

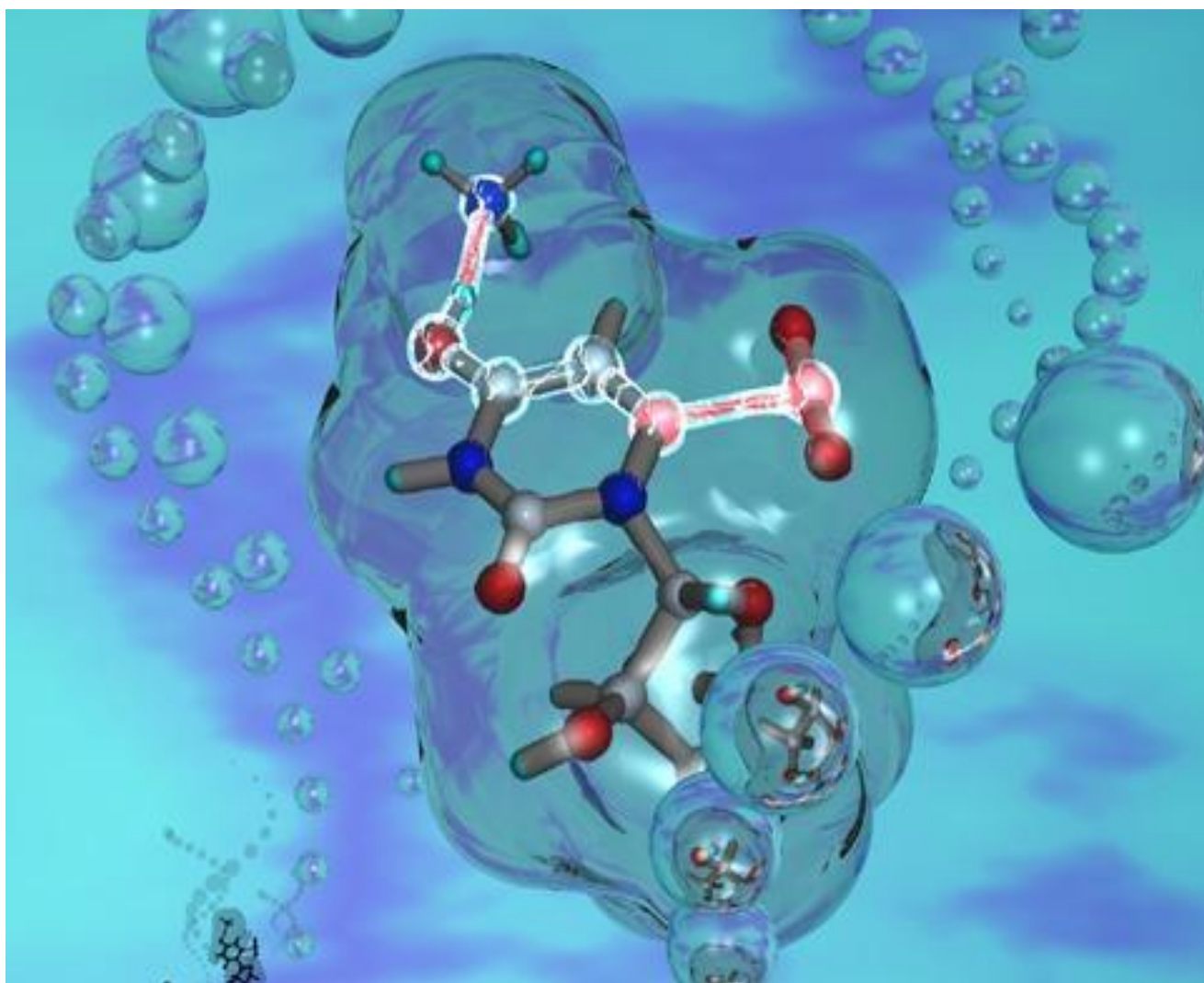
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

Методичні рекомендації для проведення лабораторних
занять з курсу

«БІОХІМІЯ»

*для студентів освітнього рівня «Бакалавр»
спеціальності 181 «Харчові технології»*



УМАНЬ – 2022

Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дисципліни «Біохімія» для студентів освітнього рівня «Бакалавр» спеціальності 181 Харчові технології. Умань: Уманський національний університет садівництва, 2022 р. 91 с.

Укладач: Леонтюк І.Б. – кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Рецензент: Улянич О.І. – доктор сільськогосподарських наук, професор.

Методичні вказівки схвалені на засіданні кафедри біології (протокол № 2 від 29.08.2022 р.)

Затверджено і рекомендовано до видання методичною комісією факультету плодовоовочівництва, екології та захисту рослин (протокол № 1 від 31. 08. 2022 р.)

УДК 664.34:581

@ Леонтюк І.Б., 2022

ПЕРЕДМОВА

Біохімія – це наука, що вивчає хімічний склад і властивості сполук живих організмів, а також перетворення цих сполук у процесі життєдіяльності. Біохімія досліджує молекулярний і надмолекулярний рівні організації живих систем, які лежать в основі вищих рівнів і забезпечують якісну своєрідність живого.

Біохімія базується на фундаментальних досягненнях фізіології, генетики, фізики і хімії, які відкрили нові можливості для вивчення внутрішньої організації живої клітини і її фізіологічної функції.

Основною метою є глибоке, всебічне вивчення речовинного складу рослинних організмів, вмісту в них ферментів, вітамінів, жирів і вуглеводів, структури, властивостей і біологічної ролі найважливіших сполук, які входять до складу рослин, а також вивчення таких важливих ланок обміну речовин, як дихання, бродіння, фотосинтез, утворення і розщеплення жирів, синтез і взаємоперетворення вуглеводів і органічних кислот. Порушення цих важливих процесів викликає погіршення смакових, харчових і технологічних властивостей плодів і овочів.

Знання основ біохімії необхідне спеціалістам технологам харчових підприємств для удосконалення технології, а також для правильного зберігання, переробки і вживання плодів та овочів.

В результаті вивчення дисципліни студент повинен **знати**: речовинний склад рослинного організму, біологічну роль, структуру, локалізацію основних класів органічних речовин рослини, біохімічну характеристику найважливіших життєвих процесів у рослинному організмі, їх роль і взаємозв'язок, залежність від внутрішніх і зовнішніх факторів; **вміти**: проводити якісне та кількісне визначення основних класів органічних речовин у рослинному матеріалі, досліджувати загальні властивості речовин, володіти важливими лабораторними методиками та методами біохімічного аналізу.

ПІДГОТОВКА ПРОБ ПЛОДІВ І ОВОЧІВ ДО АНАЛІЗУ

Всі плоди і овочі перед аналізом подрібнюють за допомогою різноманітних лабораторних подрібнювачів. Середні проби плодів і овочів, які поступили на аналіз, перш за все, очищають від усяких забруднень. Так, наприклад, у капусти зривають верхній шар зелених і забруднених листків, у цибулі – верхні відмерлі лусочки.

Середня проба, яка складається із 10 рослин у деяких культур досить велика (капуста, коренеплоди буряка), і тому в день аналізу із неї беруть меншу за масою лабораторну пробу.

Для качаної капусти беруть 1/4 - 1/8 кожного качана і подрібнюють. У листової капусти подрібнюють 1/2 кожної рослини, розрізаної вздовж по стеблу.

Середні проби салату, шпинату подрібнюють повністю і із готової маси для аналізу відбирають 1/4 частину. При підготовці проб селери, петрушки, цибулі-порей для аналізу беруть половину від кожної рослини, причому цибулю, коренеплоди петрушки і селери відділяють від листків і аналізують все окремо.

Плоди помідорів, перцю, баклажанів і кабачків розрізають вздовж і для подрібнення відбирають 1/2 – 1/4 частину кожного плоду. Помідори, огірки і кабачки, які зібрані в споживчій зрілості, аналізують разом із насінням.

Плоди гарбузових (кавун, диня, гарбуз) ділять на 4 або більше частин і із кожного плоду беруть одну частину, знімають пробковий шар, виймають насіння і подрібнюють в гомогенізаторі.

Коренеплідні овочі відмивають від землі, просушують, а потім розрізають на половинки вздовж коренеплоду. Бульби картоплі промивають у воді, протирають щіткою і просушують, для подрібнення беруть 1/2 або 1/4 кожної бульби (шкірку не знімають).

Плоди (яблука, груші, сливи, абрикоси і персики) розрізають на 2 частини. Половинки від кожного плоду подрібнюють, використовуючи подрібнювачі або гомогенізатори, насіння і кісточки видаляють.

Плоди цитрусових ділять вздовж на 2 - 4 частини, відокремлюють шкірку і після видалення насіння також подрібнюють.

Ягоди винограду відділяють кожну окремо і після перемішування подрібнюють 1/2 або 1/4 частину ягід, насіння відділяють.

Ягоди смородини, агрусу, малини і суниці подрібнюють всі і аналізують разом із насінням.

ТЕМА 1. БУДОВА КЛІТИНИ ТА ХІМІЧНИЙ СКЛАД ПЛОДІВ І ОВОЧІВ

Робота 1. Дослідження органел клітини рослин. Якісні реакції на основні запасні речовини

Матеріали та обладнання: 1) листки традесканції, м'якоть гарбуза, картопля, насіння гороху; 2) мікроскоп; 3) предметні та накривні скельця; 4) скальпель; 5) препарувальна голка; 6) мікроскоп; 7) розчин йоду.

Клітина – це найменша біологічна і структурна одиниця живого організму, якій характерні всі життєві процеси. Термін клітина належить Роберту Гуку, який у 1665 році удосконалив мікроскоп і дослідив багато рослинних об'єктів, в яких бачив лише оболонки клітин.

Рослинна клітина складається з живої речовини – протопласта, замкненого в оболонку, яка є продуктом його життєдіяльності.

Протопласт – це активна частина клітини, до складу якої входять органоїди: цитоплазма, ендоплазматична сітка, рибосоми, мітохондрії, пластиди, апарат Гольджі, лізосоми, ядро.

Цитоплазма - в'язка, напівпрозора, безкольорова рідина, до складу якої входять: вода – 80 - 90%, білки – 12 - 20%, ліпіди – 4 – 5%, нуклеїнові кислоти – 1-2%, вуглеводи – 1-2% . В складі цитоплазми розрізняють три шари: плазмолему – тонку оболонку; мезоплазму, яка становить основну масу цитоплазми; тонопласт – внутрішню мембрану, що відокремлює клітинний сік.

Ядро – зовні покрите подвійною оболонкою, що являє собою цитоплазматичну мембрану. В середині ядро заповнене ядерним соком, в якому знаходиться одно або кілька ядерць.

Вакуоля виникає в процесі життєдіяльності рослинної клітини. В ній нагромаджується клітинний сік – водний розчин кінцевих продуктів обміну.

Зовні клітина покрита оболонкою з порами, через які відбувається зв'язок між клітинами.

Під мікроскопом на виготовленому препараті буде помітна цитоплазма, білки якої під дією йоду забарвлюються в жовтий колір. Цитоплазма під мікроскопом зерниста, тому що білки, нуклеїнові кислоти і ліпіди в воді не розчинні. Ядро має більш інтенсивне забарвлення і розміщене в постійному шарі цитоплазми. Деяка частина клітин молодша і ядро знаходиться в центрі. Добре помітні оболонки клітин, в яких можна помітити пори у вигляді темних поперечних рисочок.

ХІД РОБОТИ

1. Виготовити зріз епідермісу з нижньої сторони листка традесканції і помістити в краплю води нижньою стороною вверх. Під мікроскопом потрібно розглянути шестигранні, безбарвні або забарвлені в блідо-фіолетовий колір, завдяки пігменту клітинного соку – антоціану, клітини. Знаходимо клітину з добре вираженим ядром, навколо якого помітні мілкі, безбарвні, округлі тільця – лейкопласти. Замалювати кілька клітин.

2. Виготовити препарат з м'якоті гарбуза. Розглянути препарат при малому і великому збільшеннях мікроскопа. Замалювати кілька клітин з хромопластами.

3. Виготовити препарати крохмальних зерен бульб картоплі, насінин гороху, розглянути при великому збільшенні і замалювати. Для цього з поверхні розрізаної бульби картоплі зшкребти трішечки вмісту клітин, виготовити препарат. Розглянути і замалювати овальні або яйцевидні не забарвлені крохмальні зерна. Провести реакцію забарвлення розчином йоду.

Також необхідно приготувати і розглянути препарат з насінин гороху. Розглянути великі, овальні крохмальні зерна, що мають велику кількість малих

алейронових зерен. Провести йодну реакцію, в результаті якої крохмальні зерна набувають синього кольору, а алейронові – жовтого.

На основі одержаних даних роблять відповідні висновки.

Робота 2. Визначення вмісту води і сухих речовин методом висушування

Матеріали і обладнання: 1) бюкси; 2) плоди і овочі; 3) аналітичні терези; 4) сушильна шафа; 5) ножі; 6) ексікатор; 7) тигельні щіпці.

В кількісному відношенні вода є основною частиною тіла рослини, особливо багато її в молодих органах, що ростуть. Значення води визначається тим, що всі біохімічні процеси у клітині можуть відбуватися лише у рідкому середовищі.

По вмісту води різні види плодів і овочів значно відрізняються – від 75% в картоплі до 97% - в огірках. Вода, яка міститься в плодах і овочах нерівномірно розміщується по тканинах. Так, в покривних тканинах (шкірці) її значно менше, ніж в паренхімних (м'якоті). Більша частина води знаходиться в вільному стані і лише незначна її кількість в зв'язаному стані, тому всі плоди і овочі легко висушуються до 10-12% вологості. При середньому вмісті води на вміст сухих речовин припадає від 5 до 25 %. Значну частину сухих речовин складають вуглеводи. Від їх вмісту залежить перш за все загальний рівень сухих речовин.

ХІД РОБОТИ

На аналітичних терезах зважують два чистих висушених бюкса з точністю до одного міліграма – маса А (до початку роботи бюкси знаходяться в ексікаторі з сухим хлористим кальцієм або з концентрованою кислотою). Після чого в обидва бюкси вносимо близько 2 – 3 г подрібненого матеріалу. Подрібнювати плоди і овочі потрібно швидко ножами з нержавіючої сталі на пластмасових або дерев'яних дисках. Найбільший розмір частинок – близько 3 мм. Сушені плоди і овочі подрібнюють до 1-2 мм. Коренеплоди та зерняткові плоди зручно

подрібнювати на кухонних тертках із нержавіючої сталі, а ягоди – в фарфорових ступках. Отриману масу висушують.

Бюкси з сирію наважкою зважують (маса Б) і вміщують в шафу з регулюючою температурою, ставлячи кришку бюксів на ребро. В перші 20- 30 хв. температуру сушіння встановлюють – 100 - 105⁰С (для швидкого припинення діяльності ферментів), а потім знижують її до 80 - 90⁰С на час від 1 до 3 годин, в залежності від особливості продукту. Повністю досушують наважку при 105⁰ С. Сушити близько 3 годин. Вийняті із сушильної шафи бюкси накривають кришками і ставлять на 20 - 30 хв. для охолодження в ексікатор. Після охолодження бюкси з висушеним матеріалом зважують (маса В). Досушування і зважування повторюють декілька разів, поки різниця не буде дорівнювати 2 мг.

Результати визначень записують в таблицю:

| № бюкса | Маса бюкса (А) | Маса бюкса з сирію наважкою (Б) | Маса бюкса з сухою наважкою (В) | Вміст сухої речовини $\frac{B-A}{B-A} \cdot 100\%$ |
|---------|----------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| | | | | |

Вміст сухої речовини вираховують по кожному із двох бюксів окремо, а потім визначають середнє арифметичне із двох отриманих результатів. Розходження не повинно перевищувати 0,5 %. Точність методу + 1 %. Віднімаючи одержану величину від 100, отримуємо вміст води в %.

Робота 3. Визначення вмісту сухих розчинних речовин у плодах і овочах рефрактометричним методом

Матеріали і обладнання: 1) плоди і овочі; 2) рефрактометр РДУ; 3) терка; 4) ручний прес; 5) скляна паличка; 6) марлева серветка; 7) дистильована вода.

Сухі розчинні речовини в плодах і овочах представлені різними органічними і мінеральними сполуками, зокрема, простими вуглеводами (глюкозою, фруктозою, сахарозою), амінокислотами, органічними кислотами, вітамінами, мінеральними солями, розчинним пектином.

Принцип визначення сухих речовин рефрактометром полягає в тому, що показник заломлення поляризованого променя світла залежить від концентрації досліджуваного розчину. Якщо в розчині знаходиться речовина, то рефрактометром з відомою точністю можна визначити її концентрацію. Рефрактометричний метод широко використовують для оцінки якості плодів і овочів призначених для переробки, наприклад томатів, які поступають на концерні заводи, винограду, який направляється на виноробні пункти.

Підготовка рефрактометра до роботи

Для одержання в приладі чіткого поля зору регулюють освітлення за допомогою дзеркала. Перед початком визначень перевіряють встановлення нуля рефрактометра за дистильованою водою, одну – дві краплі якої наносять оплавленим кінцем скляної палички на нижню призму. Закривають кришку верхньої лінзи, спрямовують світло за допомогою дзеркала в її віконечко. Через окуляр знаходять границю світлого і темного поля зору і пунктирна лінія на шкалі повинна співпадати з 0 % при температурі 20⁰С. Якщо ці показники не збігаються, то спеціальним ключем шкалу встановлюють на нульову поділку. Усунення світлорозсіювання та встановлення чіткої межі світлої і темної половини поля зору досягають обертанням компенсатора. Вірність встановлення нульової поділки перевіряють 2-3 рази.

ХІД РОБОТИ

Призми рефрактометрів насухо витирають чистою марлею. Потім поміщують в прилад краплю досліджуваного розчину і проводять відлік показника заломлення світла. Слід мати на увазі, що при пресуванні перші і послідувачі краплі соку можуть мати різну концентрацію. Тому рекомендується досліджувати або перемішаний після пресування сік або брати середні його порції, а перші і останні відкидати. Визначення проводять не менше, ніж у двох паралельних пробах, кожна з яких повинна бути достатньо показовою.

Необхідно мати на увазі, що рефрактометр градується за сахарозою, а віджати пресом рослинний сік включає не тільки сахарозу, але й ряд інших речовин, які мають різноманітні показники заломлення. Тому отриманий за

допомогою рефрактометра результат показує лише деяку умовну величину, виражену в процентах сахарози. В зв'язку з цим, рефрактометром можна користуватися лише тоді, коли цікавить не абсолютна концентрація соку, а порівнянні величини цього показника в різних культур, сортів або варіантів досліду, в тому числі при визначенні фізіологічної потреби рослин у воді або при порівнянні різних селекційних зразків за вмістом сухих речовин в плодах. Достовірні дані по вмісту сухих речовин отримують лише в тому випадку, коли в соку досліджуваних зразків суха речовина в основному представлена цукрами (наприклад, в кавунів і томатів).

Якщо визначення проводиться не при 20⁰С, то в момент проведення аналізу фіксують температуру за термометром і роблять поправку за табл. 1.

