. АЛКАЛОИДЫ

Алкалоиды представляют собой природные азотосодержащие соединения, основного характера, образующиеся в растительных организмах. Большинство из них обладает высокой физиологической активностью и оказывает сильное действие на организм человека и животных

Алкалоиды могут содержаться во всем растении или образовываться и накапливаться в каком-либо одном или нескольких определенных органах растений. Ведущая роль в образовании алкалоидов принадлежит листьям и подземным органам.

Содержание алкалоидов в растениях невелико, всего несколько сотых десятых долей процента. Растения, содержащие 1–2 % алкалоидов, уже считают алкалоидным сырьем. Однако некоторые растения способны накапливать очень много алкалоидов. Так, например, корневище крестовника содержит до 4 % алкалоидов, в коре хинного дерева сумма алкалоидов достигает до 15 %, много алкалоидов в табаке, барбарисе.

Алкалоиды очень разнообразны по строению. Большинство из них принадлежит к гетероциклическим соединениям с атомом азота в кольце, реже азот бывает в боковой цепи. Классифицируют алкалоиды чаще всего на основании строения гетероцикла, входящего в состав их молекул. По построению гетероцикла алкалоиды можно разделить на несколько групп. Выделяют производные пирролидина, пирролизидина, пиридина, хинолизидина, индола, пурина и некоторые другие группы.

7.1 Определение содержания эфедрина (на примере эфедры хвощевой)

Эфедрин относится к фенилэтиламинным алкалоидам. Содержание алкалоидов в зеленых ветках эфедры хвощевой колеблется от 0,6 до 3,2 %, при этом преобладает эфедрин. Наиболее широко эфедрин применяется при бронхиальной астме, крапивнице, коклюше, вазомоторном насморке, при сонливости.

Оборудование и реактивы: аналитические весы, мельница, сито, механическая качалка, водяная баня, конические колбы на 1 л, 300 мл, фарфоровые чашки; 1 %-й раствор серной кислоты, хлорид

натрия, 30 %-й раствор едкого калия, серный эфир, 0,1 н раствор соляной кислоты, 0,1 н раствор едкого калия, 1 %-й раствор метилового красного, дихлорид ртути, йодид калия.

Принцип метода: эфедрин экстрагируют из растительного материала раствором серной кислоты, затем извлекают эфиром с последующим переводом в раствор соляной кислоты. Избыток соляной кислоты, не прореагировавший с алкалоидом, оттитровывают щелочью. По количеству соляной кислоты рассчитывают содержание эфедрина.

Ход анализа. В коническую колбу емкостью 1 л помещают 40 г измельченной травы эфедры, далее прибавляют 400 мл 1 %-го раствора серной кислоты и в течение 2–3 ч взбалтывают на механической качалке, затем дают хорошо отстояться и фильтруют в коническую колбу на 300 мл. Отбирают 160 мл экстракта, прибавляют к нему хлорид натрия до полного насыщения и надосадочную жидкость переносят в делительную воронку. Затем к жидкости приливают 15 мл 30 %-го раствора едкого натрия и порциями эфира по 30 мл исчерпывающе извлекают алкалоиды, сливая каждый раз водный щелочной слой в колбу с остатком хлорида натрия. Конец фракционирования определяют по отсутствию реакций на алкалоиды, с реактивом Майера в водном щелочном слое.

Объединенные эфирные извлечения сушат безводным сульфатом натрия, фильтруют, дважды промывая фильтр эфиром по 20 мл. Затем в фарфоровой чашке отгоняют эфир до объема около 3 мл на водяной бане при температуре 36–38 °С. После этого в фарфоровую чашку приливают 40 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, остаток эфира удаляют на слегка подогретой водяной бане, раствор охлаждают, и избыток соляной кислоты титруют 0,1 н раствором едкого калия в присутствии метилового красного.

Содержание суммы алкалоидов в процентах в сырье вычисляют по формуле

$$X = (V_1 - V_2) \cdot 0,01652 \cdot 100 \cdot 100 / m \cdot (100 - v),$$

где 0,01652 – количество алкалоидов, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, г;

V_1 – объем 0,1 н раствора соляной кислоты, мл;

V_2 – объем 0,1 н раствора едкого калия, пошедшего на титрование избытка соляной кислоты, мл;

m – навеска, соответствующая количеству извлечения, взятого для анализа, г;

w – влага, % (учитывается в случае работы со свежим сырьем).

Приготовление реактива Майера: 1,238 г дихлорида ртути растворяют в 60 мл воды, приливают раствор 5 г иодида калия в 10 мл воды и общий объем доводят водой до 100 мл. С большинством алкалоидов этот реактив образует белый или желтоватый осадок.

7.2 Определение кофеина в растительном материале

Кофеин является метальным производным 2,6-диоксипурина. Листья китайского чайного куста содержат 1,5–3,5 %, семена кофе – от 0,65 до 2,7 % кофеина (в зависимости от сорта). Кофеин действует возбуждающе на ЦНС и сердечную мышцу.

Исследование содержания кофеина в растениях и определение его содержания в таких тонизирующих продуктах, как чай, кофе, кока-кола, пепси-кола и других представляет существенный научный и практический интерес.

Кофеин извлекают хлороформом из водного экстракта с последующим спектрофотометрическим определением в максимуме поглощения, при 275 нм.

Оборудование и реактивы: баня водяная, весы аналитические, воронки стеклянные, колбы мерные на 100 мл, пипетки на 1 мл, 5 мл, спектрофотометр, ступки, вода дистиллированная кипяченая, хлороформ, чай, кофе.

Ход работы: анализируемый материал предварительно измельчают в ступке. Сухой (1 г) или свежий (4–5 г) материал переносят в мерную колбу на 100 мл, приливают 80 мл кипящей дистиллированной воды и колбу помещают в водяную баню для экстракции содержимого в течение 1 ч. Горячий экстракт охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Для определения кофеина берут 0,1–0,5 мл фильтрата (в зависимости от содержания кофеина в материале), помещают в пробирку (лучше с притертой пробкой), прибавляют 5 мл хлороформа и энергично встряхивают в течение 10 мин. Полученный хлороформный экстракт кофеина оставляют для отстаивания эмульсии на 1–2 часа. После этого прозрачный раствор осторожно (во избежание попадания капелек воды) сливают в кювету спектрофотометра. Определение оптической плотности хлороформного экстракта кофеина производят при 275 нм. Количество кофеина вычисляют по таблице.

Зависимость величины оптической плотности (D) при 275 нм от концентрации кофеина в хлороформном растворе, мкг/мл

D, нм	Содержание кофеина, мг/мл						
0,20	3,4	0,30	5,4	0,41	7,8	0,51	9,8
0,21	3,6	0,31	5,6	0,42	8,0	0,52	10,1
0,22	3,8	0,32	5,9	0,43	8,2	0,53	10,3
0,23	4,0	0,33	6,1	0,44	8,4	0,54	10,6
0,24	4,2	0,34	6,4	0,45	8,6	0,55	10,8
0,25	4,4	0,35	6,6	0,46	8,8	0,56	11,0
0,26	4,6	0,36	6,8	0,47	9,0	0,57	11,2
0,27	4,8	0,37	7,0	0,48	9,2	0,58	11,4
0,28	5,0	0,38	7,2	0,49	9,4	0,59	11,6
0,29	5,2	0,39	7,4	0,50	9,6	0,60	11,8

Для получения наиболее точных данных необходимо, чтобы величина оптической плотности хлороформного раствора кофеина при 275 нм была около 0,500, что достигается взятием соответствующего количества водного экстракта. Содержание кофеина вычисляется по следующей формуле

$$X = \frac{5 \cdot a \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_1 \cdot (100 - b)},$$

где X – содержание кофеина в исследуемом материале, %;
a – содержание кофеина по таблице, мкг/мл;
V – объем экстракта, соответствующий всей навеске, мл;
V₁ – объем взятого для анализа водного экстракт, мл;
m – навеска материала, г;
b – содержание влаги, %.

Фенольные соединения

Фенольными соединениями называют вещества, содержащие ароматические кольца с гидроксильной группой, а также их функциональные производные. Фенольные соединения, в ароматическом кольце которых имеется больше одной гидроксильной группы, называют полифенолами.

Все содержащиеся в растениях фенольные соединения образуются из углеводов и в процессе биосинтеза проходят шикиматный путь.

Классификация фенольных соединений строится с учетом основного углеродистого скелета – числа ароматических колец и атомов углерода в боковой цепи. По этим признакам фенольные соединения подразделяют на простые фенолы; фенолокислоты; фенолоспирты, фенилуксусные кислоты, ацетофенолы; оксикоричные кислоты, кумарины, хромоны; лигнаны; флавоноиды; дубильные вещества.

7.3 Определение содержания арбутина (на примере листьев брусники)

Арбутин является глюкозидом гидрохинона, относящегося к группе простых фенолов. Присутствует в представителях семейств вересковые, брусничные, розоцветные, камнеломковые, астровые. Собранные весной до цветения или осенью, листья толокнянки (семейство вересковые) содержат до 15 %, а листья брусники (семейство брусничные) 6–9 % арбутина.

Оборудование и реактивы: аналитические весы, ступки, колбы с обратным холодильником на 100 мл, стеклянные воронки, стеклянные пластинки, цилиндры, пипетки, водяная баня, микробюретки; дистиллированная вода, 10 %-й раствор уксуснокислого концентрированной серной кислоты, цинковая пыль, бикарбонат натрия сухой, 0,1 н раствор йода, 1 %-й раствор крахмала, уксусная кислота.

