

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 091 «Біологія»*



Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дисципліни «Біохімія» для студентів освітнього рівня «Бакалавр» спеціальності 091 Біологія. Умань: Уманський національний університет садівництва, 2021 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 № 1 від 26.08.2021 р.)

Затверджено і рекомендовано до видання методичною комісією факультету плодовоовочівництва, екології та захисту рослин (протокол № 1 від 30. 08. 2021 р.)

УДК 664.34:581

@ Леонтюк І.Б., 2021

ЗМІСТ

Вступ	5
Правила роботи в лабораторії та техніка безпеки	6
Підготовка проб плодів і овочів до аналізу	7
Робота 1. Дослідження органел клітини рослин. Якісні реакції на основні запасні речовини	8
Робота 2. Визначення вмісту води і сухих речовин методом висушування	9
Робота 3. Визначення вмісту сухих розчинних речовин у плодах і овочах рефрактометричним методом	11
Робота 4. Одержання розчину білків і вивчення їх властивостей. Якісні реакції на білок	14
Робота 5. Визначення вмісту сумарних білків	20
Робота 6. Дослідження білків молока	22
Робота 7. Виділення нуклеопротейнів та нуклеїнових кислот із біологічного матеріалу	26
Робота 8. Визначення цукрів у плодах та овочах	30
Робота 9. Виявлення дисахаридів	34
Робота 10. Кількісне визначення дисахаридів	35
Робота 11. Визначення вмісту крохмалю в м'якоті плодів та в коренеплодах	36
Робота 12. Визначення загальної кислотності плодів і овочів титрометричним методом	40
Робота 13. Визначення щавлевої кислоти в плодах і овочах	41
Робота 14. Визначення вмісту жиру рефрактометричним методом	43
Робота 15. Вивчення властивостей жирів та визначення їх констант	44
Робота 16. Визначення вмісту вітаміну С (аскорбінової кислоти)	48
Робота 17. Визначення вмісту провітаміну А (β -каротину)	49
Робота 18. Кількісне визначення вмісту вітаміну Р у чаї за Левенталем	50
Робота 19. Визначення активності каталази	52
Робота 20. Визначення активності аскорбатоксидази	53
Робота 21. Визначення активності тирозинази	55
Робота 22. Визначення порівняльної активності дегідрогеназ в різних рослинних тканинах	58
Робота 23. Виявлення поліфенолоксидази і пероксидази в рослинних об'єктах	58
Робота 24. Визначення вмісту дубильних і барвних речовин	60

Робота 25. Виявлення дубильних речовин у рослинах	63
Робота 26. Виявлення алкалоїдів у рослинах	
Робота 27. Визначення вмісту антоціанів у плодах , ягодах та овочах	63
Робота 28. Хімічний аналіз з соку рослин (за К.П.Магніцьким)	65
Робота 29. Визначення масової частки золи та її лужності	67
Робота 30. Мікрохімічний аналіз золи рослин	69
Робота 31. Колориметричне визначення вмісту фосфору в рослинах	71
Робота 32. Хроматографічний розподіл пігментів	72
Робота 33. Визначення вмісту хлорофілу в листках за допомогою фотоелектроколориметру	73
Робота 34. Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння різнихрослин	76
Робота 35. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного диоксиду вуглецю (за Бойсеном-Ієнсеном)	78
Робота 36. Визначення виділеного тепла при диханні насіння, що проростає	80
Список рекомендованої літератури	83

В С Т У П

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.

Даний практикум містить перелік лабораторних робіт із біохімії, які укладено за програмними питаннями курсу "Біохімія" для студентів спеціальності 091 Біологія. В методичних рекомендаціях наведені лабораторні роботи з усіх основних розділів курсу: білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, органічні кислоти, ліпіди, вітаміни, ферменти, рослинні речовини вторинного походження, мінеральні речовини, гормони.

Розділи містять інформаційний матеріал для засвоєння теми, лабораторний практикум з акцентом на якісне та кількісне визначення біологічних молекул, питання для самоконтролю. В лабораторних роботах викладено принцип метода з наведенням реакцій взаємодіючих речовин, детально описаний хід роботи та очікувані результати.

При створенні методичних рекомендацій використані знання та навички студентів, що були здобуті з предметів: неорганічна хімія, органічна хімія, аналітична хімія, фізична хімія.

Структура лабораторних робіт дозволяє проводити їх без додаткових вказівок, що особливо актуально в зв'язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного рішення проблем в навчально-дослідницькій та практичній роботі. Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у хімічній лабораторії. Приготування реактивів та розчинів наведено в додатку А.

Результати виконаних лабораторних робіт оформляються студентами у вигляді звітів, які повинні містити: назву лабораторної роботи, її мету, короткі теоретичні відомості (не більш 0,5 – 1 стор.), експериментальну частину з результатами виконаних дослідів, а також кожна лабораторна робота повинна містити висновок (узагальнення результатів).

Лабораторний практикум визначає той необхідний мінімум знань, які повинен засвоїти студент на лабораторних заняттях. Більш детальні відомості в області різних розділів біохімії студенти одержують в лекційних курсах.

ПРАВИЛА РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ ТА ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

При роботі в біохімічній лабораторії необхідно неухильно виконувати правила роботи та техніку безпеки:

- старанно готуватися до кожного лабораторного заняття;
- стисло записувати в журналі усі спостереження, зроблені під час експерименту;
- усі склянки з реактивами закривати пробками і ставити на постійні, відведені для них місця. Не брати зайву кількість реактивів, а коли це випадково трапиться, не виливати надлишок у загальну склянку, щоб не забруднювати реактив у склянці;
- усі операції з леткими та шкідливими речовинами проводити лише у витяжній шафі;
- ніяких речовин в лабораторії не коштувати на смак. Нюхати речовини можна, лише направляючи на себе пару або газу легким рухом руки, а не нахилиючись до посудини і не вдихаючи на повні груди;
- категорично забороняється затягувати ротом з піпетки кислоти, луги, органічні речовини і їх розчини;
- під час нагрівання рідких і твердих речовин у пробірках і колбах заборонено направляти їх отвори на себе і сусідів, не зазирати зверху у посудину, яка нагрівається відкрито, щоб запобігти можливого враження під час викиду гарячої маси;
- категорично забороняється виливати у раковину концентровані розчини кислот і лугів, а також різноманітні органічні розчинники, сильно пахучі і вогнебезпечні речовини. Усі ці відходи потрібно зливати у спеціальні бутлі;
- не входити до лабораторії у верхньому одязі, не класти на хімічні столи портфелі, валізки та інші непотрібні для хімічного дослідження речі;
- вимкнути після роботи електронагрівальні прилади, загасити пальники, перевірити, чи добре закручені водопровідні крани;
- при опіку полум'ям, кислотами, лугами і при отруєнні реактивами або газом, слід негайно звернутися до викладача або лаборанта для надання першої допомоги. У тяжких випадках до потерпілого негайно слід викликати лікаря.

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.

Робота 1. Дослідження органел клітини рослини. 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 ядерців.

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 вверху. 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) ексикатор; 7) тигельні щипці.

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.

За вмістом 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 сирою 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 сирою 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 променю 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 послідуєчі 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 віджятий 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

Питання для самоконтролю.

1. Предмет вивчення біохімії. Особливості біохімії як науки.
2. Практичне значення та завдання біохімії.
3. Історія становлення й розвиток біохімії рослин, роль у цьому вітчизняних вчених.
4. Загальна будова рослинної клітини.
5. Будова та функції клітинних мембран.
6. Характеристика та значення пластид.
7. Мітохондрії, їх будова та функції.
8. Будова та функції ядра.
9. Функції та значення запасної тканини.
10. Будова та функції покривних тканин.
11. Характеристика механічних тканин.
12. Будова провідної системи. Значення та функції ксилеми та флоєми.
13. Вміст та значення води і сухих речовин для рослин.

Робота 4. 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.