1. Поправки на масову частку сухих розчинних речовин залежно від температури при рефрактометричному визначенні

| Температура °С | Поправка | | | | | | | | | |
|-------------------|--|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | При масовій частці сухих розчинних речовин у продукті, % | | | | | | | | | |
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |

Від показників рефрактометра відняти

| | | | | | | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 15 | 0,27 | 0,29 | 0,31 | 0,33 | 0,34 | 0,35 | 0,37 | 0,38 | 0,39 | 0,40 |
| 16 | 0,22 | 0,24 | 0,25 | 0,26 | 0,27 | 0,29 | 0,30 | 0,30 | 0,31 | 0,32 |
| 17 | 0,17 | 0,18 | 0,20 | 0,20 | 0,21 | 0,21 | 0,22 | 0,23 | 0,23 | 0,24 |
| 18 | 0,18 | 0,13 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,15 | 0,15 | 0,16 | 0,16 |
| 19 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,08 |

До показників рефрактометра додати

| | | | | | | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 21 | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,08 |
| 22 | 0,13 | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,16 | 0,16 | 0,16 |
| 23 | 0,19 | 0,20 | 0,21 | 0,22 | 0,22 | 0,23 | 0,23 | 0,24 | 0,24 | 0,24 |
| 24 | 0,26 | 0,27 | 0,28 | 0,29 | 0,30 | 0,31 | 0,31 | 0,31 | 0,32 | 0,32 |
| 25 | 0,33 | 0,35 | 0,36 | 0,37 | 0,38 | 0,39 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| 26 | 0,40 | 0,42 | 0,43 | 0,44 | 0,45 | 0,47 | 0,48 | 0,48 | 0,48 | 0,48 |
| 27 | 0,48 | 0,50 | 0,52 | 0,53 | 0,54 | 0,55 | 0,56 | 0,56 | 0,56 | 0,56 |
| 28 | 0,56 | 0,57 | 0,60 | 0,61 | 0,62 | 0,63 | 0,64 | 0,64 | 0,64 | 0,64 |
| 29 | 0,64 | 0,66 | 0,68 | 0,69 | 0,71 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 | 0,73 |
| 30 | 0,72 | 0,74 | 0,77 | 0,78 | 0,79 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,81 |

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Визначення науки біохімії та її значення для спеціалістів технологів харчової промисловості.
2. Предмет вивчення біохімії. Особливості біохімії як науки.
3. Практичне значення та завдання біохімії.
4. Історія становлення й розвиток біохімії рослин, роль у цьому вітчизняних вчених.
5. Поділ плодів і овочів на групи. Характеристика кожної групи.
6. Загальна будова рослинної клітини.
7. Будова та функції клітинних мембран.
8. Характеристика та значення пластид.
9. Мітохондрії, їх будова та функції.
10. Будова та функції ядра.
11. Функції та значення запасної тканини.
12. Будова та функції покривних тканин.
13. Характеристика механічних тканин.
14. Будова провідної системи. Значення та функції ксилеми та флоєми.
15. Вода, її вміст та значення для плодів і овочів.
16. Вміст та значення сухих речовин.

ТЕМА 2. АМІНОКИСЛОТИ, БІЛКИ І НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ, ЇХ БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ

Робота 4. Визначення окремих амінокислот методом розподільної хроматографії на папері

Принцип методу. Застосування методу розподільної хроматографії на папері для розділення суміші амінокислот ґрунтується на відмінностях у коефіцієнтах розподілу окремих амінокислот між двома рідинами, що не змішується. Використовуваний як інертний носій, хроматографічний папір здатний утримувати в порах значну масу нерухомої рідкої фази.

Коефіцієнт розподілу R_f який визначається як відношення відстаней, пройдених амінокислотою та рухомою фазою від точки старту, є характерною величиною для кожної амінокислоти в певних умовах досліду (склад розчинника, температура, сорт хроматографічного паперу).

Положення амінокислот на папері визначають за допомогою кольорової реакції з нінгідрином. У присутності нінгідрину окремі амінокислоти виявляються у вигляді плям, забарвлених у синій, фіолетовий або інші кольори (залежно від хімічної природи амінокислоти).

Ідентифікацію амінокислот у складі суміші проводять за розподілом відомих амінокислот (стандартів).

Матеріали і обладнання: 1) ексікатор або чашки Петрі; 2) пульверизатор; 3) мікропіпетки на 5-10 мкл; 4) сушильна шафа; 5) олівець; 6) лінійка; 7) годинник; 8) хроматографічний папір; 9) розчинник – суміш н-бутанолу, оцтової кислоти та води в співвідношенні 4:1:1; 10) суміш амінокислот і їхні стандарстні розчини (0,1%-ві розчини аланіну, лейцину та глутатіонової кислоти), 11) свіжоприготовлений нінгідриновий реактив (змішати 95 мл 0,5 %-го розчину нінгідригу в 95 %-му ацетоні, 1 мл льодяної оцтової кислоти та 4 мл дистильованої води).

ХІД РОБОТИ

Хроматографічний папір вирізати в формі круга, діаметр якого дорівнює поверхневому радіусу ексикатора або чашки Петрі. Простим олівцем круг розділити на сегменти. В центрі зробити невеликий отвір (діаметром 0,5 -1 см), у який вставити згорнутий в трубочку фільтрувальний папір (гніт). Змінюючи товщину й довжину гніту, що опущений у розчинник, можна регулювати швидкість подачі розчинника на хроматографічний папір.

Олівцем в основі гніту на хроматографічному папері в кожному сегменті намітити точку нанесення амінокислот. На один із сегментів за допомогою мікропіпетки нанести суміш амінокислот (5 – 10 мкл суміші аланіну, лейцину та глютамінової кислоти), на інші сегменти – такий же об'єм стандартного розчину чистих амінокислот. Після цього хроматографічний папір висушити на повітрі впродовж 10 хв. В ексикатор або чашку Петрі налити розчинник - суміш н-бутанолу, оцтової кислоти та води, такий об'єм, щоб гніт був занурений у розчинник. Кругову хроматографу далі помістити в ексикатор або між двома половинками чашки Петрі. Хроматографа з діаметром 12 см утвориться приблизно через 1 год., із діаметром 20 см – через 2 год. Після завершення розподілу (коли фронт розчинника дійде до встановленої відмітки) хроматографу висушити та проявити, обприскавши її нінгідриним реактивом із пульверизатора та прогрівши в сушильній шафі впродовж 10 хв. при температурі 110°C.

Порівнюючи положення плям суміші амінокислот із положенням плям амінокислот-стандартів, провести ідентифікацію плям суміші амінокислот. За допомогою лінійки визначити відстані, пройдені фронтом розчинника та амінокислот, і обчислити значення коефіцієнта розподілу.

Робота 5. Одержання розчину білків і вивчення їх властивостей. Якісні реакції на білок

Матеріали і обладнання: 1) колби на 100 мл; 2) лійки; 3) пробірки; 4) аміак; 5) фільтрувальний папір; 6) спиртівки; 7) мука бобових культур; 8) 2% -вий

розчин NaCl; 9) 50% NaCl; 10) концентровані кислоти – H₂SO₄; HCl; HNO₃; 11) аміак; 12) SiSO₄; 13) 10%-вий NaOH.

ХІД РОБОТИ

3-5 г муки насіння бобових культур насипають в колбочку і додають 20 – 30 мл 2 % розчину NaCl. Закривають колбочку пробкою, струшують протягом 3 хвилин і ставлять на відстоювання на 30 хв. Потім фільтрують, якщо фільтрат мутний, то фільтрують ще раз. В одержаному розчині виявляють глобулін, з яким проробляють наступні реакції:

1. Нерозчинність глобулінів у воді

Для цього в пробірку наливають 1 мл одержаного розчину і додають води, з'являється помутніння, в результаті випадання в осад глобуліну, якщо ж додати слабкого розчину нейтральної солі NaCl помутніння зникне в результаті розчинення білка глобуліну, який випав в осад.

2. Висолювання білків

В пробірку наливають 2-3 мл одержаного розчину білків і додають концентрований розчин NaCl. Коли концентрація досягне 50%, глобулін почне випадати в осад, а розчин помутніє. Якщо ж в пробірку додати води, то концентрація солі зменшиться, а білок, який випав в осад, знову перейде в розчин.

3. Коагуляція білків

В пробірку наливають 2-3 мл розчину білків і поступово нагрівають, доводячи до кипіння. При цьому з'являється помутніння і осад, що свідчить про коагуляцію білків. Цей осад не розчиняється при додаванні сольового розчину.

В пробірку наливають 2-3 мл розчину білків і додають кілька крапель сильної кислоти (H₂SO₄; HCl; HNO₃). Зразу ж утворюється осад, який теж не розчиняється при додаванні сольового розчину, тобто під впливом сильної кислоти теж відбувається коагуляція білків.

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ

1. Біуретова реакція

Розчин білка сильно підлужують їдким натрієм (10 % розчин) і потім додають краплями слабкий розчин CuSO_4 (блідо-голубого кольору), утворюється осад гідрату окису міді, який в присутності білків розчиняється і забарвлює розчин в фіолетовий колір (цю реакцію дають сполуки, які містять пептидну групу – $\text{CO} - \text{NH}$ – і складаються із декількох амінокислот).

2. Ксантопротейнова реакція

До розчина білків доливають сильну кислоту і відбувається звертання білків, а осад і розчин забарвлюється в жовтий колір (при нагріванні в більш яскравий). При доливанні аміаку жовтий колір переходить в оранжевий (ця реакція вказує на присутність в молекулі білків таких амінокислот, як фенілаланіну, тирозину і триптофану).

Робота 6. Визначення вмісту сумарних білків

Матеріали і обладнання: 1) колби на 100 мл; 2) пробірки; 3) піпетки; 4) боратний буфер; 5) біуретовий реактив; 6) ротатор; 7) центрифуга; 8) колориметр; 9) розмелене зерно бобових рослин.

Існує кілька методів кількісного визначення білків в рослинних тканинах: колориметричний, спектрофотометричний, а також за кількістю азоту, що міститься в чистому препараті білків після мінералізації останнього.

ХІД РОБОТИ

Підготовчі операції

Екстракція білків із тканин рослин базується на їх здатності при руйнуванні клітин (обробка детергентами, ультразвуком, розтирання матеріалу в ступці з кварцовим піском, гомогенізація, розмелювання на електричних млинках сухого рослинного матеріалу) розчинятися у воді, розчинах солей, органічних сполуках, кислотах і лугах, буферних розчинах. Буферні розчини забезпечують м'які умови видалення білків, при яких зберігається природна структура їх молекул. Для виділення більшої частини білкових речовин (препарат сумарних білків)

використовують буферні розчини з рН 8.

Виділення сумарних білків із свіжого рослинного матеріалу

В фарфорову ступку вносять 0,5 г рослинного матеріалу, додають невелику кількість промитого і прожареного кварцового піску і розтирають з 40 мл боратного буферу (рН 10), в який додано 0,2% бісульфіту натрію і кілька крапель октилового спирту. Потім вміст ступки кількісно переносять в два-три прийоми в конічну колбу на 100 мл. Ступку два рази споліскують боратним буфером (по 5 мл) в колбу.

Загальний об'єм боратного буферу в колбі не повинен перевищувати 50 мл.

Виділення сумарних білків із сухого рослинного матеріалу

Відважують на аналітичних терезах 0,3 г розмеленого зерна бобових культур або 0,8-1 г розмелених зернівок зернових культур. Наважку вміщують в колбу на 100 мл, заливають 50 мл боратного буферу з рН 10, що містить 0,2% бісульфіту натрію і п'ять-шість крапель октилового спирту. Колбу ретельно закривають пробкою і залишають на 1 год. при кімнатній температурі, щоб сухий матеріал увібрав в себе буфер. Потім колбу переносять на ротатор.

Наступні операції для виділення сумарних білків однакові для обох видів екстракції.

Колби збовтують на ротаторі на протязі 1 години. Потім знімають з ротатора, відкривають пробки і дають розчину сумарних білків відстоятися на протязі 15 хвилин. За допомогою піпетки із верхньої частини розчину обережно набирають 10 мл і кількісно переносять в центрифужні пробірки. Пробірки позначають восковим олівцем, урівноважують між собою, доливаючи буфер з рН 10. Пробірки центрифугують на протязі 15 хвилин, потім виймають в штатив, піпеткою відбирають 1 мл над осадовою рідиною, яку переносять в наступну чисту скляну пробірку і додають 4 мл біуретового реактиву. Пробірку обережно струшують і залишають на 30 хв. при кімнатній температурі, після чого колориметрують при 540 нм.

Побудова калібрувального графіка

На аналітичних вагах відважують 1 г казеїну і вносять в мірну колбу на 100

мл через лійку для сипких речовин, приливають буфер з рН 10 (до 2/3 об'єму колби). Колбу щільно закривають і струшують на ротаторі до повного розчинення казеїну. Потім колбу знімають з ротатора, доводять буфером до мітки, ретельно перемішують кілька разів. В 1 мл такого розчину міститься 10 мл білка. Із робочого стандартного розчину готують шкалу.

| Номер колби | Об'єм колби, мл | Стандартний розчин казеїну, мл | Боратний буфер з рН 10, мл | Концентрація білка, мг/л |
|-------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1 | 100 | 1 | 99 | 0,1 |
| 2 | 100 | 3 | 97 | 0,3 |
| 3 | 100 | 5 | 95 | 0,5 |
| 4 | 100 | 10 | 90 | 1,0 |
| 5 | 100 | 15 | 85 | 1,5 |
| 6 | 100 | 20 | 80 | 2,0 |

Піпеткою відбирають необхідну кількість стандартного розчину білків і переносять в колбу на 100 мл. Вміст колби доводять буферним розчином до мітки і перемішують. Для консервування в колби вносять по одній – дві краплі антисептика (толуол).

Шкалу, як і дослідні розчини забарвлюють в градуйованих пробірках на 10 мл. В пробірки із відповідних колб наливають по 1 мл розчину білків, додають по 4 мл біуретового реактиву, обережно перемішують і через 30 хв. колориметрують при 540 нм.

На основі одержаних даних будують калібрувальний графік. На осі ординат відкладають величини оптичної щільності білкових розчинів, на осі абсцис – концентрацію білка (мг/мл).

Вміст білка розраховують за формулою:

$$B = \frac{C \cdot V \cdot 100\%}{n \cdot 1000}, \%$$

де С – концентрація білків, мг/мл;

V – об'єм екстракту білків, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Амінокислоти, їх фізичні та хімічні властивості.
2. Характеристика замінних, незамінних і на пів замінних амінокислот.
3. Амінокислотний склад плодів і овочів.
4. Визначення поняття білка, його будова та елементарний склад.
5. Класифікація та функції білків.
6. Прості білки, їх представники.
7. Складні білки, їх представники.
8. Первинна структура організації білків.
9. Вторинна структура організації білків.
10. Третинна і четвертинна структура.
11. Нуклеїнові кислоти, їх будова та функції.
12. Дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК), їх будова та функції.
13. Рибонуклеїнові кислоти (РНК), їх будова та функції.
14. Транспортні РНК, їх функції.
15. Інформаційні (матричні) РНК, їх характеристика та функції.
16. Характеристика та функції рибосомних РНК.

ТЕМА 3. ВУГЛЕВОДИ

Робота 7. Визначення цукрів у плодах та овочах

Матеріали і обладнання: 1) досліджувані зразки плодів і овочів; 2) колби на 200 мл; 3) колби на 100 мл; 4) лійки; 5) мірні циліндри на 10-25 мл; 6) бюретки на 10, 25 мл; 7) піпетки на 1, 5 і 10 мл; 8) водяна баня; 9) 15% - вий розчин натрію вуглекислого безводного; 10) 30% - вий розчин свинцю оцтовокислого; 11) 20%-вий розчин натрію фосфорно - кислого; 12) насичений розчин сульфату натрію; 13) 1% - вий розчин $K_3 [Fe (CN)_6]$; 14) 10% - вий розчин цинку сірчано – кислого; 15) 20% - вий розчин калію йодистого; 16) 0,1 н розчин гіпосульфїту; 17) 0,1 н розчин сірчаної кислоти; 18) 0,1 н розчин соляної кислоти; 19) 1% - вий розчин

метиленового синього; 20) 0,2% - вий розчин метиленового червоного; 21) 2,5 н розчин гідроксиду натрію; 22) папір лакмусовий; 23) папір фільтрувальний.

Цукри в рослинному організмі виконують надзвичайно важливу роль, вони є джерелом енергії та запасних речовин, приймають участь у метаболізмі живих клітин.

Найбільш поширеними цукрами у плодах і овочах є моносахариди глюкоза і фруктоза, а також дисахарид сахароза.

Методи визначення вмісту цукрів ґрунтуються на відновлювальній здатності редуруючих цукрів – глюкози і фруктози. Сахароза не володіє відновлювальною здатністю, тому її попередньо розщеплюють в кислому середовищі на інвертний цукор. В основі ціанідного методу визначення вмісту цукрів лежить властивість редууючих моносахаридів відновлювати в лужному середовищі фериціанід калію $K_3 [Fe (CN)_6]$ (червона кров'яна сіль) у фероціанід калію $K_4 [Fe (CN)_6]$ (жовта кров'яна сіль) в присутності індикатора метиленовий синій. Редууючі цукри відновлюють його до безбарвної сполуки, що свідчить про закінчення реакції відновлення фериціаніду калію.

ХІД РОБОТИ

З добре подрібненої і перемішеної середньої проби зразків беруть наважку масою 20 – 25 г при вмісті цукру до 10% і масою 12-15 г – при більшому вмісті. Дистильованою водою наважку без втрат переносять у мірну колбу місткістю 200 – 250 мл і заповнюють її дистильованою водою більше ніж на половину. При аналізі плодів і овочів з підвищеним вмістом кислот вміст колби нейтралізують 10%-вим розчином гідроксиду калію чи натрію або 15%-вим розчином бікарбонату натрію, використовуючи лакмусовий папір. При аналізі мало кислих овочів, наприклад, моркви, капусти нейтралізацію не проводять.

Для прискорення екстрагування цукрів колбу з її вмістом витримують на водяній бані протягом 20-30 хв. при температурі 80⁰С, періодично збовтуючи. Потім вміст колби охолоджують до кімнатної температури. Для видалення з

розчину барвників, білкових і пектинових речовин мірним циліндром додають у колбу 5-7 мл 30% - го ацетату свинцю, добре збовтують і залишають на 5 хв. для осадження зазначених речовин і освітлення розчину. Ацетат свинцю повинен бути в надлишку. Для виявлення надлишку ацетату свинцю в склянку наливають 10-15 мл насиченого розчину сульфату натрію, занурюють скляну паличку спочатку в робочий розчин у колбі, а потім у розчин ацетату свинцю. Утворення у верхньому розчину в склянці світлої каламуті свідчить про надлишок ацетату свинцю. Надлишок ацетату свинцю видаляють додаванням у колбу розчину сульфату натрію до зникнення помутніння. Після цього в колбу доливають до мітки дистильовану воду, збовтують і фільтрують крізь складчастий фільтр. В одержаному фільтраті (А) визначають вміст редуруючих цукрів і дисахариду сахарози.

Визначення вмісту редууючих цукрів – глюкози і фруктози

Якщо вміст цукрів у розчині складає від 0,25 до 2%, то в конічну колбу на 100-150 мл наливають з бюретки 20 мл 1%-го розчину фериціанід калію, доливають циліндром 5 мл 2,5 н розчину гідроксиду калію і нагрівають до кипіння. З початком закипання в киплячу суміш додають 2-3 краплі 1%-го розчину метиленового синього. Якщо цукру в розчині менше 0,25%, то беруть 10 мл розчину фериціаніду калію та 2,5 мл гідроксиду калію. Киплячий розчин досліджують при періодичному струшуванні, титруючи отриманим фільтратом, поки забарвлення розчину не перейде з фіолетового до світло кремового. Дослідження проводять в двох аналітичних повтореннях.

Розрахунок вмісту редукованих цукрів проводять наступним чином: якщо для титрування було взято фериціаніду калію 20 мл і 5 мл лугу, то за формулою:

$$X = \frac{K \cdot (20,12 + 0,035 \cdot O_{\phi}) \cdot O_{\text{в}} \cdot 100}{M_{\text{н}} \cdot O_{\phi} \cdot 1000},$$

якщо для титрування було взято відповідно 10 і 2,5 мл, то за формулою:

$$X = \frac{K \cdot (10,06 + 0,0175 \cdot O_{\phi}) \cdot O_{\text{в}} \cdot 100}{M_{\text{н}} \cdot O_{\phi} \cdot 1000},$$

де X – вміст редуруючих цукрів, %;

K – поправочний коефіцієнт до титру 1% - го розчину фериціаніду калію;

O_{ϕ} - об'єм фільтрату, витраченого на титрування, мл;

$M_{\text{н}}$ – маса наважки досліджуваного матеріалу, г;

$O_{\text{в}}$ – загальний об'єм витяжки до фільтрування, мл;

коефіцієнти $20,12 + 0,035$ і $10,06 + 0,0175$ встановлені емпірично.

Розрахунок проводять з точністю до 0,1%. Кінцевим результатом вважають середнє арифметичне двох паралельних визначень. Різниця між паралельними визначеннями вмісту моносахаридів не повинна перевищувати 0,5%.

Визначення вмісту глюкози

В конічну колбу піпеткою переносять 10 мл досліджуваного фільтрату (A). В цю ж колбу додають 25 мл 0,1 н розчину йоду. Після цього обережно при постійному перемішуванні доливають приблизно 30 мл 0,1 н розчину гідроксиду натрію. Колбу закривають годинниковим склом і залишають на 10-15 хв. при кімнатній температурі в темному місці.