Принцип метода. Метод основан на экстрагировании арбутина из растительного материала с последующим титрованием вытяжки раствором йода в присутствии крахмала до синего окрашивания. По количеству раствора йода, пошедшего на титрование, рассчитывается содержание арбутина.

Ход анализа. Хорошо измельченные листья брусники 0,5 г помещают в колбу емкостью 100 мл, заливают 50 мл воды и кипятят в течение 30 мин. Экстракт фильтруют в мерную колбу емкостью 100 мл, не допуская попадания растительного материала на фильтр.

Растительный материал в первой колбе заливают 25 мл воды и кипятят 20 мин. Горячий экстракт вместе с материалом переносят на фильтр, остаток на фильтре дважды промывает горячей водой (по 10 мл). К объединенному фильтрату приливают 3 мл 10 %-го раствора уксуснокислого свинца, перемешивают и по охлаждении объ-

ем доводят водой до метки. Колбу помещают на кипящую водяную баню до полного створаживания осадка. Горячую жидкость фильтруют в сухую колбу, прикрывая воронку стеклянной пластинкой. После охлаждения к фильтрату приливают 1 мл концентрированной серной кислоты, колбу взвешивают, соединяют с обратным холодильником и нагревают в течение 1,5 ч, поддерживая равномерное и слабое кипение. После охлаждения и доведения до первоначальной массы жидкость фильтруют в сухую колбу, к фильтрату добавляют 0,1 г цинковой пыли, встряхивают в течение 6 мин. Затем жидкость нейтрализуют по лакмусовой бумажке бикарбонатом натрия, добавляют еще 2 г бикарбоната натрия и после этого растворения жидкость фильтруют в сухую колбу. К 50 мл фильтрата (половина навески) прибавляют 200 мл воды и немедленно титруют из микробюретки 0,1 н раствором йода, (индикатор – крахмал, 3 капли 1 %-го раствора) до синего окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Содержание арбутина в листьях определяют по формуле

$$X = V \cdot 0,01361 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100 / m \cdot (100 - v),$$

где V – объем 0,1 н раствора йода, израсходованного на титрование, мл;

m – масса сырья, г;

v – влага, % (учитывается при работе со свежим сырьем);

0,01361 – количество арбутина и свободного гидрохинона, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора йода, г.

Приготовление раствора уксуснокислого свинца: 10 г ацетата свинца растворить в 50 мл дистиллированной воды, прибавить уксусной кислоты до получения прозрачного раствора и довести общий объем до 100 мл.

7.4 Определение антоцианов

Флавоноиды представлены многочисленной группой фенольных соединений, в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из C₆-C₃-C₆ углеродных единиц. По степени окисленности гетероциклического фрагмента флавоноиды могут быть разбиты на несколько подгрупп - катехины, лейкоантоцианы, флаваноны, антоцианы, флавоны, флаванолы и др. Максимальное образование флавоноидов отмечается в надземных частях растений в период бутонизации и цветения.

Оборудование и реактивы: аналитические весы, гомогенизатор, колбы на 250 мл, водяная баня, воронки, фильтры, мерные колбы на 100 мл, спектрофотометр; 1 %-й раствор соляной кислоты»

Принцип метода. Количественное определение суммы антоцианов проводится спектрофотометрическим методом, путем измерения оптической плотности кислотного извлечения при длине волны 510 нм.

Ход анализа. Измельченное растительное сырье 0,3 г помещают в колбу емкостью 250 мл, прибавляют 100 мл 1 %-й соляной кислоты, колбу помещают на водяную баню (40–45°C) и выдерживают в течение 15 мин. Экстракт фильтруют в мерную колбу на 250 мл.

Оставшееся сырье повторно экстрагируют указанным выше способом, прибавив 100 мл 1 %-го раствора соляной кислоты. После фильтрования экстракты объединяют в мерной колбе, и охлажденный фильтрат доводят 1 %-м раствором соляной кислоты до объема 250 мл. Полученное извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата, и оптическую плотность раствора определяют на спектрофотометре (или фотоэлектроколориметре) при длине волны 510 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 1 %-ый раствор соляной кислоты.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3,5-диглюкозид в сухом сырье в процентах вычисляют по формуле

$$X = D \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100 / 453 \cdot m \cdot (100 - v),$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

453 – удельный показатель поглощения цианидин-3,5-диглюкозида в 1%-ом растворе соляной кислоты;

m – масса сырья, г;

v – влага, % (учитывается при работе с сырым материалом).

Контрольные вопросы

1. Что такое вещества вторичного происхождения? На какие группы их делят?
2. Дайте общую характеристику фенольным соединениям.
3. Каковы функции фенолов в растениях?
4. Дайте общую характеристику флавоноидам.

5. Дайте общую характеристику дубильным веществам.
6. Что такое алкалоиды? Каковы основные функции алкалоидов в растениях?
7. Что такое гликозиды? Каковы основные функции гликозидов в растениях?
8. Что такое эфирные масла? Каковы функции эфирных масел в растении и их практическое применение?
9. Дайте характеристику антоцианам. От чего зависит их окраска?

8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ЗЕРНА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Повышение качества зерна злаков является важной задачей селекции. Известные методы скрининга этих качеств зерна требуют слишком много времени, являются сложными, разрушительными и малопригодными для процесса размножения. Поэтому весьма актуальными являются работы, заключающиеся в разработке косвенных методов оценки показателей качества зерна, которые являются неразрушающими, простыми и экспрессными.

Индивидуальный отбор ячменя по содержанию белка в зерне

Как известно, количество воды, необходимое для набухания семян в процессе прорастания, зависит от их химического состава. Причем, большая часть воды (180–250 %) поглощается именно белками. Кроме того, известно, что количество поглощенной воды при набухании семян увеличивается при повышенной (45–55 °С) температуре. Гипотеза: при набухании зерна станет происходить снижение его плотности, которое будет зависеть от содержания белка в зерне. Проведенные эксперименты подтвердили возможность такого разделения генотипов ячменя. В результате были найдены коррелятивные связи и предложены простые подходы к косвенной оценке зерновых культур по содержанию белка. Показано сокращение времени на определение содержания белка в зерне ячменя; возможность индивидуального отбора ячменя на содержание белка в зерне; сохранение всхожести зерен после отбора их на содержание белка.

Цель работы: разделить популяцию ячменя на низко- и высокобелковые фракции при сохранении всхожести зерен после отбора их на содержание белка.

Ход работы. В колбе зерно ячменя предварительно замачивают в воде с температурой 20 °С в течение 10–20 минут. Затем разделяют последовательно в растворах сахарозы различных концентраций на фракции, перенося из одного раствора в другой; потом потонувшие в растворах сахарозы фракции зерен промывают каждую отдельно в воде. Далее каждую фракцию зерен выдерживают в воде в термостате при температуре 40–50 °С в течение 4-х часов. После набухания зерен в течение 4 часов в воде с зерен каждой фракции удаляют влагу фильтровальной бумагой и проводят повторное разделение зерен в растворах сахарозы, возвращая назад каждую фракцию зерен в со-

ответствующий по концентрации раствор сахарозы, в котором они первоначально тонули. Всплывшие в каждом растворе зерна объединяют в одну группу, промывают водой, подсушивают на воздухе и используют как наиболее высокобелковые.

Оценка пивоваренных качеств ячменя

К основной характеристике пивоваренных качеств ячменя относится быстрая деградация эндосперма при выдерживании зерна в воде. Структура эндосперма зерновок непивоваренного ячменя является физически более твердой. Экспериментально найдено, что показатель твердости зерновок злаков в значительной степени обусловлен уровнем адгезии между гранулами крахмала и белковым матриксом в эндосперме. Общепринято, что величина твердости зерна ячменя отрицательно связана с объемом водного экстракта ячменя и деградацией эндосперма. Варьирование величины твердости зерновок у разных сортообразцов ячменя может быть обусловлено различием в толщине клеточных стенок эндосперма, разницей в содержании химических компонентов этих стенок – бета-глюканов и арабиноксиланов, не одинаковой концентрацией белка, а также различием в соотношении малых и больших гранул крахмала.

Для прогноза качества будущего солода в практике применяется сортовой показатель, связанный с измерением физической твердости зерновок ячменя. Логично предположить, что твердость зерна может быть связана с его плотностью, измерить которую несложно.

Цель работы: изучить взаимосвязи между поглощением воды зерном и его плотностью.

Ход работы. Образцы зерна различных сортов ячменя взвешивают (100 г) и помещают в марлевых мешочках в отстоянную водопроводную воду при 18 °С на 21 час (с 9-часовым перерывом нахождения на воздухе). После этой процедуры зерно промокают при помощи двух слоев фильтровальной бумаги для удаления воды с поверхности. Операцию повторяют до полного удаления влаги. Зерно взвешивают и вычисляют относительное количество поглощенной воды. Каждый образец анализируют в трехкратной повторности. Параллельно этой операции определяют плотность зерна. Последнее находят путем деления массы (около 10 г) зерна на его объем. Для измерения объема навески зерно помещают в мерную пробирку с водой (цена деления 0,2 мл). По разнице

конечного и начального объемов воды в пробирке рассчитывают объем зерна. Относительная ошибка измерения объема составляет не более 2 %, а массы – 0,1 %. Общая относительная величина ошибки измерения плотности зерна равна 2,1 %. В литературе показана сильная отрицательная связь между плотностью зерна ячменя и относительным поглощением им воды ($r = -0,731 \pm 0,081$, $p = 0,001$).

