

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА

Кафедра біології

Методичні рекомендації для проведення
лабораторних занять з курсу

**«БІОХІМІЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ
КУЛЬТУР»**

*для студентів освітнього рівня «Магістр»
спеціальності 091 «Біологія та біохімія»*

Умань - 2023

Методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дисципліни «Біохімія сільськогосподарських культур» для студентів освітнього рівня «Магістр» спеціальності «Біологія та біохімія». Умань: Уманський національний університет садівництва, 2023 р. 57 с.

Укладачі: Карпушина С.А. – кандидат хімічних наук, доцент
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 30.08.2023 р.)

Затверджено і рекомендовано до видання методичною комісією факультету плодовоовочівництва, екології та захисту рослин (протокол № 1 від 31. 08. 2023 р.)

УДК 664.34:581
@ Карпушина С.А., 2023
Леонтюк І.Б., 2023

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Правила роботи в лабораторії та техніка безпеки.....	5
Підготовка проб плодів і овочів до аналізу.....	6
Лабораторна робота 1. Правила роботи з мікроскопом. Методика виготовлення тимчасових препаратів. Порівняльний аналіз будови клітин прокаріот та еукаріот.....	7
Лабораторна робота 2. Будова рослинної клітини.....	13
Лабораторна робота 3. Визначення цукрів у плодах та овочах.....	18
Лабораторна робота 4. Спектрофотометричне визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот за методом Спіріна.....	23
Лабораторна робота 5. Вплив різних чинників на ступінь пошкодження клітинних мембран.....	26
Лабораторна робота 6. Визначення вмісту жиру рефрактометричним методом.....	28
Лабораторна робота 7. Кількісне визначення вітаміну С в рослиному матеріалі.....	31
Лабораторна робота 8. Аналіз соку рослин на вміст мінеральних елементів (за К. П. Магніцьким).....	33
Лабораторна робота 9. Виділення фотосинтетичних пігментів з рослинної сировини та їх розділення адсорбційним методом.....	37
Лабораторна робота 10. Визначення міцності зв'язку хлорофілу з білок-ліпідним комплексом.....	41
Лабораторна робота 11. Встановлення активності дегідрогенази.....	44
Лабораторна робота 12. Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння рослин.....	47
Лабораторна робота 13. Визначення каталазної активності у тканинах рослин за методом О. М. Баха і А. І. Опаріна.....	50
Лабораторна робота 14. Визначення ліполітичної активності насіння.....	54
Список рекомендованої літератури.....	57

В С Т У П

Навчальний курс «Біохімія сільськогосподарських культур» – професійно-орієнтована обов'язкова дисципліна, що вивчається студентами за освітньою програмою «Агробіологія» освітньо-кваліфікаційного рівня «Магістр» зі спеціальності «Біологія та біохімія».

Біохімія рослин, зокрема сільськогосподарських культур – це наука, яка вивчає хімічну природу і перетворення речовин, що входять до складу рослинних організмів і надходять до них із зовнішнього середовища. При цьому досліджуються молекулярний і надмолекулярний рівні організації рослин як автотрофних живих організмів. «Біохімія рослин – багатюща, нескінчене різноманіття, невичерпне джерело речовин і засобів, які забезпечують здорове, щасливе і повноцінне життя людей» (академік А. М. Гродзінський).

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

Дані методичні рекомендації містять перелік лабораторних робіт із біохімії рослин, які укладено згідно з програмою навчальної дисципліни «Біохімія сільськогосподарських культур» для студентів спеціальності 091 «Біологія та біохімія». В методичних рекомендаціях наведені лабораторні роботи з усіх основних розділів біохімії рослинних організмів: білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, органічні кислоти, ліпіди, вітаміни, ферменти, рослинні речовини вторинного походження, мінеральні речовини, гормони, біохімія фотосинтезу та дихання.

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. Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у хімічній лабораторії.

Результати виконаних лабораторних робіт оформляються студентами у вигляді звітів, які повинні містити: назву лабораторної роботи, її мету, короткі теоретичні відомості (приблизно 0,5-1 стор.), експериментальну частину з результатами виконаних дослідів, висновок (узагальнення результатів) та відповіді на питання, що наведені у завданні до лабораторної роботи.

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.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1

Правила роботи з мікроскопом. Методика виготовлення тимчасових препаратів. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот

Мета заняття: ознайомитись з будовою мікроскопа, сформувані навички користування ним; порівняти будову клітин прокариот та еукаріот.

Матеріали та обладнання: цибуля ріпчаста з забарвленими лусками; елодея канадська; фільтрувальний папір; 1% розчин йоду в КІ або 5% спиртовий розчин йоду (розчин Люголя); 0,2 М розчин KNO_3 ; розбавлений етанол; нагріта дистильована вода ($30^\circ C$); предметні та покривні скельця; піпетки Пастера; крапельниці; промивалка з дистильованою водою; препарувальні голки; пінцети; леза; мікроскоп.

Будова мікроскопа

У кожному світловому мікроскопі розрізняють три основних частини: механічну, освітлювальну та оптичну. Механічна частина мікроскопа складається з штатива, тубуса, револьвера, предметного столика, мікрометричного гвинта (або кремальєри) і мікрометричного гвинта. Штатив складається з масивної підковоподібної ніжки, на якій кріпиться весь мікроскоп і тубосотримач. До тубосотримача прикріплено тубус (зорова труба), який пересувається вгору і вниз за допомогою мікрометричного і мікрометричного гвинтів. До штативу прикріплено предметний столик. У центрі столика є отвір, над яким кладуть предметне скло. Воно фіксується двома затискачами (клемами). Знизу до тубуса рухомо прикріплено револьвер-пластинку з трьома- чотирма об'єктивами. Освітлювальна частина мікроскопа складається з дзеркала, конденсора та діафрагми. Дзеркало закріплене рухомо під предметним столиком. З одного боку воно плоске, а з другого – увігнуте. Плоскою і увігнутою поверхнею користуються залежно від джерела світла і особливостей об'єкта. Конденсор, що знаходиться між предметним столиком і дзеркалом, складається з кількох лінз. Діафрагма закріплена на нижній поверхні конденсора. Промені від джерела світла відбиваються дзеркалом і спрямовуються в конденсор. Лінзи конденсора концентрують світлові промені і спрямовують їх через отвір предметного столика на досліджуваний предмет та в об'єктив. Діафрагма регулює ширину пучка, збільшує або зменшує освітлення предмета. Оптична частина мікроскопа складається з системи лінз, окуляра і об'єктивів. Окуляр встановлений в тубус зверху. На оправі окуляра

є цифри, які показують його збільшення (наприклад 7х, 10х, 15х). Об'єктив - це система лінз, вправлених у трубку-гільзу. Об'єктиви закріплені у револьвері. Вони можуть давати від малого (7х, 8х, 10х) до великого (40х, 90х) збільшення. Щоб знати загальне збільшення мікроскопа, слід перемножити цифри, що стоять на оправі окуляра і об'єктива.

Правила роботи з мікроскопом

1. Мікроскоп зберігають захищеним від вологи, пилу та світла. При перенесенні мікроскоп беруть правою рукою за колонку штатива, а лівою підтримують знизу.

2. Окуляр, об'єктив, дзеркало протріть серветкою. Поставте мікроскоп перед собою ближче до лівого плеча. Праворуч від мікроскопа покладіть альбом.

3. Вивчення будь-якого об'єкта починають з малого збільшення. Поставте в робоче положення об'єктив малого збільшення (х8). Для цього повертайте револьвер, поки потрібний об'єктив не займе центроване положення (над отвором предметного столика), про що буде свідчити легке клацання спеціального пристрою револьвера.

4. Підніміть за допомогою макрогвинта об'єктив над предметним столиком на висоту 0,5 см. Відкрийте діафрагму і підніміть конденсор.

5. Дивлячись в окуляр (лівим оком), поверніть дзеркало в напрямку до джерела світла, поки поле зору не буде освітлено яскраво і рівномірно.

6. Покладіть на предметний столик препарат з перехрещених волосин накривним скельцем догори, щоб об'єкт знаходився в центрі отвору предметного столика.

7. Потім під контролем зору повільно опустіть тубус за допомогою макрометричного гвинта, щоб об'єктив знаходився на відстані біля 2 мм від препарату.

8. Дивіться в окуляр і одночасно повільно піднімайте тубус за допомогою макрогвинта, поки в полі зору не з'явиться зображення об'єкта. Запам'ятайте, що фокусна відстань для об'єктива малою збільшення дорівнює приблизно 0,5 см.

9. Щоб перейти до розглядання об'єкта при великому збільшенні мікроскопа, необхідно відцентрувати препарат, тобто помістити точку перехрещення волосин точно в центр поля зору. Для цього, дивлячись в окуляр, пересувайте препарат руками, поки він не займе необхідне положення. Якщо об'єкт не буде відцентрований, то при великому збільшенні точка перехрещення волосин залишиться поза полем зору.

10. Поворотом револьвера за годинниковою стрілкою переведіть в робоче положення об'єktiv великого збільшення (x40). Опустіть тубус під контролем ока (дивіться, як опускається тубус, не в окуляр, а збоку) майже до препарату. Запам'ятайте, що фокусна відстань для об'єktива великого збільшення дорівнює приблизно 1 мм.