Потім годинникове скло обмивають дистильованою водою і вносять в колбу близько 35 мл 0,1 н розчину сірчаної кислоти. При цьому створюється слабо кисла реакція і вміст колби набуває бурого забарвлення внаслідок виділення надлишку йоду, який не прореагував. Залишок йоду відтитровують 0,1 н розчином гіпосульфиту до повного знебарвлення вмісту колби в присутності індикатора 1% - го розчину крохмалю.

Вміст глюкози розраховують за формулою:

$$X = \frac{(M_1 T_1 - M_2 T_2) \cdot O_1 \cdot 0,009 \cdot 100}{M_{\text{н}} \cdot O_2},$$

де X – вміст глюкози, %;

M_1 – кількість взятого 0,1 н розчину йоду, мл;

T_1 – поправка до титру 0,1 н розчину йоду, мл;

M_2 – кількість 0,1 н розчину гіпосульфїту, яка пішла на титрування, мл;

T_2 – поправка до титру 0,1 н розчину гіпосульфїту;

O_1 – загальний об'єм водної витяжки до фільтрування, мл;

O_2 – об'єм фільтрату, взятий для титрування, мл;

M_n – наважка, г;

0,009 – коефіцієнт перерахунку розчину йоду на глюкозу (1 мл 0,1 н розчину йоду окислює 0,009 г глюкози).

Визначення вмісту загальних цукрів і сахарози

Для визначення вмісту сахарози її необхідно попередньо перетворити в інвертний цукор. Для цього 50 мл фільтрату А переносять в мірну колбу на 100 мл, циліндром додають туди 3 мл концентрованої соляної кислоти (густиною 1,19) і нагрівають на водяній бані при температурі 68-70⁰ С протягом 5 хв. колбу охолоджують, обережно нейтралізують кислий розчин у колбі кристалічною содою в присутності червоного лакмусового паперу, доводять до мітки дистильованою водою і фільтрують через складчастий фільтр (якщо розчин чистий – можна не фільтрувати).

Одержаний фільтрат використовують для визначення вмісту сахарози і загального цукру.

В одержаному фільтраті визначають загальний цукор за тією ж методикою, що й редукуючі цукри, але в ньому розведення буде вдвічі більше, ніж у фільтраті А.

Для розрахунку вмісту сахарози необхідно від загальної кількості цукрів відрахувати вміст редукуючих цукрів, тобто визначених до інверсії, а різницю помножити на 0,95 (0,095 г сахарози утворює 1 г інвертного цукру):

$$X = (B - A) \cdot 0,95$$

де: X – вміст сахарози, %;

B – вміст цукру після інверсії, %;

A – вміст цукру до інверсії (редукуючих цукрів), %;

0,95 – коефіцієнт перерахунку на сахарозу.

Робота 8. Визначення вмісту клітковини (целюлози)

Матеріали та обладнання: 1) досліджуванні зразки плодів, овочів; 2) конічні колби на 300 мл; 3) мірний циліндр на 100 мл; 4) вертикальний (кульковий) холодильник; 5) електроплитка; 6) азбестова решітка; 7) порцеляновий тигель з пористим дном; 8) водоструменевий насос; 9) колба Бунзена; 10) сухий азбест; 11) суміш кислот (900 мл 70%-го розчину оцтової кислоти, щільність 1,068; 60 мл концентрованої азотної кислоти, щільність 1,4 і 24 г трихлороцтової кислоти).

Клітковина – полісахарид, який є основною складовою клітинних стінок плодів і овочів. Клітковина не представляє харчової цінності для організму, разом з тим вона має значення для нормальної роботи травної системи як механічний подразник стінок кишечника, посилюючий перистальтику кишок і пересування їжі.

Даний метод визначення клітковини базується на тому, що вона не розкладається концентрованою азотною кислотою в суміші з оцтовою і три хлороцтовою кислотами.

ХІД РОБОТИ

Беруть 5 г абсолютно сухого матеріалу з точністю до мг і переносять цю наважку конічну колбу ємністю близько 300 мл, в неї вносять 100 мл кислотної суміші, яка розщеплює всі органічні речовини, окрім клітковини. Колбу з'єднують з вертикальним водяним холодильником. З'єднання колби з холодильником повинно бути пришліфоване, в крайньому випадку можна використати щільний корковий корок. Колбу обережно нагрівають на електроплитці з азбестовою решіткою до кипіння і кип'ятять приблизно 30 хв.

Після цього в колбу разом з невеликою кількістю гарячої дистильованої води вносять 0,3 г точно зваженого сухого азбесту, збовтують і фільтрують через зважений порцеляновий тигель з пористим дном (діаметр тигля – 3 см, висота – 6 см, діаметр пор – 90 - 150 мк) з відсмоктуванням. Пристрій для фільтрування з відсмоктуванням складається з водоструменевого насоса, колби Бунзена і тигля. Залишок на тиглі промивають великою кількістю гарячої дистильованої води до зникнення кислоти реакції фільтрату, потім залишок промивають без відсмоктування невеликою кількістю спирту і етилового ефіру (приблизно 50 мл).

Тигель з промитим залишком висушують в сушильній шафі при температурі близько 130⁰ С, охолоджують і зважують.

Вміст клітковини розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 100}{H},$$

де : X – вміст клітковини, % до сухої маси;

a – маса клітковини (маса тигля з азбестом і залишком після гідролізу і висушування мінус маса тигля з азбестом), г;

h – наважка сухої маси досліджуваного матеріалу, г.

Робота 9. Визначення вмісту пектинових речовин колориметричним методом

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні зразки плодів та овочів; 2) технічна вага; 3) ФЕК; 4) водяна баня; 5) бюретка; 6) піпетки; 7) мірні колби на 50 і 100 мл; 8) конічні колби на 150 мл; 9) пробірки; 10) галактуронова кислота; 11) 0,2%-ий розчин карбазолу в абсолютному етанолі; 12) розчин бури в 100 мл концентрованої кислоти; 13) етиловий спирт.

Пектинові речовини являють собою полімерні сполуки. Вони складаються в основному із залишків α - галактуронової кислоти, яка є похідною глюкози. Пектинові речовини – це декілька груп: пектова кислота, пектини, пектати, протопектини.

В присутності цукрів і кислот пектинові речовини утворюють драглі, що є однією із основних їхніх фізико-хімічних властивостей.

Пектинові речовини обумовлюють щільність м'якуша плодів і овочів. Під час досягання плодів і овочів водонерозчинний протопектин перетворюється у водорозчинний пектин, який переходить у вакуолю, що зумовлює розм'якшування тканин м'якуша.

Метод визначення вмісту пектинових речовин базується на кількісному обліку галактуронової кислоти, що утворюється при їх гідролізі за допомогою забарвлення карбазолом у сірчаноокислому середовищі. Оптична густина розчинів, забарвлених карбазолом, прямо пропорційна концентрації галактуронової кислоти. Вимірювання оптичної густини досліджуваних розчинів проводять на фотоелектроколориметрі. Для визначення вмісту галактуронової кислоти в досліджуваному розчині будують калібрувальну криву в залежності від оптичної густини забарвлених карбазолом розчинів галактуронової кислоти відомої її концентрації. Для цього готують водні розчини галактуронової кислоти відомих концентрацій і кожного із них беруть в окремі пробірки по 0,5 мл. Далі в пробірки додають обережно з бюретки при охолодженні (вода з льодом) по 3 мл розчину сірчаної кислоти з бурою і нагрівають на водяній бані при кипінні протягом 6 хв. Після охолодження (вода з льодом) в кожен пробірку вносять по 0,1 мл 0,2%-го розчину карбазолу і ставлять на киплячу водяну баню на 10 хв. Охолоджують і проводять виміри оптичної густини на фотоелектроколориметрі, використовуючи зелений світлофільтр і кювети з робочою довжиною 5 мм.

ХІД РОБОТИ

Наважку 0,5 г середнього зразку плодів та овочів переносять в конічну колбу місткістю 150 мл, заливають 25 мл спирту (якщо вміст пектину визначають у

слабо забарвлених плодах чи овочах, то використовують 50 мл, а якщо в інтенсивно забарвлених – 70 мл спирту і кількість екстракцій збільшують), кип'ятять із зворотним повітряним холодильником 30 - 40 хв. Осад відфільтровують, ще раз заливають 15 мл спирту і ставлять на 15 хв. на водяну баню, знову відфільтровують, заливають залишком спирту (10 мл) і ще екстрагують 10 хв., відфільтровують.

Фільтр підсушують і осад без втрат знову переносять в конічну колбу і доливають 40 мл дистильованої води. Колбу нагрівають на водяній бані при 50⁰ С протягом 30 хв. Суспензію відфільтровують у мірну колбу на 50 мл, промиваючи фільтр невеликими порціями дистильованої води, фільтрат доводять до мітки і за вмістом галактуронової кислоти визначають вміст *водорозчинного* пектину.

Решту осаду з фільтра знову переносять в ту саму конічну колбу, додають 80 мл 1 н сірчаної кислоти і витримують на киплячій водяній бані 1 год. Після охолодження розчин фільтрують в мірну колбу на 100 мл. Доводять до мітки 1 н сірчаною кислотою і визначають вміст *протопектину*.

В дві пробірки беруть по 0,5 мл досліджуваного розчину (додатково одна пробірка служить для контролю, в яку додають всі реактиви, окрім досліджуваного розчину і дистильовану воду). Після цього при охолодженні (вода з льодом) з бюретки по краплях додають 3 мл концентрованої сірчаної кислоти з боратом, не допускаючи перегрівання суміші. Потім пробірки нагрівають 6 хв. на киплячій водяній бані і охолоджують водою з льодом. Після охолодження в кожну пробірку додають по 0,1 мл 0,2% - го розчину карбазолу. Всі пробірки знову поміщають у киплячу водяну баню на 10 хв. Охолоджують і проводять вимірювання показників оптичної густини розчинів.

Розрахунки проводять за калібрувальною кривою, яка побудована за галактуроновою кислотою (табл.1)

Величина оптичної густини розчину, яка відповідає вмісту
галактуронової кислоти

| Галактуронова кислота (мкг) | Оптична густина | Галактуронова кислота (мкг) | Оптична густина |
|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| 4 | 0,055 | 25 | 0,238 |
| 6 | 0,073 | 30 | 0,282 |
| 8 | 0,091 | 25 | 0,325 |
| 10 | 0,102 | 40 | 0,368 |
| 15 | 0,152 | 45 | 0,410 |
| 20 | 0,195 | 50 | 0,454 |

Робота 10. Визначення вмісту крохмалю в м'якоті плодів та в коренеплодах

Матеріали і обладнання: 1) 0,5 н розчин $K_2Cr_2O_7$; 2) 80 – вий % розчин $Ca(NO_3)_2$; 3) 0,5 - вий % розчин йоду в розчині KJ; 4) 0,1 н розчин тіосульфату.

Крохмаль – це полімер глюкози, який складається із двох полісахаридів: амілози (25%) і амілопектину (75%). Амілоза більш легше розчиняється і володіє меншою в'язкістю ніж амілопектин. При нагріванні під дією кислот крохмаль розщеплюється на полісахариди з меншою молекулярною масою – декстрини. Вони гідролізуються до дисахариду мальтози, а остання – до глюкози.

Найбільш характерною реакцією крохмалю є його якісне виявлення. Він забарвлюється в синьо-фіолетовий колір за допомогою розчину йоду в йодистому калію, зокрема амілоза дає з йодом сине забарвлення, а амілопектин – червоно-фіолетове.

В рослинах крохмаль відкладається у вигляді зерен, круглих або еліптичних, які мають пошарову будову, а також є різними по розміру. Встановлено, що різниця крохмалю різних рослин обумовлена в основному різницею в будові амілопектину, тоді як амілоза є більш подібною.

Виділення крохмалю із бульб картоплі

Бульби картоплі труть на тертці, заливають водою і віджимають через марлю. Одну і ту саму порцію обробляють 3 рази, кожний раз новою порцією

води і об'єднують отриману суспензію, в якій і знаходиться крохмаль. Для вилучення білків крохмаль заливають 10-% розчином хлористого натрію і дають відстояти на протязі 2 годин. Рідину зливають, а крохмаль відмивають від хлористого натрію спочатку прокип'яченою (холодною) водою, а потім – дистильованою.

Визначення крохмалю об'ємним методом

Даний метод базується на отриманні комплексної сполуки крохмалю з йодом, наступним окисненням крохмалю біхромату і йодометричним обліком надлишку останнього.

ХІД РОБОТИ

Отримання розчину крохмалю

Беруть 1 г бульб картоплі, розтирають в ступці з 5 мл 80-% розчину азотнокислого кальцію, переносять в конічну колбу на 200 мл, залишок змивають 25 мл 80-% розчином $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, колбу накривають скляною лійкою, ставлять на електроплитку і кип'ятять (несильно) 3 хв. При цьому крохмаль переходить в розчин. Після охолодження лійку споліскують водою. Вміст колби переносять в мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки водою, перемішують і фільтрують через складчастий фільтр.

Осідання крохмалю

Піпеткою набирають 5 мл фільтрату і переносять в центрифужну пробірку, доливають 2 мл 0,5 %-го розчину йоду, перемішують скляною паличкою і залишають на 30 хв. При цьому осідається сполука крохмалю з йодом, яка містить 14 - 16 % йоду. Потім центрифугують і прозорий розчин зливають, осад промивають 5 %-м розчином $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ декілька разів, при цьому кожний раз приливають 5 мл, і перемішуючи осад з розчином скляною паличкою, яку потім промивають тим же розчином. Промивання повторюють 3 – 6 разів, в залежності від кількості домішків.

Окислення крохмалю

Промитий осад крохмалю з йодом зливають в конічну колбу на 200 мл невеликими порціями води – по 0,2 – 0,3 мл, добре перемішуючи скляною

паличкою. Загальна кількість води не повинна перевищувати 3 мл. В колбу додаємо 10 мл 0,5 н розчину $K_2Cr_2O_7$, перемішують і зразу ж вміщують на 15 хв. на кип'ячу водяну баню. При цьому крохмаль окисляється біхроматом до вуглекислого газу і води.



Потім колбу знімають, дають охолонуть, доливають 5 мл 20 %-го розчину йодистого калію, який реагуючи з залишком біхромату, виділяє йод; останній відтитровують 0,1 н розчином тіосульфату, під кінець додають 1 мл 0,5 % -го розчину крохмалю (1 мл 0,1 н розчину тіосульфату відповідає 0,675 мг крохмалю).

Окремо відбирають 10 мл 0,5 н розчин $K_2Cr_2O_7$ доливають 120 мл води, прибавляють 5 мл 20 % - го розчину йодистого калію і відтитровують 0,1 н розчином тіосульфату.

Вміст крохмалю розраховують за формулою:

$$X = \frac{0,675 \cdot V \cdot T (a - a_1)}{V_1 \cdot n}$$

де, а - об'єм розчину тіосульфату, використаного при контрольному титруванні біхромату калію, мл;

a_1 - об'єм розчину тіосульфату, використаного при визначенні крохмалю, мл;

V - об'єм досліджуваного розчину, в якому розчинена наважка досліджуваної речовини, мл;

V_1 - об'єм досліджуваного розчину, взятого для осідання крохмалю, мл;

T – титр розчину тіосульфату, мг;

n – маса наважки, г .

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Визначення поняття вуглеводи.
2. Фізіологічна роль вуглеводів в плодах і овочах.
3. Транспортні форми вуглеводів.
4. Запасні форми вуглеводів.
5. Сахароза, мальтоза, їх будова та значення.
6. Целюлоза і геміцелюлоза, їх характеристика та значення.
7. Крохмаль, його будова та значення для рослин.
8. Загальні властивості моноцукрів.
9. Характеристика окремих представників: глюкози, фруктози, арабінози і ксилози.
10. Перетворення крохмалю і цукру в бульбах картоплі.
11. Пектинові речовини, їх значення та вміст в плодах і овочах.
12. Обмін вуглеводів під час зберігання плодів і овочів.
13. Синтез та перетворення вуглеводів у рослинах.
14. Перетворення моносахаридів і дисахаридів при дозріванні плодів і овочів.
15. Синтез та розщеплення полісахаридів.
16. Вуглеводний обмін при формуванні плодів та овочів.

ТЕМА 4. ОРГАНІЧНІ КИСЛОТИ ТА ЛІПІДИ

Робота 11. Визначення загальної кислотності плодів і овочів титрометричним методом

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні об'єкти; 2) конічні колби на 200 мл; 3) крапельниця; 4) лакмусовий папір; 5) фільтрувальний папір; 6) термометр; 7) бюретки на 25 мл; 8) 1% - вий спиртовий розчин фенолфталеїну; 9) 0,1 н розчин їдкого натрію або калію.

Органічні кислоти відіграють надзвичайно важливу роль у метаболізмі живих клітин. Вони мають місце в обміні вуглеводів, білків, жирів. Завдяки

перетворенням органічних кислот в циклі Кребса живі клітини забезпечуються енергією і важливими проміжними продуктами, які і є вихідними для синтезу органічних сполук.

Кількісний вміст органічних кислот в рослинах змінюється залежно від добових і сезонних змін. Встановлено, що різні види і сорти рослин відрізняються за вмістом в них окремих органічних кислот.

Яблучна, лимонна, винна, щавлева і інші кислоти знаходяться в рослинах не тільки в вільному стані, але і у вигляді солей, головним чином калію, натрію і кальцію. При титруванні нейтральні солі майже не враховуються, а титрують виключно вільні кислоти. Розчини солей органічних кислот в суміші з вільними кислотами складають буфери. В плодах і ягодах переважають вільні кислоти, а в листках вони містяться головним чином у формі солей. Кислотність плодів є не тільки сортовою, але і видовою ознакою. Так, титруючи кислотність, яка виражена в кількості яблучної кислоти в свіжих плодах, коливається : для груш – від 0,1 до 0,6 %; слив – від 0,4 до 3,5%; лимона – від 3,8 до 8%; граната від 0,2 до 9%.

Титрометричний метод базується на титруванні лугом всіх кислот, які містяться в досліджуваному матеріалі.

ХІД РОБОТИ

Із подрібненої середньої проби відбирають 20 г з точністю до 0,01 г, без втрат переносять в мірну колбу на 200 або 250 мл, змиваючи гарячою (температура 80⁰С) дистильованою водою. Гарячою дистильованою водою вміст колби доводять $\frac{3}{4}$ об'єму, добре збовтують і настоюють протягом 30 хв., періодично збовтуючи. Потім колбу охолоджують водопровідною водою до кімнатної температури, доливають дистильованою водою до мітки і добре збовтують. Вміст колби фільтрують через сухий складчастий фільтр в суху колбу. Фільтрат використовують для визначення загальної кислотності.

Відмірюють 50 мл фільтрату і переносять і конічну колбу на 200 або 250 мл, додають 3-5 крапель 1%-го спиртового розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н

розчином лугу до рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с., якщо фільтрат дуже забарвлений, його розводять, доливаючи до титрування в конічну колбу рівний об'єм дистильованої води.

Загальну кислотність в перерахунку на відповідну кислоту розраховують за формулою:

$$X = \frac{M \cdot K \cdot O_n \cdot 100}{M_n \cdot O_p}$$

де: X – загальна кислотність, %;

M – кількість 0,1 н розчину лугу, витраченого на титрування, мл;

K – коефіцієнт перерахунку на відповідну кислоту: яблучну (більшість плодів і овочів) – 0,0067; лимонну (ягоди і цитрусові) – 0,0064; щавлеву (щавель, ревінь, шпинат) – 0,0063; винну (виноград) – 0,0075;

O_n – загальний об'єм подрібненої досліджуваної маси і води в мірній колбі, мл;

M_n - наважка досліджуваного об'єкту, г;

O_p - об'єм фільтрату, взятого для титрування, мл.

Робота 12. Визначення вмісту лимонної кислоти в плодах і овочах

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні зразки плодів і овочів; 2) 20% H_2SO_4 ; 3) 30% - вий розчин KBr; 4) 5%-ий розчин $KMnO_4$; 5) насичений розчин сірчаноокислого заліза (40 г в 100 мл води, підкисленого сірчаною кислотою); 6) 0,1 н розчин NaOH або KOH; 7) 5% - вий розчин фосфорновольфрамівної кислоти або метафосфорної кислоти; 8) колби мірні на 250 мл і 200 мл.

Лимонна кислота $CH_2(COOH) - C(OH)(COOH) - CH_2(COOH)$ являється одним із компонентів циклу три карбонових кислот. Вона накопичується в значній кількості в плодах і листках. В плодах цитрусових вона становить біля 90% всіх кислот.