В работе значение плотности зерна сравнивают с относительным поглощением воды зерном (21 ч). Находят корреляцию между плотностью зерна и поглощением им воды.

Оценка пленчатости зерна ячменя

Одним из нормируемых показателей пивоваренного ячменя является пленчатость зерновки. Для приготовления качественного солода ее значение не должно быть менее 8 и более 10 %, а цветковые чешуйки должны характеризоваться слабой морщинистостью. Данные параметры указывают на то, что зерно имеет высокое содержание крахмала и может создать слой необходимой толщины для фильтрации сусла. Напротив, повышенная массовая доля наружных покровов (высокая пленчатость) снижает экстрактивность зерна.

При замачивании ячменя в воде последняя проникает внутрь зерна, что способствует активизации ферментов и запуску процессов прорастания. Первоначально вода поглощается оболочкой и заполняет капилляры во внешних пленках зерновки. Логично предположить, что чем выше массовая (объемная) доля пленчатости, тем больше будет водопоглощение зерна на самом начальном этапе. Экспериментально показано, что на относительное количество поглощенной воды за первую минуту влияет относительная масса наружных покровов (пленок) зерна. Между уровнем пленчатости зерна и начальным поглощением им воды прослежена сильная положительная связь (коэффициент корреляции составил достоверные величины, равные 0,760 – 0,890, $p = 0,001$).

Цель работы: определение показателя пленчатости зерна разных образцов ячменя.

Ход работы. Берут навеску сухих зерен каждого образца по 10 г (точность измерения 0,1 г). Затем в сосуд с водой комнатной температуры помещают навеску образца и через 1 минуту извлекают из сосуда зерно, промокают фильтровальной бумагой, взвешивают.

Впоследствии вычисляют относительное поглощение воды зерном (ОПВ) за 1 минуту по формуле

$$\text{ОПВ} = [(M_{\text{кон}} - M_{\text{нач}}) / M_{\text{нач}}] \cdot 100 \%,$$

где $M_{\text{кон}}$ – масса зерна после процедуры намачивания в течение минуты;

$M_{\text{нач}}$ – исходная масса сухого зерна.

Далее вычисляют величины пленчатости по относительному поглощению зерном воды за первую минуту намачивания. Расчетное уравнение выглядит следующим образом:

$$\text{ПЗ} (\%) = 1,44 \cdot \text{ОПВ},$$

где ПЗ – показатель пленчатости зерна;

ОПВ – относительное поглощение воды зерном за 1 минуту.

Контрольные вопросы

1. Назовите методы отбора ячменя по содержанию белка в зерне.
2. Что происходит при замачивании ячменя в воде?
3. Как проводится оценка пивоваренных качеств ячменя?

ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ

1. Классификация белков.
2. Классификация углеводов.
3. Вещества, относящиеся к липидам.
4. Классификация витаминов.
5. Понятие о веществах с антиоксидантной активностью.
6. Классификация ферментов.
7. Синтез и распад органических кислот и аминокислот.
8. Окисление липидов.
9. Проблема получения сбалансированного растительного белка.
10. Влияние экологических факторов на накопление белка в растениях.
11. Влияние экологических факторов на накопление углеводов в растениях.
12. Влияние экологических факторов на накопление жира в растениях.
13. Влияние экологических факторов на накопление витаминов и алкалоидов в растениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение биохимических процессов в растительных клетках на сегодняшний день – одно из главных направлений в области биологических исследований. Отработка практических навыков по определению содержания белков, углеводов, липидов, витаминов является основополагающей базой для экспериментальной деятельности студентов, магистрантов, аспирантов агроэкологических специальностей.

Логическая последовательность и доступность изложения, наличие контрольных вопросов и методических рекомендаций по ходу всего практикума позволяет систематизировать знания по каждой теме и акцентировать внимание студента на главных и характерных вопросах, определениях и взаимосвязях.

Практикум закрепляет и расширяет практические навыки студентов по дисциплине «Биохимия растений». Студенты знакомятся со свойствами и методами определения разных биохимических структур.

Учебное пособие обеспечивает формирование системных научных и практических знаний в области эколого-биохимических исследований у студентов соответствующих направлений и специальностей всех форм обучения. Практические вопросы имеют большую актуальность при проведении лабораторных исследований.

ТЕРМИНЫ И ПОНЯТИЯ

АБК – абсцизовая кислота и ее производные – фитогормоны, являющиеся соединениями терпеноидной природы. Образуется из мевалоновой кислоты или в результате деградации каротиноидов, в частности виолоксантина, перемещается в составе ксилемного и флоэмного соков, а также по паренхиме, главным образом, в направлении очагов высокой меристематической активности и замыкающих клеток устьиц. Абсцизовая кислота является ингибитором широкого спектра действия.

Алкалоиды – гетероциклические соединения, содержащие в цикле один или несколько атомов азота, реже кислорода. Являются органическими основаниями и образуют с органическими кислотами соли. Содержатся в растениях чаще всего в виде солей яблочной, лимонной, винной и других кислот. В виде солей алкалоиды растворимы в воде, в свободном виде в воде нерастворимы, но растворяются в органических растворителях. Используются в растении для построения других соединений (например, алкалоид горденин превращается в лигнин); являются определенной промежуточной формой процесса превращения азотистых соединений в растениях – в этой форме азотистые продукты обмена веществ обезвреживаются и сохраняются; могут участвовать в окислительно-восстановительных процессах (образующиеся N-оксидные формы алкалоидов, в которых азот пятивалентен и связан с атомом кислорода, могут легко отдавать свой кислород, окисляя при этом различные соединения – аскорбиновую и лимонную кислоты, гидрохинон, пирогаллол); могут являться (например, никотин) источником материала, необходимого для синтеза ферментов; действуют как регуляторы роста, в частности, как ингибиторы прорастания; помогают поддерживать ионный баланс благодаря своей хелатирующей способности.

Алкалоиды истинные – алкалоиды, содержащие азот в гетероцикле, биогенетическими предшественниками которых являются аминокислоты. К этой группе относят производные пирролидина (стахидрин, кокаин, атропин), пиридина (никотин, риганин), пиперидина (кониин, пиперин), хинолина (хинин), изохинолина (морфин, кодеин), хинозалина (вазицин), пирролизидина (ретронецин), хинолизидина (лупинин и спартеин), индола (иохимбин, стрихнин, агроклавин), акридина (рутакридон), имидазола (эрготионеин), пурина (кофеин, теобромин) антибиотика. Образуется из аллиина – амино-

кислоты, содержащейся в чесноке. Аллиин не обладает запахом чеснока – запах этот свойствен неналлицину, образуемому в результате расщепления аллиина ферментом аллиин-лиазой. В чистом виде аллицин представляет собой маслянистую жидкость, плохо растворимую в воде, но растворимую в спирте и эфире, легко разрушается при хранении его препаратов. Он подавляет бактерии уже в концентрации 1:250000.

Альбумины – протеины, растворимые в воде, например, лейкозин, содержащийся в зародыше пшеничного зерна (4–7 % общего количества белков в зерне). В зерне кукурузы альбуминов 6–14 % от общего количества белков, овса – 15 , проса – 12 , ржи – 25 %.

Амигдалин – цианогенный гликозид, представляющий сочетание дисахарида гентиобиозы и агликона, который состоит из остатка синильной кислоты и бензальдегида. При кислотном гидролизе амигдалина, кроме составных частей агликона (в том числе, синильной кислоты), образуются две молекулы глюкозы. Подобное действие оказывает на амигдалинферментный препарат эмульгин, получаемый из сладкого или горького миндаля и содержащий глюкозидазу. Исходным соединением для синтеза амигдалина служит аминокислота фенилаланин. Амигдалин содержится в листьях и косточках плодов многих растений из семейства розоцветных: яблони, вишни, сливы, айвы, черешни, рябины (0,2–0,8 %). Особенно большое количество его в горьком миндале и семенах персика (2–3 %), и именно с наличием этого гликозида связан специфический вкус и аромат.

Антивитамины – это вещества, инактивирующие витамины. Выделяют две группы антивитаминов: 1) специфические, препятствующие осуществлению метаболических функций (сходных по структуре и занимающих в связи с этим место витаминов в биологически активных молекулах); 2) неспецифические, препятствующие проникновению в клетку тем или иным путем (связывание, разрушение). Примерами антивитаминов первой группы являются стрептоцид и аналогичные ему сульфаниламидные препараты. По своему химическому строению они близки парааминобензойной кислоте. Угнетающее действие на витамины стрептоцида и других сульфаниламидных препаратов объясняется тем, что препараты, весьма сходные с парааминобензойной кислотой, вступают вместо нее в соединение с ферментом или другим веществом, с которым в процессе обмена веществ обычно реагирует парааминобензойная кислота. Аналог никотиновой кислоты – пиридин-3-сульфо кислота – угнетает

рост некоторых бактерий, причем угнетающее действие может быть снято никотиновой кислотой. Некоторые из этих антивитаминов являются структурными аналогами пантотеновой кислоты. Ко второй группе антивитаминов можно отнести некоторые белки, специфически связывающие данный витамин. Таким антивитамином белковой природы является, например, авидин, содержащийся в белке яиц и специфически реагирующий с биотином, в результате чего последний теряет свою биологическую активность. В целом, антивитамины имеют большое практическое значение, так как многие из них угнетают рост болезнетворных бактерий.