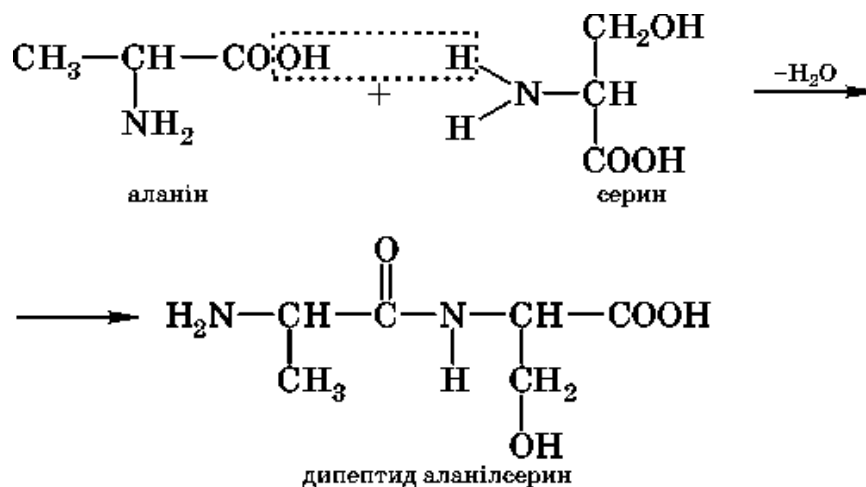
Білки – високомолекулярні нітрогеновмісні органічні сполуки, побудовані з великої кількості залишків амінокислот, з'єднаних між собою пептидними (кислотно-амідними) зв'язками в поліпептидний ланцюг (ланцюги), що мають складну структурну (просторову) організацію та виконують важливі життєві функції.

Їм належить першочергова роль у структурній організації і функціонуванні живих організмів. Білки є основними структурними компонентами живих організмів і в кількісному відношенні посідають перше місце серед усіх макромолекул, які містяться в живій клітині. В організмі тварин білків міститься від 40 до 50% і більше від сухої маси, менше у рослин – до 20–30%. У тканинах ссавців білки складають – 18–20%, тоді як нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди – 1–15%. Суха маса організму людини складається на 45-50% із білків, при цьому їх вміст досягає: у м'язах – 80%, у серці – 60%, печінці – 72%, легенях – 82%, нирках – 72%, селезінці – 84%, у кістках – 28%.

На сьогодні досягнуто значних успіхів у розкритті структури великої кількості білків, у вивченні взаємозв'язку структури і функції білків, механізму їх участі у найважливіших процесах життєдіяльності організму, у розумінні основ патогенезу багатьох хвороб. Білки мають велике народногосподарське значення. Вони є найважливішими компонентами їжі людини і сільськогосподарських тварин. Хронічна нестача білків призводить до різноманітних захворювань, зменшуючи тим самим середню тривалість життя.

Залежно від природи радикалу розрізняють амінокислоти аліфатичного (жирного) і циклічного рядів, причому останні можуть бути як ароматичними, так і гетероциклічними сполуками.

Одна з найважливіших властивостей амінокислот – це їх здатність вступати в реакцію поліконденсації з виділенням молекули води і утворенням ковалентного пептидного зв'язку; в реакції беруть участь тільки функціональні групи сусідніх амінокислот. Наприклад:



Різноманітність біохімічних функцій білків пов'язана з особливостями їх хімічної будови, яка визначається *якістю, кількістю* амінокислотних залишків і *порядком їх чергування* в поліпептидному ланцюгу.

Білкам належить першочергова роль у структурній організації і функціонуванні живих організмів.

Радикали амінокислот дають різноманітні забарвлення, що зумовлює можливість виявлення більшості з них певними кольоровими реакціями.

Кольорові реакції широко використовуються для виявлення білкової природи речовин, вивчення амінокислотного складу різних природних білків і пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот. Багато з них є досить чутливими та високо специфічними, що дозволяє відкривати незначні кількості білків, тієї чи іншої амінокислоти в продуктах харчування, у гідролізатах білків, які використовуються в харчовій промисловості.

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

Розчинність різних білків у воді і в різних розчинниках неоднакова і залежить від природи білка й розчинника, значення рН, температури, іонної сили тощо. У кислому середовищі краще розчиняються білки, для яких характерні кислотні властивості, а в лужному - білки, з основними

властивостями. Альбуміни добре розчиняються в дистильованій воді, а глобуліни розчинні у воді тільки в присутності електролітів. Білки опорних тканин (кератини, колаген, еластин та ін.) не розчиняються у воді й сольових розчинах, у воді вони лише набрякають. Розчинність білків у воді зростає за невеликих концентрацій нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.). Цей ефект називають сольовим розчиненням. Нейтральні солі в малих концентраціях збільшують ступінь дисоціації іонізованих груп білка, екранують заряджені групи білкових молекул і цим зменшують білок-білкові взаємодії. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висолюють) білки з водних розчинів; найактивніше це відбувається у ІЕТ білка. При цьому солі відтягують до себе від заряджених груп білка поляризовані молекули води і тим самим частково позбавляють білок гідратної оболонки, котра запобігає його осадженню з розчину.

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

У водному розчині більшість білків та їх частинок заряджені і гідратовані. При додаванні великих кількостей солей лужних і лужноземельних металів (натрію сульфату, магнію сульфату, натрію хлориду та інших), а також нейтральних солей, наприклад, амонію сульфату, відбувається руйнування гідратної оболонки (дегідратація) білка. Крім цього, електричний заряд білкової молекули знижується йонами солі, що на ній адсорбуються, частинки білка злипаються одна з одною і випадують в осад. Таке явище називають «висолюванням» білка. При висолюванні білок не втрачає притаманних йому фізико-хімічних і біологічних властивостей. Він знову розчиняється у воді і проявляє майже з тією активністю ферментативні, антигенні, імунні та інші біологічні властивості, тобто залишається нативним (натуральним).

Осадження білка методом висолювання використовують для розділення білкових фракцій при отриманні очищених білків, у тому числі ферментних і гормональних препаратів, а також для одержання білків в кристалічному стані. Його використовують у клініко-біохімічних лабораторіях для розділення альбумінів і глобулінів і визначенні їх співвідношення в сироватці крові. Осаджену фракцію білка відділяють центрифугуванням, розчиняють і кількісно визначають за допомогою різних методів.

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

Білки під впливом фізичних (температури, ультразвуку, йонізуючої радіації та інших), хімічних (мінеральних і органічних кислот, лугів, органічних розчинників, важких металів, алкалоїдів тощо) та біологічних факторів зазнають глибоких змін, пов'язаних з порушенням четвертинної, третинної і вторинної структури, що призводить до зміни фізико-хімічних і біологічних властивостей білка, тобто до *денатурації* (втрати нативності). При денатурації білка відбувається розрив «цементуючих» білкову молекулу вторинних зв'язків (водневих, дисульфідних, електростатичних, ефірних, вандервальсових та ін.). Це призводить до зміни просторової структури і зменшує його гідрофільні властивості. Білок стає більш гідрофобним, втрачає здатність розчинятись у звичайних для нього розчинниках і втрачає свої біологічні функції. Глибока денатурація є незворотною на відміну від взаємно-зворотної, при якій зміни структури білка бувають неглибокими і білок за деяких умов може знову набувати своїх нативних властивостей. Наприклад, при осадженні білків органічними розчинниками — спиртом або ацетоном (при низькій температурі), з подальшим видаленням осаджувача.

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 (H_2SO_4 ; HCl; HNO_3). 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

Біуретова реакція зумовлена наявністю в молекулах білків пептидних

(фенілаланін, тирозин, триптофан), а також вільні вище вказані амінокислоти нітруються з утворенням динітропохідних жовтого кольору, які при додаванні лугу перетворюються на хіноїдні структури, забарвлені в оранжевий колір.

Фенілаланін нітрується важче. Білки, що не містять циклічних амінокислот, не дають ксантопротеїнової реакції.