Визначення лимонної кислоти в плодах і листках базується на окисленні лимонної кислоти перманганатом калію до ацетон дикарбоновою кислоти, яка після додавання бром утворює осад пентабромацетон, який і визначається об'ємним методом.

ХІД РОБОТИ

Наважку 5-10 г ретельно розтирають в ступці з 5 мл 20%-ої H_2SO_4 з додаванням піску, потім переносимо в мірну колбу на 250 мл і доводимо дистильованою водою до 200 мл.

Суміш ретельно збовтуємо і залишаємо на 2 години, при цьому неодноразово збовтуємо. Після цього додаємо 5-10 мл 5%-ої метафосфорної кислоти і доводимо дистильованою водою до 250 мл, добре перемішуємо і фільтруємо через фільтр в суху колбу.

Потім відбираємо 50 мл фільтрату і переносимо в мірну колбу на 200 мл, додаємо 5 мл 30%-го розчину KBr , 10 мл розведеної сірчаної кислоти (1:1) і після розмішування швидко додаємо 20 мл 5% розчину $KMnO_4$. Суміш залишаємо на 10 хв., періодично збовтуючи, потім охолоджуємо до $t + 10^0C$. Якщо бурий осад, який з'явився зник, то визначення можна повторити з додаванням дещо більшої кількості $KMnO_4$.

Надлишок окислювача видаляють додаванням 20 мл насиченого розчину сірчаноокислого заліза або 3% H_2O_2 по краплям до повного освітлення. Суміш з утвореним в цих умовах пентабромацетоном ставлять у воду зі льодом або в холодильник і залишають на ніч. За цей період мутний розчин поступово освітлюється, а осад ущільнюється на дні колби.

Потім зливають рідину з осаду, решту рідини з осадом фільтрують, а потім фільтр з осадом ретельно промивають до нейтральної реакції по метилоранжу. Осад пентабромацетону повинен бути чисто білим або блідо забарвленим. Стаканчик з осадом висушують і знаючи його суху масу визначають масу осаду пентабромацетону $CNBr_2 - CO - CBr_3$ 1 мг якого дорівнює 0,483 мг лимонної кислоти.

Вміст лимонної кислоти вираховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot n}, \text{ мг}$$

де a – маса лимонної кислоти, одержаної після перемноження на 0,483 мг;

V - об'єм витяжки, мл (250 мл);

V_1 - об'єм витяжки, взятої для окислення, мл (200 мл);

n – наважка, г.

Робота 13. Визначення щавлевої кислоти в плодах і овочах

Матеріали і обладнання: 1) колби на 250 мл; 2) лійки; 3) фільтрувальний папір; 4) колби на 100 мл; 5) борна кислота; 6) 10%-вий розчин H_2SO_4 ; 7) аміак; 8) 1%-вий розчин $AgNO_3$; 9) 0,1 н розчин $KMnO_4$.

Реактив для осадження щавлевої кислоти : 25 г $CaCl_2$ розчиняємо в невеликій кількості води, переносимо в мірну колбу на 500 мл і доливаємо до мітки 50% CH_3COOH і розчин 330 г кристалічно оцтовокислого натрію в 300 мл води, обидва розчини перемішуємо, реактив витримуємо 48 годин при $3-7^0$ С і фільтруємо.

Щавлева кислота ($COOH - COOH$) присутня в плодах і ягодах в незначній кількості (сотій частці відсотку), але в таких овочевих рослинах як ревінь, листя буряків її досить багато і вона знаходиться у вигляді калієвої солі ($COOH - COOK$), в ревені – у складі оксалату кальцію ($COOH - COO (Ca)_2$). Остання сіль нерозчинна у воді і в клітинному соку виявлена у вигляді зрослих кристалів – друзів. Щавлева кислота пекуча за смаком, її солі швидше шкідливі, ніж корисні для організму людини. Використовувати щавель і ревінь в їжу краще навесні. В цей період в них переважають яблучна і лимонна кислоти, щавлевої ще небагато.

ХІД РОБОТИ

Наважку 10 г (листки, стебла) розтирають у фарфоровій ступці із піском, потім додаємо 5 мл 10% H_2SO_4 , одержану масу переносимо в мірну колбу і доливаємо до 250 мл дистильованої води, збовтуємо і відставляємо на ніч. В другу колбу відбираємо по 50 мл витяжки і додаємо аміак до лужної реакції, а потім 1-2 г борної кислоти (для осадження солі винної кислоти). В подальшому додаємо 10 мл реактиву для осадження щавлевої кислоти і залишаємо на 48 год. Рідину над осадом відфільтровуємо, а осад в пробірці промиваємо до негативної реакції на хлор (проба 1% розчином $AgNO_3$) до утворення білого осаду $AgCl\downarrow$. Потім цей осад розчиняють в 5 мл 10% H_2SO_4 і після нагрівання на водяній бані відтитровують щавлеву кислоту перманганатом калію до блідо-рожевого кольору.

Вміст щавлевої кислоти вираховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot a \cdot K \cdot 100}{V_1 \cdot n}$$

Де: X – вміст щавлевої кислоти, мг;

V – загальний об'єм витяжки (250 мл);

a – кількість 0,1 н $KMnO_4$, яка пішла на титрування, мл;

V_1 - об'єм витяжки, взятої для осадження (50 мл);

K – поправка до титру (4,5);

n – наважка (10 г)

Робота 14. Визначення вмісту жиру рефрактометричним методом

Матеріали і обладнання: 1) рефрактометр РЛУ; 2) фарфорові ступки; 3) лійки; 4) піпетки на 5 мл; 5) пробірки; 6) папір фільтрувальний; 7) пісок кварцовий; 8) монобромнафталін – α .

Ліпіди і ліпідоподібні речовини являють собою досить різноманітну в хімічному плані групу. У групі ліпідів можна виділити жири – це ліпіди, які при кімнатній температурі залишаються твердими, і рослинні олії, що при кімнатній температурі є рідкими. У хімічному плані власне ліпіди є похідними спиртів і так званих жирних кислот, будучи складними ефірами. У даний час у рослин встановлено вже більше 1300 видів різних ліпідів, які виконують найважливіші біологічні функції. Насамперед, вони широко виступають як конституційні речовини, що беруть участь у побудові мембран, протоплазми, органел клітин. Не менш важлива енергетична функція ліпідів, пов'язана з тим, що в багатьох рослин ліпіди виступають як дихальний матеріал, окислення якого забезпечує рослину енергією у вигляді АТФ. Тому ліпіди виступають як один з найважливіших видів запасного поживного матеріалу в насінні.

Найбільш цінними вважаються рослини, що дають невисихаючі жирні або слабо висихаючі олії, у ліпідах яких переважають насичені жирні кислоти. Це олії соняшникова, макова, арахісова, маслинова, соєва, гірчична. У них середній вміст олії становить: соняшник (у ядрі) – до 56%, льон – 37%, бавовник – 23%, гірчиця - 32%, рицина – 60%, мак – 60%, волоський горіх – 72%.

ХІД РОБОТИ

Подрібнену наважку масою 4 г переносимо у фарфорову ступку, додаємо 4 г сірчаноокислого натрію і 3 г піску, ретельно розтираємо на протязі 1 хвилини, після чого додаємо 5 мл монобромнафталіну в 2 прийоми: спочатку 3 мл і розтираємо наважку на протязі 1 хвилини, потім додаємо 2 мл. І розтираємо на протязі 3 хвилин. Одержану суміш фільтруємо через паперовий фільтр або вату. Потім 1 – 2 краплі фільтрату наносимо на призму рефрактометра і визначеній температурі відмічаємо коефіцієнт заломлення фільтрату.

При визначенні коефіцієнта заломлення розчину жиру у фільтраті в умовах температури, яка відхиляється від 20⁰ С, вносимо відповідну поправку (+) або (-) 0,0004.

Вміст жиру в процентах вираховують за формулою:

$$X = \frac{V_p \cdot d_{\text{ж}}}{g} \cdot \left(\frac{K_p - K_{\text{ф}}}{K_{\text{ф}} - K_{\text{ж}}} \right) \cdot 100,$$

де V_p – об'єм розчинника, скоректований на об'єм, в мл (5 мл);

$d_{\text{ж}}$ – щільність жиру при 20⁰С, (0,93);

g – наважка досліджуваного продукту, в г (4 г);

K_p – коефіцієнти заломлення розчинника при 20⁰С, (1,6582);

$K_{\text{ф}}$ – коефіцієнт заломлення одержаного фільтрату (показники рефрактометра);

$K_{\text{ж}}$ – коефіцієнт заломлення жиру, який міститься в досліджуваному продукті (1,41).

Робота 15. Вивчення властивостей жирів та визначення їх констант

Матеріали і обладнання: 1) соняшникова олія; 2) жовч; 3) 1% - вий розчин карбонату натрію; 4) 50% - вий спиртовий розчин КОН; 5) розчин калієвого мила; 6) концентрована НСІ; 7) 0,1 н розчин КОН; 8) 0,1% - вий спиртовий розчин фенолфталеїну; 9) спирт; 10) бензол; 11) 0,5 н спиртовий розчин НСІ; 12) 0,5 н розчин КОН ; 13) 0,1 н спиртовий розчин йоду; 14) 1% - вий розчин крохмалю; 15) 0.1 н розчин гіпосульфїту.

ХІД РОБОТИ

1. Емульгування жиру

Жири з водою утворюють нестійку емульсію, яка при стоянні швидко розшаровується. Цього можна уникнути, якщо додати до неї речовину, яка буде знижувати поверхневий натяг і запобігати злиттю дисперсованих часток жиру. До таких речовин відносяться білки, мила, розчини лугів.

В три пробірки наливаємо по 1 мл дистильованої води і додаємо по 3 краплі соняшникової олії. Потім в другу пробірку додаємо 5 крапель жовчі, а в третю – 5 крапель розчину Na_2CO_3 . Енергійно струшуємо всі три пробірки і спостерігаємо утворення емульсії.

2. Лужний гідроліз жиру

Жири в присутності лугів гідролізуються, утворюючи мило і гліцерин.

У колбочки на 50 мл вносимо 0,5 мл олії, додаємо 10 мл 50% - вого спиртового розчину КОН, перемішуємо і кип'ятимо протягом 1 години. Після омилення розчин доводимо до об'єму 20 мл дистильованою водою. Розчин калієвого мила використовуємо для подальших реакцій.

При додаванні до мила сильної кислоти, вона витісняє з нього більш слабкі вищі жирні кислоти, які нерозчинні у воді і збираються на поверхні розчину.

У пробірку з 5 мл калієвого мила додаємо 1 мл концентрованої НСІ. Спостерігається утворення вільних жирних кислот.

3. Визначення констант жиру:

а) визначення кислотного числа жиру

Кислотність жиру або кислотним числом називають число міліграмів КОН потрібне для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Кислотне число характеризує якість масла.

В конічну колбу на 50 мл вносимо 2 г рослинного або іншого жиру, додаємо 4 мл суміші спирту і бензолу (1:1) і 2 краплі розчину фенолфталеїну. Після цього розчин у колбі титруємо 0,1 н розчином КОН до появи блідо-рожевого забарвлення, яке не зникає на протязі 30 секунд.

1 мл 0,1 н розчину КОН відповідає 5,6 мг КОН.

Кислотне число розраховуємо за формулою:

$$K = \frac{a \cdot 5,6 \cdot f}{m},$$

де а – об'єм 0,1 н розчину КОН, який витрачений на титрування наважки жиру, мл;

m – наважка жиру, г;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,1 н КОН.

б) визначення числа омилення жиру

Числом омилення називається кількість міліграмів гідроксиду калію, яка потрібна для нейтралізації всіх вільних і зв'язаних кислот, що містяться в 1 г жиру.

Беруть дві конічні колбочки на 50 мл. В одну колбочку поміщають 0,5 г жиру, а в другу 0,5 мл води. В обидві колбочки доливаємо по 15 мл 0,5 н спиртового розчину КОН і кип'ятимо на водяній бані із зворотним холодильником 50 хвилин. Після цього в обидві колбочки додаємо по 10 крапель 0,1% розчину фенолфталеїну і титруємо 0,5 н розчином НСІ до зникнення рожевого забарвлення.

1 мл 0,5 н розчину КОН відповідає 28 мг КОН.

Число омилення розраховуємо за формулою:

$$Ч.О. = \frac{(B - A) \cdot 28 \cdot f}{m},$$

де В – кількість мл 0,5 н розчину НСІ витраченого на титрування контролю;

А – кількість мл 0,5 н розчину НСІ витраченого на титрування проби після гідролізу жиру;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,5 н розчину НСІ;

m – наважка жиру в грамах.

в) визначення йодного числа жиру

Йодним числом називається кількість грамів йоду, яка може прореагувати з 100 г жиру.

В конічну колбочку на 100 мл вносимо наважку жиру 0,1-0,2 г, який розчиняємо у 10 мл спирту, якщо потрібно, то вміст колбочки злегка підігріваємо на водяній бані. Потім додаємо 10 мл 0,1 н спиртового розчину йоду, добре збовтуємо і додаємо іще 20 мл дистильованої води, знову добре збовтуємо і залишаємо на 5 хвилин.

Після цього титруємо 0,1 н розчином гіпосульфїту до слабо-жовтого забарвлення, а потім додаємо 1 мл розчину крохмалю і титруємо до виникнення синього забарвлення.

Контрольна проба. В колбочку на 100 мл вливаємо 10 мл 0,1 н спиртового розчину йоду і додаємо 20 мл дистильованої води, потім відтитруємо 0,1 н розчином гіпосульфїту.

1 мл 0,1 н розчину гіпосульфїту відповідає 0,0127 г йоду.

Йодне число розраховуємо за формулою:

$$Й.Ч. = \frac{(B - A) \cdot 0,0127 \cdot 100}{m},$$

де В – кількість мл 0,1 н розчину гіпосульфїту витраченого на титрування контрольної проби;

А – кількість мл 0,1 н розчину гіпосульфїту витраченого на титрування дослідної проби;

m – наважка жиру в грамах.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальна характеристика органічних кислоти.
2. Значення органічних кислот для плодів та овочів.
3. Перетворення органічних кислот при дозріванні плодів та овочів.
4. Зміна загальної кислотності та склад органічних кислот в залежності від зберігання.
5. Визначення та характеристика ліпідів.
6. Загальна будова, склад та властивості простих жирів.
7. Складні жири, їх будова та значення.
8. Вміст жирів та їх значення.
9. Значення воскового напливу для рослини.

ТЕМА 5. ВІТАМІНИ

Робота 16. Визначення вмісту вітаміну С

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні об'єкти; 2) ступки; 3) 1% - вий розчин НСІ; 4) мірні колби на 100 мл; 5) конічні колби; 6) 2% - вий розчин мета фосфорної кислоти або 1% - вий розчин щавлевої кислоти; 7) 0,001 н розчин 2,6 – дихлорфеноліндофенол; 8) хлороформ.

Вітаміни - це велика група низькомолекулярних сполук, досить різних за своїм складом та будовою, які необхідні для нормальної життєдіяльності організму.

По фізико-хімічним властивостям вони поділяються на дві групи: водорозчинні та жиророзчинні. До водорозчинних відносяться вітаміни групи В, вітамін С та РР. До жиророзчинних належать: вітамін А, Д, Е, К, Ф.

Аскорбінова кислота (вітамін С) – антицинговий вітамін. Вона відіграє дуже важливу роль в харчуванні людини. Вітамін С не накопичується в організмі, тому він повинен щоденно надходити з продуктами харчування. Аскорбінова кислота бере участь в окисно-відновних процесах, що відбуваються в клітинах. Вона не містить вільної карбоксильної групи і її кислотний характер зумовлений наявністю двох здатних до дисоціації водневих іонів. Аскорбінова кислота існує в двох формах – власне аскорбінової кислоти та її окисленої форми – дегідроаскорбінової кислоти. Взаємне перетворення відбувається дуже легко і тим визначається важливість аскорбінової кислоти в окисно-відновних процесах.

В основу методу визначення масової частки вітаміну С покладено відновлення реактиву Тільманса (2,6-дихлорфеноліндофенол). Його водний розчин синього кольору, а при реакції з аскорбіновою кислотою він знебарвлюється. За кількістю витраченого на титрування реактиву розраховують вміст аскорбінової кислоти у витяжках.

ХІД РОБОТИ

З подрібненої і перемішаної середньої проби беруть наважку рослинного матеріалу 5-10 г (залежно від вмісту аскорбінової кислоти) з точністю до 0,01 г. В зв'язку з тим, що аскорбінова кислота легко окислюється киснем повітря, особливо в присутності незначних домішок іонів металів (заліза, міді), при готуванні наважки плоди і овочі необхідно подрібнювати ножами і теркою з нержавіючих матеріалів і по можливості швидше.

Відважену наважку переносять у порцелянову ступку, ополіскуючи склянку 20 мл 2,5-% розчину соляної кислоти (для ін активування ферментів і вимивання аскорбінової кислоти з клітин рослинного матеріалу). Часточки наважки у ступці повинні бути повністю покриті розчином кислот. Наважку швидко (не більше 10 хв.) розтирають до утворення однорідної маси.

Розтерту наважку обережно через лійку по скляній паличці переносять у мірну колбу на 100 мл, ступку багаторазово змивають дистильованою водою і доводять об'єм в колбі до мітки, вміст добре перемішують. Для екстрагування аскорбінової кислоти необхідно приблизно 10 хв. На цей час колбу залишають у темному місці, а потім фільтрують у чисту суху колбу.

Із здобутого екстракту у чисті колбочки чи склянки піпеткою на 10 мл відбирають дві проби і титрують з мікро бюретки 0,001 н розчином барвника до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30-40 секунд.

Масову частку аскорбінової кислоти визначають за формулою:

$$X = \frac{M_1 \cdot K \cdot O_1 \cdot 0,088 \cdot 100}{M_2 \cdot O_2},$$

де: X – масова частка аскорбінової кислоти, мг/100 г;

M₁- кількість реактиву, яка пішла на титрування, мл;

K – поправка до титру 0,001 н розчин барвника;

O₁ – загальний об'єм витяжки, мл;

M₂ – наважка, г;

O₂ – об'єм витяжки, взятий для титрування, мл;

0,088 – коефіцієнт перерахунку кількості реактиву на аскорбінову кислоту (1 мл 0,001н розчину реактиву окислює 0,088 мг аскорбінової кислоти).

Якщо визначають масову частку аскорбінової кислоти в плодах, інтенсивно забарвлених (чорна смородина, слива, вишня, томати), то застосовують такий метод: наважку екстрагують як описано вище. Після фільтрування беруть піпеткою 5 мл забарвленого екстракту з пробірки і туди ж додають мірним циліндром по 5 мл хімічно чистого хлороформу або дихлоретану чи толуолу, в які переходить аскорбінова кислота.

Екстракт титрують розчином барвника при обережному похитуванні. Як тільки з'являться перші ознаки рожевого забарвлення у шарі хлороформу, титрування закінчують. Обчислення результатів визначень проводять за вищенаведеною формулою.

Робота 17. Визначення вмісту провітаміну А (β-каротину)

Матеріали і обладнання: 1) рослинні зразки; 2) аналітичні терези; 3) колориметр; 4) порцелянова ступка з товкачиком; 5) кварцовий пісок; 6) ніж; 7) скляна лійка; 8) конічна колба на 100 мл; 9) петролейний ефір або ацетон; 10) сухий CaCO_3 ; 11) безводний Na_2SO_4 ; 12) перекристалізований $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Метод ґрунтується на тому, що пігменти пластид утворюють з білками єдиний комплекс, який має гідрофільні і ліофільні фази. Каротин, як речовина, що розчиняється в жирах, знаходиться у ліофільній фазі. При швидкому і обережному зневодненні тканини рослини комплекс білок – пігменти переводі каротину в розчин з послідовною оцінкою оптичної густини цього розчину.

ХІД РОБОТИ

Наважку коренеплоду (1 г) дрібно нарізають і розтирають у ступці із сухим піском. В ступку додають 3 г окису кальцію (для відняття води) і продовжують розтирати до одержання гомогенної маси. Потім невеликими порціями по 10-15

мл додаємо в ступку ацетон чи бензол і продовжуємо розтирання. Одержаний екстракт фільтрують і зливають у мірну колбу на 50 мл, тому в ступку можна додати не більше 45 мл розчинника.

По закінченню екстракції розчинником доливають мірну колбу до мітки. Оптичну густину розчину визначають на фотоелектроколориметрі.