Антиоксиданты – вещества, снижающие активность радикальных окислительных процессов по механизмам: ингибирование радикальных форм активных кислородных метаболитов, способных инициировать образование органических радикалов; изменение структурной организации субстрата, замедляющее окисление; прерывание окислительной цепи посредством взаимодействия с органическими радикалами; снижение концентрации кислорода; связывание или окисление ионов металлов переменной валентности, инициирующих разложение перекисей и образование радикалов; перевод перекисей в стабильные продукты окисления: спирты, альдегиды, кетоны и другие соединения.

Антиоксиданты вторичной защиты – антиоксиданты, которые обеспечивают восстановление от повреждений после действия активных форм кислорода. К ним относят процессы репарации ДНК, гидролитические ферменты, осуществляющие удаление окисленных липидов из мембраны, протеолиз поврежденных белков, комплекс реакций, связанных с метаболизацией продуктов перекисного окисления липидов.

Антоцианы – пигменты, относящиеся к группе флавоноидных пигментов, широко распространенные в растении, своим присутствием обуславливающие яркую пигментацию различных тонов – от розовой до черно-фиолетовой. Антоцианы представляют гликозиды, в которых остаток глюкозы, галактозы или рамнозы связан с окрашенным аглюконом, принадлежащим к группе антоцианидинов.

Атропин – алкалоид, содержащийся в корнях белладонны (*Atropa belladonna*), семенах дурмана (*Datura stramonium*), корнях скополии (*Scopolia carniolica*) и других пасленовых (*Solanaceae*). Биосинтетический предшественник N-гетероцикла – L-орнитин. Атропин действует на нервную систему, может использоваться как

противоядие при отравлении никотином. Атропин оказывает сильное действие на моторные нервы глазного яблока и используется, главным образом, в качестве средства, расширяющего зрачок. В токсических дозах атропин – сильный яд, наибольшая лечебная доза – 0,001–0,003 г.

Белки запасные – это основные белки семян. У зерновых культур они представлены проламинами, у масличных – в основном альбуминами и глобулинами. В частности, проламины зерновок ячменя подразделяются на четыре группы: γ -гордеины, В-гордеины, С-гордеины и D-гордеины, из которых наименее полноценными являются С-гордеины. Альбумины и глобулины масличных растений – хорошо сбалансированные по аминокислотному составу белки, имеющие высокую питательную ценность. Во время созревания в семенах масличных растений происходят два конкурирующих процесса – образование белков из аминокислот, а также жиров из углеводов.

Белки полноценные – белки, в составе которых присутствует достаточное количество всех незаменимых аминокислот, т. е. имеется сбалансированный аминокислотный состав. К таковым относятся белки сои, картофеля, моркови, свеклы, капусты и др. К полноценным близки белки некоторых бобовых культур. Среди растительных белков много неполноценных. Так, в белках злаков, как правило, содержится недостаточное количество лизина и триптофана, а в белках бобовых – метионина.

Вещества дубильные – водорастворимые эфиры фруктозы и ароматических кислот, содержащиеся в клеточном соке большого числа растений. Особенно много их в клетках коры дуба, ивы. Отличаются сильным вяжущим вкусом, предохраняют ткани растения от загнивания.

Вещества пектиновые – полисахариды, содержащиеся в плодах, корнеплодах, растительных волокнах. В присутствии сахаров и кислот пектиновые вещества образуют желе или студни, что используется в кондитерской промышленности. В основе строения пектиновых веществ лежит цепь из остатков α -D-галактуроновой кислоты, соединенных 1,4-гликозидными связями, и имеющая большое количество карбоксильных групп. Эта цепь называется полигалактуроновой кислотой. Часть карбоксильных групп кислоты связана с метиловым спиртом, часть атомов водорода этих групп может быть замещена катионами металлов, т. е. в растениях могут содержаться со-

ли полигалактуроновой кислоты. Карбоксильные группы соседних цепей могут соединяться друг с другом через ионы двухвалентных металлов, особенно кальция, создавая прочную структуру. Ионы кальция способны обмениваться на другие катионы (H^+ , K^+).

Витамин А (ретинол) – представляет светло-желтую маслянистую жидкость, хорошо растворимую в жирах. Молекула витамина А точно соответствует половине молекулы β -каротина, поэтому из одной его молекулы могут образоваться 2 молекулы витамина A_1 , эмпирическая формула которого $C_{20}H_{30}O$. Из α - и γ -каротинов может образовываться лишь по одной молекуле витамина A_1 . В печени пресноводных рыб был открыт витамин A_2 , эмпирическая формула которого – $C_{20}H_{28}O$. В растениях витамины группы А встречаются только в виде провитамина – каротина, который в организме животных под действием ферментов (каротиназ) переходит в витамин А. Содержание каротина в мг на 100 г продукта составляет: в листьях шпината – 5,0–15,0; в корне петрушки – 6,5–10,0; корнеплоде моркови – 5,4–19,8; плодах перца – 0,4–0,6; плодах черной смородины – 0,7–2,0. Суточная потребность в витамине А – 0,5–2,0 мг, у кормящих женщин – до 4 мг (по каротину). Отсутствие или недостаток в пище витаминов группы А сказывается в нарушении роста, понижении стойкости к заболеваниям, вызывает кожные болезни (слизистых оболочек, потовых и слезных желез) и глазные болезни (куриная слепота и болезни роговицы).

Витамин B_1 (тиамин) – соединение, построенное из пиримидинового и тиазолового колец. Играет важную роль в процессах превращения углеводов в организме животных, растений и микроорганизмов, так как входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы (в виде своего фосфорнокислого эфира тиаминпирофосфата), расщепляющей при диссимиляции углеводов пировиноградную кислоту (ПВК) – $CH_3COCOON$. Витамин B_1 образуется только в продуктах растительного происхождения некоторых микроорганизмов. Синтез его идет лишь на свету, а содержание в растениях существенно изменяется от условий их выращивания и питания. Содержание тиамин в мкг на 1 г продукта составляет: в зерновках пшеницы – 2,6–10,2; семенах гороха – 4,0–13,2; зерновках овса – 4,8–10,3; свежих фруктах и овощах – 1,0–2,0; семенах сои – 4,6–9,6. Суточная потребность человека в витамине B_1 составляет 2–3 мг. Недостаток витамина B_1 в пище приводит к недостаточной концентрации внимания, быстрой физической и умственной утомляемости, легкой

возбудимости, плохому аппетиту и снижению массы тела. При дальнейшем развитии болезни наблюдаются болевые ощущения в ногах, заболевания периферической нервной системы (полиневрит), параличи, одышка.

Витамин В₂ (рибофлавин) – соединение, в котором азотистое основание (6,7-диметилизоаллоксазин) связано с остатком многоатомного спирта D-рибита, образующегося при восстановлении сахара D-рибозы. Из-за оранжево-желтой окраски и содержания остатка D-рибита витамин В₂ и получил свое название (*Flavus*– желтый). Витамин В₂ в соединении с фосфорной кислотой входит в состав окислительно-восстановительных, так называемых флавиновых ферментов. Коферментная форма рибофлавина – флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Коферментные функции – транспорт электронов и протонов от НАДН₂ и НАДФН₂ на цитохромную систему, участие в дегидрировании аминокислот, кетокислот и оксикислот. Витамин В₂ синтезируется только в растениях и некоторых микроорганизмах. Содержание рибофлавина в мкг на 100 г продукта составляет: листья шпината – 143–570; листья салата – 40–70; корнеплод моркови – 20–50; яблоки – 20–90; плоды шиповника – 6–30. Суточная потребность человека в этом витамине – 2–4 мг. Недостаток витамина В₂ в пище вызывает нарушение аппетита, снижение массы тела, резь в глазах, фуксиноподобный язык, образование трещин в уголках рта и на губах (кейлозис).

Витамин В₆ (пиридоксин) – производное пиридина – кристаллическое соединение, хорошо растворимое в воде и спирте. В виде фосфорного эфира он входит в состав активных групп ферментов, катализирующих переаминирование и декарбоксилирование аминокислот, а также дезаминирование и другие превращения отдельных аминокислот. При недостатке витамина В₆ отмечают глубокие нарушения в синтезе и обмене аминокислоты триптофана, нарушении белкового обмена и синтеза жиров в животном организме. Эти нарушения проявляются в виде остановки роста, нервных расстройств, дерматитов. Витамин В₆ синтезируется в растениях и некоторых микроорганизмах. Содержание пиридоксина в мкг на 1 г продукта составляет: пшеница – 3–6; рис полированный – 1–2; дрожжи сухие – 45–50. Суточная потребность человека в витамине В₆ составляет 10–15 мг. Жвачные животные не нуждаются в витамине В₆, так как он синтезируется микрофлорой в желудочно-кишечном тракте.