В одну пробірку наливають 1 мл 1%-вого розчину яєчного білка, в другу – 1мл 0,1%-вого розчину тирозину, в третю – 1%-вого розчину желатини, в четверту – 1 мл 0,1% -вого розчину гліцину. Додають до всіх пробірок по 1 мл концентрованої нітратної кислоти і обережно нагрівають до появи жовтого забарвлення. Потім пробірки охолоджують під струменем водопровідної води, додають краплями 20 % розчин натрію гідроксиду, доки не почнеться зміна забарвлення. Ця реакція вказує на присутність в молекулі білків таких амінокислот, як фенілаланіну, тирозину і триптофану. Дають пояснення результатам досліду в кожній пробірці, порівнюють забарвлення і записують хімізм реакції.

3. Нінгідринова реакція

Білки, пептиди, вільні α -амінокислоти дають сине або синьо-фіолетове забарвлення при взаємодії з нінгідрином (трикетогідринденгідратом). Реакція характерна для аміногруп, що знаходяться в α -положенні. α -Амінокислоти при нагріванні до 70°C з нінгідрином перетворюються на альдегіди з виділенням амоніаку і вуглекислоти. Нінгідрин при цьому відновлюється.

Відновлений нінгідрин конденсується з амоніаком та окисненим нінгідрином і утворює сполуку, яка енолізується і переходить у забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір.

Нінгідринова реакція з використанням спиртового (або ацетонового) розчину широко використовується в хроматографічному аналізі, а також для колориметричного кількісного визначення, амінокислот (цистеїн, метіонін, глутамінова кислота, гістидин; амінокислот у гідролізатах білків).

В одну пробірку наливають 1 мл 1 % -вого розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 % -вого розчину α -аланіну і в третю –1 мл 0,1% -вого розчину β -аланіну. Приливають у всі пробірки по 5-10 крапель 0,5 % -вого водного розчину нінгідрину і нагрівають на водяній бані при температурі 70°C протягом 5 хв. Спостерігають за утворенням забарвлення, порівнюють швидкість утворення забарвлення в кожній пробірці, дають пояснення та записують хімізм реакції.

Робота 5. 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 рідини, 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.

Робота 6. Дослідження білків молока

Молоко - полідисперсна система. Молоко і продукти його переробки є цінною сировиною і напівфабрикатами. Їхня висока біологічна цінність обумовлена оптимальним вмістом і майже ідеальним співвідношенням білків, ліпідів, вуглеводів, мінеральних солей і вітамінів. Завдяки складу і збалансованості амінокислот ці речовини засвоюються організмом людини майже повністю.

Ступінь чистої утилізації молочного білка в організмі людини становить 75%). Білки коров'ячого молока багаті на лізин і треонін, лімітуючими амінокислотами є метіонін і цистеїн.

Завдяки колоїдному стану білки молока легкодоступні для дії травних ферментів. Харчова цінність білків збільшується завдяки тому, що вони утворюють комплекси з вітамінами, особливо групи В, і мінеральними речовинами.

Харчова цінність молока і вихід таких молочних продуктів, як кисломолочний сир, сири сичужні залежить від вмісту білка. Білки молока є найціннішими в харчовому відношенні. Вміст білків у молоці коливається в межах 2,8-4,0%.

Молоко містить більше ніж 20 білків. Їх поділяють на дві групи: *казеїни* (складні білки) і *сироваткові* (прості білки). Вони відрізняються один від одного за молекулярною масою, ізoeлектричною точкою, співвідношенням амінокислот, особливостями складу і структури.

Вміст казеїну в молоці становить 73-85% усіх білків. Казеїн має вигляд колоїдних частин або міцел (ниток), що складаються з більш дрібних частин (субміцел). Казеїн чутливий до дії іонів кальцію. За їх наявності випадає в осад. Казеїн є фосфопротеїном, оскільки містить у своєму складі фосфорну кислоту. Він приєднує до себе кальцій, магній, натрій, мінеральні речовини. У складі казеїну є чотири фракції, що відрізняються за вмістом амінокислот, фосфорної кислоти, за чутливістю до дії іонів кальцію та сичугового ферменту. Казеїн у молоці міститься у вигляді кальцій-фосфат-казеїнового комплексу. Він складається з казеїнату кальцію, колоїдного фосфату кальцію, лимонної кислоти, магнію, калію і натрію.

Після осадження казеїну в ізoeлектричній точці виявляються сироваткові білки. До їх складу входять β -лактаглобулін, α -лактоальбумін, альбумін сироватки крові, імуноглобуліни і протеозопептидна фракція.

Здатність казеїну легко коагулювати під дією кислоти, сичужного ферменту (пепсину) та наростання іонів кальцію широко використовується у виробництві кисломолочних продуктів, сичужних сирів та бринзи. Іншу значну частину білків складають сироваткові білки (15-20% всіх білків). Відділяють сироваткові білки внаслідок кип'ятіння прозорих фільтратів, отриманих після осадження казеїну. Дані білки містять багато незамінних амінокислот (метіоніну, цистеїну, треоніну), що має важливе значення при їх використанні в подальшому для харчових цілей. У багатьох країнах світу вже давно введені розцінки за молоко з врахуванням вмісту білка. Найближчим часом це планується робити і в Україні.

У нейтральному середовищі білки молока не коагулюють при кип'ятінні, хоча й денатурують. Осадження казеїнів відбувається під впливом молочної кислоти, що утворюється під дією мікроорганізмів у процесі скисання молока.

Матеріали і обладнання: 1) нагрівальний прилад; 2) штатив із пробірками; 3) мірні циліндри на 10 мл; 4) папір індикаторний; 5) колби на 50 мл; 6) конічні колби на 100 мл; 7) бюретки на 25-50 мл; 8) лійки; 9) молоко; 10) кальцій хлорид, 10% розчин; 11) ацетон, 50% розчин; 12) буфер, рН якого дорівнює 5,0 (змішують 10,3 мл 0,2 М розчину $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ із 9,7 мл 0,1 М розчину лимонної кислоти $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); 13) H_2SO_4 розчин 1:3; 14) крохмальний розчин KI (3 г KI та 3 г крохмалю у 100 мл води); 15) сульфатна кислота; 16)

нітратна кислота; 17) калій йодид, 5% розчин; 18) розчин крохмалю, 2% розчин; 19) хлоридна кислота, концентрована; 20) фенолфталеїн, 1% розчин; 21) натрій гідроксид, 0,1 н розчин; 22) формалін, 40% розчин.

ХІД РОБОТИ

Осадження казеїну.

До складу молока входять різні білки: казеїни, лактоглобуліни, альбуміни. За кількістю переважає казеїн. У нейтральному середовищі вони не коагулюють при кип'ятінні, хоча й денатурують. Осадження казеїнів відбувається під впливом молочної кислоти, що утворюється під дією мікроорганізмів у процесі скисання молока. При коагуляції білків молока кальцій хлоридов в осад переходять усі їх фракції.

У пробірку наливають близько 2 мл молока і доводять його до кип'ятіння, потім додають 5-6 крапель розчину кальцій хлориду, спостерігається поява осаду.

Осадження білків молока ацетоном.

Даний метод використовується для вивчення свіжості молока. Ацетон у нерозчиненому вигляді, спричиняючи дегідратацію білків, осаджує їх із розчину. Наполовину розбавлений ацетон не викликає коагуляцію білків молока. У разі накопичення в молоці кислот стійкість білків знижується, і додавання 50% розчину ацетону викликає їх коагуляцію. Це відбувається при такій кількості кислот в молоці, яка ще не відчувається на смак. Проба з ацетоном визначається при визначенні свіжості молока.

У дві пробірки наливають по 1 мл молока. В одну з них додають таку саму кількість лимоннокислого буфера, доводячи рН суміші до 5,0 (контролюють за допомогою індикаторного папірця). Струшуючи цю пробірку переконуються у відсутності на стінках коагулянту. Потім в обидві пробірки доливають по 1 мл ацетону, енергійно струшують, спостерігають появу згустків на стінках пробірки.

Визначення наявності гідроген пероксиду.

У пробірку наливають 2 мл молока, не перемішують, додають 1 мл розчину сульфатної кислоти та 0,2 мл крохмального розчину. Через 10 хвилин спостерігають за зміною розчину в пробірці, не струшуючи її. Поява в пробірці окремих плям синього кольору свідчить про наявність гідроген пероксиду в молоці.