11. Дивлячись в окуляр, повільно піднімайте тубус, поки в полі зору не з'явиться зображення. Застосовуючи мікрометричний гвинт, потрібно одержати контрастне зображення волосин. Мікрометричний гвинт можна повертати не більше, як на півоберта. Якщо не видно зображення волосин під великим збільшенням, це означає, що препарат був не відцентрований або пропущена фокусна відстань. У цьому випадку перейдіть знову до малого збільшення і виконайте пункти 9-11.

12. При малюванні препарату дивіться в окуляр лівим оком, а в альбом - правим.

Характеристика рослинної та тваринної клітини

Основними функціональними структурами клітини є її поверхневий комплекс, цитоплазма та ядро.

Поверхневий комплекс включає в себе глікокалікс, плазматичну мембрану (цитолему) та кортикальний шар цитоплазми. Неважко помітити, що чіткої межі поверхневого комплексу від цитоплазми немає.

У *цитоплазмі* виділяють гіалоплазму (матрикс, цитозоль), органели і включення.

Основними структурними компонентами *ядра* є каріолема (каріотека), нуклеоплазма та хромосоми; петлі деяких хромосом можуть переплітатись і в цій області утворюється ядерце.

Цитолема, каріолема та частина органел утворені біологічними мембранами.

Основними відмінними ознаками рослинної і тваринної клітини є відсутність в тваринній клітині вакуолей, пластид і клітинної стінки.

Наявність пластид з хлоропластами і хлорофілом дає можливість рослинній клітині синтезувати органічну речовину (крохмаль) при допомозі процесу фотосинтезу. Тому рослини в основному мають атрофічний спосіб живлення.

Цитоплазма - це напіврідка, в'язка, без кольору маса, яка має властивості колоїдного розчину. Основними речовинами, які входять в її склад є колоїдно- органічні сполуки: білки, вуглеводи, жири, ліпіди (жироподібні речовини), РНК, вода і деякі інші речовини.

Кількість води в цитоплазмі змінюється на протязі вегетації рослин. Цитоплазма складається з 3-х шарів: плазмолемми – тоненької плівки, яка прилягає до клітинної оболонки; мезоплазми, складаючої основну масу цитоплазми, і на кінець тонопласта – внутрішньої тоненької плівки, яка обтягує вакуоль і регулює обмін речовин між мезоплазмою і клітинним соком вакуолі.

Цитоплазмі властиві фізіологічні функції: живлення, дихання, рух, подразливість, обмін речовин, розмноження. Рухається цитоплазма постійно, але іноді це важко помітити. Вона допомагає переміщенню ряду речовин з однієї клітини в іншу. Важливими властивостями цитоплазми являються: в'язкість і напівпроникність.

Колоїди цитоплазми здатні ставати більш в'язкими (гель) і більш рідкими (золь), що допомагає рослині швидко пристосовуватись до змін умов зовнішнього середовища. Висока в'язкість цитоплазми збільшує стійкість рослин до підвищених температур.

ХІД РОБОТИ

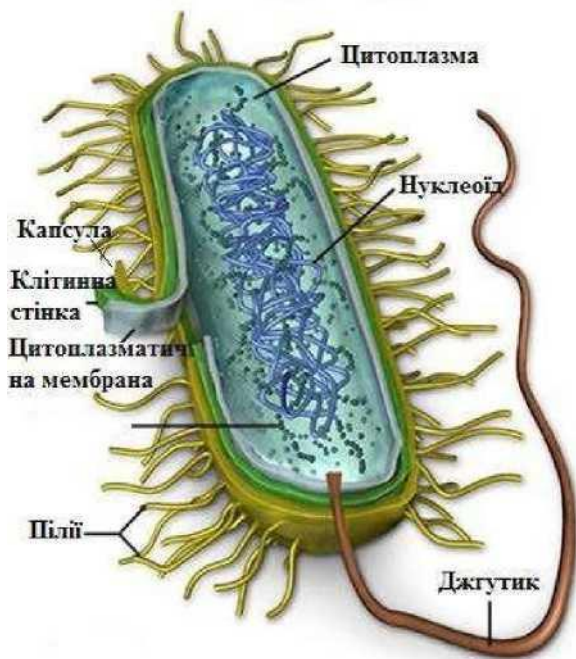
1. У м'ясистій лусочці *цибулини* з випуклої сторони вирізати в радіальному напрямку невеликий кусочок. Потім препарувальною голочкою або пінцетом відділити кусочок шкірочки в декілька квадратних міліметрів. Нанести на предметне скельце і виготовити тимчасовий препарат. Спочатку шкірочку цибулини розглядаємо під малим, а потім під великим збільшенням.

Шкірочка цибулини являє собою покривну тканину, яка складається з шару продовгуватих клітин щільно прилягаючих одна до одної. Після розгляду препарату в такому стані, його слід закрасити розчином йоду в йодистому калії. **Завдання.** Клітини шкірочки цибулини замалювати.

2. Свіжий листок *елодії* або *валіснерії* треба відірвати і покласти нижньою частиною на предметне скло в краплю води, накрити покривним скельцем. Спочатку препарат розглядають при малому, а потім при великому збільшенні. При великому збільшенні ми можемо розглянути хлорофілові зерна округлої або овальної форми. В краєвих клітинах листка, де мало хлорофілових зерен і вони маленькі, можна розглянути також вакуолю, ядро і цитоплазму. **Завдання.** Клітини з хлорофіловими зернами і органоїдами замалювати.

3. На готових препаратах і таблицях розглянути будову рослинної клітини. **Завдання.** Замалювати будову рослинної клітини.

4. **Завдання.** Користуючись малюнком 1. та додатковою літературою порівняйте будову клітини прокаріот та еукаріот та заповніть таблицю.



Таблиця. Порівняльний аналіз будови клітин прокариот та еукаріот:

№ п/п	Органели	Прокаріоти	Еукаріоти	
			Рослини	Тварини
1.	Клітинна стінка			
2.	Цитоплазм. мембрана			
3.	Нуклеоїд			
4.	Ядро			
5.	Вакуолі			
6.	Мітохондрії			
7.	Хлоропласти			
8.	Рибосоми			
9.	ЕПС			
10.	Комплекс Гольджі			
11.	Клітинний центр			
12.	Лізосоми			
13.	Пероксисоми			
14.	Пілії/війки			
15.	Джгутики			

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2

Будова рослинної клітини

Мета заняття: ознайомитися з будовою рослинної клітини, навчитися розпізнавати структурні елементи клітини, вивчити зовнішню будову і локалізацію органел в клітині; набути навичок визначення структурних компонентів оболонки клітини за допомогою якісних реакцій, набути навичок виконання масштабованого рисунку мікрооб'єктів, закріпити навички мікроскопування та виготовлення мікропрепаратів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи; препарувальні інструменти (препарувальні голки, пінцети, леза) скляні палички або піпетки; фільтрувальний папір; предметні і покривні скельця; листки елодеї канадської (*Elodea canadensis*); листки валіснерії (*Vallisneria spiralis*); м'якоть зрілих плодів глоду (*Crataegus*); шипшини (*Rosa canina*); горобини (*Sorbus aucuparia*); стручкового перцю (*Capsicum annuum*); листки традесканції (*Tradescantia*); плід айви (*Cydonia oblonga*); бульба картоплі (*Solanum tuberosum*); вата; розчин йоду в калій йоді; розчин флороглюцину в 50% спирті; концентрована сірчана (H_2SO_4) або соляна (HCl) кислоти; сірчаноокислий анілін; судан III; хлор-цинк-йод; гліцерин.

Структурні компоненти рослинної клітини та їх функції

Ядро - має оболонку з двох мембран, які пронизані ядерними парами і хроматин (в такій формі розкручені хромосоми знаходяться в інтерфазі). Є ще ядерний сік і ядерце. Розміри його не більше 2-20 мкм.

Ф у н к ц і ї – хромосоми містять ДНК, а це речовина спадковості. Ділення ядра лежить в основі розмноження клітин. В ядерці утворюються р и б о с о м и.

Плазматична мембрана складається з трьох шарів - в центрі мембрани ліпідний бішар, а по боках білкові шари.

Ф у н к ц і ї - одна з основних властивостей біологічної мембрани - її вибіркова проникність (напівпроникність) - одні речовини проходять через неї важко, інші легко і навіть в бік більшої концентрації. Так, для більшості клітин концентрація іонів Na^+ всередині клітини значно нижча, ніж у навколишньому середовищі. Для іонів K^+ характерне протилежне співвідношення: їхня концентрація всередині клітини вища, ніж зовні. Через це іони Na^+ завжди намагаються проникнути в клітину, а іони K^+ - вийти назовні. Вирівнюванню

концентрації цих іонів перешкоджає дія особливої системи клітинної мембрани, яка виконує роль насоса, що відкачує іони Na^+ із клітини і одночасно накачує іони K^+ всередину (так званий натрій-калієвий насос).

Прагнення іонів до переміщення всередину використовується для транспорту цукрів і амінокислот в клітину. При активному видаленні іонів Na^+ з клітини створюються умови для надходження глюкози і амінокислот всередину неї.

У багатьох клітин поглинання речовин відбувається також шляхом фагоцитозу і піноцитозу. При фагоцитозі гнучка зовнішня мембрана утворює невеликі заглибини, куди потрапляє захоплювана тверда частинка. Це заглиблення поступово збільшується, стає глибшим, і частинки, які потрапили в неї, занурюються в середину клітини. Явище фагоцитозу властиве амебам і деяким іншим найпростішим, також лейкоцитам (фагоцитам). Аналогічно відбувається поглинання клітинами і рідин, які містять необхідні клітинні речовини. Це явище назване піноцитозом (гр. сл. піно - п'ю, цитос – клітина). Для клітинної мембрани характерна також дифузія – рух газів, наприклад при диханні, осмос – рух води з розчиненими в ній речовинами в клітину, а також екзоцитоз - видалення з вакуолей неперетравлених частин.