Визначають оптичну густину стандартного розчину (як стандарт використовують розчин біхромату калію, 0,36 г біхромату в 1 літрі води, він відповідає 0,00208 г каротину в 1 мл розчину).

Вираховують вміст каротину за формулою:

$$X = \frac{\kappa \cdot h_1 \cdot v \cdot 100}{a \cdot h_2},$$

де X – кількість каротину в мг на 100 г зразку;

κ – кількість каротину в стандарті (0,00208);

h_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

h_2 – оптична густина стандартного розчину;

v - об'єм розчину (50 мл);

a – наважка.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Визначення вітамінів та коротка історія розвитку вітамінології.
2. Класифікація та номенклатура вітамінів.
3. Склад та властивості жиророзчинних вітамінів.
4. Характеристика вітамінів групи В.
5. Характеристика вітамінів Р і С.
6. Динаміка аскорбінової кислоти в плодах і овочах.
7. Характеристика вітаміноподібних речовин.

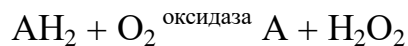
ТЕМА 6. ФЕРМЕНТИ

Робота 18. Визначення активності каталази

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні об'єкти; 2) ступки; 3) 1%-вий розчин H_2O_2 ; 4) 10 % - вий розчин H_2SO_4 ; 5) 0,1 н. розчин KMnO_4 ; 6) CaCO_3 ; 7) центрифуга; 8) піпетки; 9) бюретки; 10) мірні колби на 100 мл.

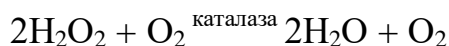
Ферменти – це біологічні каталізатори білкової природи, які володіють високою специфічністю і відіграють важливу роль в процесах обміну речовин.

Каталаза відноситься до складних ферментів, які складаються з білкової частини і простетичної групи, яка містить залізо. В процесах окислення ряд речовин в рослинах під дією оксидаз утворюють пероксид водню:



AH_2 – відновлений субстрат, A – окислений субстрат.

Пероксид водню в підвищених концентраціях токсично діє на цитоплазму клітин. Під дією ферменту каталази пероксид водню розкладається на воду і кисень:



ХІД РОБОТИ

Наважку 5 г розтирають в ступці з кварцовим піском і 0,3 г CaCO_3 , потім добавляють 20 мл води і знову розтирають до утворення однорідної маси. Після цього розтерту масу за допомогою води кількісно переносять в мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм до мітки. Через 30-40 хвилин суміш фільтрують або центрифугують. Дві порції чистого фільтрату або центрифугату (по 20 мл) вміщують в колби на 100 мл. Одну із колб кип'ятять 2-3 хвилини для інактивації ферменту і потім охолоджують. В обидві колби приливають по 20 мл води і по 3 мл 1%-вого розчину пероксиду водню. Через 20-30 хвилин в обидві колби добавляють 4-5 мл 10%-вого розчину H_2SO_4 і титрують 0,1 н. розчином KMnO_4

до слабо-розового забарвлення, яке не зникає на протязі хвилини. По різниці між контрольним і досліджуваним титруванням визначають кількість розкладеного пероксиду водню в розрахунку на 1 г вихідної рослинної речовини.

Розрахунки проводять за формулою:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 1,7}{n};$$

X – активність каталази в міліграмах H_2O_2 ;

a – кількість 0,1 н розчину $KMnO_4$, яке пішло на титрування контрольного розчину, мл;

b – кількість 0,1 н розчину $KMnO_4$, яке пішло на титрування досліджуваного розчину, мл;

T – поправка до титру 0,1 н. $KMnO_4$;

1,7 – кількість міліграмів H_2O_2 , яке відповідає кожному мілілітру 0,1 н. $KMnO_4$;

n – наважка матеріалу, взятого для аналізу, г.

Робота 19. Визначення активності пероксидази

Матеріали і обладнання: 1) досліджуванні об'єкти; 2) ступки; 3) 3%-вий розчин H_2O_2 ; 4) 30 % - вий $NaOH$; 5) 0,01 н. розчин $KMnO_4$; 6) розчин бензидину в 1%-вій льодяній оцтовій кислоті; 7) колориметр ; 8) піпетки; 9) пісчані часи; 10) мірні колби на 10 і 25 мл.

Пероксидаза активує перекисі, в тому числі і перекису водню. Під її дією проходить окислення різних фенолів і ароматичних амінів. Цей фермент дуже широко поширений в тканинах рослинного і тваринного походження. Найбільша кількість пероксидази міститься в коренях хрону, редьки і ряду інших коренеплодів.

Даний метод полягає на здатності пероксидази каталізувати окислення бензидину з утворенням забарвленої сполуки р-хіноїдінаміду.

ХІД РОБОТИ

Наважку 1г коренів хрону, редьки або інших рослин розтирають в ступці з кварцовим піском і потім за допомогою води кількісно переносять в посуду на 10 мл, об'єм витяжки доводять до мітки. Витяжку фільтрують через складчастий фільтр. В колбу на 25 мл наливають 2 мл 1%-вого розчину бензидину, 2 мл 3%-вого розчину перекисі водню і 1 мл ферментативного препарату (фільтрату), вміст колбочки перемішують і залишають на 3 хвилини, час відміряють за допомогою пісчаних часів. Через 3 хвилини в колбу доливають 10 мл 30%-вого розчину NaOH і все перемішують. Випавшу в осад забарвлену сполуку розчиняють за допомогою додаванням 10 мл абсолютного спирту, а потім отриманий розчин колориметрують по стандартному розчині.

Стандартний розчин виготовляють в мірній колбі на 25 мл. В колбу наливають 2 мл 1%-вого розчину бензидину і 3 мл 0,01 н. розчину КМпО₄. Через 10 хвилин, коли зелене забарвлення перетвориться в темно-червоне, прибавляють 10 мл 30%-вого розчину NaOH і 10 мл абсолютного спирту.

За одиницю пероксидази приймають таку ж її активність, при якій препарат пероксидази за 3 хвилини дає забарвлення, яке рівне стандарту. Активність пероксидази (С) в прийнятих одиницях на 1 г рослинної тканини дорівнює:

$$C = \frac{h_1 \cdot 10}{h_2};$$

С - активність пероксидази;

h₁ – товщина шару зразкового розчину;

h₂ – товщина шару дослідного розчину.

Робота 20. Визначення активності аскорбатоксидази

Матеріали і обладнання: 1) термостат; 2) ступки; 3) мірні колби на 25 і 50 мл; 4) конічні колби на 100 мл; 5) 0,01 н. КJO₃; 6) 10%-вий КJ; 7) 0,001 н. Na₂S₂O₃; 8) 1%-вий розчин крохмалю; 9) фосфатний буфер, 0,15 М з рН 7,0; 10) аскорбінова кислота (розчин з вмістом 1мг на 1 мл); 11) 5% HCl.

Аскорбатоксидаза відноситься до класу оксидоредуктаз; вона каталізує окислення аскорбінової кислоти (вітамін С) в дегідроаскорбінову кислоту. До складу аскорбатоксидази входить мідь (0,24%). У рослин аскорбатоксидаза разом з деякими іншими ферментами створює додаткову дихальну систему без участі цитохромів, але при наявності відновленої форми НАДФ.

Цей фермент в значній кількості міститься в гарбузах, кабачках, салаті, квасолі та в інших рослинах.

В основу методу визначення активності аскорбатоксидази покладено йодометричне вимірювання кількості аскорбінової кислоти.

ХІД РОБОТИ

Наважку 20 г рослинного зразку розтираємо в ступці з 10-15 мл 0,15 М фосфатного буферу з рН 7,0, розтерту масу переносимо в мірну колбу на 50 мл і доводимо об'єм колби до мітки за допомогою фосфатного буферу. Через 1 годину настоювання вміст колби фільтруємо і фільтрат використовуємо в якості ферментативного препарату.

Дві порції ферментативного фільтрату по 10 мл наливаємо в колбочки на 50 мл, одну з них нагріваємо до кипіння і кип'ятимо на протязі 1-2 хвилин для інактивації ферменту, а потім охолоджуємо. Після цього обидві колбочки ставимо в термостат (перед цим у них доливають по 10 мл розчину аскорбінової кислоти) для інкубації протягом 30 хвилин при температурі 37⁰С. Вміст обох колбочок нагрівають до кипіння, охолоджують і доводять водою до мітки.

По 10 мл прозорої рідини з колб переносять у колби з місткістю 100 мл. У кожну колбу додають по 5 мл 10% розчину КJ, 10 мл 5% НСІ, 10 крапель 1% крохмалю і 10 мл 0,01 н. розчину КJО₃. Через 5 хвилин після додавання останнього реактиву вміст колб титрують 0,001 н. Na₂S₂O₃ до зникнення синього забарвлення.

Результати досліду обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,088}{n} ;$$

де X - активність аскорбатоксидази, мг окисленої аскорбінової кислоти під дією ферменту в 1 г рослинної тканини за час інкубації;

a – об'єм 0,001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, який витрачено на титрування надлишку йоду в дослідній пробі, мл;

b – об'єм 0,001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, який витрачено на титрування контрольної проби, мл;

T - поправка до титру 0,001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

0,088 – маса аскорбінової кислоти, яка відповідає 1 мл 0,001 н. розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мл;

n – наважка рослини, яка відповідає об'ємові препарату, взятого для титрування, г.

Робота 21. Визначення активності тирозинази

Матеріали і обладнання: 1) термостат; 2) тертки; 3) водяна баня; 4) пробірки; 5) піпетки; 6) 1%-вий розчин тирозину.

Тирозиназа відноситься до класу оксидоредуктаз, до групи фенолоксидаз. Цей фермент, на відміну від інших ферментів цієї групи володіє груповою специфічністю і каталізує окислення не тільки монофенолів, але і поліфенолів. Тирозиназа досить широко поширена в рослинних організмах. По своїй природі вона є протеїдом, який містить мідь.

За каталітичною дією тирозинази можна спостерігати по реакції окислення тирозину киснем повітря в присутності препарату тирозинази. В процесі окислення із тирозину утворюється червоний пігмент гелохром, а потім темний пігмент меланін.

ХІД РОБОТИ

Картоплю натирають на тертці, відбирають наважку 1 – 2 г рослинної маси , яку заливають 5 мл води і добре перемішують. Потім фільтрують через два шари марлі і фільтрат використовують як препарат ферменту.

В дві пробірки наливають по 1 мл ферментного фільтрату, вміст однієї нагрівають до кипіння і кип'ятять на протязі 1-2 хвилини, а потім охолоджують. В обидві пробірки додають по 1 мл 15%-вого розчину тирозину і при періодичному (через 3 хвилини) перемішуванні струшуванням суміш інкубують при температурі 40⁰С.

За забарвленням рідини спостерігають в пробірках. Рідина в пробірці з активною витяжкою поступово стає спочатку розовою, потім бурюю, і в кінці чорною. В „холостій” пробірці з інактивуючим ферментом колір рідини в пробірці не змінюється. Результати спостереження фіксуються.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Хімічна природа ферментів.
2. Будова ферментів.
3. Механізм дії ферментів.
4. Вплив температури на активність ферментів.
5. Вплив рН середовища на активність ферментів.
6. Специфічність дії ферментів (абсолютна, групова, стереоізомерна).
7. Активатори ферментів.
8. Інгібітори ферментів.
9. Номенклатура та класифікація ферментів.
10. Клас оксидоредуктази.
11. Клас трансферази.
12. Клас гідролази.
13. Клас ліази.
14. Клас ізомерази.
15. Клас лігази.

ТЕМА 7. РОСЛИННІ РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Робота 22. Визначення вмісту дубильних і барвних речовин

Матеріали і обладнання: 1) мірні колби на 100, 200 і 250 мл; 2) склянки; 3) лійки; 4) термометр; 5) водяна баня; 6) склянка місткістю до 2 л; 7) піпетки на 10, 20 і 50 мл; 8) мірні циліндри на 10 мл і 1 л; 9) бюретки; 10) фільтрувальний папір; 11) активоване вугілля; 12) 0,1 н розчин перманганату калію; 13) розчин сірчаної кислоти (1:4); 14) 0,1-% розчин індигокарміну.

Дубильні і забарвлюючі речовини зумовлюють терпкий смак і інтенсивність забарвлення плодів та овочів. При підвищеному вмісту дубильних речовин рослини загалом і соковиті плоди, більш стійкі до мікроорганізмів.

Для виявлення дубильних речовин (якісна реакція) використовують властивість їх давати з солями заліза чорно-синє або чорно-зелене забарвлення.

Застосовують 3 – 5% - ий розчин хлорного заліза, до 5 -10 мл якого в пробірку додають по краплях сік плодів. За появою та інтенсивністю забарвлення можна приблизно судити про наявність і кількість дубильних речовин.

Метод кількісного визначення дубильних і барвних речовин оснований на здатності їх до окислення в кислому середовищі перманганатом калію. Але цим реактивом окислюються і деякі інші речовини, тому спочатку окислюють всі речовини, які реагують з перманганатом калію, після чого дубильні і барвні речовини відділяють, користуючись їх властивістю адсорбуватися активованим вугіллям, і знову проводять окислення. За різницею кількості перманганату калію, яка пішла на окислення в перший і другий раз, розраховують вміст дубильних і барвних речовин.

ХІД РОБОТИ

Готування первинної витяжки. Із подрібненої середньої маси проби беруть наважку масою 25 г з точністю до 0,01 г, яку зважують у хімічній склянці, і без втрат переносять в мірну колбу на 200 або 250 мл. Вміст колби повинен

складати 1,2 – 1,3 її об'єму. Потім колбу поміщають у водяну баню з температурою води 80⁰С і за таких умов колбу витримують 10 – 15 хв. Після цього колбу охолоджують водою з крану до кімнатної температури. Дистильованою водою вміст колби доводять до мітки, збовтують і залишають на 5 хв., щоб осіли частки досліджуваного матеріалу, які затримують фільтрування. Фільтрують в суху колбу або склянку місткістю 200 -300мл.

Окислення речовин первинної витяжки. Окислення речовин витяжки, здатних до цього (в тому числі дубильних і забарвлюючих), проводять шляхом титрування 0,1 н розчином перманганату калію. Титрують в порцеляновій чашці або великій хімічній склянці місткістю до 2 л, в яку додають 20 мл першої витяжки, 20 мл індигокарміну як індикатора, 10 мл сірчаної кислоти (1:4) і 950 мл води (можна водопровідної). При постійному помішуванні вмісту чашки або склянки додають з бюретки по краплях 0,1 розчин перманганату калію. Забарвлення від синього переходить через зеленувате до жовтого. Титрування вважають закінченим, коли краплі перманганату калію, що додають у титрований розчин, залишається не жовте, а червоне забарвлення, а загальний відтінок рідини залишається без змін.

Готування вторинної витяжки. Її готують з метою адсорбування дубильних і забарвлюючих речовин. З первинної витяжки відбирають піпеткою 40 мл, переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 5 г активованого вугілля і ставлять у гарячу водяну баню на 10 – 15 хв. Після цього колбу знімають, охолоджують, доводять її вміст до мітки дистильованою водою і фільтрують через складчастий фільтр у суху колбу.

Окислення вторинної витяжки. Підготовку реакційної суміші і титрування проводять аналогічно окислюванню речовин первинної витяжки. В порцелянову чашку або великий хімічний стакан беруть 50 мл фільтрату первинної витяжки, 20 мл розчину індигокарміну, 10 мл сірчаної кислоти (1:4) і 920 мл водопровідної води. Титрують, як і перший раз, 0,1 н розчином перманганату калію до появи жовтого забарвлення. При цьому титруванні перманганат витрачається на окислення речовин, крім дубильних і барвних (адсорбованих вугіллям).

Розрахунок вмісту дубильних і барвних речовин. Результати першого і другого титрування порівнянні, оскільки вони відносяться до 20 мл первинної витяжки (в другий раз взяті 40 мл первинної витяжки, розведені до 100 мл, а з них взято на титрування 50 мл, тобто половина). Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{(M_1 - M_2) \cdot T \cdot 0,004157 \cdot O_1 \cdot 100}{H \cdot O_2},$$

де: X – вміст дубильних і барвних речовин, %;

M₁ – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, яка пішла на перше титрування, мл;

M₂ – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, яка пішла на друге титрування, мл;

T – поправка до титру 0,1 н розчину перманганату калію;

O₁ – загальний об'єм витяжки, мл;

H – наважка , г;

O₂ – об'єм витяжки, взятої на титрування (20 мл);

0,004157 – коефіцієнт перерахунку мілілітрів 0,1 н розчину перманганату калію на грами дубильних і барвних речовин (1 мл 0,1 н розчину перманганату окислює 0,004157 г дубильних і барвних речовин).

Робота 23. Виявлення дубильних речовин у рослинах

Матеріали і обладнання: 1) гострий ніж; 2) скляна паличка; 3) піпетка; 4) пробірка; 5) спиртівка; 6) розчин хлорного заліза; 7) листки і гали дуба.

ХІД РОБОТИ

Характерною реакцією на дубильні речовини є почорніння їх при обробці слабким розчином будь-якої залізної солі, хоча б хлорного заліза.

1. Шматочок рослинного матеріалу, величиною з горошину, кип'ятять в пробірці з 5 – 6 мл води до якої потім прибавляють 1 -2 краплі хлорного заліза.
2. Вижати краплю соку із рослинного матеріалу на чашку Петрі, додати до неї краплю хлорного заліза.
3. Зробити тонкий зріз досліджуваної рослини і нанести на нею краплю хлорного заліза.

Зробити запис за наступною формою:

| Назва рослини | Частина рослини | Ступінь почорніння | | |
|---------------|-----------------|--------------------|---------|--------|
| | | сильне | середнє | слабке |
| | | | | |

Робота 24. Виявлення алкалоїдів у рослинах

Матеріали і обладнання: 1) скляна паличка; 2) піпетка; 3) чашка Петрі; 4) розчин йоду в йодистому калію; 6) алкалоїдні рослини: люпин, беладона, дурман.

ХІД РОБОТИ

Шматочок кореня, листка і плоду досліджуваної рослини ретельно розминають скляною паличкою до отримання однорідної маси, додають декілька крапель розчину йоду в йодистому калію. Червонувато – бурий осад вказує на наявність алкалоїдів.

Зробити запис за наступною формою:

| Назва рослини | Частина рослини | Кількість осаду | | |
|---------------|-----------------|-----------------|------------|------|
| | | багато | посередньо | мало |
| | | | | |

Робота 25. Визначення вмісту антоціанів у плодах , ягодах та овочах

Матеріали і обладнання: 1) мірні колби на 100 і 50 мл; 2) склянки; 3) лійки; 4) фільтрувальний папір; 5) етиловий спирт; 6) ступки; 7) 1-% HCl; 8) 30-% H₂O₂.

Антоціани – пігментні речовини клітинного соку, які в значній мірі обумовлюють забарвлення плодів, ягід та овочів. Аглікони антоціанів – антоціаніди – мають різний колір; пеларгонідин – яскраво червоний, ціанідин – малиновий, дельфінідин – рожево – синій. Колір антоціанів змінюється в залежності від рН середовища, наявності іонів металів та інших умов.

ХІД РОБОТИ

Беруть наважки шкірок забарвлених сортів яблук або інших плодів, ягід та овочів з забарвленим м'якушем, відважують по 1 г, швидко подрібнюють. Наважки зразу ж заливають сумішшю етилового спирту (10 – 20 мл) з 1-% HCl і витримують 24 години при температурі 4⁰С. Потім їх розтирають в ступці і екстрагують антоціани на лійці Бюхнера. Після виміру об'єму екстрактів (40 – 60 мл) визначають їх оптичну густину на фотоколориметрі або на спектрофотометрі при довжині хвилі 529 нм в кюветі з робочою довжиною 1 мл. Кількість антоціанів знаходять за калібрувальним графіком, побудованим за одним із антоціанів.

При високому вмісті в зразку інших забарвлюючих речовин в контроль необхідно додати 2 -3 краплі 30-% H₂O₂, після цього через 2 хвилини зробити виміри. Одержані дані враховують із дослідної проби.