Реакція на наявність хлору в молоці.

До 10 мл молока додають у колбу 1 мл 5% розчину КJ і 1 мл свіжоприготовленого 2% розчину крохмалю, перемішують, доливають в 10 мл концентрованої хлоридної кислоти і перемішують. Якщо в молоці наявний хлор, через 5-10 хвилин у колбі з'являється синє забарвлення рідини.

Визначення казеїну формольним титруванням.

У конічну колбу відміряють циліндром 10 мл молока, додають 5 крапель розчину фенолфталеїну і з бюретки обережно титрують 0,1 н розчином натрію гідроксиду, увесь час перемішуючи рідину до появи незникаючого протягом хвилини слаборожевого забарвлення. Потім у рідину додають 2 мл попередньо нейтралізованого розчину формаліну і, коли рідина почне знебарвлюватися, знову продовжують обережно титрувати з тієї самої бюретки до появи слаборожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хвилини. Рівень лугу в бюретці записують і за різницею з першим титруванням визначають кількість лугу, який пішов на друге титрування. Отриману цифру помножують на 1,47 і знаходять вміст казеїну в молоці у відсотках, а після множення на 1,94 визначають загальну кількість білка в молоці.

Осадження казеїну із молока

До 30 мл сепарованого молока, розведеного в чотири рази, обережно перемішуючи, по краплях додають 0,1 % розчин оцтової кислоти до припинення осаження казеїну, який відфільтровують, промивають водою, вносять у 0,1 % розчин карбонату натрію, щоб очистити від жиру та інших речовин.

Казеїн у розчині карбонату натрію розчиняється, а жир знаходиться в емульгованому стані.

Суміш фільтрують через вологий фільтр (жир залишається на фільтрі). Із фільтрату розчином оцтової кислоти знову осаджують казеїн. Осад відфільтровують, віджимають між листками фільтрувального паперу (бажано насухо) й розтирають у ступці з 15 – 20 мл 96 %-го розчину спирту з метою зневоднення. Для знежирення казеїну змішують спочатку з 20 мл ефіру, а потім із 20 мл суміші метилового спирту та хлороформу (1 : 1). Знежирений казеїн висушують на повітрі й розтирають у порошок, який використовують для гідролізу казеїну.

Робота 7. Виділення нуклеопротейнів та нуклеїнових кислот із біологічного матеріалу

Матеріали і обладнання: 1) Тканина (селезінка, молоки риб); 2) сухі дріжджі; 3) 5%-й розчин хлориду натрію, який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію, 4) 0,2%-й, 0,4%-й і 0,02 моль/л розчини NaOH, 5) 5%-й розчин оцтової кислоти; 6) фільтри, 7) фарфорова ступка з товкачиком, 8) скляні палички, 9) центрифужні та звичайні пробірки, 10) лійки, 11) центрифуга.

Дослід 1. Виділення рибо- та дезоксирибонуклеопротейнів з тваринних тканин та дріжджів

Дезоксирибо- та рибонуклеопротейни можна виділити з тваринних тканин, використовуючи луги. Якщо розчиняти дезоксирибонуклеопротейни (ДНП) в лугах, їх можна осадити шляхом нейтралізації, а якщо розчиняти в розчинах солей, осадження можна здійснити після розведення розчину. Рибонуклеопротейни, що є також розчинними в лужних розчинах, осаджуються при додаванні неорганічних кислот (оцтової кислоти) в ізоелектричній точці.

ХІД РОБОТИ

Одержання дезоксирибонуклеопротейнів.

1. 0,5 г селезінки або іншої тканини (зобна залоза, селезінка, молоки риб, сухі дріжджі) подрібнюють у фарфоровій ступці з 100 мг скляного порошку та з 15 мл 5%-го розчину NaCl (який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію) протягом 15 хв.

2. Суміш переносять у центрифужні пробірки й центрифугують 15 хв за 1000 g. У пробірку наливають 90 мл води й повільно доливають центрифугат, перемішуючи вміст скляною паличкою. Дезоксирибонуклеопротейни, які є нерозчинними у воді, випадають у осад у вигляді ниток. Нитки збирають на паличку або, якщо утвориться осад, фільтрують, переносять у чисту пробірку та розчиняють у 0,2%-му розчині NaOH.

Одержання рибонуклеопротейнів.

1. Наважку сухих дріжджів (10 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці протягом 15 хв із 50 мл 0,4%-го розчину NaOH, який додають невеликими порціями.

2. Суміш центрифугують 10 хв при 2000 g, до центрифугату доливають, помішуючи, 15—20 мл 5%-го розчину оцтової кислоти. Для відокремлення осаду проби центрифугують, після цього отриманий осад розчиняють у 15—20 мл розчину NaOH (0,02 моль/л). Одержані розчини рибо- та дезоксирибонуклеопротейнів використовують у якісних реакціях на виявлення їх

складових компонентів (азотистих основ, вуглеводів, фосфорної кислоти та білків).

Дослід 2. Виділення дезоксирибонуклеопротейнів за методом Мирського та Поллістера.

Даний метод дозволяє отримати ДНК з тканин тварин за допомогою екстракції нуклеопротейнів розчинами хлориду натрію. Після цього нуклеопротейни можна осадити й отримати з них очищені нуклеїнові кислоти. Екстракцію ДНП і РНП проводять розчинами NaCl різної концентрації: 1,0 М і 0,14 М, відповідно.

Матеріали і обладнання: 1) Тканина, 2) 0,14 М розчин хлориду натрію, 3) 2М розчин хлориду натрію, 4) 1М розчин NaCl, 5) суміш 306 хлороформ — етиловий спирт (4 : 1), 6) 65%-й і 95%-вий етанол, 7) ефір, 8) 10%-ва ТХО, 9) колби, 10) ступка, 11) ножиці, 12) електромішалка, 13) годинник, 14) піпетки, 15) мірний циліндр, 16) ваги, 17) льодяна баня, 18) термостат, 19) центрифужні пробірки, 20) центрифуга (8000 – 10000 об./хв).

ХІД РОБОТИ

1. Тканину (наприклад, печінку) подрібнюють, ретельно промивають трьома об'ємами 0,14 М розчину хлориду натрію, перемішуючи на електромішалці протягом 1 хв, потім центрифугують при 8000 об/хв. Цю операцію повторюють, доки екстракт не перестане осаджуватись ТХО.

2. Осад розмішують у 2,5 об'ємі 0,14 М розчину хлориду натрію відносно вихідної ваги тканини, додають рівний об'єм 2 М розчину хлориду натрію і перемішують протягом 2—3 хв на електромішалці. В'язкий розчин перемішують на холоді протягом кількох годин і центрифугують при 10000 об/ хв.

3. Отриманий прозорий в'язкий розчин доливають до 6 об'ємів холодної води, в результаті чого концентрація NaCl зменшується до 0,14 М. Нитковидний осад дезоксирибонуклеопротейну намотують на скляну паличку. Одержаний препарат ДНП очищують, повторно розчиняючи в 1 М розчині NaCl і потім осаджуючи з 0,14 М розчином хлориду натрію. Такий розчин препарату в 1 М розчині хлориду натрію добре зберігається на холоді.

Для того, щоб отримати препарат ДНП у сухому вигляді, осад промивають послідовно 65%-вим етиловим спиртом, гарячим 95%-вим етиловим спиртом і ефіром, а потім висушують препарат при 106°C.

4. Для розщеплення дезоксирибонуклеопротейну на білок і нуклеїнову кислоту проводять 7-8-кратне розмішуванням його в 1,0 М розчині хлориду натрію з сумішшю хлороформ — етиловий спирт (4 : 1), щоразу протягом 5 год. При цьому нуклеїнова кислота залишається у розчині, а білковий компонент збирається у вигляді осаду на межі фаз вода_хлороформ. Після сьомого розмішування нуклеїнова кислота практично звільнюється від білка. З цього безбілкового розчину її осаджують 5-ма об'ємами спирту, промивають 65% і 95%-вим спиртом, потім ефіром і висушують у вакуумі. За допомогою цього методу можна отримати препарати високополімерної натрієвої солі ДНК. Метод є досить простим і тому широко застосовується з препаративною й аналітичною метою.