Ендоплазматична сітка - система мембранних мішечків у вигляді трубочок і пластинок, які утворюють єдине ціле з зовнішньою мембраною ядерної оболонки.

Ф у н к ц і ї. Якщо поверхня ендоплазматичної сітки покрита рибосомами, то її називають шорховатою. На рибосомах синтезується білок, який транспортується по цистернах ендоплазматичної сітки. Гладка ендоплазматична сітка (без рибосом) служить місцем синтезу ліпідів і стероїдів.

Рибосоми. Містять білок і РНК (65% всієї РНК клітини) в рівних кількостях. Їх знайшли в мітохондріях і в хлоропластах рослин.

Ф у н к ц і ї. На рибосомах синтезується білок.

Мітохондрії. Мають оболонку з двох мембран. Зовнішня мембрана гладенька, а внутрішня утворює складки – кристи. Містять мітохондрії і матрикс, де є рибосоми, одну кільцеву молекулу ДНК і фосфатні гранули.

Ф у н к ц і ї. Мітохондрії – енергетичні станції клітини. Внаслідок дихання відбувається розклад речовин з утворенням енергії. В кристах при аеробному диханні проходить окислювальне фосфорилування і перенос електронів, а в матриксі працюють ферменти, які приймають участь в циклі Кребса (цикл лимонної кислоти) і в окисненні жирних кислот. Синтезується на рибосомах і білок.

Апарат Гольджі. Це стопка мембранних мішечків. На одному кінці

стопки мішечки безперервно утворюються, а з другого підшнуровуються у вигляді бульбашок.

Ф у н к ц і ї. Транспорт. Клітинні матеріали, наприклад ферменти і ендоплазматична сітка модифікуються в цистернах і транспортуються у бульбашках. Синтез лізосом.

Лізосоми. Сферичний мембранний мішечок, який заповнений перетравлювальними ферментами (мембрана одинарна).

Ф у н к ц і ї. Перетравлення поживних Хлоропласти. Це велика пластида, що містить в собі хлорофіл. В хлоропластах проходить фотосинтез. В хлоропластах є оболонка, яка складається з двох мембран. Хлоропласти заповнені стромою. В стромі знаходиться система мембран зібраних в стопки, які з'єднуються між собою ламетами. В стромі може відкладатися крохмаль, крім того в ній є рибосоми, ДНК і крапельки масла.

Лейкопласти – без кольору, хлоропласти – зелені, хромопласти – жовті, червоні і т. д.

Ф у н к ц і ї. Фотосинтез з утворенням вуглеводів з води, CO₂ і сонячної енергії. В хлоропластах сонячна енергія перетворюється в хімічну енергію, тобто енергію хімічних зв'язків.

Плазмодесми. Тонка цитоплазматична нитка, що поєднує цитоплазму двох сусідніх клітин через тонку пору в клітинній стінці.

Ф у н к ц і ї. Об'єднує протопласти сусідніх клітин в єдину безперервну систему, по якій проходить транспорт речовин між клітинами.

Вакуолі - мішок, обтягнутий одинарною мембраною, яку називають тонопластом. У вакуолях знаходиться клітинний сік, де є мінеральні солі, цукри (вуглеводи), пігменти, органічні кислоти і ферменти.

Ф у н к ц і ї. Тут зберігаються різноманітні речовини, в тому числі і кінцеві продукти обміну. Від вмісту вакуолей залежать осмотичні властивості клітини. В клітині є ще різні включення.

Таким чином, клітина має цілий комплекс, що допомагає їй функціонувати як єдиному цілому організмові. Ядро – передача спадковості, рибосоми – синтез білка, мітохондрії – енергетичні станції, вакуолі - осмос, хлоропласти – фотосинтез, апарат Гольджі, ендоплазматична сітка – транспорт, лізосоми – перетравлення, плазмодесми – зв'язок між клітинами, плазматична мембрана – обмін між клітиною і середовищем.

речовин і клітинних компонентів, які відслужили свій строк.

Клітинна стінка. Жорстка клітинна стінка складається з целюлозних волокон.

Ф у н к ц і ї. Забезпечує механічну опору і захист клітини. Завдяки їй в клітині виникає тургорний тиск, не допускає осмотичного розриву клітини.

ХІД РОБОТИ

1. Вивчення будови типової рослинної клітини на прикладі клітин листка елодеї канадської (або на прикладі клітин листка валіснерії).

На виготовленому мікропрепараті листка елодеї канадської розглянути будову клітини, при великому збільшенні виявити круговий рух цитоплазми в клітинах листка. Забарвити мікропрепарат розчином йоду в йодиді калію. При малому та великому збільшенні роздивитися основні структурні компоненти клітин – оболонку, цитоплазму, пластиди.

Завдання. Замалювати при великому збільшенні схему будови рослинної клітини, зробити позначення, стрілками позначити напрямок руху органел.

Пагони елодеї (або валіснерії) за 30 хвилин до роботи поміщають у теплу воду (23-30 °C) і витримують на яскравому світлі. Пінцетом або лезом відділити шматочок листка елодеї, занурити в краплю води на предметному склі зовнішньою стороною догори, накривають накривним скельцем. При великому збільшенні мікроскопу добре видимі світлі стінки клітин, в яких помітні непотовщені місця - пори. В середині кожної клітини в безбарвній зернистій цитоплазмі добре видно ядро з одним-двома ядерцями. В молодих клітинах ядро знаходиться в центральній частині і оточене цитоплазмою, яка розходить від центру тяжами. Між тяжами цитоплазми розташовані вакуолі, заповнені клітинним соком. В більш старих клітинах ядро лежить в пристінному шарі цитоплазми, а центральну частину займає велика вакуоль.

Використання розчину йоду в йодистому калії робить чітко помітною границю між цитоплазмою і вакуолями. Даний реактив також є реактивом на білок, тому в результаті реакції білки цитоплазми набувають жовтого кольору, білки ядра - темно- жовтого, вакуолі - більш світлого кольору, клітинна оболонка залишається безбарвною.

Мікроскопують в краплині води при малому збільшенні. При великому збільшенні в клітинах спостерігається переміщення пластид вздовж клітинної стінки, навколо великої вакуолі (вона займає центр клітини). Це пов'язано з рухом цитоплазми, яка підхоплює їх за собою. Такий рух називається круговим або ротаційним.

2. Ідентифікація основних хімічних компонентів клітинних стінок об'єктів рослинного походження. Проведення якісної реакції на целюлозні оболонки клітини.

Виготовити тимчасовий мікропрепарат волоконцець бавовника. Провести кольорову реакцію на целюлозу (дія Cl-Zn-I). Розглянути, замалювати наслідки кольорової реакції при великому збільшенні, зробити

ВИСНОВОК.

Тонкий шматочок волоконцець вати кладуть на предметне скло в краплю хлор-цинк-йоду і накривають накривним скельцем. Реактив зафарбовує целюлозну оболонку в синьо-фіолетовий колір. При малому збільшенні знайти тонші ділянки, де клітини розміщуються в один шар, перевести на велике збільшення і більш детально вивчити будову оболонки.

3. Проведення якісної реакції на суберинізовані вторинні оболонки.

Виконати кольорову реакцію на визначення хімічного складу клітинних стінок перидерми картоплі дією судану III (реакція на суберин). Виготовити тимчасовий мікропрепарат, розглянути при малому та великому збільшенні, спостерігати дію реактиву. Замалювати декілька клітин, зробити висновки.

З бульби картоплі лезом зрізати тонкий шматочок шкірки, приготувати препарат в краплі судану III. При великому збільшенні відмічається зафарбування зкорковілих суберинізованих клітинних оболонок у жовтогарячий колір.

4. Вивчення осмотичних явищ (плазмолізу і деплазмолізу) в рослинній клітині.

Виготовити мікропрепарат епідерми соковитої луски цибулини цибулі та дослідити осмотичні явища — плазмоліз і деплазмоліз. Замалювати схему цих процесів.

Пінцетом або препарувальною голкою знімають епідерму з поверхні лусочки цибулі, занурюють в краплю води на предметному склі зовнішньою стороною догори, накривають накривним скельцем. При великому збільшенні мікроскопу добре видимі світлі стінки клітин, в яких помітні тонкі місця - пори. В середині кожної клітини в безбарвній зернистій цитоплазмі добре видно ядро з одним-двома ядерцями. В молодих клітинах ядро знаходиться в центральній частині і оточене цитоплазмою, яка розходить від центру тяжами. Між тяжами цитоплазми розташовані вакуолі, заповнені клітинним соком. В більш старих клітинах ядро лежить в пристінному шарі цитоплазми, а центральну частину займає велика вакуоль.

Піпеткою з одного боку накривного скельця наносять розчин плазмолітика. З протилежного боку, не зрушуючи препарату, починають відсмоктувати воду фільтрувальним папером. При цьому необхідно дивитися в мікроскоп і слідкувати за тим, що відбувається в клітинах — повинно спостерігатися поступове відходження протопласту від оболонки клітини внаслідок виходу води з вакуолі. Наступає такий момент, коли протопласт повністю відходить від оболонки і набуває округлої форми (повний плазмоліз клітини). Потім наносять краплю води, яка за законом діалізу заміщує плазмолітик в клітині. При цьому повинно відбуватися поступове заповнення

вакуолей клітинним соком та притискання цитоплазми до оболонки (деплазмоліз).