Витамин В₁₂ – объединяет группу веществ, которые относятся к комплексным соединениям трехвалентного кобальта. Важнейшим представителем этой группы веществ является цианокобаламин. Молекула витамина состоит из двух частей – нуклеотидной и хромофорной, или кобальтсодержащей. Название цианокобаламин соединение получило в связи с тем, что в его состав входят аминные группы, группа – CN и атом кобальта. Это единственный витамин, содержащий металл в молекуле. Другие представители группы витаминов В₁₂ отличаются от цианокобаламина тем, что вместо группы – CN содержат молекулу воды (аквокобаламин) или молекулу аммиака (кобалихром). Один из немногих витаминов, которые не образуются в растениях. Главным источником в пище человека витамина В₁₂ являются продукты животного происхождения, особенно печень и почки. Травоядные животные снабжаются этим витамином за счет микрофлоры пищеварительного тракта, особенно рубца. Суточная потребность человека в витамине В₁₂ составляет 10–20 мг. Человек также частично получает витамин В₁₂ за счет микрофлоры кишечника. По-видимому, единственными организмами, способными к биосинтезу витамина В₁₂, являются некоторые микроорганизмы. При его недостатке ухудшается усвоение пищи, нарушается обмен белков, углеводов. Этот витамин интенсивно действует на органы кроветворения, стимулирует образование крови в костном мозге, принимает участие в биосинтезе биологически активных соединений, содержащих метильные группы, в обмене нуклеиновых кислот и некоторых других веществ.

Витамин С (кислота аскорбиновая) – белое кристаллическое вещество без запаха, с сильным кислым вкусом, хорошо растворяется в воде, легко разрушается в растворах, особенно в присутствии воздуха, света, следов меди или железа. Участвует в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в живой клетке. В растениях витамин С образуется из углеводов. При прорастании семян начинается интенсивное его накопление (как в темноте, так и на свету) в растении, оно достигает максимума в листьях в фазе цветения. В период опадания листьев витамин С в них не содержится. Содержание аскорбиновой кислоты в мг на 100 г продукта составляет: капуста белокочанная – 30–40; перец – 100–400; плоды шиповника – 2000–4500; орехи грецкие незрелые – до 3000; смородина черная – 100–400. Суточная потребность человека в витамине С составляет 50–100 мг. В организме человека он не синтезируется, недостаточ-

ное его содержание в пище приводит к возникновению цинги. В производстве витамин С получают из хвои.

Витамин Е (токоферол) – представлен четырьмя изомерами, получившими название α -, β -, γ -, δ - токоферолов. Представляет собой вязкую жидкость, очень термостоек, чувствителен к свету. Основная функция токоферолов – регуляция свободнорадикальных реакций в клетках. Благодаря этим соединениям обеспечивается стабильность клеточных мембран. Со структурно-функциональными нарушениями мембран связаны гемолитическая анемия у недоношенных детей, мышечная дистрофия. Витамин Е защищает ненасыщенную боковую цепь витамина А от пероксидного окисления, повышая таким образом биологическую активность этого витамина. Является синергистом селена, который как кофактор глутатионпероксидазы участвует в инактивации гидропероксидов липидов – токоферол тормозит пероксидное окисление липидов. Токоферолы широко распространены в растениях, особенно их много в зеленых частях, а также в зародышах семян ряда растений. Содержание витамина Е в мкг на 1 г продукта составляет: в зерне пшеницы – 8,0–9,0; в зародышах пшеницы – 150–130; масле из зародышей пшеницы – 1500–3000; масле подсолнечном – 350–420. Потребность человека сутки – 20–5 мг суммы всех токоферолов. При недостатке витамина Е у животных нарушается белковый обмен, обмен липидов, некоторые процессы углеводного обмена.

Витамин Н (биотин) – гетероциклическое соединение, в основе строения которого лежит тиофеновое кольцо, к которому присоединена мочевиная группа, а боковая цепь представлена валериановой кислотой. Малоустойчив к высокой температуре, к действию света и кислорода воздуха. Биотин в качестве кофактора входит в состав активной группы ферментов, катализирующих процесс карбоксилирования жирных кислот, принимает участие в превращении некоторых аминокислот (аспарагиновой кислоты, серина и треонина). Синтезируется биотин в растениях и некоторых микроорганизмах. Появляется этот витамин одновременно с прорастанием семян. У взрослых растений он образуется только в листьях, поэтому они всегда содержат биотина больше, чем другие органы растений. Содержание биотина в мкг на 1 г продукта составляет: зерновки пшеницы – 0,08–0,11; плоды томатов – 0,4–1,0; зерновки овса – 0,17–0,24; семена сои – 0,78–0,90; корнеплоды моркови – 0,28–0,40. Суточная потребность человека в биотине – около 10 мг. Недостаток биотина в

пище приводит к поражениям кожи, выпадению волос и поражению ногтей.

Витамин Р – комплекс биофлавоноидов, состоящий из рутина, кверцетина, гесперидина, чайных катехинов. Эти биофлавоноиды обладают так называемым Р-витаминным действием на организм животных и человека – они увеличивают упругость кровеносных капилляров и нормализуют их нарушенную проницаемость.

Витамин РР (никотиновая кислота) – содержится в организме, главным образом, в виде своего амида, при этом активны и никотиновая кислота, и ее амид. Физиологическая роль никотиновой кислоты заключается в том, что в виде амида она входит в состав окислительно-восстановительных ферментов – дегидрогеназ, катализирующих отнятие водорода от окисляющихся органических веществ. При недостатке никотиновой кислоты задерживается образование большой группы ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в организме. Интенсивный синтез никотиновой кислоты в растениях начинается одновременно с прорастанием семян, усиливается на свету. Некоторое количество никотиновой кислоты может синтезироваться в растениях из триптофана, вследствие чего, при интенсивном синтезе никотиновой кислоты, содержание триптофана в растениях снижается. Содержание никотиновой кислоты и ее амида в мкг на 1 г продукта составляет в зерновках пшеницы – 5–7; семенах гречихи 4–5; клубнях картофеля – 0,8–1,4; листьях капусты – 0,21–0,57. Ежедневная потребность человека в никотиновой кислоте 15–25 мг. Отсутствие или недостаток витамина РР в пище приводит к заболеванию, которое называют пеллагра. Характерными симптомами этой болезни являются поражения кожи, поносы, психические расстройства.

Витамины – относительно низкомолекулярные вещества различной химической природы, необходимые, в небольшом количестве для нормального функционирования живого организма. Витамин – это не химическое или биохимическое понятие, оно имеет физиологический смысл. Витамины разделяют на водорастворимые (В₁, В₂, В₆, В₁₂, РР, С, липоевая и пантотеновая кислоты) и жирорастворимые (А, D, Е, К). Значение витаминов обусловлено их участием в формировании циклически работающих сложных органических молекул, в первую очередь – коферментов и кофакторов.

Воски – сложные эфиры высших жирных кислот (С₂₄–С₃₆) и высокомолекулярных одноатомных спиртов (С₂₂–С₃₂). Кроме эфи-

ров, в состав восков могут входить и молекулы свободных высокомолекулярных спиртов, кислот и углеводов. Например, воск стеблей льна состоит из линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот, церилового спирта, содержит до 65 % углеводов. Воски наиболее гидрофобны из всех липидов, секретируются цитоплазмой и накапливаются в виде отдельных пластинок в клеточной стенке эпидермальных клеток, откуда поступают на поверхность в виде гранул, палочек, ячеек. Защищают листья, стебли, плоды растений от высыхания при недостатке влаги и вымокания в период длительных дождей, служат существенной преградой для проникновения в растение патогенных грибов и бактерий, а также ряда вредных насекомых.

Гликоалкалоиды – гликозиды, агликон которых представляет собой алкалоид. Например, к гликоалкалоидам относятся соланины и чаконины – ядовитые вещества горького вкуса, находящиеся в ботве, клубнях и особенно ростках картофеля, баклажанах, плодах паслена. Агликоном этих соединений является алкалоид соланидин.

Гликозиды – сложные вещества, образующиеся из сахаров и компонента неуглеводной природы (агликона), присоединяющегося к углеводу за счет гликозидного гидроксила (у моносахаридов так называется гидроксильная группа, находящаяся у первого атома углерода глюкозы и у второго атома углерода молекулы фруктозы). В качестве агликона в построении молекул гликозидов могут принимать участие остатки спиртов, ароматических и гидроароматических соединений, стероидов, алкалоидов и других соединений. Простейшим примером может служить метилгликозид. В зависимости от природы связи между углеводной частью молекулы гликозида и агликоном различают: О-гликозиды, у которых остаток агликона соединен с углеводом через кислород; S-гликозиды, у которых остаток агликона присоединен через серу; N-гликозиды, в которых имеется связь C–N, и C-гликозиды – имеют прямую углерод-углеродную связь между углеводом и агликоном. Большое число гликозидов, накапливаясь в семенах, плодах, листьях и других органах растений, которые используются в пищу человеком и на корм скоту, обладают токсическим действием на животные организмы. Многие гликозиды обладают лекарственными свойствами, например, сердечные гликозиды; служат сырьем для промышленного производства красителей, например, индикан, для получения индиго; сами и продукты их гид-

ролиза часто имеют специфический аромат, вследствие чего используются в пищевой промышленности.

Глюкованилин – гликозид, представляющий собой соединение глюкозы с остатком ароматического альдегида ванилина. Относится к группе О-гликозидов. Довольно широко распространен в растительном мире, больше всего его в плодах ванили. Под действием ферментов легко расщепляется с образованием глюкозы и ванилина, который является ценным душистым веществом, применяемым в пищевой и парфюмерной промышленности, а также для производства некоторых медицинских препаратов.

Глобулины – протеины, которые растворяются в слабых растворах разных солей (легумин – в семенах гороха, фазеолин – в семенах фасоли, глицинин – в семенах сои). Используют, например, 10 %-й раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 – 1,0 н растворы Na_2SO_4 , K_2SO_4 , KCl , NaCl . Содержание глобулинов в зерне пшеницы в среднем около 20 %, в зерне кукурузы – от 7 до 23, овса – 12–24, ржи – 15–29 %.