Дослід 3. Виділення РНК з дріжджів за Шантреном.

РНК можна отримати з різних об'єктів: дріжджів, вірусу тютюнової мозаїки, печінки, підшлункової залози. При виділенні РНК із дріжджів за методом Шантрена проводять лужний гідроліз дріжджів при 0°C. РНК осаджується спиртом у кислому середовищі, а для очищення препарату здійснюють переосадження.

Матеріали і обладнання: 1) Пекарські дріжджі, 2) 10%-вий розчин NaOH, 3) оцтова кислота, 4) 94%-й етиловий спирт, 5) концентрована соляна кислота, 6) ефір, 7) 2%-вий розчин NaOH, 8) холодний ацетон, 9) колби, 10) льодяна баня, 11) полотно для фільтрування, 12) годинник, 13) піпетки, 14) мірний циліндр, 15) центрифужні пробірки, 16) центрифуга, 17) ексікатор.

ХІД РОБОТИ

1. Наважку пекарських дріжджів суспендують у 4-х об'ємах води і охолоджують до 0°C. Потім додають ще 2 об'єми попередньо охолодженого до 0°C 10%-вого розчину NaOH до кінцевої концентрації лугу 3,3%.

2. Розчин залишають на 1,5 год при 0°C, доводять рН до 6,5 оцтовою кислотою і фільтрують крізь полотно. Отриману прозору рідину, до якої додають етиловий спирт до концентрації 4%, фільтрують. При цьому утворюється прозорий фільтрат жовтого кольору із зеленуватою флуоресценцією.

3. До фільтрату додають концентровану соляну кислоту до кислої реакції за конго, а потім повільно при перемішуванні додають 4/5 об'єму 94%-го етилового спирту.

4. Розчин відстоюють 30 хв, при цьому утворюється білий осад. Більшу частину рідини зливають, а осад відокремлюють центрифугуванням, промивають двічі спиртом, ефіром і висушують в ексікаторі над сірчаною кислотою.

Таким чином отримують рибонуклеїнову кислоту у вигляді білого порошку. Вихід становить 1,2% від ваги взятих для роботи дріжджів. Даний метод дозволяє одержати нерозчинний препарат РНК. При виникненні необхідності таку РНК можна перевести в натрієву сіль, яка добре розчинна у воді. Для цього беруть певну наважку РНК, суспендують її у 50 об'ємах води і рН розчину доводять 2%-вим розчином NaOH до 6,0. Якщо розчин каламутний, його фільтрують, охолоджуючи до 0°C, і додають 3 об'єми холодного ацетону. При цьому в осад випадає рибонуклеїнат натрію, його центрифугують, промивають ацетоном і висушують в ексікаторі. У такий спосіб препарати РНК, що є в продажу, переводять в натрієву сіль.

Питання для самоконтролю.

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.

Робота 8. Визначення цукрів у плодах та овочах

Вуглеводи, нарівні з білками, – найбільш розповсюджені біогенні сполуки, що беруть участь у структурній організації клітини і

використовуються в процесі її життєдіяльності. Вуглеводами називають полігідроксикар- бонільні сполуки, що містять альдегідну чи кетонну групу або утворюють їх при гідролізі. Залежно від кількості моносахаридних одиниць, що утворюють молекулу, вуглеводи розподіляються на такі групи: моносахариди (монози) або прості цукри, олігосахариди, що дають при гідролізі від двох до десяти моносахаридів і полісахариди (поліози), що гідролізуються з утворенням більше десяти моносахаридів.

Вуглеводи утворюються з неорганічних речовин у процесі фотосинтезу в зелених рослинах із карбону діоксиду і води з поглинанням сонячної енергії. Вуглеводам в організмі належать різноманітні функції: енергетична, структурна, опорна, захисно-механічна, гідроосмотична, кофакторна та ін.

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 редуруючих 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.

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 гіпосульфиту; 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.

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 розчині 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 редукуючих цукрів і дисахариду сахарози.

Визначення вмісту редукуючих 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:

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

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

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

де X – вміст редукуючих цукрів, %;

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

$O_{\text{ф}}$ - 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 (А). В цю ж колбу додають 25 мл 0,1 н розчину йоду. Після цього обережно при постійному перемішуванні доливають приблизно 30 мл 0,1н 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 0,1н

розчином гіпосульфїту до повного знебарвлення вмісту колби в присутності індикатора 1% - го розчину крохмалю.

Вміст глюкози розраховують за формулою:

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

де X – вміст глюкози, %;

M₁ – кількість взятого 0,1 н розчину йоду, мл;

T₁ – поправка до титру 0,1 н розчину йоду, мл;

M₂ – кількість 0,1 н розчину гіпосульфїту, яка пішла на титрування, мл;

T₂ – поправка до титру 0,1 н розчину гіпосульфїту;

O₁ – загальний об'єм водної витяжки до фільтрування, мл;

O₂ - 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 редуруючих 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 9. Виявлення дисахаридів.

Матеріали та реактиви. Розчини лактози, мальтози, гідроксиду натрію та сульфату міді (всі 0,5%-ві). Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, пальник.

Дослід 1. Реакції виявлення дисахаридів мальтози і лактози.

Завдяки наявності вільної альдегідної групи в молекулі лактози (в залишку глюкози) та мальтози (в другого залишку глюкози) ці дисахариди мають відновлюючі властивості й можуть брати участь у реакціях відновлення, зокрема, мальтоза та лактоза дають позитивну реакцію Троммера

ХІД РОБОТИ.

В дві хімічні пробірки наливають: в одну 2 мл 0,5%-го розчину мальтози, в другу – 2 мл 0,5%-го розчину лактози, додають по 1 мл 0,5%-го розчину гідроксиду натрію і додають по 5 крапель 0,5%-го розчину сульфату міді. Пробірки обережно нагрівають у полум'ї пальника і спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Дослід 2. Виявлення сахарози.

Для виявлення дисахаридів, які не відновлюються, використовують методи, що базуються на гідролізі дисахаридів до моноз:



із наступним їх виявленням за реакціями Троммера, Селіванова, Фелінга тощо.

Матеріали та реактиви. Концентрована соляна кислота, 25%-й розчин соляної кислоти, 5%-ві розчини сахарози, гідроксиду натрію та сульфату міді, кристалічний резорцин. Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, термометр, лабораторний годинник.

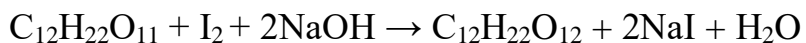
ХІД РОБОТИ.

В дві пробірки наливають по 6 мл 5%-го розчину сахарози. В одну з них додають 2 краплі концентрованої HCl і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Друга пробірка містить контрольний розчин сахарози. Після охолодження до кімнатної температури беруть ще дві пробірки і ділять обидва розчини навпіл (по 3 мл). Одну половину підкисленого розчину нейтралізують додаванням 1 мл 5%-го розчину NaOH, а до половини контрольного розчинують 1 мл води. Надалі ці пробірки використовують для проведення реакції Троммера. Для цього до вмісту обох пробірок додають по 1 мл розчину гідроксиду натрію та по 5 крапель розчину сульфату міді і надалі нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Гідролізат сахарози дає позитивну реакцію Троммера (червоний осад геміоксиду міді), а контрольний розчин — негативну. З гідролізатом сахарози та контрольним розчином сахарози, які залишилися (по 3 мл) проводять реакцію Селіванова на виявлення фруктози. Для цього в обидві пробірки додають по 1 мл розчину соляної кислоти та декілька кристалів резорцину, вміст пробірок нагрівають на водяній бані протягом 5-10 хв за температури 80°C. Спостерігають позитивну реакцію в пробі з гідролізатом (поява вишнево-червоного забарвлення) і відсутність забарвлення в контрольній пробі. Спостереження записують у зошит, роблять висновок.

Робота 10. Кількісне визначення дисахаридів

Дослід 1. Визначення концентрації лактози в молоці.