Кількість антоціанів знаходять за формулою:

$$X = \frac{k \cdot D \cdot V \cdot 100}{n}$$

X – кількість антоціанів, мл/100 г

k - коефіцієнт, розрахований за калібровочною кривою, 0,077

D – оптична густина розчину

V – об'єм екстракту, мл

n – наважка, г.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Рослинні речовини вторинного походження, їх будова та значення.
2. Фенольні сполуки, їх властивості та значення.
3. Група $C_6 - C_1$ сполук.
4. Група $C_6 - C_3$ сполук.
5. Група $C_6 - C_3 - C_6$ сполук.
6. Глікозиди.
7. Вміст та значення дубильних речовин для плодів та овочів.
8. Ефірні масла, їх роль у формуванні аромату плодів та овочів.
9. Пігменти, їх роль та значення.
10. Алкалоїди, їх вміст та значення.
11. Похідні пурину.
12. Алкалоїди групи тропану.
13. Похідні хіноліну.
14. Алкалоїди родини лілійних.
15. Похідні пурину.
16. Речовини вторинного походження та їх роль в обміні речовин.

ТЕМА 8. МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ

Робота 26. Хімічний аналіз з соку рослин (за К.П. Магніцьким)

Матеріали і обладнання: 1) рослинний матеріал; 2) польова лабораторія Магніцького; 3) дистильована вода; 4) марлева серветка.

Мінеральні речовини відіграють важливу роль в процесах обміну. Вони є основними частинами цілого ряду вітамінів, ферментів, гормонів. Мінеральні речовини безпосередньо пов'язані з ферментними системами клітин, приймають участь в ряді окислювально - відновних процесах, впливають на синтез вуглеводів, білків, нуклеїнових і органічних кислот, вітамінів і ін. В плодах і овочах мінеральні речовини знаходяться найчастіше в легкодоступній для організму формі.

Аналіз з соку рослин дає можливість контролювати умови живлення рослин і орієнтовно визначити необхідність підживлення їх відповідними добривами. Користуючись лабораторією Магніцького, можна швидко і досить точно визначити вміст у клітинному соку азоту, фосфору, калію та магнію. До крапель соку рослинного матеріалу додають відповідні реактиви. Забарвлення одержаних розчинів чи осадів порівнюють з кольоровою шкалою, що додається до лабораторії Магніцького, і виражають вміст відповідних елементів у мг/г соку чи балах.

ХІД РОБОТИ

З 5 – 6 рослин зрізають по одному листку певного ярусу. В картоплі, томатів, соняшнику беруть листки, що закінчили ріст: до бутонізації – 2- 3 листок, під час цвітіння і пізніше – 3 – 4 листок, у злаків – після виходу в трубку беруть 2 – 4 листок, у буряків пробу беруть із зовнішніх листів розетки. Для аналізу беруть черешки, а в сидячих листків вирізають із нижньої третини середню жилку. Можна також використовувати нижні частини молодих пагонів.

Витирають взятую пробу чистою серветкою. Якщо черешки товсті, то їх розрізають навпіл і використовують половину чи четвертину. Із нижньої частини кожного черешка, жилки чи стебла вирізають ножицями шматок довжиною 2 – 3 см. Матеріал кладуть під прес, видавлюють сік і зливають в суху крапельницю. Прес ретельно вимивають водою і витирають серветкою чи фільтрувальним папером.

Для визначення **нітратного азоту** насипають в заглиблення фарфорової пластинки сухий реактив на азот об'ємом як зернівка жита, приливають 3 краплі буферного розчину, а потім додають одну краплю досліджуваного соку. Ретельно розмішують сік скляною паличкою і через 1 хвилину порівнюють забарвлення з кольоровою шкалою лабораторії Магницького.

Для визначення **фосфору** вносять краплю соку в заглиблення пластинки, додають 3 краплі води і 2 краплі реактиву на фосфор. Ретельно перемішують олов'яною паличкою, поки забарвлення не стане стійким. Порівнюють забарвлення одержаного розчину з кольоровою шкалою.

Для визначення калію в заглиблення пластинки вносять краплю соку, додають краплю реактиву на калій і одну краплю соляної кислоти, перемішують скляною паличкою і порівнюють забарвлення одержаного осаду з кольоровою шкалою.

Для визначення **магнію** в заглиблення пластинки вносять краплю соку, три краплі води і краплю титанового жовтого, перемішують скляною паличкою і додають краплю розчину NaOH. Якщо забарвлення змінюється не чітко, аналіз повторюють, додаючи перед внесенням NaOH краплю свіжо виготовленого 1 - % розчину крохмалю. Забарвлення порівнюють із кольоровою шкалою.

Із деяких рослин виділити сік досить важко або він не може мати інтенсивне забарвлення, що затрудняє проведення кольорових реакцій. В таких випадках готують водну витяжку: подрібнюють матеріал, беруть наважку 2 г, додають 0,2 – 0,5 г активного вугілля, 6 мл води і ретельно розтирають в фарфоровій ступці. Розтерту масу загортають в тонку щільну тканину і віджимають пресом.

Для визначення фосфору і магнію, як зазначалось раніше, сік розводять водою у відношенні 1:3, коли для аналізу беруть витяжку, такого розведення робити не слід, витяжку зразу ж використовують для визначення.

Для визначення азоту і калію в заглиблення пластинки вносять 4 краплі витяжки і дають їй випаруватися в теплому місці або на сонці. Потім до сухого залишку додають краплю води і проводять аналіз згідно з інструкцією. Одержані результати записують в таблицю.

Ґрунтуючись на одержаних даних досліджень, роблять висновки щодо ступеня забезпеченості досліджуваних рослин відповідними елементами мінерального живлення.

| Рослина | Елемент | Кількість елементів | |
|---------|---------|---------------------|-----|
| | | Мл/л соку | Бал |
| | | | |

Робота 27. Виявлення нітратів у рослинах

Матеріали і обладнання: 1) свіжі рослинні об'єкти з кореннями; 2) 1 - % розчин дифеніламіну в концентрованій сірчаній кислоті; 3) біла фарфорова чашка; 4) скляна паличка; 5) фільтрувальний папір.

Азот, що поглинається коренями із ґрунту в нітратній формі відновлюється рослиною до аміаку, який потім зв'язується кетокислотами (пірвіноградною, щавелевооцтовою, α – кетоглутаровою) з утворенням в процесах прямого амінування відповідної амінокислоти (аланін, аспарагінової, глутамінової та ін.). При достатньо високому рівні вмісту вуглеводів і активності відповідних ферментів (нітратредуктази та ін.) вище згадані фізіолого-біохімічні процеси інтенсивно проходять в коренях. Проте, частина нітратів може в незмінному стані досягти листків по висхідній течії, де також відбувається їх відновлення.

Для виявлення нітратів використовують реакцію з дифеніламіном, який в присутності іона NO_3 утворює аніліновий барвник синього кольору. Виходячи з інтенсивності синього забарвлення, можна орієнтовно судити про кількість нітратів у досліджуваних об'єктах.

ХІД РОБОТИ

В білу фарфорову чашку вміщують шматочки листової пластинки, коренів, плодів та інших частин рослини, розминають чистою скляною паличкою і наносять піпеткою розчин дифеніламіну (з ним слід поводитись дуже обережно), дифеніламін можна наносити на свіжі зрізи рослинних об'єктів. Досліджують декілька рослинних об'єктів. Ступінь забарвлення оцінюють за п'ятибальною шкалою.

Шкала вмісту нітратів у рослинних об'єктах:

| Характер забарвлення | Бали | Вміст нітратів % на сиру речовину |
|--|------|-----------------------------------|
| Зріз і розчин швидко забарвлюється в темно-синій колір. Забарвлення зберігається певний час. | 5 | 0,0221 + 0,0005 |
| Зріз і розчин забарвлюються в синій колір. Забарвлення спостерігається не відразу. | 4 | 0,0174 + 0,0007 |
| Зріз і розчин забарвлюються в світло - синій колір. Забарвлення зникає через 2 – 3 хв. | 3 | 0,0151 + 0,0006 |
| Забарвлюються лише провідні пучки в світло – голубий колір і забарвлення швидко зникає. | 2 | 0,0067 + 0,0004 |
| Слабко помітне голубе забарвлення, що швидко зникає. | 1 | 0,0028 + 0,0006 |

Результати заносять у таблицю:

| Об'єкт | Кількість нітратів | | |
|--------|--------------------|----------------------|-----------|
| | у черешках | в листовій пластинці | в коренях |
| | | | |

У висновках вказують в яких органах рослин відбувається відновлення нітратів і в якому органі їх найвищий вміст.

Робота 28. Визначення масової частки золи та її лужності

Матеріали і обладнання: 1) рослинний матеріал; 2) водяна баня; 3) муфельна піч; 4) електрична плитка; 5) сушильна шафа; 6) конічні колби на 50; 300 мл; 7) порцеляновий тигель; 8) ексікатор; 9) 0,1 н HCl; 10) 0,1 н NaOH; 11) фенолфталеїн.

Зола плодів та овочів характеризується тим, що на відміну від золи багатьох інших продуктів в ній перевищують лужні елементи. Включення плодів та овочів в дієту при раціональному харчуванні необхідне для того, щоб урівноважити елементи золи кислого характеру.

Метод ґрунтується на озоленні проби продукту, визначенні маси золи і титрометричному визначенні її лужності.

ХІД РОБОТИ

У висушений до постійної маси, зважений на аналітичних терезах з точністю до 0,001 г порцеляновий тигель беруть наважку (дві повторності) від 5 до 25 г (з похибкою не більше $\pm 0,0002$ г).

Вміст тигля випарюють на водяній бані до сухого залишку, підсушують у сушильній шафі при температурі від 100 до 105⁰С, обережно обвуглюють на електричній плитці чи під інфрачервоною лампою, не допускаючи запалення або розбризкування проби, і прожарюють у муфельній печі при температурі 525 \pm 25⁰С.

Зола повинна бути білого або світло-сірого кольору (при наявності заліза з коричнево-червоним, а міді і марганцю – із зеленим відтінком) без обвуглених часток.

Для продуктів, в складі яких більше 2% хлористого натрію, необхідно провести знесолення, для чого промивають обвуглений залишок декілька разів невеликими порціями гарячої дистильованої води, пропускаючи кожного разу

промивні води через фільтр. Фільтрат збирають у конічну колбу або стакан місткістю 50 см³.

Фільтр з осадом переносять у тигель з обвугленим залишком, обвуглюють на плитці, прожарюють у муфельній печі при температурі 525±25⁰С 30 хв. і охолоджують в ексікаторі.

До охолодженого тиглю із золюю переносять одержаний раніше фільтрат, випаровують на водяній бані, сушать у сушильній шафі, прожарюють при температурі 525±25⁰С, не допускаючи розплавлення золи, охолоджують в ексікаторі і зважують. Різниця між двома послідовними зважуваннями не більше ±0,001 г.

Масову частку золи вираховують за формулою:

$$X = \frac{(M_1 - M)}{M_2} \cdot 100$$

Де: X – масова частка золи, %;

M – маса тигля, г;

M₁ – маса тигля із золюю, г;

M₂ – маса наважки продукту, г.

За кінцевий результат досліджень приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних зважувань з допустимим відхиленням між ними не більше 5%.

Визначення лужності золи. В тигель із золюю доливають 25 см³ 0,1 н розчину соляної кислоти, нагрівають до кипіння і кип'ятять 1 хв., накривши тигель годинниковим склом. Розбавлену золу кількісно переносять в конічну колбу місткістю 300 см³ з дистильованою водою. Після охолодження додають 3 краплі спиртового розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н розчином гідроксиду натрію до появи рожево – червоного кольору, який не зникає протягом 1 хв.

Лужність золи визначають у сантиметрах кубічних розчину соляної кислоти з розрахунку на 100 г проби і вираховують за формулою:

$$X_1 = \frac{O_1 - O_2}{M_3} \cdot 10$$

Де: X₁ – лужність золи, см³;

O_1 – об'єм розчину соляної кислоти, cm^3 ;

O_2 – об'єм розчину гідроксиду натрію, cm^3 ;

M_3 – маса наважки продукту, г.

Між двома паралельними титруваннями допустиме розходження не більше $0,1 \text{ cm}^3$ розчину соляної кислоти.

Робота 29. Мікрохімічний аналіз золи рослин

Матеріали і обладнання: 1) мікроскоп; 2) предметні скельця; 3) колбочки на 50 мл; 4) стаканчики; 5) фільтрувальний папір; 6) зола рослин; 7) спиртівка; 8) аміак; 9) 10% HCl ; 10) 1% H_2SO_4 ; 11) NH_4Cl ; 12) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 13) 1% $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; 14) 1% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; 15) $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$.

ХІД РОБОТИ

Мікрокристалоскопічні реакції виконують як правило на предметному склі. На присутність досліджуваного елемента чи іону вказує специфічна форма утворених кристалів, які розглядають під мікроскопом. При користуванні цим методом потрібні добре очищені витяжки із золи рослин. Для виявлення Ca , Mg , P , S , Fe золу заливають чотирикратним об'ємом 10% соляної кислоти. Після настоювання розчин відфільтровують. Всі реакції проводять на предметному склі. Тонкими скляними паличками наносять на скло маленькі крапельки досліджуваного розчину і реактиву на відстані 2 – 3 мм один від одного, потім чистою скляною паличкою з'єднують дві крапельки. В місці з'єднання проходить реакція, а по краю швидка кристалізація продуктів реакції. Кристалічний осад розглядають під мікроскопом.

Для виявлення **кальцію** на краплю досліджуваного розчину діють 1% розчином H_2SO_4 і злегка підігрівають на спиртівці до появи облямівки по краях

краплі. В результаті реакції випадають голчасті кристали гіпсу $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Реакція дозволяє відкрити $0,4 \text{ Ca}^{++}$.

Для виявлення **магнію** краплі досліджуваного розчину спочатку нейтралізують аміаком, а потім уже з'єднують з $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ і розглядають утворені кристали MgNH_4PO_4 під мікроскопом. Кристали фосфорно-аміачно-магнезіальної солі мають вид ящиків, кришок, зірок або крилів. Реакція дає змогу виявити мінімум $0,012 \text{ Mg}^{++}$.

Для виявлення **фосфору** краплю досліджуваного розчину з'єднують з 1% розчином молібденовокислого амонію. Після підігрівання випадає зеленувато-жовтий осад фосфорномолібденовокислого амонію $(\text{NH}_4)_3 \text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Фосфор також можна виявити попередньою реакцією на магній, але на останньому етапі замість $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ вводять кристалик MgSO_4 . Утворюються такі самі кристали фосфорноаміачномагнезіальної солі $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Реакція дозволяє встановити $0,01\text{PO}_4$.

Вміст **сірки** визначають за допомогою розчину стронцію нітрату. Після нагрівання утворюються дрібні заокруглені кристали SrSO_4 . Реакція дає змогу встановити $0,8$ сірки.

Для відкриття **заліза** використовують звичайну кольорову реакцію з 1% жовтою кров'яною сіллю. Утворений осад "берлінської лазурі" $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ забарвлює розчин у темно-синій колір.

Усі препарати розглядаємо під мікроскопом і замальовуємо.

Робота 30. Колориметричне визначення вмісту фосфору в рослинах

Матеріали і обладнання: 1) 25 розчин хлористого калію; 2) молібденово-кислий амоній на концентрованій сірчаній кислоті; 3) хлористе чи металічне олово; 4) KH_2PO_4 ; 5) мірні колби на 50 мл; 6) фарфорова чашка; 7) ексікатор з ефір; 8) ФЕК; 9) піпетки.

Метод ґрунтується на взаємодії фосфорної кислоти та її солей з молібденово-кислим амонієм в присутності відновника (олова), в результаті чого утворюються сполуки голубого забарвлення, інтенсивність якого пропорційна вмісту фосфору в рослинах.

ХІД РОБОТИ

Наважку свіжих листків 200 – 250 мг кладуть у фарфорову чашку і ставлять на 45 хв. в ексікатор, на дно якого налито ефір, пари якого вбивають листки. Потім у чашку приливають 5 мл 25 розчину хлористого калію. Через 2 години в одержаній витяжці визначають вміст фосфору. 1 – 3 мл (залежно від місту фосфору), витяжки вміщують у мірну колбу на 50 мл, до половини об'єму доливають дистильовану воду, 2 мл молібденовокислого амонію, перемішують і додають 2 – 3 краплі двохлористого олова (можна 1 – 2 шматочки металічного олова), перемішують. Вміст колби доводять до мітки дистильованою водою, перемішують і через 7 – 10 хв. колориметрують на ФЕКу з червоним світлофільтром № 8. Кількість фосфору в досліджуваному розчині знаходять за калібрувальною кривою.

Для виготовлення стандартного розчину наважку 0,1917 г KN_2PO_4 розчиняють в 1 л дистильованої води (в мірній колбі). Цей розчин розводять в 10 разів, щоб в 1 мл стандартного розчину містилося 0,01 мг P_2O_5 . В 10 мірних колб на 50 мл приливають від 0,5 до 20 мл стандартного розчину в зростаючому порядку, потім у колби додають всі реактиви, як і при аналізі досліджуваних проб, колориметрують на ФЕКу з червоним світлофільтром №8. Виходячи з одержаних показників, будують калібрувальну криву. Розрахунок вмісту P_2O_5 проводять за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 100}{n},$$

Де: X – вміст P_2O_5 в 100 г рослинної маси, мг;

a – вміст P_2O_5 знайдений на калібрувальній кривій, мг;

n – наважка рослинного матеріалу.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

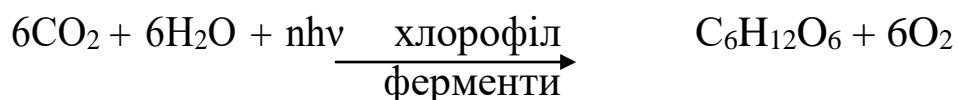
1. Загальна характеристика мінеральних речовин, їх поділ.
2. Фізіолого-біохімічне значення макроелементів.
3. Роль та значення азоту.
4. Роль та значення фосфору.
5. Фізіологічне значення сірки.
6. Значення та роль магнію.
7. Фізіолого-біохімічне значення мікроелементів.
8. Вміст мінеральних речовин в плодах та овочах.

ТЕМА 9: ФОТОСИНТЕЗ

Робота 31. Пігменти зеленого листка

Матеріали і обладнання: 1) свіжі або сухі листки рослин; 2) етиловий спирт; 3) бензин; 4) КОН в гранулах; 5) 10% HCl в крапельниці; 6) CaCO₃; 7) оцтовокислі цинк чи мідь; 8) кварцовий пісок; 9) ступка; 10) лійка; 11) скляна паличка; 12) штативи з пробірками (5 шт.); 13) піпетка; 14) ножиці; 15) спиртівка; 16) утримувач для пробірок; 17) вазелін; 18) фільтрувальний папір.

Фотосинтез – це процес утворення зеленими рослинами органічної речовини з CO₂ і H₂O за допомогою енергії світла:



Фотосинтез здійснюється в хлоропластах, що оточені двома білково-ліпідними мембранами. Хлоропласт містить систему ламелярних подвійних мембран тилакоїдів, утворених внутрішньою мембраною. В тилакоїдах здійснюється світлова фаза фотосинтезу, тобто трансформація енергії квантів світла в хімічну енергію синтезованих АТФ та НАДФ · Н₂, а біохімічні реакції,

відновлення CO_2 і синтез вуглеводів, відбувається у стромі (ламелярному просторі).

В мембранах тилакоїдів містяться такі пігменти: **хлорофіл а** - $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4$ Mg зеленого кольору з синюватим відтінком; **хлорофіл в** - $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4$ Mg зеленого кольору з жовтуватим відтінком; **каротин** – $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ жовто-оранжевого кольору та **ксантофіл** - $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ жовто-золотистого кольору. Всі зазначені пігменти нерозчинні в воді, проте добре розчиняються в органічних розчинниках (спирті, ацетоні, бензині та ін.)

За хімічною природою хлорофіли являють собою складні ефіри дикарбонової кислоти хлорофіліну та двох спиртів метанолу CH_3OH і фітолу $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$; каротиноїди є тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену C_5H_8).

Завданням даної роботи є одержання спиртової витяжки із зелених листків та ознайомлення з деякими властивостями пігментів.