Глютелины – протеины, растворяющиеся в слабых растворах щелочей (0,2 %). Содержатся в семенах злаков и зеленых частях растений, например, глютеин пшеницы, составляющий 25 % общего количества белка. В зерне ржи глютелинов содержится в среднем 17 % от общего количества белков, ячмене – 27 и овсе – 40 %.

Гутта – вещество, близкое по строению к каучуку. Представляет транс-1,4-полиизопрен с более низкими пределами молекулярной массы, чем каучук (около 100 остатков изопрена). Гутта образуется в различных видах тропических деревьев рода *Palaquium* (*Sapotaceae*), произрастающих в Малайзии. Латекс не может вытекать из них с той же легкостью, как каучуковый латекс, поэтому для сбора гутты нужно срубить деревья, что привело практически к вымиранию первоначального главного источника гутты – *Palaquium gutta*. В настоящее время в небольших масштабах коммерческий сбор осуществляют из гваюлы серебристой (*Parthenium argentatum*) – кустарника, произрастающего в пустынных местностях Мексики. Каучуконосами являются также кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) и тау-сагыз (*Scorzoneratau-saghyz*). Образуется гуттаперча и в бересклете (*Evonymys*).

Жирные кислоты – органические, карбоновые, кислоты, которые входят в состав молекул нейтральных жиров, фосфолипидов, различных органических эфиров. Они состоят из углеводородных цепочек (C_6 – C_{22}) с концевой карбоксильной группой. В растениях в

основном встречаются жирные кислоты с четным числом углеродных атомов и неразветвленной структурой. Три кислоты – линолевая, линоленовая и арахидоновая – являются незаменимыми, так как они не синтезируются в организме человека и высших животных.

Жиры – смеси сложных эфиров (триглицеридов) глицерина и высокомолекулярных жирных кислот, в основном С10–С18. В состав растительных жиров (называемых обычно маслами) может входить несколько десятков жирных кислот, но наиболее часто из ненасыщенных кислот – олеиновая, линолевая, линоленовая и насыщенных – пальмитиновая и стеариновая. Различия между жирами обусловлены исключительно органическими кислотами, так как спирт один и тот же – глицерин. При преобладании в жирах насыщенных кислот (пальмитиновая, стеариновая, миристиновая) они при комнатной температуре имеют твердую консистенцию, при преобладании ненасыщенных – жидкую. Растительные жиры не являются индивидуальными веществами, а представляют собой смеси триглицеридов – однокислотных и разнокислотных. Однокислотные, в состав которых входит только одна кислота, встречаются лишь в немногих растительных маслах. Например, в оливковом масле 80 % общего количества жирных кислот приходится на олеиновую кислоту, в нем имеется значительное количество триолеина; в подсолнечном масле 30–35 % приходится на олеиновую, 55–60 – на линолевую кислоту.

Примерами разнокислотных глицеридов могут служить пальмитинодиолеин, содержащийся в масле льна, и миристинопальмитинолеин, находящийся в масле какао. В химически чистом виде растительные масла не имеют ни цвета, ни вкуса, ни запаха, а окраска и вкусовые качества зависят от наличия других веществ: желтый цвет – каротиноидов (подсолнечное масло), зеленый (конопляное масло) – хлорофилла и т. д.

Ингибиторы фенольные – вещества, подавляющие растяжение клеток, тормозящие образование корней и процессов, связанных с распусканием почек и прорастанием семян. Обнаружены в семенной кожуре, околоплоднике, в органах, переходящих к покою. К ним относятся нарингенин, кумарин, хлорогеновая кислота, коричная, феруловая, ванилиновая, кофейная кислоты и др. Одной из главных причин торможения роста является снижение количества АТФ в клетках. Под влиянием фенольных ингибиторов уменьшается синтез ИУК и ускоряется ее распад, так как они стимулируют активность ИУК-оксидазы, а также ингибируется образование гиббереллинов и

цитокининов. Под действием кумарина уменьшается скорость выделения пасоки и интенсивность транспирации.

Инозит – витаминоподобное вещество, синтезируемое зелеными растениями и являющееся необходимым фактором роста. Максимальное его количество находится в незрелых плодах и семенах. По химическому строению это шестиатомный циклический спирт, лишь одна из оптических форм которого обладает витаминной активностью – миоинозит. Миоинозит играет важную роль в качестве предшественника уроновых кислот, входящих в состав клеточной стенки растений; является компонентом инозитфосфатидов, содержащихся во всех тканях; обладает липотропной активностью, как компонент фосфолипидов, конкурирующий за высшие жирные кислоты. В процессе созревания мио-инозит часто превращается в сахар, инозитфосфорную кислоту и фитин. Фитин, или кальциево-магниевая соль инозитфосфорной кислоты – запасное вещество, используемое во время прорастания семян и развития проростка.

Инулин – полисахарид ряда растений, имеющий эмпирическую формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$. Растворим в воде, осаждается из водных растворов при добавлении спирта. При гидролизе с помощью кислот образует фруктофуранозу и небольшое количество глюкопиранозы. Содержится в большом количестве в клубнях земляной груши и георгина, в корнях одуванчика и цикория, в артишоках, в корнях, листьях и стеблях каучуконосного растения гваюлы. В клубнях георгина и артишока инулин составляет более 50 % сырой массы ткани. В этих растениях инулин заменяет крахмал. Растения, содержащие инулин, используются для получения фруктозы.

Камедь – сильно гидратированные полисахариды пектиновой природы, клейкие, в сухом виде – твердые. Образуются в специализированных клетках вместо целлюлозной стенки. В состав камедей часто входят алкалоиды, фенольные соединения. Камедетечение из ран на стволах и ветвях наблюдается, например, у вишни и сливы: застывающая на воздухе камедь выполняет защитную функцию, закрывая рану и предотвращая проникновение патогенных микроорганизмов в ткани растений.

Каротиноиды – пигменты желтого, оранжевого и красного цвета, являющиеся тетратерпеноидами, производными изопрена (C_{40}). Подразделяются на каротины (α -каротин, β -каротин и γ -каротин, имеющие формулу $C_{40}H_{56}$) и ксантофиллы, содержащие дополнительные гидроксид- и эпокси-группы (лютеин, зеаксантин –

$C_{40}H_{56}O_2$, виолаксантин, и неоксантин – $C_{40}H_{56}O_4$). Синтез каротиноидов не требует света, они максимально поглощают волны синеволетовой, хуже – голубой (400–500 нм) части спектра. Физиологическое значение: играют роль дополнительных пигментов, передающих энергию поглощенных квантов хлорофиллу, защищают хлорофилл от фотоокисления, участвуют в генеративных процессах.

Каротины – основные каротиноиды высших растений оранжевого цвета, суммарная формула $C_{40}H_{56}$. В растениях обычно встречается смесь изомеров каротина – α -, β - и γ - каротины. Они различаются формами кристаллов, оптической активностью, биологическим действием. Во всех зеленых частях растений являются спутниками хлорофилла, встречаются в моркови (80 % общего количества каротинов – β -каротин), плодах абрикоса, персика, вишни и т. д. Спектры поглощения α -каротина в бензоле – 478 – 477,5 и 423 нм; β -каротина в бензине – 483,5 и 452, 424 нм; γ -каротина в бензине – 495–462, 431 нм. В зеленых частях растений каротины часто замаскированы хлорофиллом и проявляются при разрушении хлорофилла в период созревания плодов, стареющих листьях, стеблях.

Катехины – группа флавоноидных соединений, представляющих собой бесцветные кристаллические вещества, легко окисляющиеся и склонные к полимеризации. Характерная особенность катехинов – образование эфиров с галловой кислотой: катехингаллатов и галлокатехингаллатов. Наиболее распространены в растениях (+) – катехин и (–) эпикатехин, несколько реже встречаются (–) – эпигаллокатехин и (+) галлокатехин. Катехины содержатся в различных плодах (яблоки, груши, айва) и в ягодах (ежевика, земляника, смородина, малина), особенно их много в молодых побегах чайного растения (до 30 % на сухую массу). Продукты окисления катехинов обладают характерным слабым вяжущим вкусом и окраской, что используется в производстве какао, вина и чая. Катехины обладают наиболее высокой Р-витаминной активностью на организм животных и человека – они увеличивают упругость кровеносных капилляров и нормализующих нарушенную проницаемость.

Каучук – высокомолекулярный полиизопрен, образующийся в латексе около 300 родов покрытосеменных растений. Из них только гевея (*Heveabra siliensis*) используется в промышленном масштабе. Латекс, содержащий частички каучука, накапливается в специализированных клетках или сосудах, называемых млечниками. У гевеи каучук образуется и запасается в коре в кольцевых млечниках. Бла-

годаря наличию перемычек между соседними сосудиками в кольцевых млечниках латекс может вытекать из большой зоны коры при подсочке. Каучук представляет собой цис-1,4-полиизопрен с широким спектром молекулярной массы.

Кверцетин – полиоксипроизводное флавона, является желтым пигментом растений, обладает Р-витаминной активностью.

Кефалины – сложные эфиры глицерина, в которых две спиртовые группы глицерина этерифицированы двумя, обычно разными, жирными кислотами (например, стеариновой и олеиновой), а третья связана с фосфохолиновой группировкой, которая при гидролизе дает неорганический фосфат и азотистое основание коламин (этанолламин) – $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Природные кефалины представляют собой α -формы. Чаще всего в состав кефалинов входят пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты.