Метод заснований на здатності альдегідної групи лактози в лужному середовищі окиснюватися молекулярним йодом:



Надлишкову кількість йоду, яка не вступила в реакцію, визначають титруванням тіосульфатом натрію, використовуючи як індикатор крохмаль. **Матеріали та реактиви.** Складчасті паперові фільтри, молоко, 7%-й розчин сульфату міді, 2%-й розчин гідроксиду натрію, 5%-й розчин фториду натрію, 0,04 моль/л розчин йоду, 5%-й розчин соляної кислоти, 0,05 моль/л розчин

тіосульфату натрію, 1%-й розчин крохмалю. Обладнання. Скляні палички, градуйовані піпетки, колби мірні (об'єм 50 мл), колби конічні з притертою пробкою (об'єм 100 мл), лійки скляні, бюретки, крапельниці, годинник.

ХІД РОБОТИ.

У дві мірні колби вносять по 5 мл розчину сульфату міді, по 5 мл розчину гідроксиду натрію та по 2,5 мл розчину фториду натрію. В одну з них (проба) додають 5 мл молока, в іншу (контроль) – 5 мл дистильованої води, перемішують, доливають дистильованої води до об'єму 50 мл і через 30 хв фільтрують. Потім у конічні колби переносять по 20 мл фільтрату проби й контролю, вливають по 20 мл розчину йоду і, безперервно перемішуючи, по 10 мл розчину гідроксиду натрію. Колби ретельно закривають, через 20 хв до їх вмісту додають по 10 мл розчину соляної кислоти, по три краплі розчину крохмалю і титрують розчином тіосульфату натрію до зникнення забарвлення, яке утворилося внаслідок додавання крохмалю. Масову концентрацію лактози в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = \frac{(A - B) \times f \times Q \times V_0}{V_1 \times V_2};$$

A і B – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування проби та контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину тіосульфату натрію (0,97);

Q – маса лактози (18,1 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину тіосульфату натрію; V₀ – загальний об'єм проби;

V₁ і V₂ – об'єми фільтрату та молока, взяті для дослідження.

Розрахунок масової концентрації лактози в молоці та отриманий результат записують у зошит.

Робота 11. Визначення вмісту крохмалю в м'якоті плодів та в коренеплодах

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 синє 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.

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 KI; 4) 0,1 н розчин тіосульфату.

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 $Ca(NO_3)_2$, колбу накривають скляною лійкою,

ставлять на електроплитку і кип'ять (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 повторяють 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 добавляємо 10 мл 0,5 н розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 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 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 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 .

Питання для самоконтролю.

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.
17. Які зв'язки формуються між моносахаридними одиницями у складі дисахаридів?
18. Від чого залежить наявність у дисахаридів відновлювальних властивостей?
19. Які дисахариди належать до невідновлювальних?
20. Які методи застосовують для виявлення дисахаридів, що не мають відновлювальних властивостей?
21. В чому полягає принцип методу визначення концентрації лактози в молоці?

ОРГАНІЧНІ КИСЛОТИ ТА ЛІПІДИ

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.

Робота 12. 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.

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 луку 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 луку, 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 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 $3-7^0$ C і фільтруємо.

Щавлева кислота ($\text{COOH} - \text{COOH}$) 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 ($\text{COOH} - \text{COOK}$), в ревені – у складі оксалату кальцію ($\text{COOH} - \text{COO}(\text{Ca})_2$). 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 $\text{AgCl}\downarrow$. 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 сірчаноокислового 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 20°C , 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.

Питання для самоконтролю.

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.

ВІТАМІНИ

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.

Робота 16. Визначення вмісту вітаміну С (аскорбінової кислоти)

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 шавлевої кислоти; 7) 0,001 н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенол; 8) хлороформ.

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 інактивування 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 мікробюретки 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, мл/100 г;

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

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

O_1 – загальний об'єм витяжки, мл;

M_2 – наважка, г;

O_2 – 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.

Робота 18. Кількісне визначення вмісту вітаміну Р у чаї за Левенталем

До речовин, які володіють Р-вітамінною активністю, належать, насамперед, рутин і гесперидин. Подібну активність проявляють катехіни й таніни чайного листка. В рослинах ці сполуки беруть участь в окисно-відновних процесах. За своєю природою рутин є глікозидом, який складається з залишків рамнози, β -глюкози та флавонону кверцитину. Крім чайного листка, рутин у незначній кількості міститься в бутонах і квітах софори японської, а також у листках і квітах різних видів гречки.

Метод кількісного визначення рутину ґрунтується на його здатності окислюватися перманганатом калію; як індикатор використовують індигокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин.

Експериментально встановлено, що 1 мл 0,02 моль/л розчину перманганату калію окислює 6,4 мкг рутину.

Матеріали і обладнання: 1) Ваги технохімічні, 2) мікробюретка, 3) крапельниця, 4) піпетки градуйовані, 5) хімічні стаканчики або колбочки, 6) годинник, 7) електрична плитка, 8) 0,01 моль/л розчин перманганату калію (KMnO_4), 9) індикатор індигокармін (1 г індигокарміну розтерти в фарфоровій ступці, розчинити в 50 мл концентрованої сірчаної кислоти та залити водою до об'єму 1 л; потім суміш відфільтрувати та зберігати в темній посудині), 10) дистильована вода, 11) чай або готовий екстракт.

ХІД РОБОТИ

Наважку чаю масою 100 мг помістити в колбочку, залити 50 мл гарячої дистильованої води та кип'ятити впродовж 5 хв. Отриманий екстракт охолодити, відібрати 10 мл і перенести в іншу колбочку або хімічний стаканчик, куди долити ще 10 мл дистильованої води та 5 крапель індигокарміну (при цьому з'являється синє забарвлення). Ретельно перемішуючи рідину в колбочці, вміст її відтитрувати розчином KMnO_4 до появи стійкого жовтого забарвлення. Паралельно провести титрування контрольного розчину, де замість екстракту в колбочку внести 10 мл дистильованої води. Різниця між дослідним і контрольним титруванням представляє собою число мілілітрів 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , що витратився на окислення рутину.

Вміст вітаміну Р $w(\text{P})$ (в мкг) розрахувати за формулою:

$$W(\text{P}) = \frac{q \cdot V \cdot V_0}{V_1 \cdot m}$$

де q – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (3,2);

V – об'єм 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , витраченого на титрування, мл;

V_0 – об'єм вихідного розчину, в якому розчинена взята для аналізу наважка, мл;

V_1 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл;

m – маса сухої речовини, взятої для аналізу, г.

Питання для самоконтролю.

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.

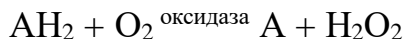
ФЕРМЕНТИ

Робота 19. 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.

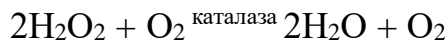
Ферменти – це біологічні каталізатори білкової природи, які володіють високою специфічністю і відіграють важливу роль в процесах обміну речовин.

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 (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-рожевого забарвлення, яке не зникає на протязі хвилини. За різницею

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 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. KJO_3 ; 6) 10%-вий KJ ; 7) 0,001 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 8) 1%-вий розчин крохмалю; 9) фосфатний буфер, 0,15 М з рН 7,0; 10) аскорбінова кислота (розчин з вмістом 1 мг на 1 мл); 11) 5% HCl .

Аскорбатоксидаза відноситься до класу оксидоредуктаз, вона каталізує окислення аскорбінової кислоти (вітаміну 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 кожену 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;

а – об'єм 0,001 н. розчину Na₂S₂O₃, який витрачено на титрування надлишку йоду в дослідній пробі, мл;

б – об'єм 0,001 н. розчину Na₂S₂O₃, який витрачено на титрування контрольної проби, мл;

T - поправка до титру 0,001 н. розчину Na₂S₂O₃;

0,088 – маса аскорбінової кислоти, яка відповідає 1 мл 0,001 н. розчину Na₂S₂O₃, мл;

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

Робота 21. Визначення активності тирозинази

Тирозиназа або монофенол-монооксигеназа широко розповсюджена в рослинах. Вона міститься в картоплі, цукровому буряку, багатьох плодкових культурах, у зернах злаків та інших рослинах. Активна тирозиназа міститься в зерні жита та в окремих сортах пшеничного борошна. Темний колір житнього хліба частково пояснюється саме дією тирозинази; цією ж причиною пояснюється потемніння макаронів при сушінні.