ХІД РОБОТИ

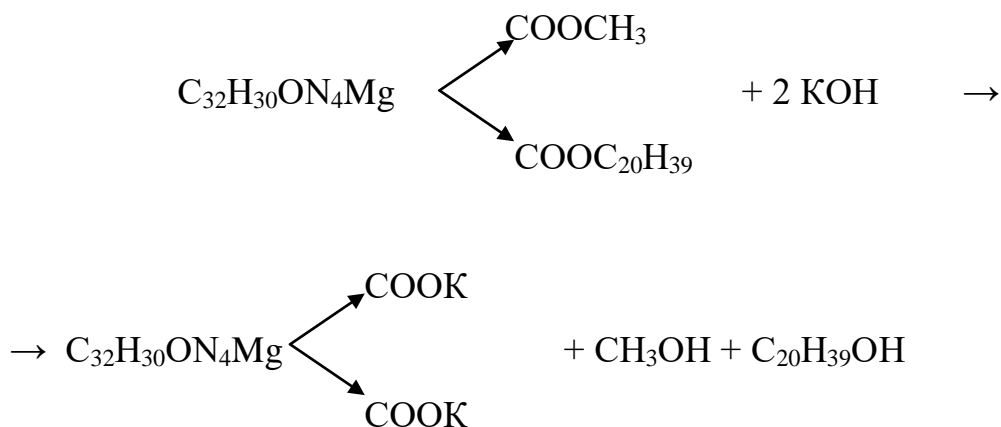
Свіжі чи сухі листки подрібнюють ножицями, відкидають крупні жилки і черешки, вміщують в ступку, додаючи CaCO_3 для нейтралізації клітинного соку (коли беремо свіжі листки) і трохи чистого кварцового піску чи товченого скла. Добре розтирають, додаючи невеликими порціями етиловий спирт, змастивши носик ступки ззовні вазеліном, зливають одержаний темно зелений розчин по паличці в лійку з фільтром.

Розливають одержану витяжку по 2 – 3 мл в чотири пробірки і проводять такі досліди:

а) розділення пігментів за Краусом. Додають до спиртової витяжки пігментів дещо більший об'єм бензину і 2 – 3 краплі води (щоб спирт не змішувався з бензином). Пробірку закривають пальцем, декілька разів інтенсивно струшують і дають відстоятись. Помутніння нижнього шару від надлишку води можна усунути, приливаючи трохи спирту. Відмічають жовте забарвлення нижнього (спиртового) шару і зеленого верхнього (бензинового), замальовують.

Роблять висновки про різну розчинність пігментів у спирті і бензині; при цьому слід урахувати, що ксантофіл, як двоосновний спирт, майже не розчинний у бензині. Щодо каротину, то правильний висновок можна зробити після співставлення результатів цього досліду з наступним.

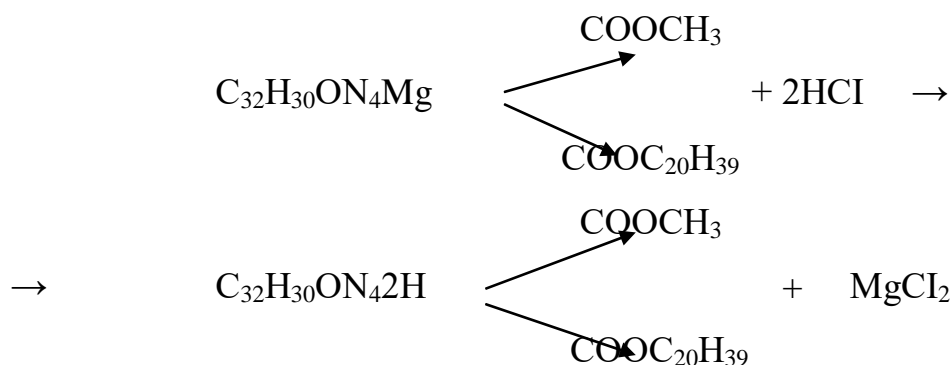
б) омилення хлорофілу лугом. До 2 – 3 мл спиртової витяжки пігментів добавляють 1 – 2 гранули лугу і струшують, потім приливають такий же об'єм бензину, інтенсивно струшують і дають відстоятись. Відмічають забарвлення спиртового і бензинового шарів, замальовують. У висновках зазначають реакцію омилення хлорофілу, в результаті якої відбувається відщеплення спиртів метанолу і фітолу, а двоосновна кислота хлорофілін дає сіль:



Солі хлорофілінів мають зелене забарвлення, але відрізняються від хлорофілу нерозчинністю в бензині.

Зазначають, які речовини розчинні в спирті і бензині, маючи на увазі, що жовті пігменти із лугом не реагують.

в) одержання феофітину і відновлення металоорганічних зв'язків. Беруть дві пробірки із спиртовою витяжкою пігментів і доливають в них по 2 – 3 краплі 10% - вої НСІ. При цьому утворюється буровато оливкова речовина феофітин – продукт заміщення магнію в молекулі хлорофілу двома атомами водню:



В одну пробірку з феофітином вносять невелику кількість оцтовокислого цинку чи оцтовокислої міді і доводять розчин до кипіння на спиртівці. Відмічають зміну забарвлення завдяки відновленню металоорганічних зв'язків. Записують рівня реакції.

Робота 32. Оптичні властивості пігментів

Матеріали і обладнання: 1) спиртова витяжка пігментів листка; 2) розчин каротину (бензиновий шар одержаний після омилення хлорофілу) і ксантофілу; 3) спектроскоп.

В процесі фотосинтезу світлова енергія перед трансформацією в хімічну повинна бути поглинена пігментами. Пластидні пігменти поглинають світло в межах видимої частини спектру (380 – 720 нм), завдяки чому ця ділянка випромінювання називається фотосинтетично активною радіацією (ФАР). Пігменти поглинають видиме світло не повністю, а вибірково, тобто кожен пігмент має свій характерний спектр поглинання. Зокрема, найважливіша особливість спектрів поглинання хлорофілів *a* і *b* – наявність у них двох чітко виражених максимумів в червоній ділянці відповідно 660 і 640 нм і в синьо-фіолетовій 430 і 450 нм. Мінімум поглинання знаходиться в зоні зелених променів; цим і пояснюється зелене забарвлення листків. В живому листку хлорофілів більш широкий і вирівняний спектр поглинання.

Каротин і ксантофіли поглинають світло лише в ділянці синьо-фіолетових променях.

ХІД РОБОТИ

Для того, щоб розглянути спектр поглинання хлорофілу, спочатку за допомогою спектроскопа розглядають спектр сонячного світла (чи від електричної лампочки). Потім перед щілиною спектроскопу розміщують пробірку

з витяжкою пігментів і спостерігають темні смуги поглинання в червоних і синьо-фіолетових променях спектру. Спектр поглинання хлорофілу замальовують.

Ширина смуг поглинання залежить від концентрації хлорофілу. Щоб упевнитися в цьому, відливають у чисту пробірку невелику кількість витяжки і розбавляють її спиртом у співвідношенні 1:1, 1:5. Розглядають спектр поглинання.

Для одержання спектра поглинання каротиноїдів беруть їх розчини і розміщують перед щілиною спектроскопу. Розглядають спектри поглинання і порівнюють їх зі спектром поглинання хлорофілу.

Спектри поглинання пігментів замальовують у вигляді таблиці і роблять відповідні висновки.

| Розчини | Ф | С | Г | З | Ж | О | Ч |
|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Хлорофілу: | | | | | | | |
| Нерозбавлений розчин | | | | | | | |
| Розбавлений розчин 1:1 | | | | | | | |
| Розбавлений розчин 1:5 | | | | | | | |
| Каротину | | | | | | | |
| Ксантофілу | | | | | | | |

Робота 33. Хроматографічний розподіл пігментів

Матеріали і обладнання: 1) хроматографічний папір; 2) пігментна витяжка; 3) піпетки на 1 мл; 4) петролейний ефір; 5) ацетон; 6) хроматографічна камера; 7) скріпки; 8) чорний папір; 9) бензин.

Хроматографія – фізико-хімічний метод розподілу рідких і газоподібних сумішей, при якому компоненти суміші виділяються у вигляді окремих смуг чи зон.

Фундаментом хроматографічного аналізу є професор М.С.Цвет. В 1904 році він вперше застосував адсорбційну хроматографію для розподілу пігментів листка, яка ґрунтується на різній адсорбованості їх на адсорбенті.

ХІД РОБОТИ

1) Одержання витяжки пігментів листка: наважку досліджуваного матеріалу (200 мг) ретельно розтирають у фарфоровій ступці. До розтертого матеріалу додають 2 – 3 мл спирту чи ацетону і продовжують розтирання, відфільтровують у мірний циліндр на 25 мл. Ступку споліскують декілька разів ацетоном і виливають її вміст у лійку.

2) Підготовка хроматографічного паперу і внесення пігментної витяжки: смугу хроматографічного паперу 25x13 см (руками не чіпати) розміщують на столі, на відстані 5 см знизу від краю проводять простим олівцем риску – старт, відступають від бічних країв на 2,5 см. Вчитись наносити екстракт пігментів слід на фільтрувальному папері, розмістивши його вище зазначеним способом.

Із одержаної витяжки пігментів беруть 1 мл в піпетку з тоненьким носиком і весь об'єм наносять на стартову лінію в кілька разів при періодичному підсушуванні на повітрі.

3) Підготовка розчинників і одержання хроматограми: в чисту посудину для хроматографування наливають розчинник, виготовлений із таких компонентів:

- 1) петролейний ефір – 7,5 мл
- 2) ацетон – 10,5 мл
- 3) бензин – 24,5 мл

Підсушений папір з нанесеною стартовою смужкою пігментів скручують в трубочку, верхні ріжки з'єднують скріпкою, ставлять на дно посудини і щільно закривають кришкою. Щоб уникнути руйнівної дії світла, посудини обгортають чорним папером.

Експозиція розподілу 20 хвилин, температура повітря не більше 25⁰С. Слідкують, щоб фронт пігментів не вийшов за межі хроматографічного паперу.

Після повного розподілу (візуально на старті відсутнє зелене забарвлення і пігментів відділились один від одного) папір виймають із посудини, підсушують у витяжній шафі.

Послідовність розподілу пігментів на одномірній висхідній хроматограми буде такою:

Старт

Смуга хлорофілу в

Смуга хлорофілу а

Смуга ксантофілу

Смуга каротину

На основі одержаних результатів роблять відповідні висновки.

Робота 34. Визначення вмісту хлорофілу в листках за допомогою фотоелектроколориметру

Матеріали і обладнання: 1) сухі чи свіжі листки рослин; 2) ацетон; 3) спирт етиловий; 4) лійка з фільтром; 5) мірна колба чи циліндр; 6) зневоднена сірчано-кисла мідь; 7) стандартний розчин хлорофілу; 8) бюкс металевий; 9) ФЕК 56 ПМ; 10) сушильна шафа; 11) ступка; 12) вага технохімічна.

Для визначення концентрації хлорофілу (як і інших забарвлених розчинів) застосовують фотоелектроколориметр, принцип дії якого ґрунтується на зрівнюванні інтенсивності двох світлових пучків за допомогою стандартного розчину відомої концентрації. При проходженні світлового пучка крізь досліджуваний розчин його світлова енергія знижується в результаті поглинання променів спектру розчиненою речовиною. Наприклад, хлорофіл найінтенсивніше поглинає червоні промені світла, тому світлова енергія цих променів, що пройшла крізь розчин хлорофілу, значною мірою знижується.

ХІД РОБОТИ

У фарфорову ступку беруть наважку листків 250 мг, приливають 3 – 4 мг етилового спирту і розтирають до одержання гомогенної маси. Потім розтерту масу переносять на фільтр, після цього ступку двічі промивають і знову зелений розчин переносять на фільтр. Фільтрування здійснюється через фільтр змочений спиртом, в мірну колбу на 25 мл. Витяжку ретельно перемішують і приступають до колориметрування.

Якщо для досліджень беруть свіжі листки, то необхідно визначити їх вологість. З цією метою беруть наважку 1 г, вносять її в металевий бюкс, ставлять у сушильну шафу і висушують за температури 105⁰С до постійної ваги. Вологість листка визначають за формулою:

$$X = \frac{(a - в)}{a} \times 100\% ,$$

Де а – маса сирої наважки;

в - маса сухої наважки.

Порядок колориметрування:

1. Включають прилад в електромережу за 15 – 20 хв. до вимірювання.
2. Встановлюють «електричний нуль». Для цього з допомогою ручки перекривають світловий потік шторкою і рукояткою установки електричного нуля переміщують стрілку мікроамперметра на <0>, відкривають шторку.
3. Ручкою переключення світлофільтрів встановлюють відповідний світлофільтр.
4. Встановлюють ручку чутливості так, щоб при обертанні барабану на 1% по шкалі світло пропускання стрілка мікроамперметра відхилилась на 1 -3 поділки.
5. В лівий пучок світла вміщують кюветку з розчинником (водою), в правий із забарвленим розчином.
6. правий барабан встановлюють на поділку 100 по шкалі світло пропускання (числа чорного кольору).
7. Прокручування лівого барабану досягають установлення стрілки мікроамперметра на <0>.

8. Поворотом рукоятки в правому світловому потоці кюветку з розчином замінюють кюветкою з розчинником (водою). Прокручування правого барабану досягають установки стрілки мікроамперметра на <0>.

9. Записують показник оптичної густини на шкалі на правому барабані (червоні числа). Після закінчення роботи прилад відключають.

10. За встановленою величиною оптичної густини розчину розраховують концентрацію хлорофілу за формулою:

$$C = \frac{D_2 \times 0,000085 \times V \times 100}{D_1 \times M(1 - 0,01 \times a)},$$

Де С – вміст хлорофілу, % на суху речовину листка;

D_1 – оптична густина стандартного розчину;

D_2 – оптична густина дослідного розчину;

0,000085 – концентрація хлорофілу, г/мл;

M – наважка листків;

V – об'єм витяжки, мл;

a – вміст води в листках, %.

Робота завершується відповідними висновками.

Робот 35. Фотосенсibiliзуюча дія хлорофілу на реакцію перенесення водню (за Гуревичем)

Матеріали і обладнання: 1) штатив; 2) 4 пробірки; 3) чорний папір; 4) електролампа на 300 Вт; 5) піпетки; 6) скляна посудина з плоско паралельними стінками; 7) шпатель; 8) спиртова витяжка пігментів; 9) метиловий червоний; 10) спирт етиловий; 11) кислота аскорбінова кристалічна.

Суть світлової фази фотосинтезу полягає в окисненні води до молекулярного кисню з участю світлової енергії, поглиненої хлорофілом. Електрони і протони, що при цьому вивільнюються, передаються по ланцюгу проміжних переносників до НАДФ, що відновлюється до НАДФН₂.

Крім того, при перенесенні електронів частина енергії використовується на утворення АТФ, тобто фотосинтетичне фотофосфорилування.

Вважають, що в перенесенні електронів і протонів водню до НАДФ беруть участь послідовно дві пігментні системи, які містять різні форми хлорофілу, що відрізняються максимумами поглинання в довгохвильовій частині спектру. В першу систему входять хлорофіл *a*, в другу хлорофіл *b* та деякі інші пігменти.

Отже, кінцевий результат фото окиснення води виділення молекулярного кисню і утворення багатих на енергію і відновлювальний потенціал сполук: АТФ і НАДФ Н₂, необхідних для наступного відновлення СО₂.

Спрощено фотоліз води і фотофосфорилування можна уявити таким чином:



Як видно із наведеної схеми, хлорофіл виконує функцію фотосенсибілізатора, що сприяє перенесенню електронів (водню) на НАДФ.

Фотосенсибілізуюча роль хлорофілу може бути продемонстрована в модельних дослідах з виділенням із рослин хлорофілом. За джерело водню беруть аскорбінову кислоту, а акцептор – метиловий червоний, який при приєднанні водню відновлюється до безбарвної лейкополуки. Аскорбінова кислота окислюється в дегідроаскорбінову кислоту:

Цю реакцію легко спостерігати, оскільки вона пов'язана із знебарвленням метилового червоного, забарвлення хлорофілу залишається без змін.

ХІД РОБОТИ

Беруть чотири пробірки: в перші три приливають по 5 мл спиртової витяжки хлорофілу, в четверту 5 мл етилового спирту. В першу, другу і четверту пробірки вносять по 50 мг кристалічної аскорбінової кислоти і декілька разів енергійно струшують розчин. У всі пробірки з хлорофілом приливають по 3-4 краплі спиртового розчину метилового червоного до тих пір, поки червоне забарвлення

перейде в червоно-буре. В четвертій пробірці забарвлення розчину доводять за допомогою індикатору до рожевого. Другу пробірку закривають чошликом із чорного паперу, а потім усі пробірки ставлять у штатив і освітлюють електролапою (300 Вт), що розташоване за 15 см від штатива. Для поглинання теплових променів між пробірками і джерелом освітлення розміщують заповнену водою посудину з плоско паралельними стінками.

Після 10-15 хвилинного освітлення в першій пробірці внаслідок відновлення метиловий червоний знебарвлюється і розчин знову набуває зеленого забарвлення. В дослідних пробірках забарвлення розчинів не змінюється, оскільки при відсутності світла, аскорбінової кислоти чи хлорофілу метиловий червоний не відновлюється до лейкоформи.

Роблять узагальнення і висновки за результатами досліджень.

На основі описаної роботи можна спостерігати також залежність фотосенсибілізуючої дії хлорофілу від інтенсивності світла та його спектрального складу, а також концентрації пігменту.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальні уявлення про фотосинтез
2. Фотосинтетичні пігменти.
3. Циклічне фотофосфорилування
4. Нециклічне фотофосфорилування
5. Метаболізм вуглецю за Кальвінієм
6. Цикл Хетча-Слека
7. Фотодихання.
8. Екологія фотосинтезу
9. Взаємозв'язок фотосинтезу з диханням

ТЕМА 9: ДИХАННЯ

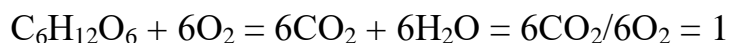
Робота 36. Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння різних рослин

Матеріали та обладнання: 1) штативи; 2) гумові корки з вставленими в них зігнутими під прямим кутом тонкими градуйованими трубками; 3) пісковий годинник на 5 хв; 4) ножиці; 5) пінцети; 6) фільтрувальний папір; 7) проросле насіння різних деревних порід; 8) вазелін; 9) 20%-ний розчин КОН; 10) насіння дослідних рослин.

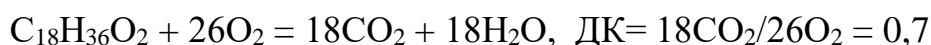
Дихальний субстрат в значній мірі впливає на газообмін у процесі дихання. Щоб характеризувати співвідношення між виділеною вуглекислотою, і увібраним киснем, користуються показником, який називається дихальним коефіцієнтом (ДК).

$$\text{ДК} = \frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$$

Величина ДК залежить від ступеня відновленості органічної речовини, яка окислюється при диханні, від ступеню забезпеченості клітини, що дихає киснем тощо. Наприклад, коли дихальним матеріалом є вуглеводи, то ДК дорівнюватиме одиниці, тому що при окисленні гексози (глюкози або фруктози) об'єми газів, які обмінюються при диханні однакові:



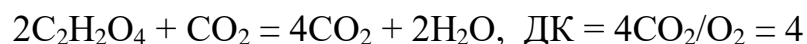
Коли в процесі дихання використовуються жири, наприклад, при диханні насіння олійних рослин, то ДК буде менше ніж одиниця, бо в молекулі жиру менше кисню, ніж у молекулі вуглеводу і для окислення жиру витрачається більше кисню:



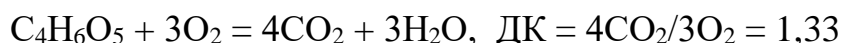
стеаринова кислота

Якщо для дихання використовуються білки, то ДК також буде меншим за одиницю.

Коли на дихання використовуються більш окислені речовини, ніж вуглеводи, білки і жири, наприклад, органічні кислоти, то величина ДК буде більшою за одиницю:



щавлева кислота



яблучна кислота

Визначення величини дихального коефіцієнта широко використовують для характеристики процесів дихання як організмів в цілому, так і їхніх органів і тканин.

Зручним об'єктом для визначення ДК є проросле насіння різних рослин, бо в ньому міститься багато органічних запасних поживних речовин: вуглеводів, жирів, білків тощо. ДК пророслого насіння різних сільськогосподарських культур визначають на простих приладах, які монтують з пробірок і скляних трубок.

Щоб орієнтовно визначити величину ДК, досліджуваний матеріал вміщують у пробірку і щільно закривають її гумовим корком з градуйованою трубкою, в якій знаходиться крапля зафарбованої води. Якщо об'єми газів, які обмінюються при диханні однакові, то крапля рідини в трубці не рухатиметься. Якщо ж ДК більший або менший за одиницю, то в трубці крапля переміщується.