Завдання. Заповнити таблиці 1 та 2.

Таблиця 1. Будова рослинної клітини

№	Структурні компоненти рослинної клітини	Будова та локалізація в клітині	Функція

Таблиця 2. Порівняльна характеристика первинної та вторинної оболонок.

Характеристики	Первинна оболонка	Вторинна оболонка
Хімічний склад Фізичні властивості Особливості будови порового апарату		

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3

Визначення цукрів у плодах та овочах

Мета заняття: провести визначення в рослинній сировині редуруючих цукрів (глюкози і фруктози) та загальної кількості цукрів і сахарози титриметричним методом

Матеріали і обладнання: досліджувані зразки плодів і овочів; колби на 200 мл; колби на 100 мл; лійки; мірні циліндри на 10-25 мл; бюретки на 10, 25 мл; піпетки на 1, 5 і 10 мл; водяна баня; 15% розчин натрій карбнату; 30% розчин плюмбум ацетату; 20% розчин натрій фосфату; насичений розчин натрій сульфату; 1% розчин $K_3[Fe(CN)_6]$; 10% розчин цинку сульфату; 20% розчин калій йодиду; 0,1 н розчин натрій тіосульфату; 0,1 н розчин сульфатної кислоти; 0,1 н розчин хлоридної кислоти; 1% розчин метиленового синього; 0,2% розчин метиленового червоного; 2,5 н розчин натрій гідроксиду; папір лакмусовий; папір фільтрувальний.

Вуглеводи, нарівні з білками, найбільш розповсюджені біогенні сполуки, що беруть участь у структурній організації клітини і використовуються в процесі її життєдіяльності. Вуглеводами називають полігидроксикарбонільні 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 редукуючих 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 редукуючих моносахаридів відновлювати в лужному середовищі калій гексаціаноферат (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ (червона кров'яна сіль) у калій гексаціаноферат (II) $K_4[Fe(CN)_6]$ (жовта кров'яна сіль) в присутності індикатора метиленового синього. Редукуючі цукри відновлюють його до безбарвної сполуки, що свідчить про закінчення реакції відновлення калій гексаціаноферату (III).

ХІД РОБОТИ

Пробопідготовка. 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 цукру.

Наважку переносять у мірну колбу місткістю 200-250 мл без втрат. Для цього залишки наважки змочують і змивають дистильованою водою. Мірну колбу заповнюють дистильованою водою більше ніж на половину. При аналізі плодів і овочів з підвищеним вмістом кислот вміст колби нейтралізують 10% розчином калій (натрій) гідроксиду або 15% розчином натрій карбонату, використовуючи лакмусовий папір. При аналізі малоокислих 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 80°C, 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% плюмбум ацетату, добре збовтують і залишають на 5 хв для осадження зазначених речовин і освітлення розчину. Плюмбум ацетат повинен бути в надлишку. Для виявлення надлишку плюмбум ацетату в склянку наливають 10-15 мл насиченого розчину натрій сульфату, занурюють скляну паличку спочатку в робочий розчин у колбі, а потім у розчин натрій сульфату. Утворення у верхньому шарі розчину в склянці світлої каламуті свідчить про надлишок ацетату свинцю. Надлишок плюмбум ацетату в досліджуваному робочому розчині видаляють додаванням у колбу розчину натрій сульфату. Перевіряють повноту осадження плюмбум ацетату як описано вище. Після цього в колбу додають 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% розчин калій гексаціаноферату (III), додають за допомогою циліндра 5 мл 2,5 н розчину калій гідроксиду 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 калій гексаціаноферату (III) та 2,5 мл калій гідроксиду. 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 редукуючих цукрів проводять наступним чином: якщо для титрування було 20 мл розчину калій гексаціаноферату (III) і 5 мл лугу, то за формулою:

$$X = \frac{K \cdot (20,12 + 0,035 \cdot V_{\phi}) \cdot V_v \cdot 100}{m_n \cdot V_{\phi} \cdot 1000},$$

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

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

де X – вміст редукуючих цукрів, %;

K – поправочний коефіцієнт до титру 1% розчину калій гексаціаноферату (III);

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

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

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

коефіцієнти 20,12 та 0,035 (10,06 та 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 сульфатної кислоти. При цьому створюється слабо кисла реакція і вміст колби набуває бурого забарвлення внаслідок виділення надлишку йоду, який не прореагував. Залишок йоду відтитровують 0,1 н розчином натрій тіосульфату до повного знебарвлення вмісту колби в присутності 1% розчину крохмалю як індикатора.

Вміст глюкози розраховують за формулою:

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

де X – вміст глюкози, %;

V_1 – об'єм взятого 0,1 н розчину йоду, мл;

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

V_2 – об'єм 0,1 н розчину натрій тіосульфату, яка пішла на титрування,

мл;

T_2 – поправка до титру 0,1 н розчину натрій тіосульфату;

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

V_{ϕ} – об'єм фільтрату, взятий для титрування, мл;

m_H – 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 хлоридної кислоти (густиною 1,19) і нагрівають на водяній бані при температурі 68-70°C протягом 5 хв, колбу охолоджують, обережно нейтралізують кислий розчин у колбі кристалічним натрій карбонатом в присутності червоного лакмусового паперу, доводять до мітки дистильованою водою і фільтрують через складчастий фільтр (якщо розчин чистий – можна не фільтрувати).

Одержаний фільтрат використовують для визначення вмісту сахарози і загального цукру.

В одержаному фільтраті визначають загальний цукор за тією ж методикою, що й редукуючі цукри, але в ньому розведення буде вдвічі більше, ніж у фільтраті А. Для розрахунку вмісту сахарози необхідно від загальної кількості цукрів відрахувати вміст редукуючих цукрів, тобто визначених до інверсії, а різницю помножити на 0,95 (0,095 г сахарози утворює 1 г інвертного цукру):

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

де: X – вміст сахарози, %;

B – вміст цукру після інверсії, %;

A – вміст цукру до інверсії (редуючих цукрів), %; 0,95 – коефіцієнт перерахунку на сахарозу.

Завдання

Навести основні етапи проведення дослідів. Відмітити спостереження та навести рівняння відповідних хімічних реакцій.

Дати відповідні на наступні питання.

1. Які зв'язки формуються між моносахаридними залишками у складі дисахаридів? Наведіть їх будову.

2. Від чого залежить наявність у дисахаридів відновлювальних властивостей? Наведіть приклади.
3. Які дисахариди належать до невідновлювальних?
4. Які методи застосовують для виявлення дисахаридів, що не мають відновлювальних властивостей?

Питання для самоконтролю.

1. Визначення поняття вуглеводи.
2. Фізіологічна роль вуглеводів в плодах і овочах.
3. Загальні властивості моноцукрів.
4. Характеристика окремих представників: глюкози, фруктози.
5. Які зв'язки формуються між моносахаридними одиницями у складі дисахаридів?
6. Від чого залежить наявність у дисахаридів відновлювальних властивостей?
7. Які дисахариди належать до невідновлювальних?
8. Які методи застосовують для виявлення дисахаридів, що не мають відновлювальних властивостей?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4

Спектрофотометричне визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот за методом О. І. Спірина

Мета заняття: здійснити кількісну екстракцію нуклеїнових кислот із рослинного матеріалу та їх кислотний гідроліз, провести кількісне визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот УФ-спектрофотометричним методом.

Матеріали та обладнання: рослинна тканина (0,1-0,2 г); 0,2 н та 0,5 н розчини хлорної (перхлоратної) кислоти HClO_4 (охолоджені); льод; скляні піпетки; ваги; пробірки конічні; лабораторна центрифуга (3000 g); водяна баня; годинник; спектрофотометр; кювети.

Кількісне визначення нуклеїнових кислот (НК) за методом О. І. Спірина засновано на використанні спектрофотометричного методу, який базується на вимірюванні світлопоглинання (А) розчинів НК в ультрафіолетовій ділянці спектру (УФ-спектрофотометрія). Метод УФ-спектрофотометрії потребує попередньої пробопідготовки, яка включає екстракцію НК з одночасним

гідролізом полінуклеотидів. При цьому, вільні нуклеїнові кислоти мають бути попередньо видалені. При неповному гідролізі утворюється суміш нуклеотидів, до складу яких входить одна молекула пуринової чи піримідинової основи, одна молекула пентози й молекула фосфатної кислоти. При повному гідролізі нуклеїнових кислот утворюється суміш нітрогеновмісних гетероциклічних основ (піримідинів й пуринів). За хімічним складом НК характеризуються постійним вмістом фосфору (8-10%) і нітрогену (15-16% за масою).

За методом О. І. Спірина, екстракцію та гідроліз НК з рослинного матеріалу проводять за допомогою гарячої хлорної кислоти з подальшим дослідженням світлопоглинання отриманих гідролізатів в УФ-ділянці спектру при двох довжинах хвиль 270 та 290 нм.

Максимальне світлопоглинання нуклеїнових кислот в УФ-області спектру спостерігається при довжині хвилі 260 нм, що обумовлено наявністю азотистих основ в їх складі. Азотисті основи мають однаковий максимум світлопоглинання, окрім цитозину, максимум світлопоглинання якого відповідає 270 нм. При цьому, природна дезоксирибонуклеїнова кислота має світлопоглинання суттєво нижче (приблизно на 40-50%), порівняно зі складовими її нуклеотидів. Це пов'язано з «гіпохромним ефектом» обумовленим наявністю подвійної спіралі в природній ДНК, таким самим ефектом володіє й РНК, яка має петлі.