Кислота жасминовая (жасмонат) – соединение, впервые выделенное в 1962 году из эфирного масла жасмина крупноцветкового, где оно присутствует в виде летучего эфира метилжасмоната. При обработке растений ингибирует рост проростков, прорастание пыльцевых трубок, образование каллуса, способствует закрытию устьиц, стимулирует образование клубней и луковиц. Жасмонаты вызывают в зародышах синтез белков позднего эмбрионального развития (*Lea*-белков), запускают синтез вегетативных запасных белков (VSP). Параллельно с синтезом этих двух групп белков синтезируются белки, специфичные для водного стресса, появление которых сопровождается ослаблением флоэмного тока и закрытием устьиц. Жасминовая кислота усиливает иммунный ответ за счет синтеза экстенсинов (упрочняется клеточная стенка и замедляется рост, что неблагоприятно для патогенов), синтеза белков тионинов (белки с высоким содержанием цистеина, связывающиеся с мембранными структурами патогена с токсическим эффектом), синтеза фитоалексинов, салициловой кислоты и пептида системина.

Кислота липоевая (витамин N) – витаминоподобное вещество (в химическом отношении – циклический дисульфид), содержащееся в растительных и животных тканях и играющее весьма важную роль в обмене веществ животных и микроорганизмов. В частности, она входит в состав коферментов окислительного декарбоксилирования α -кетокислот (например, пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот) и, как сильный восстановитель, снижает потребность в витаминах E и C, предотвращая их быстрое окисление.

Кислота пантотеновая (витамин В3) – гигроскопическая светложелтая вязкая маслянистая жидкость. Молекула ее построена из двух компонентов: α -, γ -диокси- β -диметилмасляной кислоты и β -аланина. Пантотеновая кислота образуется в растениях, при этом в проростках она накапливается позднее, чем другие витамины, так как биосинтез ее связан с фотосинтезом. У взрослых растений наибольшее количество пантотеновой кислоты содержится в молодых листьях и кончиках корней. В этих органах содержание ее в 2–3 раза выше, чем в старых листьях и стеблях. Пантотеновая кислота входит в состав кофермента А, при участии которого происходят активирование и перенос образующихся в организме остатков уксусной кислоты и других кислотных остатков (ацилов), синтез лимонной кислоты, жирных кислот, стеролов, глицеридов и многих других соединений. Содержание пантотеновой кислоты в мкг на 1 г продукта составляет: зерновки овса – 6,2–15,2; корнеплоды моркови – 14,4–20,7; семена арахиса – 21,1–23,8; зерновки пшеницы – 7,4–16,9. Суточная потребность человека в пантотеновой кислоте – 10–15 мг. Человек и животные не способны синтезировать пантотеновую кислоту, поэтому при недостатке ее в пище приостанавливается образование кофермента А, что приводит к серьезным нарушениям в обмене веществ.

Кислота парааминобензойная (ПАБК) – важный фактор роста для многих микроорганизмов, в том числе и тех, которые населяют кишечник животных и способны к синтезу ряда витаминов, усваиваемых организмом хозяина. Видимо, с этим непрямым действием и связано стимулирующее влияние на рост молодых животных и птиц. В растениях и животных тканях ПАБК главным образом связана с белками, полипептидами и аминокислотами, а также содержится в виде ацетильного производного. ПАБК входит в состав водорастворимого витамина – фолиевой кислоты. Содержится в продуктах, богатых витаминами группы В (дрожжи, печень, семена растений). Может быть легко получена синтетическим путем.

Кислота салициловая – участвует в регуляции термогенеза у ароидных, усиливает иммунную реакцию растения при действии патогенов, непосредственно участвует в аллостерической регуляции работы ряда ферментов, высокие дозы салицилата вызывают гибель клеток.

Кислота фолиевая (витамин Вc) – состоит из остатков глютаминовой кислоты, парааминобензойной кислоты и 2-амино-4-окси-6-метилптерина. Основная функция фолиевой кислоты в организмах

– процесс трансформирования – перенос остатка формальдегида, который происходит с участием воды. В реакциях трансформирования принимает участие не свободная фолиевая кислота, а ее производное – ангидроформилтетра-гидрофолиевая кислота, которая при этом превращается в тетрагидрофолиевую кислоту. Тетрагидрофолиевая кислота является коферментом класса трансфераз, катализирующих активирование и перенос одноуглеродных фрагментов: остатков формальдегида ($-\text{СОН}$), муравьиной кислоты ($-\text{СООН}$), метильных групп ($-\text{СН}_3$) и оксиметильных групп ($-\text{СН}_2\text{ОН}$). В качестве донатора формильных групп фолиевая кислота участвует в биосинтезе нуклеотидов, в реакциях взаимных превращений аминокислот серина, метионина и глицина, а когда формильный остаток восстанавливается до метильной группы, производные этой кислоты активируют процесс трансметилирования. Фолиевая кислота образуется в растениях и некоторых микроорганизмах. Содержание фолиевой кислоты в мкг на 1 г продукта составляет: листья шпината – 5–6; соцветие капусты цветной – 4–4,5; корнеплоды свеклы – 2; клубни картофеля – 2–3. Суточная потребность человека в фолиевой кислоте составляет 0,05–0,4 мг.

Кислота хинная ($\text{C}_6\text{H}_7(\text{OH})_4 - \text{COOH}$) – относится к кислотам ряда циклогексана. Найдена в молодых побегах ели (до 13,5 % сухой массы), в коре хинного дерева (до 9 %), в кофейных зернах, в летней хвое сосны, в листьях табака, в ягодах черники, клюквы, крыжовника, ежевики, в плодах айвы, яблок, винограде, сливах. Содержание хинной кислоты сильно колеблется в растениях в зависимости от времени года, что свидетельствует о важности ее как промежуточного продукта обмена веществ. При введении в ткани хинная кислота активно превращается в фенилаланин.

Кислота шикимовая ($\text{C}_6\text{H}_7(\text{OH})_3 - \text{COOH}$) – относится к кислотам ряда циклогексана. Впервые выделена из плодов аниса звездчатого. Найдена в яблоках, вишне, клубнике, ежевике, крыжовнике, грушах, бобах, люцерне. Является ключевым промежуточным продуктом в биосинтезе ароматических аминокислот и фенольных соединений.

Кислоты фенольные относятся к группе простейших фенольных соединений C_6 – C_{11} -ряда, которые можно рассматривать как производные бензойной кислоты ($\text{C}_6\text{H}_5 - \text{COOH}$). Распространены в растениях более широко, например, ванилиновая, протокатеховая, галловая, п-оксибензойная кислоты обнаружены практически у всех ис-

следованных к настоящему времени покрытосеменных растений. Несколько реже встречаются салициловая, сиреневая и о-пирокатеховая кислоты. Галловая кислота ($C_6H_2(OH)_3 - COOH$) обычно встречается в полимеризованной форме в виде растворимого танина. Свободная галловая кислота в небольших количествах присутствует в листьях чайного растения, герани, сумаха. Фенольные кислоты участвуют в аллелопатических взаимоотношениях растений.

Кислотное число жира – количество миллиграммов едкого кали КОН, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, которые содержатся в 1 грамме жира. Высокое кислотное число является показателем низкого качества пищевого масла, так как свободные жирные кислоты придают ему неприятный вкус. Обычно при хранении масел содержание свободных жирных кислот повышается. Большое количество свободных жирных кислот присутствует в масле, полученном из незрелых семян.

Клейковина – белковый сгусток, который образуется при отмывании водой теста, замешанного из муки. Количество сырой клейковины в муке пшеницы колеблется от 16 до 52 %. Основная масса клейковины – белки, представленные проламинами (глиадином) и глютелинами (глютенином). Кроме того, в клейковине содержится небольшое количество небелковых азотистых соединений. Сахар и крахмал не являются характерными для клейковины веществами и большей частью задерживаются в клейковине механически. Жиры связаны в клейковине главным образом в форме липопротеидов.

Крахмал – полисахарид, при полном гидролизе которого образуется α -D-глюкоза. Представляет собой смесь двух полисахаридов – амилозы и амилопектина. *Амилоза* по химическому составу – длинная (от нескольких сотен до несколько тысяч гликозидных остатков) неразветвленная цепь глюкозных остатков, соединенных 1,4-гликозидными связями. Имеет спиральную форму, причем каждый виток спирали состоит из шести глюкозных остатков. *Амилопектин* имеет сильно разветвленные древообразные структуры, содержащие до 50 000 D-глюкопиранозных остатков, соединенных главным образом 4-гликозидными связями. В точке ветвления образуется 1,6-гликозидная связь. Этот тип связи занимает около 5 % от общего количества гликозидных связей амилопектина. Основными органами растения, в которых накапливается крахмал, являются семена, клубни, луковицы. Особенно много крахмала в семенах риса

(60–80 %), кукурузы (65–75 %), пшеницы (60–70 %), клубнях картофеля (12–20 %).

Кумарины – производные о-кумаровой (о-окси-коричной) кислоты. В свободном виде кумарин в растениях обычно не присутствует, а образуется в результате ферментативного гидролиза глюкозида кумариновой кислоты. Наиболее богаты им ясменник и донник. При отщеплении глюкозного остатка кумариновая кислота спонтанно превращается в лактон кумарин. Запах свежескошенного сена характерен именно для легколетучего кумарина, который образуется при повреждении тканей листьев. Производные кумарина широко распространены у представителей семейств зонтичных, рутовых, бобовых, пасленовых. Локализуются в плодах, корнях, коре, цветках, в меньшем количестве – в листьях.