ХІД РОБОТИ

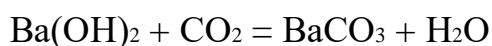
Щоб визначити ДК пророслого насіння, беруть дві пробірки, два гумових корки з вставленими в них зігнутими скляними трубками, штатив і монтують прилад. В одну пробірку насипають (приблизно 1/4 об'єму) пророслого насіння пшениці, жита або ячменю, а в другу - соняшника, конопель або іншої олійної культури. Обидві пробірки щільно закривають корками з скляними зігнутими градуйованими трубками, в які вводять по краплі зафарбованої води, створюючи

Роблять висновок про залежність величини дихального коефіцієнта від природи окислювальних речовин.

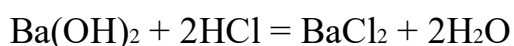
Робота 37. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного диоксида вуглецю (за Бойсеном-Ієнсенем)

Матеріали та обладнання: 1) проросле і не проросле насіння, бруньки, листки, стебла, квітки і інший рослинний матеріал; 2) 0,025 Н розчин Ва(ОН)₂; 3) 0,025 Н розчин НСl; 4) фенолфталеїн; 5) технічні терези; 6) однакові конічні колби на 250-300 мл (3шт); 7) марлеві мішечки (2шт); 8) бюретки (2шт).

Для визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного вуглецю в конічну колбу вміщують наважку досліджуваного матеріалу (2-3 г) і певну кількість розчину лугу (25 мл). Диоксид вуглецю, що виділяється в процесі дихання, реагує з лугом:



Через певний час луг, що залишився в колбі, титрують:



Порівнюють одержувану величину з результатом титрування такої ж кількості вихідного розчину лугу. Останнє потрібно для визначення початкової концентрації лугу і для обліку невеликої кількості СО₂, що була в посудині до досліду, а також поглинутого лугом під час відкривання посудини. Різниця між результатами титрування контрольної і дослідної посудини прямо пропорційна кількості виділеного під час дихання СО₂.

Тривалість експозиції залежить від маси наважки та інтенсивності дихання досліджуваного об'єкту. При дуже короткій експозиції різниця між результатами титрування контрольної і дослідної і дослідної колб буде недостовірною. Навпаки, якщо в колбі залишається дуже мало бариту, то може відбутися неповне поглинання СО₂. Тому, бажано підібрати таку експозицію, щоб на зв'язування СО₂ було використано 20-50% лугу (якщо, наприклад, на титрування бариту в

контрольній колбі пішло 10 мл НСІ, то на титрування розчину в дослідній колбі повинно піти не більше 8 і не менше 5 мл.

ХІД РОБОТИ

Наважку пророслого насіння (2-3 г) або іншого досліджуваного матеріалу висипають у марлевий мішечок і закріплюють його гачечком до гумового корка (мішечок повинен легко проходити крізь горловину колби і не торкатись розчину). Коли все підготовлено, в колбу швидко наливають 25 мл 0,025 Н розчину Ва(ОН)₂, додають 2-3 краплі фенолфталеїну, відразу опускають в колбу мішечок з насіння і щільно закривають колбу гумовим корком. У контрольну колбу наливають таку саму кількість бариту і фенолфталеїну, але досліджуваний матеріал в неї не опускають.

Колби з об'єктами, що містять хлорофіл потрібно на весь період досліду поставити в темне місце для виключення процесу фотосинтезу. Через 1-2 години насіння чи інший досліджуваний матеріал виймають, колби швидко закривають корками з бюретками і відтитровують залишок бариту 0,025 Н розчином соляної кислоти до зникнення рожевого забарвлення. Вміст контрольної колби титрують через 20 хв. після заповнення її розчином Ва(ОН)₂. За цей час колбу періодично збовтують (дослідні колби також легенько збовтують, щоб на поверхні рідини не утворювалася плівка ВаСО₃).

Інтенсивність дихання вираховують за такою формулою:

$$I_{д} = \frac{(a - b) \times K \times 0.55}{p \times T}, \text{ де:}$$

$I_{д}$ - інтенсивність дихання досліджуваного матеріалу, мг СО₂ на 1 г за 1 годину;

a - кількість 0,025 Н розчину НСІ, використаного на титрування контролю, мл;

b - кількість 0,025 Н розчину НСІ, яку використано на титрування досліду, мл;

K - поправка до титру розчину НСІ, мл;

p - наважка, г;

T - тривалість досліду, год.

Результати досліду записують за такою схемою:

| Об'єкт | Варіант досліду | Маса проби, гр | Тривалість досліду, год т | Використано на титрування 0,025 Н розчину НСІ, мг | | Поправка до титру НСІ, К | Інтенсивність дихання мг/г/год Ід |
|--------|-----------------|----------------|---------------------------|---|-----------|--------------------------|-----------------------------------|
| | | | | контроль, а | дослід, в | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

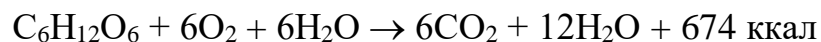
Під час цієї роботи вивчають інтенсивність дихання сухого, набубнявілого, пророслого насіння, листків, квіток, бруньок різних культур за звичайних умов І під впливом різних температур. На підставі добутих середніх даних досліду роблять висновок про вплив досліджуваного фактору на інтенсивність дихання об'єкта, вибраного для дослідів.

Робота 38. Визначення виділеного тепла при диханні насіння, що проростає

Матеріали та обладнання: 1) плоди каштану, дуба, ліщини, що накілчилися; 2) концентрований розчин КОН; 3) термоси (3 шт.); 4) термометри з поділками до 0,1⁰С (4 шт.); 5) стакани на 50 мл (3 шт.); 6) марля.

Утворена у процесі фотосинтезу органічна речовина і нагромаджена у ній хімічна енергія не можуть безпосередньо використовуватися клітиною. Окислювальний розпад складних органічних сполук до проміжних та найпростіших кінцевих продуктів, вуглекислоти і води з виділенням доступних

форм енергії відбувається у процесі дихання. Схематично дихання зображують таким рівнянням:



Отже, суттю дихального процесу, якщо він відбувається до кінця, є пов'язане з окислювальним розпадом органічних речовин здобування енергії. Тому найважливішою, хоча і не єдиною, функцією біологічного окислення вважають постачання організму доступною для використання формою енергії – АТФ. Іншою формою хімічної енергії, що може легко утилізуватися, є відновний потенціал типу НАДН чи НАДФН. Саме АТФ і НАДН у ході метаболічних процесів перетворюються в інші форми хімічної енергії і лише у відпрацьованому вигляді виділяються як теплова енергія.

Однак до цього часу сумарний енергетичний ефект від біологічного окислення різних органічних речовин вимірюють не кількістю синтезованих молекул АТФ і НАДН, а тепловим ефектом, що виникає при спалюванні цих речовин у калориметричній бомбі. Для глюкози це становить 4 ккал/г, білка – 5,7, жиру – 9,2 ккал/г. Загальна закономірність така: чим більше входить до складу молекули водню і менше кисню, тим калорійність вища.

Проте у живому організмі не весь водень перетворюється в універсальну форму енергії. Так, кількість молів АТФ на 1 г глюкози становить 0,21, на 1 г білків – 0,18, жирів – 0,51. Очевидно, різниця в енерго- і теплоємності різних речовин виявляється у різній зміні температури матеріалу, то дихає.

ХІД РОБОТИ

У термоси місткістю 250 мл ставлять по стакану розчином КОН і закривають марлею. Потім у термоси засипають по 50–100 г насіння пшениці, гороху і соняшнику, що проростає. Термоси закривають корковими пробками, в які вставлені термометри. Кульки термометрів повинні бути занурені у насіння. Порівнюючи показники термометрів, що вмонтовані у термоси, з показником зовнішнього термометра, встановлюють кількість тепла, яке виділяється насінням, що проростає.

Результати спостережень записують у таблицю:

| Об'єкт | Температура | | Підвищення температури, град. | Переважаючий тип запасних речовин |
|----------|-------------|-----------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | зовнішня | у термосі | | |
| Пшениця | | | | |
| Горох | | | | |
| Соняшник | | | | |

Зробити висновки про залежність дихання насіння різних видів рослин від типу запасних речовин.

Робота 39. Визначення порівняльної активності дегідрогеназ в різних рослинних тканинах

Матеріали і обладнання: 1) набубнявіле насіння гороху та пшениці; 2) бульби картоплі і коренеплоди цукрових буряків; 3) олія; 4) 0,05%-вий водний розчин метиленового синього; 5) 0,87%-ний водний розчин K_2HPO_4 ; 6) вага; 7) спиртівка; 8) сірники; 9) водяна баня; 10) термостат; 11) скальпель; 12) стулка; 13) фарфорові чашки; 14) пробірки в штативі; 15) лійка.

ХІД РОБОТИ

Для визначення використовують безбарвний рослинний матеріал (бульби, корені, насіння). При використанні насіння з нього попередньо знімають оболонку, бо вона може мати дубильні речовини, які пригнічують, активність ферментів. Крім того, оболонки майже не мають дегідрогеназ.

Беруть 1 г рослинного матеріалу, розтирають в ступці в 5 мл 0,87%-ного розчину K_2HPO_4 і переносять всю суміш в пробірку. Пробірку ставлять на водяну баню або в термостат з температурою 37 °С.

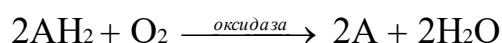
Через 15 хв. в пробірку добавляють 1 мл водного розчину метиленового синього (0,05%) і добре перемішують. Для створення анаеробних умов поверхню розчину в пробірці заливають олією і ставлять на водяну баню при температурі 37°С. З цього моменту починається відлік часу досліду.

Про активність дегідрогеназ судять за швидкістю знебарвлення метиленового синього в хвиликах. На основі одержаних результатів роблять висновки про активність дегідрогеназ в різних рослинних об'єктах.

Робота 40. Виявлення поліфенолоксидази і пероксидази в рослинних об'єктах

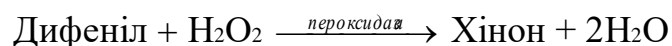
Матеріали і обладнання: 1) бульби картоплі - свіжі і варені; 2) пагони кінського каштана, дуба та інших деревних рослин, корені хрону і редьки; 3) 1%-вий спиртовий розчин гваякової смоли в крапельниці; 4) 3%-вий розчин H_2O_2 в крапельниці; 6) пінцет; 7) електроплитка; 8) тарілка; 9) фільтрувальний папір.

Оксидазами називають ферменти, що активують молекулярний кисень (переносячи на нього електрони від окислюваної речовини). Активований таким чином кисень з'єднується з відщепленим від субстрату воднем, утворюючи воду або пероксид водню за схемою:



До цієї групи ферментів відноситься поліфенолоксидаза, яка окислює поліфеноли киснем повітря з утворенням відповідних хінонів.

Пероксидаза – фермент, що окислює полі феноли і ароматичні аміни киснем пероксиду водню:



Виявити поліфенолоксидазу за допомогою розчину гваякової смоли, який при наявності цього ферменту змінює забарвлення з жовтого на синій. Пояснюється це тим, що поліфеноли, які знаходяться в гваяковій смолі, нездатні довільно реагувати з молекулярним киснем, окислюються активованим киснем.

Для виявлення пероксидази можна використовувати ту ж саму реакцію окислення поліфенолів гваякової смоли. Але оскільки пероксидаза з

молекулярним киснем не реагує, то до розчину гваякової смоли необхідно додати пероксид водню.

Роботу краще проводити на двох зрізах досліджуваної частини рослини, наносячи на перший зріз розчин гваякової смоли, а на другий - розчини гваякової смоли і пероксиду водню. Посиніння першого зрізу свідчить про наявність в клітинах поліфенолоксидази, тоді як посиніння другого зрізу є результат сумісної дії двох ферментів - поліфенолоксидази і пероксидази, або у випадку відсутності в даному об'єкті першого ферменту - однієї пероксидази, показник присутності обох ферментів - більш швидке посиніння другого зрізу.

ХІД РОБОТИ

На тарілку кладуть два шматочки досліджуваного об'єкта і обливають їх одноразово розчином гваякової смоли, причому другий зріз додатково обробляють краплею розчину пероксиду водню. Для контролю обробляють таким же чином матеріал, попередньо підданий кип'ятінню.

Досліджують декілька об'єктів, не допускаючи при цьому попадання соку з одного об'єкту на зріз іншого (скальпель, що використовувався для розрізування досліджених об'єктів, необхідно кожний раз мити і витирати). Результати записують в таблицю, відмічаючи швидкість появи синього забарвлення (в балах).

| ОБ'ЄКТ | ПОСИНІННЯ ПРИ ДІЇ | |
|--------|-------------------|---|
| | гваякової смоли | гваякової смоли + H ₂ O ₂ |
| | | |
| | | |

У висновках вказують на наявність чи відсутність в досліджуваних об'єктах поліфенолоксидази і пероксидази і орієнтовно оцінюють активність цих ферментів поліфенолоксидази – по посинінню 1-го зрізу, пероксидази – по різниці швидкості посиніння другого і першого зрізів.

ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Загальна характеристика дихання.
2. Значення дихання.
3. Гліколіз, як підготовча фаза дихання.
4. Аеробна фаза дихання (цикл Кребса).
5. Енергетика циклу Кребса та значення.
6. Гліюксилатний цикл, його значення.
7. Пентозофосфатний цикл.
8. Інтенсивність дихання та його залежність від зовнішніх і внутрішніх факторів.
9. Фотодихання, суть даного процесу та значення.
10. Бродіння, його сутність та значення для плодів і овочів.
11. Взаємозв'язок процесів дихання і бродіння.
12. Взаємозв'язок процесів дихання з обміном азотистих речовин і ліпідів.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Базова

1. Павлоцька Л., Дуденко Н., Левітин Є. Біологічна хімія. Підручник. Суми : Університетська книга, 2020. 513 с.
2. Павлоцька Л., Дуденко Н., Дімітрієвич Л., Божко Н. Біологічна хімія : підручник. Суми : Університетська книга, 2019. 379 с.
3. Лисиця А.В. Біохімія. Практикум: навчальний посібник. Суми : Університетська книга, 2019. 240 с.
4. Зименковский Б., Музиченко В., Ниженковська І. Biological and Bioorganic Chemistry in 2 books. Book 1. Bioorganic Chemistry. Київ : Медицина, 2019. 288 с.
5. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. Київ-Тернопіль: Укрмедкнига. 2000. 508 с.
6. Омелянчик Л.О., Генчева В.І. Біохімія: навчально-методичний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра спеціальності «Хімія» освітньо- професійної програми «Хімія» денної форми навчання /– Запоріжжя : ЗНУ, 2017. 113 с.
7. Копильчук Г. П., Волощук О. М., Марченко М. М. Біохімія: навч. посібн. 2-е вид., перероб. і доп. Чернівці: Рута, 2008. 208 с.

Допоміжна

1. Жегунов Г.Ф. Практикум з біологічної хімії : навчально-методичний посібник для студентів. 2014. 304 с.
2. Механізми біохімічних реакцій: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. рек. МОНУ / За ред. Н.О. Сибірної. Львів : Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2009. 316 с.
3. Біологічна хімія: лабораторний практикум / під заг. ред. Я. І. Гонського. Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. 288 с.
4. Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження: підруч./ О. Я. Склярів, Н. В. Фартушок, Л. Д. Сойка, І. С. Смачило. Київ: Медицина, 2009. 352 с.
5. Бондарчук Т. І., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І. та ін. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі: навч. посібник / за ред. О. Я. Склярів. Київ: Медицина, 2010. 360 с.
6. Боєчко Ф. Ф., Боєчко Л. О., Шмиголь І. В. Лабораторний практикум з біохімії: навч.-метод. посібник. Черкаси: ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2012. 196 с.
7. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. 424 с.
8. Найченко В.М. Практикум з технології зберігання і переробки плодів та овочів з основами товарознавства / Найченко В.М. - К.: ФАДА, ЛТД, 2001.- 211 с.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| ПЕРЕДМОВА | 3 |
| ПІДГОТОВКА ПРОБ ПЛОДІВ І ОВОЧІВ ДО АНАЛІЗУ | 5 |
| ТЕМА 1. БУДОВА КЛІТИНИ ТА ХІМІЧНИЙ СКЛАД ПЛОДІВ І ОВОЧІВ | 5 |
| Робота 1. Дослідження органел клітини рослин. Якісні реакції на основні запасні речовини | |
| Робота 2. Визначення вмісту води і сухих речовин методом висушування | 7 |
| Робота 3. Визначення вмісту сухих розчинних речовин у плодах і овочах рефрактометричним методом | 8 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 11 |
| ТЕМА 2. АМІНОКИСЛОТИ, БІЛКИ І НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ, ЇХ БУДОВА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗНАЧЕННЯ | 12 |
| Робота 4. Визначення окремих амінокислот методом розподільної хроматографії на папері | |
| Робота 5. Одержання розчину білків і вивчення їх властивостей. Якісні реакції на білок | 13 |
| Робота 6. Визначення вмісту сумарних білків | 15 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 18 |
| ТЕМА 3. ВУГЛЕВОДИ | 18 |
| Робота 7. Визначення цукрів у плодах та овочах | |
| Робота 8. Визначення вмісту клітковини (целюлози) | 23 |
| Робота 9. Визначення вмісту пектинових речовин колориметричним методом | 25 |
| Робота 10. Визначення вмісту крохмалю в м'якоті плодів та в коренеплодах | 27 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 30 |
| ТЕМА 4. ОРГАНІЧНІ КИСЛОТИ ТА ЛІПІДИ | 30 |
| Робота 11. Визначення загальної кислотності плодів і овочів титрометричним методом | |
| Робота 12. Визначення вмісту лимонної кислоти в плодах і овочах | 32 |
| Робота 13. Визначення щавлевої кислоти в плодах і овочах | 34 |
| Робота 14. Визначення вмісту жиру рефрактометричним методом | 35 |
| Робота 15. Вивчення властивостей жирів та визначення їх констант | 37 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 40 |
| ТЕМА 5. ВІТАМІНИ | 41 |
| Робота 16. Визначення вмісту вітаміну С | |
| Робота 17. Визначення вмісту провітаміну А (β-каротину) | 43 |

| | |
|--|-----------|
| | 90 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 44 |
| ТЕМА 6. ФЕРМЕНТИ | 45 |
| Робота 18. Визначення активності каталази | |
| Робота 19. Визначення активності пероксидази | 46 |
| Робота 20. Визначення активності аскорбатоксидази | 47 |
| Робота 21. Визначення активності тирозинази | 49 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 50 |
| ТЕМА 7. РОСЛИННІ РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ | 51 |
| Робота 22. Визначення вмісту дубильних і барвних речовин | |
| Робота 23. Виявлення дубильних речовин у рослинах | 53 |
| Робота 24. Виявлення алкалоїдів у рослинах | 54 |
| Робота 25. Визначення вмісту антоціанів у плодах , ягодах та овочах | 55 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 56 |
| ТЕМА 8. МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ | 56 |
| Робота 26. Хімічний аналіз з соку рослин (за К.П.Магніцьким) | |
| Робота 27. Виявлення нітратів у рослинах | 59 |
| Робота 28. Визначення масової частки золи та її лужності | 61 |
| Робота 29. Мікрохімічний аналіз золи рослин | 63 |
| Робота 30. Колориметричне визначення вмісту фосфору в рослинах | 64 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 66 |
| ТЕМА 9: ФОТОСИНТЕЗ | 66 |
| Робота 31. Пігменти зеленого листка | |
| Робота 32. Оптичні властивості пігментів | 69 |
| Робота 33. Хроматографічний розподіл пігментів | 70 |
| Робота 34. Визначення вмісту хлорофілу в листках за допомогою фотоелектроколориметру | 72 |
| Робот 35. Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу на реакцію перенесення водню (за Гуревичем) | 74 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 76 |
| ТЕМА 9: ДИХАННЯ | 77 |
| Робота 36. Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння різних рослин | |
| Робота 37. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного диоксида вуглецю (за Бойсеном-Іенсеном) | 80 |
| Робота 38. Визначення виділеного тепла при диханні насіння, що проростає | 82 |
| Робота 39. Визначення порівняльної активності дегідрогеназ в різних рослинних тканинах | 84 |

| | |
|---|-----------|
| | 91 |
| Робота 40. Виявлення поліфенолоксидази і пероксидази в рослинних об'єктах | 85 |
| ЗАПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ | 87 |
| СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ | 88 |