Зважаючи на вказані особливості, саме вимірювання світлопоглинання гідролізатів при 270 нм та 290 нм дозволяє нівелювати відмінність у складі нуклеотидів. Інтенсивність світлопоглинання пропорційна кількості нуклеїнових кислот у пробах матеріалу.

ХІД РОБОТИ

1. Гомогенізувати рослинну тканину і відважити (0,1–0,2 г) отриманої маси. Помістити наважку в конічну пробірку та внести 5-10 мл 0,2 н розчину HClO_4 . Перемішати гомогенізатором з розчином і відокремити осад методом центрифугування (3000 g впродовж 10 хв).

2. Надосадову рідину відібрати, а до осаду додати 5-10 мл 0,5 н розчину HClO_4 , закрити пробірку пробкою з повітряним холодильником та нагрівати у киплячій водяній бані впродовж 30 хв (відбувається повна екстракція НК та їх кислотний гідроліз на окремі фрагменти).

3. Гідролізат охолодити і відцентрифугувати, надосадову рідину відділити в окрему колбу, а з осадом провести повторний гідроліз за допомогою 0,5 н розчина HClO_4 . Гідролізати об'єднати та виміряти їх

світлопоглинання з допомогою спектрофотометра при двох довжинах хвиль: 270 та 290 нм, як розчин порівняння використовують 0,5 н розчин НСІО₄.

Якщо виміряні величини світлопоглинання надто великі (значно перевищують 1,00), гідролізат кількісно розводять додаванням 0,5 Н розчину НСІО₄.

Вміст фосфору (X, мкг/мл), що входить до НК, з розрахунку на 1 мл гідролізату, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19}$$

де 0,19 – показник екстинкції, який відповідає ΔA ($A_{270} - A_{290}$), який має гідролізат НК, що містить 1 мкг нуклеїнового фосфору в 1 мл розчину. Таким чином, ділення на 0,19 дає вміст фосфору нуклеїнових кислот в 1 мл розчину.

При розрахунках слід враховувати загальний об'єм гідролізату і його розведення. Щоб перерахувати нуклеїновий фосфор на кількість НК використовують середній перерахунковий коефіцієнт 10,3.

Рекомендовано проводити додаткове визначення світлопоглинання гідролізату при довжині хвилі 260 нм. Світлопоглинання гідролізату при 260 та 270 нм не повинно відрізнятись більш, ніж на 15%.

Завдання

Визначити вміст нуклеїнового фосфору в перерахунку на 1 г наважки рослинного матеріалу з наведених нижче умов.

При спектрофотометричному аналізі гідролізату знайдена $A_{270}=0,836$, $A_{290}=0,506$. Отриманий об'єм розчину гідролізату становив 100 см³. Перед визначенням оптичної густини він був розбавлений в 3 рази. Наважка рослинного матеріалу в перерахунку на суху вагу становила 0,5 г.

Дайте відповідь на питання.

1. Хімічний склад нуклеїнових кислот. Наведіть загальну формулу.
2. Чим відрізняється нуклеотид від нуклеозиду?
3. Характерні особливості структурного складу та будови ДНК.
4. Характерні особливості структурного складу та будови РНК.

Питання для самоконтролю

1. Що таке нуклеїнові кислоти?
2. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
3. Чим відрізняється нуклеотид від нуклеозиду?

4. Функції нуклеїнових кислот.
5. Характерні особливості структурного складу та будови ДНК.
6. Характерні особливості структурного складу та будови РНК.
7. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
8. Рівні структурної організації ДНК та зв'язки, які приймають участь у стабілізації.
9. Де міститься генетична інформація у клітині?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5

Вплив різних чинників на ступінь пошкодження клітинних мембран

Мета заняття: дослідити проникність протопласта клітин при дії різних факторів.

Матеріал та обладнання: мікроскоп; предметне й накривне скло; свердла; штативи з п'ятьма пробірками; піпетки; чашка Петрі; леза; дощечка; мірна пробірка; гумові пробки; 30% оцтова кислота; 50% розчин етанолу; дистильована вода, доведена до кипіння; коренеплоди червоного буряку.

До основних функцій, які виконують мембрани належать: *бар'єрна, транспортна, осмотична, електрична, структурна, енергетична, біосинтетична, секреторна, рецепторно-регуляторна*. Кожна органела теж має власні функції, що здійснюються в унікальному внутрішньому середовищі. Створюється це середовище завдяки вибіркової проникності та іншим специфічним властивостям мембрани, що оточують органелу та відокремлюють її від решти компартментів протопласта. Таким чином, у живій клітині завдяки наявності цитоплазматичних мембран зберігається внутрішньоклітинний *гомеостаз*. У разі їх пошкодження ця властивість втрачається і речовини, що містяться в клітинному соку, дифундують у середовище. Ступінь пошкодження корелює з кількістю виділених назовні речовин. Отже, інтенсивність виходу сполук із клітини є критерієм пошкодження мембран.

Завдяки білкам біомембранам характерні каталітичні властивості (цю функцію виконують перефериричні білки, що частково занурені в ліпідний матрикс) і напівпроникність.

Функцію напівпроникності виконують інтегральні білки, за рахунок яких утворюється пори. Завдяки мембранам клітина зберігає свої властивості

і постійність внутрішнього середовища.

Пошкодження клітини відбувається, в першу чергу, за рахунок руйнування білкових структур. Через те, що напівпроникність мембран забезпечують білки, при пошкодженні вони руйнуються і мембрана втрачає цю найважливішу функцію. Розпочинається вільний вихід речовин з клітини. Чим більше пошкодження, тим активніше виходять речовини. Ця ознака може бути використана, як індикатор або показник ступеня пошкодження клітини.

ХІД РОБОТИ

1. Із коренеплоду червоного буряка свердлом діаметром 7÷8 мм вирізати п'ять циліндричних брусків завдовжки 3 см, старанно промити їх у водогінній воді та внести по одному в п'ять пробірок, які містять по 5 мл різних рідин відповідно до схеми досліду (табл. 1).

2. За 30 хв. після початку досліду вміст всіх пробірок ретельно перемішати, бруски буряка вийняти.

3. Виміряти світлопоглинання отриманих забарвлених розчинів за допомогою фотоелектроколориметра при зеленому світлофільтрі (діапазон світлопоглинання при 500-560 нм).

4. Зробити висновки щодо рівня ушкодження рослинних тканин за дії досліджуваних факторів.

Примітка. Варіант 2 виконують наступним чином. Витримати 2 хв. у киплячій воді один із брусків буряка, потім його вийняти, охолодити й опустити в пробірку з 5 мл водогінної води кімнатної температури.

Таблиця 1. Вплив різних факторів на проникність мембран рослинної клітини

Номер пробірки	Варіант досліду	Світлопоглинання розчинів
1	Контроль (дистильована вода)	
2	Водогінна вода (після обробки рослинного матеріалу киплячою дистильованою водою)	
3	Дистильована вода + 5 крапель хлороформу	
4	30% розчин оцтової кислоти	
5	50% розчин етанолу	

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження, заповніть таблицю 1.

Чим пояснюється неоднакова швидкість забарвлення рідини у різних варіантах досліду? Зробіть висновок про розчинність бетаніну, барвника у складі буряка, у воді та гідрофільних розчинниках. Наведіть його хімічну формулу.

Дайте відповіді на наступні питання:

1. Які фактори, крім температури, спричинють пошкодження клітинних мембран?
2. Чому інтенсивність виходу сполук із клітини може бути критерієм їх ушкодження?

Питання для самоконтролю

1. Які функції виконують біологічні мембрани?
2. Які фактори, крім температури, впливають на проникність клітинних мембран?
3. Чому інтенсивність виходу сполук із клітини може бути критерієм їх ушкодження?
4. Які фактори довкілля впливають на проникність клітинних мембран у природних умовах?
5. Чи пропускає жива протоплазма речовини клітинного соку?
6. Чим пояснюється неоднакова швидкість забарвлення рідини у різних варіантах досліду?
7. Чим зумовлена напівпроникність живої цитоплазми?
8. Які білки входять до складу біомембран?
9. Які є види транспорту речовин через мембрану?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6

Визначення вмісту жиру рефрактометричним методом

Мета заняття: провести визначення вмісту олій у рослинній сировині рефрактометричним методом.

Матеріали і обладнання: рефрактометр РЛУ; фарфорові ступки; лійки; піпетки на 5 мл; пробірки; папір фільтрувальний; пісок кварцовий; монобромнафталін.

Ліпіди і ліпідоподібні речовини являють собою досить різноманітну в хімічному плані групу. У групі ліпідів можна виділити жири (жирні масла) –

це ліпіди, які при кімнатній температурі залишаються твердими, і рослинні олії (жирні олії), що при кімнатній температурі є рідкими. У хімічному плані власне ліпіди є похідними спиртів і так званих жирних кислот, будучи естерами. У даний час у рослин установлено 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.

Рідкі олії за складом ненасичених кислот класифікують на *невисихаючі*, *напіввисихаючі* і *висихаючі*.

Невисихаючі олії містять в основному гліцериди олеїнової і гідроксиолеїнової кислот (з одним подвійним зв'язком). Не утворюють плівку. Приклади, олії: оливкова, арахісова, мигдальна, персикова, абрикосова, рицинова, авокадо, лісового горіха.