Кутин – полимерные эфиры оксимоникарбоновых кислот, содержащих по 16–28 атомов углерода и по 2–3 карбоксильные группы. Выделяется через клеточную стенку на поверхность эпидермальной клетки, где окисляется и превращается в твердый кутин.

Лецитины – глицериды, в которых две спиртовые группы глицерина этерифицированы двумя, обычно разными, жирными кислотами (например, стеариновой и олеиновой), а третья связана с фосфохолиновой группировкой, которая при гидролизе дает неорганический фосфат и четвертичное аммониевое основание – холин. Природные лецитины представляют собой α -формы. Наиболее часто в состав лецитинов входят пальмитиновая, линоленовая и олеиновая кислоты.

Лигнин (от лат. *Lignum* – дерево, древесина) – природный полимер, входящий в состав почти всех наземных растений. Содержание лигнина в древесине хвойных и лиственных пород, соответственно, 23–38 и 14–25 % по массе. Лигнин расположен в клеточных стенках и межклеточном пространстве растений и скрепляет целлюлозные волокна. Вместе с гемицеллюлозами он определяет механическую прочность стволов и стеблей. Кроме того, лигнин снижает проницаемость клеточных стенок для воды и питательных веществ. Разветвленные макромолекулы лигнина построены главным образом из остатков фенолоспиртов: кониферилового, синапового и п-кумарового.

Метаболиты первичные – низкомолекулярные соединения (молекулярная масса 2–3 кДа), необходимые для жизнедеятельности клетки. Присутствуют в любой клетке растения, участвуют в основ-

ном обмене веществ, являются коферментами (НАД, НАДФ, ФАД, ФМН), строительными блоками для более сложных, высокомолекулярных соединений. К ним относят пуриновые и пиримидиновые основания (нуклеотиды), аминокислоты, сахара, органические кислоты, витамины.

Метаболиты вторичные – низкомолекулярные биологически активные соединения, не участвующие в основном обмене клеток и не требующиеся для поддержания жизнеспособности клеток в нормальных условиях.

Монотерпены – соединения, состоящие из двух изопреновых единиц и имеющие формулу $(C_5H_8)_2$, то есть $C_{10}H_{16}$. Подразделяют их на ациклические, циклогексаноидные (моно-, би- и трициклическими) и циклопентаноидные. Из ациклических следует выделить мирцен, содержащийся в эфирном масле хмеля (от 30 до 50 %) и суша дубильного (до 52 %), а также представителей кислородсодержащих производных монотерпенов – линалоол (в цветках ландыша, апельсиновом и кориандровом масле), гераниол (эвкалиптовое, розовое масла) и цитронеллол (розовое, гераниевое масла).

Насыщенность жирных кислот – степень заполнения химических связей в углеводородной цепочке атомами водорода. Жирные кислоты делят на насыщенные и ненасыщенные. К важнейшим насыщенным жирным кислотам, входящим в состав растительных жиров (масел), относят следующие: капроновая (C_6), каприловая (C_8), каприновая (C_{10}), лауриновая (C_{12}), миристиновая (C_{14}), пальмитиновая (C_{16}), стеариновая (C_{18}), арахиновая (C_{20}), бегеновая (C_{22}). Ненасыщенные жирные кислоты имеют одну или несколько двойных связей. Так, в ряду кислот олеиновая $C_{18}H_{34}O_2$, линолевая $C_{18}H_{32}O_2$, линоленовая $C_{18}H_{30}O_2$ степень насыщения связей водородом постепенно снижается. Степень насыщенности жирных кислот играет большую роль в структурном состоянии (свойствах) биологических мембран, а также влияет на физические свойства жиров (их температуру затвердевания).

Проламины – группа простых белков, растворимых в 70 % этиловом спирте. Эти химические соединения являются в основном запасными белками семян злаков. К проламинам относят специфические белки: гордеин ячменя, зеин кукурузы, глиадин пшеницы. Последний составляет значительную часть (около половины) белков клейковины.

Псевдоалкалоиды – алкалоиды терпеноидной природы. Предшественниками алкалоидов терпеноидной природы являются мевалоновая кислота плюс источник азота. Выделяют: 1) монотерпеноидный тип – в основе лежит актинидин, содержащийся в *Actinidia poligama*. Вместе с тем пиридиновый цикл может быть заменен пиперидиновым циклом, например, в скитантине из *Skytanthus acutus*; 2) секвитерпеноидный тип – выделены четыре группы алкалоидов: дендробин – содержится в *Dendrobium* (орхидея), дезоксинифаридин – в *Nipharyluteum* (водяная лилия) и др.

Соединения фенольные – органические вещества, содержащие одну или несколько гидроксильных групп, связанных непосредственно с атомами углерода ароматического ядра. Соединения с одной гидроксильной группой называют фенолами, с двумя и более гидроксильными группами – полифенолами.

Соланины – гликозиды, являющиеся ядовитыми веществами горькоговкуса, находящиеся в ботве, клубнях и особенно ростках картофеля, баклажанах, плодах паслена. Агликоном этих соединений является алкалоидсоланидин. Выделяют три вида соланинов: - соланин: соланидин + галактоза + глюкоза + рамноза; β -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза; γ -соланин: соланидин + галактоза. В клубне картофеля содержание этих соединений обычно весьма незначительное, причем сконцентрированы они главным образом в наружных слоях. Повышенное содержание соланинов встречается в недозрелых или хранящихся на свету клубнях.

Стероиды – соединения, относящиеся к терпеноидам. В основе их строения лежат конденсированные структуры из четырех углеводородных циклов, представляющих собой высокомолекулярные спирты или их сложные эфиры. Играют определенную роль в структуре клеточных мембран, а также являются витаминами группы D (эргостерол). Содержатся в зеленых листьях, зародышах пшеницы и кукурузы.

Танины – разнообразная группа производных фенола. Аморфные вяжущие вещества, обладающие антисептическими свойствами. Относятся к дубильным веществам, предохраняют ткани растения от загнивания. Соединяясь с белками, танины образуют водонерастворимые соединения, поэтому их широко применяют в качестве естественных дубителей кожи. Много танинов содержится, например, в коре дуба, листьях чая, корневищах бадана.

Тиогликозиды, или **S-гликозиды** – серосодержащие гликозиды. Наиболее известны гликозиды горчичных масел (глюкозинолаты), характерные для крестоцветных. Придают острый или жгучий вкус горчице, хрену, редьке, обладают антимикробным действием. Механизм действия сходен с действием цианогенных гликозидов: после отщепления сахарамирозиной образуются изотиоцианаты, обуславливающие жгучий вкус раздражающее действие

Флавоноиды – чрезвычайно распространенная и наиболее многочисленная группа природных фенольных соединений, в основе структуры которых лежит скелет, состоящий из $C_6-C_3-C_6$ углеродных единиц. Фенольные соединения этой группы содержатся почти у всех высших растений, многие из них придают разнообразную окраску лепесткам, листьям, плодам растений. Обычно флавоноиды сосредоточены в вакуолях, но некоторые из них обнаружены в хромопластах и хлоропластах, а целом растении локализируются, главным образом, в листьях, цветках и плодах, реже в стеблях и подземных органах. Включают большое количество классов, из которых катехины, лейкоантоцианидины, дигидрохалконы, флавононы и флавонолы не имеют окраски, антоцианидинам, флавонолам, халконам и ауринам окраска присуща. Наиболее разнообразной и весьма интенсивной окраской обладают антоцианидины. Наряду с хлорофиллом и каротиноидами, их гликозиды (антоцианы) являются главными веществами, придающими разнообразную окраску цветкам, ягодам и плодам – от розовой до черно-фиолетовой.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Борисова, Г. Г. Биохимия растений. Вторичный обмен: учебное пособие / Г. Г. Борисова [и др.]. – Москва: Юрайт, 2018. – 128 с.
2. Горчаков, Э. В. Основы биологической химии / Э. В. Горчаков [и др.]. – Ставрополь, 2017. – 208 с.
3. Чиркин, А. А. Биологическая химия: учебник / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.
4. Высокогорский, В. Е. Биохимия. Ч. 2 / В. Е. Высокогорский [и др.] – Омск, 2015. – 157 с.
5. Емельянов, В. В. Биохимия: учебное пособие / В. В. Емельянов [и др.] – Екатеринбург, 2016. – 132 с.
6. Мушкамбаров, Н. Н. Аналитическая биохимия: в 3 т. / Н. Н. Мушкамбаров. – Москва: ФЛИНТА, 2015. – 1310 с.
7. Полонский, В. И. Введение в физиологию растений / В. И. Полонский. – Красноярск, 2014. – 358 с.
8. Чаплыгина, И. А. Биохимия растений: лабораторный практикум / И. А. Чаплыгина, Н. В. Фомина. – Красноярск, 2009. – 182 с.
9. Чиркин, А. А. Биологическая химия: учебник / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. – Минск: Вышэйшая школа, 2017. – 431 с.

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Практикум

*Полонский Вадим Игоревич
Фомина Наталья Валентиновна*

Электронное издание

Редактор М.М. Ионина

Подписано в свет 08.09.2022. Регистрационный номер 164
Редакционно-издательский центр Красноярского государственного аграрного университета
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117
e-mail: rio@kgau.ru