Тирозиназа – фермент, який містить мідь і відноситься до типових оксидаз. Для її дії необхідна наявність вільного кисню. Тирозиназа каталізує окислення тирозину, фенолів, пірокатехіну, крезолів, пірогалолу та інших сполук.

При дії на тирозин тирозиназа каталізує двостадійну реакцію гідроксилювання з наступним дегідуванням. Тирозин, окислюючись, перетворюється в дигідроксифенілаланін, а потім у дофахінон. Після цього можливе протікання реакції перетворення дофахінону в дигідроксиіндол і в індол-5,6-хінон, а внаслідок конденсації двох останніх продуктів утворюється димер, до якого можуть окислювальним шляхом приєднуватися наступні дигідроксиіндольні ланки з утворенням, у кінцевому результаті, високополімерних темнозабарвлених сполук – меланінів. Потемніння очищеної картоплі, розрізаного цукрового буряка, розрізаних плодів пояснюється утворенням меланінів під дією тирозинази в присутності кисню повітря.

Тирозиназу, що міститься в рослинному матеріалі, вилучають водою. У водну витяжку, що містить фермент, вносять певну кількість тирозину та інкубують у термостаті при 40⁰ С. Під час інкубації частина тирозину перетворюється в темнозабарвлений пігмент – меланін. Після цього фермент інактивують нагріванням розчину до кипіння, а меланін осаджують хлоридом барію в присутності соди. В фільтраті визначають кількість неокисленого тирозину броматометричним методом. Для визначення кількості тирозину в розчин вносять надлишок 0,03 н розчину бромат-бромідної суміші, підкислюють соляною кислотою й залишають на 10 хв. При цьому відбувається бромовання тирозину. Надлишок бромиду відтитровують розчином метилоранжу, який руйнується й знебарвлюється під дією бромиду.

Титрування ведуть до появи червоного забарвлення, що не зникає та обумовлене надлишком метилоранжу. Нормальність розчину метилоранжу встановлюють за титруванням розчином бромат-бромиду. Молярна маса бромату калію (KBrO₃) дорівнює 167,00, молярна маса тирозину C₆H₄(OH)CH₂CH(NH₂)COOH дорівнює 181,19.

Матеріали і обладнання: 1) Піпетки градуйовані, 2) ступка з товкачиком, 3) колби мірні на 50 мл, 100 мл, 200 мл і 1 л, 4) колби конічні на 250 мл, 5) хімічний стакан, 6) лійка, 7) фільтр, 8) бюретки, 10) крапельниця, 11) центрифуга, 11) термостат, 12) годинникове скло, 13) годинник, 14) прожарений пісок, 15) толуол, 16) 0,05 %-ий розчин тирозину (0,1 г тирозину перенести в мірну колбу на 200 мл, додати 1,2 мл 5 %-ого розчину Na₂CO₃, долити 150 мл

дистильованої води, нагріти до розчинення тирозину, а потім охолодити, довести водою до мітки й перемішати; зберігати в темній посудині в холодильнику), 17) 0,03 н розчин бромат-броміду (зважити на аналітичних вагах 0,8349 г $KBrO_3$, перенести в мірну колбу на 1 л, додати 10 г KBr , розчинити у воді, розбавити водою до 1 л і старанно перемішати), 18) 0,2 %-ий розчин метилоранжу (зважити 2,0 г метилоранжу, перенести в мірну колбу на 1 л, долити дистильованої води, перемішати й довести водою до мітки, розчин відфільтрувати), 19) 10 %-ий розчин хлориду барію (10 г $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ перенести в мірну колбу на 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести водою до мітки й перемішати), 20) 5 %-ий розчин карбонату натрію (50 г безводної солі Na_2CO_3 перенести в мірну колбу на 1 л, розчинити в дистильованій воді й довести водою до 1 л), 21) розчин соляної кислоти (з розведенням 1:1) (50 мл концентрованої соляної кислоти перенести в мірну колбу на 100 мл, довести водою до мітки й перемішати).

ХІД РОБОТИ.

На технохімічних вагах відважити 2-5 г свіжого рослинного матеріалу та перенести його в фарфорову ступку й ретельно розтерти з невеликою кількістю дистильованої води. Якщо матеріал розтирається погано, то в ступку додати невелику кількість прожареного піску. Після розтирання суспензію перенести в мірну колбу на 50 мл, споліскуючи ступку невеликою кількістю води. Вміст колби довести водою до мітки, ретельно перемішати й дати осад осісти, а потім відфільтрувати. Якщо осад осаджується погано, то його відцентрифугувати впродовж 15 хв. при 5 тис. оберт./хв. Відібрати піпеткою 10 мл прозорої рідини над осадом або 10 мл фільтрату та перенести в конічну колбу на 250 мл. У колбу додати 10 мл розчину тирозину, 2-3 краплі толуолу, поставити колбу в попередньо нагрітій до $40^{\circ}C$ термостат і витримати при цій температурі 2 год. За час інкубації під дією тирозинази, що міститься в рослинному матеріалі, проходить окислення частини внесеного тирозину в меланіни.

Після закінчення інкубації в колбу додати 1 мл розчину карбонату натрію, 3 мл розчину хлориду барію, нагріти до кипіння й відфільтрувати через паперовий фільтр у колбу для титрування. Колбу, де проводилось осадження, та осад на фільтрі промити 3 рази гарячою водою порціями по 8-10 мл. Фільтрат охолодити, додати 10 мл бромат-бромідного розчину та 4 мл розчину соляної кислоти, накрити колбу годинниковим склом, перемішати та залишити на 10 хв. Надлишок бромиду відтитрувати розчином метилоранжу до появи червоного

забарвлення, що не зникає. Щоб уникнути втрат бромиду при титруванні, після додавання наступної порції метилоранжу перемішувати вміст колби коловими рухами без енергійного збовтування.

Паралельно провести контрольний дослід. Для цього 10 мл досліджуваного розчину, отриманого при фільтруванні або центрифугуванні, перенести в колбу для титрування, додати 25 мл дистильованої води та кип'ятити 5 хв. для інактивації ферменту. Після охолодження в колбу додати 10 мл розчину тирозину, 10 мл бромат- бромідного розчину, 4 мл розчину соляної кислоти, накрити колбу годинниковим склом, перемішати вміст колби й залишити на 10 хв. Після цього вміст колби відтитрувати розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає.

Активність тирозинази розрахувати за формулою

$$E = \frac{166,8 \cdot 50 \cdot N \cdot (V_e - V_k)}{10 \cdot m \cdot 2} = \frac{417,0 \cdot N \cdot (V_e - V_k)}{m},$$

де E – активність тирозинази, мкмоль окисленого тирозину за 1 год. на 1 г досліджуваного матеріалу;

50 – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл;

10 – об'єм досліджуваного розчину, що взятий для визначення активності ферменту, мл;

2 – час взаємодії ферменту з тирозином, год.;

V_e – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування дослідного розчину, мл;

V_k – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування контрольного розчину, мл;

N – нормальність титрованого розчину метилоранжу; m – наважка досліджуваного матеріалу, г;

166,8 – коефіцієнт перерахунку мг нормального розчину тирозину в мікромолі (30 200 : 181,2 = 166,8).

Робота 22. 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.

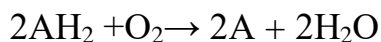
Через 15 хв. в пробірку додають 1 мл водного розчину метиленового синього (0,05%) і добре перемішують. Для створення анаеробних умов поверхню розчину в пробірці заливають олією і ставлять на водяну баню при температурі 37°С. З цього моменту починається відлік часу досліду.

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

Робота 23. 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.