Напіввисихаючі олії складаються головним чином з гліцеридів лінолевої кислоти (з двома подвійними зв'язками). Утворюють м'яку плівку. Приклади, олії: гірчична, кунжутна, бавовняна, соняшникова, кукурудзяна, сафлорова, виноградних кісточок, чорного кмину.

Висихаючі олії складаються в основному з гліцеридів ліноленової кислоти (з трьома подвійними зв'язками). Утворюють щільну плівку. Приклади, олії: макова, конопляна, лляна, перили, енотери (примули).

Найбільш цінними вважаються рослини, що дають невисихаючі та напіввисихаючі жирні олії. 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 рослинної сировини масою 4 г переносимо у фарфорову ступку, додаємо 4 г натрій сульфату і 3 г піску, ретельно розтираємо на протязі 1 хвилини, після чого додаємо як імерсійну рідину 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 (монобромнафталіну), мл (5 мл);

$d_{\text{ж}}$ – щільність жиру при 20°C, (0,93 г/мл);

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

K_p – коефіцієнти заломлення розчинника (монобромнафталіну) при 20°C, (1,6582);

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

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

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження, наведіть формулу для визначення вмісту жиру в рослинному матеріалі рефрактометричним методом.

Дайте відповіді на питання.

1. Абсолютний та відносний показник заломлення світла. Який з цих показників зазвичай вимірюється на практиці? Як називається прилад для вимірювання показника заломлення світла?
2. Хімічна будова та склад простих жирів. Чим, за хімічним складом, відрізняються тверді жири і рідкі жири (олії)?
3. Перетворення жирів при зберіганні.
4. Складні жири, їх будова та значення.
5. Воски, їх будова, значення воскового нальоту для рослини.

Питання для самоконтролю

1. Загальна характеристика органічних кислот.
2. Значення органічних кислот для плодів та овочів.
3. Перетворення органічних кислот при дозріванні плодів та овочів. Зміна

загальної кислотності та склад органічних кислот в залежності від зберігання.

4. Визначення та характеристика ліпідів.
5. Загальна будова, склад та властивості простих жирів.
6. Складні жири, їх будова та значення.
7. Вміст жирів та їх значення.
8. Значення воскового напливу для рослини.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7

Кількісне визначення вітаміну С в рослинному матеріалі за методом Тільманса

Мета заняття: провести кількісне визначення вітаміну С в рослинному матеріалі титриметричним методом з реактивом Тільманса.

Матеріали і обладнання: ступки; кварцевий пісок; скляні палички; колбочки на 50-100 мл; лійки; вата для фільтрування; хімічні стакани на 20 мл; піпетки на 5 мл; мікробюретка; терези з набором різноважок; 0,001н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (реактив Тільманса); 2% розчин хлоридної кислоти; дистильована вода; рослинний матеріал: картопля, яблука, свіжа і кисла капуста, цибуля, лимон, хвоя, шипшина.

Основним джерелом вітаміну С (аскорбінова кислота) виступають зелені рослини, свіжі овочі і фрукти; продукти тваринного походження містять незначні його кількості. Аскорбінова кислота нерівномірно розподіляється в товщі плодів. У покривних тканинах її у 2-3 рази більше, ніж у м'якоті, що потрібно враховувати при їх споживанні та технологічній обробці.

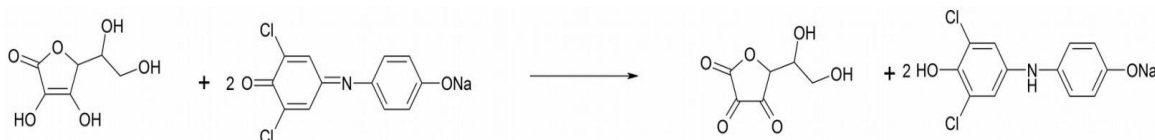
Аскорбінова кислота дуже нестійка і руйнується під впливом кисню повітря, ультрафіолетового опромінювання, лужного середовища, у присутності заліза та міді як каталізаторів і особливо під час термічної обробки. Кип'ятіння може зруйнувати 50-70% вітаміну С.

Середній вміст вітаміну С (мг%) в деяких овочах, фруктах та ягодах: перець солодкий – 100-200, капуста кольорова – 50-100, томати – 20-40, цибуля – 40-60, яблука – 5-30, вишня – 50-15, смородина чорна – 100-400.

Аскорбінова кислота має фенольну групу, яка здатна легко окислюватись і відновлюватись, завдяки чому вона відіграє важливу роль у дихальному газообміні. Існує цей вітамін у двох активних формах:

відновлена форма – L-аскорбінова кислота і окислена форма – дегідроаскорбінова кислота, вони легко взаємо перетворюються. Обидві форми фізіологічно активні. В деяких овочах виявлена зв'язана форма аскорбінової кислоти – аскорбіген. Це індольне похідне аскорбінової кислоти.

Кількісне визначення вітаміну С в рослинному матеріалі за методом Тільманса ґрунтується на здатності вітаміну С відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол з утворенням безбарвної сполуки (лейкоформи). Розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенол (реактив Тільманса) в нейтральному і лужному середовищі має синє забарвлення, в кислому середовищі набуває рожевого забарвлення. При цьому аскорбінова кислота окиснюється в дегідроаскорбінову кислоту:



Кількісний вміст вітаміну С в екстрактах з рослинної сировини визначають титриметричним методом. В еквівалентній точці надлишкова крапля розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлює суміш в рожевий колір.

Пробопідготовка включає гомогенізацію біологічного матеріалу шляхом розтирання його з кварцевим піском та екстракцію аскорбінової кислоти 2% розчином кислоти хлоридної. Хлоридна кислота дозволяє вилучити з рослинного матеріалу вільну і зв'язану аскорбінову кислоту.

Аналіз від взяття наважки до титрування слід проводити дуже швидко.

ХІД РОБОТИ

Біля 5 г (точна наважка) рослинного матеріалу розтерти у ступці з невеликою кількістю кварцевого піску при поступовому додаванні 9 мл 2% розчину кислоти хлоридної. Отриману витяжку профільтрувати через вату.

До 3 мл фільтрату додати 2-5 мл дистильованої води і відтитрувати за допомогою мікробюретки 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с.

Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в рослинному матеріалі провести за формулою, враховуючи що 1 мл 0,001н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти:

$$X = \frac{0,088 \cdot a \cdot V \cdot 100}{v \cdot C} \text{ мг\%, де}$$

- а – об'єм 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного на титрування, мл;
 V – загальний об'єм фільтрату, мл;
 В – кількість фільтрату, взятого для титрування, мл;
 С – наважка рослинного матеріалу, г.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання:

1. У чому суть кількісного визначення аскорбінової кислоти за методом Тільманса?
2. Що таке гомогенізація?
3. Дві активні форми вітаміну С. Наведіть хімічні формули.

Питання для самоконтролю

1. Класифікація вітамінів.
2. Що відбувається в організмі людини при нестачі вітаміну С? Добова потреба в вітаміні С.
3. Які вітаміни є стійкими до факторів зовнішнього середовища, до дії високих температур, а які ні? Наведіть приклади.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8

Аналіз соку рослин на вміст мінеральних елементів за методом

К. П. Магніцького

Мета заняття: ознайомитись з набором реактивів польової лабораторії К. П. Магніцького та з її використанням дослідити рослинний матеріал на вміст мінеральних елементів.

Матеріали і обладнання: рослинний матеріал; польова лабораторія К. П. Магніцького; дистильована вода; 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 тощо. В плодах і овочах мінеральні речовини знаходяться найчастіше в легкодоступній для організму формі.

В залежності від кількісного вмісту в організмі всі мінеральні речовини поділяються на три групи: *макроелементи* (елементи-органогени – вуглець, кисень, водень і азот, а також такі елементи як фосфор, сірка, хлор, кремній, калій, натрій, магній, кальцій); *мікроелементи*. (залізо, мідь, бор, марганець, цинк, молібден, кобальт та деякі інші), *ультрамікроелементи* (свинець, срібло, літій, ртуть, миш'як та інші).

У рослинах макроелементами вважаються: вуглець, водень, кисень, азот, фосфор, калій, сірка, кальцій та магній, причому перші три через специфіку зустрічальності та засвоєння іноді у списках опускаються. С, Н, О, N – чотири елементи, які разом складають близько 96-98 % маси живих клітин. Так, для рослинних тканин у загальній масі золи характерний високий вміст калію (25-35%), багато фосфору (7-10%) та кальцію (3-30%).

Аналіз з соку рослин дає можливість контролювати умови живлення рослини, орієнтовно визначити необхідність підживлення їх відповідними добривами. Користуючись лабораторією К. П. 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 паперовою кольоровою шкалою, що додається до лабораторії К. П. Магніцького, і виражають вміст відповідних елементів у мг/г соку чи балах.

Для порівняння інтенсивності забарвлення продуктів реакції мінеральних елементів з відповідними реагентами також можна використовувати стандартний розчин, який містить азот, фосфор, калій, магній у відповідних кількостях. При цьому стандартний розчин обробляють відповідними реагентами одночасно з соком рослин.

Визначення нітратного азоту проводять за допомогою реактиву, що містить сульфат барію, сульфат мангану, цинковий пил, лимонну кислоту, сульфанілову кислоту, α -нафтиламін. Метод заснований на відновленні нітрату до нітриту, який вступає в реакцію діазотування з сульфаніловою кислотою; діазотована сульфанілова кислота з α -нафтиламином утворює азобарвник червоно-фіолетового кольору.

Визначення фосфору проводять за реакцією утворення

фосфорномолібденової сині з молібдатом амонія. Спостерігають появу синього забарвлення.

Визначення калію проводять за реакцією дипікриламінатом магнію, при цьому утворюється помаранчево-червоний осад дипікриламінату калію.

Визначення магнію проводять за реакцією з титановим жовтим, магній у лужному середовищі утворює адсорбційну сполуку червоного кольору з вказаним реактивом.

Існує певний взаємозв'язок між вмістом у тканинах окремих елементів. За умови значної нестачі азоту в соку міститься багато мінерального фосфору (гальмуються процеси переходу його в органічні форми). За нестачі калію й мангану спостерігається підвищений вміст мінеральних сполук азоту та фосфору. Аналіз клітинного соку у польових умовах дає змогу контролювати динаміку живлення рослин та визначати їх потреби у певних мінеральних елементах.

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 2-3см. 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. Розведення

клітинного соку водою зменшує концентрацію органічних кислот, які заважають утворенню синього забарвлення в результаті реакції.

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 свіжовиготовленого 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.

Завдання

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

Рослина	Елемент	Кількість елементів	
		мл/л соку	

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.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 9

Виділення фотосинтетичних пігментів з рослинної сировини та їх розділення адсорбційним методом

Мета заняття: опрацювати методи екстракції фотосинтетичних пігментів з рослинної сировини різними органічними розчинниками, провести розділення пігментів адсорбційним методом.

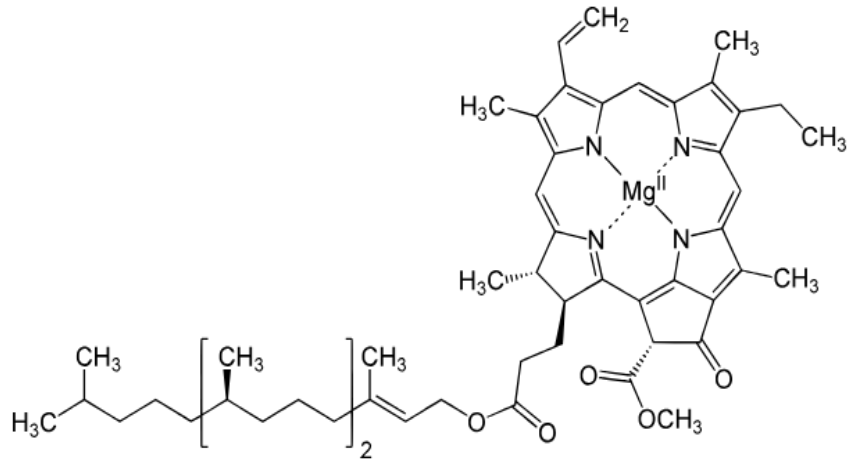
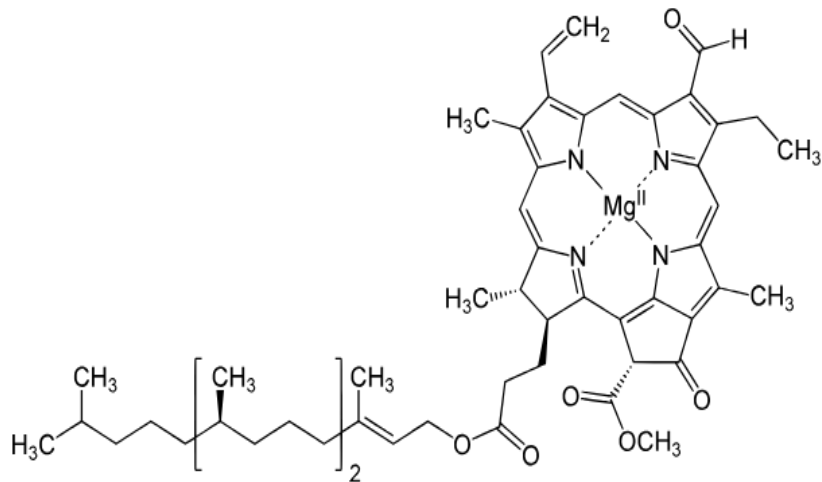
Матеріали та обладнання: листки рослин; 75 % етанол; вода дистильована; NaOH або KOH кристалічний; Na₂SO₄ безводний; бензин; ацетон; конічні колби місткістю 200 мл із пробками, водяна баня, зворотний холодильник, штатив з пробірками; ступка з пестиком; терези з важками; ділильна воронка; конічна колба з пробкою, в яку вставляють адсорбційну колонку; адсорбційна колонка, скляні бюкси з притертими кришками; вата; абсолютно суха цукрова пудра або крохмаль; стовбчик крейди (1×10 см).

Фотосинтетичні реакції проходять в хлоропластах. Основною структурною одиницею фотосинтезуючої системи є тилакоїди – спрощені вакуолі або мішечки в середині хлоропластів. В гранах тилакоїдів концентрується основна маса хлорофілу, а також інших пігментів фотосинтезу. Хлорофіл та інші пігменти хлоропластів зв'язані з ліпопротеїдним комплексом мембран.

Хлорофіл є складним етером дикарбонової кислоти хлорофіліну, у якій одна карбоксильна група етерифікована залишком метилового спирту, а друга – залишком спирту фітолу.

Хлорофіл *a* відрізняється від хлорофілу *b* тим, що у третього вуглецевого атома в другому пірольному кільці його молекули метильна група замінена на альдегідну.

Порфінова частина молекули знаходиться на поверхні мембрани тилакоїда й пов'язана із білками, а жиророзчинний фітольний ланцюг занурений у ліпідний шар.

хлорофіл *a*хлорофіл *b*

Фотосинтетичні пігменти виділяють з рослинної тканини за допомогою екстракції органічними розчинниками (наприклад, етиловий спирт), які викликають денатурацію білків та протеїнів, і таким чином руйнують зв'язок хлорофілів і ксантофілів із протеїдами пластид.

Ліпофільні розчинники (петролейний ефір, гексан, бензин і ін.) не здатні руйнувати зв'язок цих пігментів з білками й тому не екстрагують їх зі свіжої рослинної сировини. Із сухого рослинного матеріалу екстракцію проводять із додаванням води, щоб порушити зв'язок з молекулами білка. Хлорофіли є нестійкими речовинами. Екстраговані з листа, вони легко окисляються на повітрі.

Для розділення і отримання хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів застосовують адсорбційні і хроматографічні методи. Зокрема, метод розділення пігментів, розроблений в 1906 р. М. С. Цветом отримав назву адсорбційного. Саме він лежить в основі сучасних методів хроматографії: на папері, тонкошарової

хроматографії, гель-хроматографії, тощо.

Суть методу полягає в тому, що різні речовини мають неоднакову здатність адсорбуватися на твердому порошкоподібному адсорбенті. Якщо суміш пігментів листа, розчинену в якому-небудь органічному розчиннику, наприклад бензині, пропустити через сухий адсорбент (цукрова пудра, крохмаль, вуглекислий кальцій, окис цинку, фільтрувальний папір), то відбудеться розділення пігментів. Кожний пігмент має визначену, тільки йому властиву здатність адсорбуватися на даному адсорбенті. В результаті на адсорбційній колонці пігменти розділяться і розподіляться в певному порядку.

До різновиду адсорбційного методу відноситься і метод розділення пігментів за допомогою паперової хроматографії, розроблений в 1951 р. і до теперішнього часу широко застосовується при розділенні сумішей, різних сполук і їх ідентифікації.

ХІД РОБОТИ

Пробопідготовка. *Екстракція пігментів етиловим спиртом.* Екстракцію проводять як з сирого, так і сухого матеріалу. В останньому випадку висушені листи попередньо обробляють гарячою водою, щоб полегшити наступну екстракцію пігментів. Сухі листи рослин поміщають у конічну колбу місткістю 200 мл і обробляють окропом, потім воду зливають. У колбу додають 100 мл етилового спирту, закривають її корковою пробкою зі зворотним холодильником і ставлять на киплячу водяну баню. Після кип'ятіння протягом 5 хв вміст колби прохолоджують і розчин обережно зливають декантацією через лійку зі складчастим паперовим фільтром.. Зберігати розчини пігментів треба в темряві в холодильнику.

Екстракція пігментів з свіжого матеріалу сумішшю бензин-ацетон (1:1). Наважку свіжого листа (3 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника, що складається з суміші 10 мл бензину і 10 мл ацетону. Продовжують розтирання до гомогенного стану з одночасною екстракцією пігментів невеликими порціями суміші.

Осад і надосадову рідину переносять на складчастий паперовий фільтр. Ступку змивають невеликою кількістю чистого ацетону і також зливають на паперовий фільтр.

Концентрування пігментів бензином. Відфільтровану витяжку переливають в пробірку місткістю 50 мл і обережно додають 30 мл дистильованої води та декілька разів перевертають пробірку так, щоб не утворилася стійка емульсія. Суміш рідин залишають для розділення її на два шари: у верхній бензиновий шар відбулася екстракція усіх пігментів, ацетон

перейшов у нижній водний шар. За допомогою дозатора обережно відбирають верхній бензиновий шар, що містить пігменти, вносять його до бюкса з притертою кришкою, в який висипають 3-5 г натрій сульфату безводного, залишають на 15-20 хв для повного зневоднення екстракту. Для якісного розділення пігментів на адсорбційній колонці важливе значення має повнота зневоднення екстракту.

Розділення пігментів на адсорбційній колонці за методом Цвета.