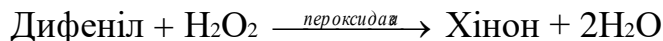
Оксидазами називають ферменти, що активують молекулярний кисень (переносячи на нього електрони від окислюваної речовини). Активований таким чином кисень з'єднується з відщепленим від субстрату воднем, утворюючи воду або пероксид водню за схемою:



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

Пероксидаза – фермент, що окислює полі феноли і ароматичні аміни

киснемпероксиду 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.

Питання для самоконтролю.

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.

РОСЛИННІ РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Робота 24. 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% - вий 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 заснований 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 80°C 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 дистильованої 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, %;

M_1 – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, яка пішла на перше титрування, мл;

M_2 – кількість 0,1 н розчину перманганату калію, яка пішла на друге титрування, мл;

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

O_1 – загальний об'єм витяжки, мл;

H – наважка, г;

O_2 – 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 25. 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 26. 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, додують 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 27. Визначення вмісту антоціанів у плодах, ягодах та овочах

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.

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.

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 густина 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 калібрувальною кривою, 0,077

D – оптична густина розчину

V – об'єм екстракту, мл

n – наважка, г.

Питання для самоконтролю.

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.

МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ

Робота 28. 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 Магницького, і виражають вміст відповідних елементів у мг/г соку чи балах.

ХІД РОБОТИ

З 5 – 6 рослин зрізують 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 теплом 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 29. 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) ексикатор; 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 \pm 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 \pm 25⁰С, не допускаючи розплавлення золи, охолоджують в ексікаторі і зважують. Різниця між двома послідовними зважуваннями не більше $\pm 0,001$ 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 золою 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: X_1 – лужність золи, см³;

O_1 – об'єм розчину соляної кислоти, см³;

O_2 – об'єм розчину гідроксиду натрію, см³;

M_3 – маса наважки продукту, г.

Між двома паралельними титруваннями допустиме розходження не більше 0,1 см³ розчину соляної кислоти.

Робота 30. 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% H₂SO₄; 11) NH₄Cl; 12) Na₂HPO₄ · 12H₂O; 13) 1% (NH₄)₂MoO₄; 14) 1% K₄Fe(CN)₆; 15) Sr(NO₃)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 підігривають 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 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 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 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 31. Колориметричне визначення вмісту фосфору в рослинах

Матеріали і обладнання: 1) 25 розчин хлористого калію; 2) молібденовокислий амоній на концентрованій сірчаній кислоті; 3) хлористе чи металічне олово; 4) $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$; 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.

Питання для самоконтролю.

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.

ФОТОСИНТЕЗ

Робота 32. 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:

- Смуга хлорофілу в
- Смуга хлорофілу а
- Смуга ксантофілу
- Смуга каротину

На основі одержаних результатів роблять відповідні висновки.

Робота 33. 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 понижується 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 понижується.

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:

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

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, %.

Питання для самоконтролю.

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

ДИХАННЯ.

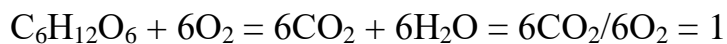
Робота 34. Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння різних рослин

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.

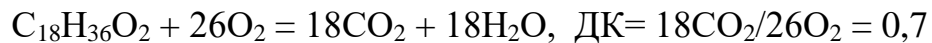
Дихальний субстрат в значній мірі впливає на газообмін у процесі дихання. Щоб характеризувати співвідношення між виділеною вуглекислою, і увібраним киснем, користуються показником, який називається дихальним коефіцієнтом (ДК).

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

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:



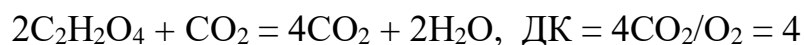
Коли в процесі дихання використовуються жири, наприклад, при диханні насіння олійних рослин, то ДК буде менше ніж одиниця, бо в молекулі жиру менше кисню, ніж у молекулі вуглеводу І для окислення жиру витрачається більше кисню:



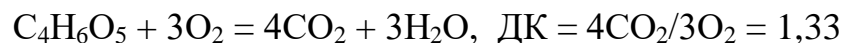
стеаринова кислота

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 цим самим всередині приладу замкнену атмосферу. Поки триватиме дослід, температура повинна бути сталою. Для цього прилад закріплюють у штатив. В приладі, де в пробірці знаходилося насіння пшениці чи ячменю, крапля не зрушила з місця, тому що тут відбувається дихання за рахунок вуглеводів і об'єми газів однакові, тобто $DK=1$.

Коли крапля води в приладі з соняшником відірветься від краю трубки, відмічають положення внутрішнього меніска краплі, а ще через 5 хв. - другий відлік, перевертають пісковий годинник і після 5 хв. роблять третій відлік. Після цього знаходять середню відстань яку пройшла крапля за 5 хв. Ця відстань відповідатиме різниці між об'ємами поглинутого насінням O_2 і виділеного CO_2 (А, мм).

Далі корок з трубкою обережно виймають з пробірки, провітрюють її і пінцетом кладуть у пробірку клаптик фільтрувального паперу, змоченого в концентрованому розчині лугу (папірець не повинен торкатися насіння). Після цього пробірку знову щільно закривають корком, вводять у трубку нову краплю води і повторюють ті ж самі операції, що й в першому випадку. Тепер середня

відстань, яку пройде крапля за 5 хв., виражатиме об'єм поглинутого в процесі дихання кисню (В, мм), оскільки виділена вуглекислота поглинається лугом. Якщо позначити об'єм поглинутого кисню – O_2 , а об'єм вуглекислого газу – CO_2 , то знаючи А і В, легко знайти дихальний коефіцієнт:

$$DK = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{B - A}{B}$$

Результати досліду записують за такою схемою:

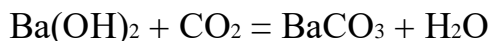
Об'єкт	Швидкість руху краплі, мм/хв								DK $\frac{B - A}{B}$
	без луку (А)				з лугом (В)				
	1	2	3	середнє	1	2	3	середнє	

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

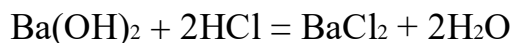
Робота 35. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного діоксиду вуглецю (за Бойсеном-Ієнсенем)

Матеріали та обладнання: 1) проросле і не проросле насіння, бруньки, листки, стебла, квітки і інший рослинний матеріал; 2) 0,025 Н розчин $Ca(OH)_2$; 3) 0,025 Н розчин HCl ; 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 луку (25 мл). Діоксид 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 CO₂, 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 CO₂.

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 CO₂. Тому, бажано підібрати таку експозицію, щоб на зв'язування CO₂ було використано 20-50% лугу (якщо, наприклад, на титрування бариту в контрольній колбі пішло 10 мл HCl, 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 N розчину Ba(OH)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 N розчином соляної кислоти до зникнення рожевого забарвлення. Вміст контрольної колби титрують через 20 хв. після заповнення її розчином Ba(OH)₂. За цей час колбу періодично збовтують (дослідні колби також легенько збовтують, щоб на поверхні рідини не утворювалася плівка BaCO₃).

Інтенсивність дихання вираховують за такою формулою:

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

I_д - інтенсивність дихання досліджуваного матеріалу, мг CO₂ на 1 г за 1 годину;

а - кількість 0,025 Н розчину НСІ, використаного на титрування контролю, мл;
 в - кількість 0,025 Н розчину НСІ, яку використано на титрування дослід, мл;
 К - поправка до титру розчину НСІ, мл;
 р - наважка, г;
 т - тривалість дослід, год.

Результати дослід записують за такою схемою:

Об'єкт	Варіант дослід	Маса проби, гр	Тривалість дослід, 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		

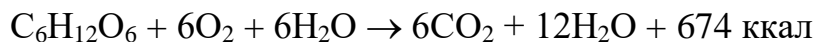
Під час цієї роботи вивчають інтенсивність дихання сухого, набубнявілого, пророслого насіння, листків, квіток, бруньок різних культур за звичайних умов і під впливом різних температур. На підставі добутих середніх даних дослід роблять висновок про вплив досліджуваного фактору на інтенсивність дихання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

Робота 36. 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.

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. Омельянчик 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. Складаров, 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. Складарова. 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.