Приготування колонки. Адсорбційна колонка є скляною трубкою діаметром 1-1,5 см і завдовжки 10-15 см, звужена на одному кінці. В звужений кінець трубки вкладають шматочок вати, щоб цукрова пудра не висипалася. Невеликими порціями вводять в колонку, добре висушену цукрову пудру або крохмаль на 2/3 її висоти, злегка постукуючи об твердий предмет. Для успішного розділення пігментів треба мати абсолютно сухі колонки, цукрову пудру (крохмаль, крейду) і прожарений сірчаноокислий натрій і стежити за рівномірним наповненням цукрової пудри у всьому об'ємі трубки.

Розділення пігментів. Бензинову витяжку (1-3 мл) обережно наливають по краю трубки у вільний простір колонки. Через декілька хвилин відбувається розділення і відокремлення пігментів. Зверху колонки залишається зелена зона, що складається з суміші пігментів, потім жовто-зелена зона хлорофілу *b*, потім синьо-зелена зона хлорофілу *a*, нижче розташовується зона темно-жовтого пігменту ксантофілу, а в самому низу колонки яскраво-жовтий каротин, який першим змивається з колонки. Пігменти по черзі можна змити з колонки бензином і зібрати у випарювальні чашки або колби для подальшого дослідження.

Розділення пігментів зеленого листа можна проводити на шматку крейди у формі стовпчика, заздалегідь добре висушеного в сушильній шафі. Одним кінцем крейду занурюють на 0,5-1,0 см в бензиновий екстракт пігментів (ретельно зневоднений за допомогою натрій сульфату безводного). Чітке розділення пігментів відбувається на стовпчику крейди протягом 5-10 хв.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження. Замалюйте колонку з розділеними пігментами за методом Цвета. Зробіть висновки про розчинність пігментів в різних розчинниках і способах виділення індивідуальних пігментів.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. Наведіть хімічні формули хлорофілів, вкажіть на можливі розчинники для їх екстрагування, виходячи з їх хімічної будови.

2. Назвіть метод концентрування витяжок, отриманих при виділенні пігментів з рослинної сировини.
3. Як проводять зневоднення екстрактів, що містять фотосинтетичні пігменти.
4. Назвіть методи розділення пігментів в витяжках з рослинної сировини

Питання для самоконтролю

1. Основні елементи внутрішньої структури хлоропласту.
2. Групи фотосинтетичних пігментів рослин.
3. Різниця в хімічній будові хлорофілу *a* і хлорофілу *b*. Як відрізняються їх спектри поглинання.
4. В чому полягає захисна функція оранжево-жовтих пігментів, Назвіть основний з них.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 10

Визначення міцності зв'язку хлорофілу з білок-ліпідним комплексом

Мета заняття: дослідити лабільність зв'язку хлорофілу з ліпопротеїдним комплексом пластид і вплив на нього умов навколишнього середовища.

Матеріали та обладнання: листки рослин; сульфат натрію безводний; магній карбонат; бензин; етанол; порцелянові ступки з товчачиками; мірні пробірки; фільтри Шотта №3; ваги; вакуумні насоси; фотоелектроколориметр.

Відношення пігментів фотосинтетичних комплексів до розчинників залежить від розчинності їх в цих розчинниках і від здатності розчинників викликати денатурацію пігмент-білкових комплексів. Неполлярні розчинники (бензин, петролейний ефір, гексан та ін.) не вилучають хлорофіл з непорушених його комплексів з білками. Додавання невеликої кількості полярних розчинників (наприклад, етанолу) до неполярних призводить до часткового видалення хлорофілу. Повного видалення хлорофілу з комплексів можна досягнути лише з використанням суміші розчинників, в якій співвідношення полярного і неполярного розчинників становить 2:1, наприклад, етанол-петролейний ефір (2:1).

При денатурації природного хлорофіл-білково-ліпідного комплексу (ХБЛК), яка відбувається під дією факторів навколишнього середовища (висока температура, ультразвук, ультрафіолетове опромінення), хлорофіл

частково екстрагується й неполярним розчинниками. Це відбувається внаслідок порушення зв'язку хлорофілу з білками та розчиненні пігменту в ліпідній частині комплексу, який екстрагується неполярними розчинниками.

Таким чином, за кількістю хлорофілу, що екстрагується неполярними розчинниками, можна визначити міцність зв'язку хлорофілу в ХБЛК.

Незначні домішки полярного розчинника, наприклад етанолу, до неполярного збільшують кількість екстрагованого хлорофілу. Зі збільшенням концентрації етанолу в петролейному ефірі кількість екстрагованого хлорофілу збільшується. Характер кривих екстрагування хлорофілу сумішшю полярних і неполярних розчинників вказує, що в мембранах можливе існування різних форм ХБЛК. З одних форм (слабкозв'язаних) хлорофіл вилучають сумішами з меншими концентраціями етанолу у петролейному ефірі, з інших, більш міцно зв'язаних, хлорофіл екстрагують сумішами з більш високими концентраціями етанолу.

При цьому, за ступенем екстрагування хлорофілу 0,4% розчином спирту в петролейному ефірі або бензині роблять висновок про кількість слабкозв'язаних комплексів, а за ступенем екстрагування 0,8% розчином – про кількість міцно зв'язаних комплексів.

Пробопідготовку проводять гомогенізацією розтиранням з магній карбонатом у присутності сульфату натрію як зневоднюючого агенту.

ХІД РОБОТИ

Із середньої проби досліджуваного матеріалу для аналізу взяти чотири наважки по 0,2 г, помістити в ступки, додати по 0,4 г безводного сульфату натрію та 0,05 г магнію карбонат. Проби розтерти до повного висушування.

До першої наважки додати 10 мл бензину (температура кипіння $40 \div 100^\circ\text{C}$), що містить 0,2% етанолу; другої – 10 мл бензину, що містить 0,4% етанолу; третьої – 10 мл бензину, що містить 0,8% етанолу; четвертої – 10 мл бензину, що містить 1,2% етанолу. Знову розтерти.

Вміст ступок перенести на скляні фільтри Шотта, розчини відфільтрувати, а залишки промити відповідними розчинами (порціями по 3 мл), щоразу відсмоктуючи промивну рідину, доки не одержимо 10 мл фільтрату.

Виміряти світлопоглинання одержаних витяжок при довжині хвилі 640-660 нм на фотоелектроколориметрі (ФЕК) (товщина кювети 10 мм). Визначити концентрацію хлорофілу в досліджуваній витяжці за допомогою калібрувального графіку (мкг/мл).

Обчислити кількість вивільненого хлорофілу за формулою:

$$m = c \times V$$

де m – кількість хлорофілу, екстрагованого з даної наважки, мкг;

c – концентрація хлорофілу в досліджуваній витяжці, мкг/мл (за калібрувальним графіком);

V – об'єм досліджуваного екстракту, мл.

Для одержання нерозчиненого хлорофілу, що залишився на фільтрі, додати 10 мл 90% етанолу.

Примітка. Спирт додавати невеликими порціями до повного екстрагування пігменту.

Об'єм екстракту довести спиртом до 10 мл і виміряти світлопоглинання витяжки при λ 640-660 нм на ФЕК.

Розрахувати міцність зв'язку хлорофілу у ХБЛК за формулою:

$$X = (c / c_1) \times 100,$$

X – міцність зв'язку хлорофілу з білком, %.

c – концентрація хлорофілу в витяжці, отриманій шляхом екстракції пігменту сумішшю етанол-петролейний ефір з відповідним співвідношенням полярного та неполярного розчинника.

c_1 – концентрація хлорофілу в витяжці, отриманій шляхом екстракції пігменту 90% етанолом.

Зробити висновок щодо залежності досліджуваного показника у різних варіантах досліду відповідно до використання сумішей етанол-петролейний ефір з різним співвідношенням полярного та неполярного розчинника.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. Яку величину використовують для кількісної характеристики міцності зв'язку хлорофілу в хлорофіл–білок–ліпідному комплексі?
2. Який інструментальний метод використовується для визначення міцності зв'язку хлорофілу в ХБЛК?
3. Назвіть полярні та неполярні розчинники.
4. Коли міцність зв'язку хлорофілу в ХБЛК вища: за більшого чи меншого вилучення хлорофілу?

Питання для самоконтролю

1. Що розуміють під міцністю зв'язку хлорофіл–білок–ліпідного комплексу?
2. Як саме вимірюють міцність зв'язку ХБЛК?
3. Назвіть полярні та неполярні розчинники.
4. Коли міцність ХБЛК вища: за більшого чи меншого вилучення хлорофілу?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 11

Встановлення активності дегідрогенази

Мета: провести в лабораторних умовах модельний експеримент з внутрішньоклітинного окислення шляхом дегідрування субстрату та продемонструвати активність ферментів дегідрогеназ у процесі дихання рослин.

Матеріали та обладнання: насіння гороху, що проростає, бульби картоплі; 1% водний розчин метиленового синього; дистильована вода; порцелянові чашки; пробірки; нагрівач (спиртівка або електроплита); водяна баня.

Дихання – основна форма дисиміляції у тварин, рослин і багатьох мікроорганізмів. Це фізіологічний процес, що забезпечує нормальний перебіг метаболізму живих організмів і сприяє підтримці гомеостазу, отримуючи з довкілля кисень і відводячи туди ж в газоподібному стані деяку частину продуктів метаболізму організму (CO₂, H₂O тощо).

Біологічне окислення – внутрішньоклітинне окислення біосубстратів, реалізується наступними шляхами в залежності від механізму процесу: 1) дегідрування субстрату; 2) віддача субстратом електронів; 3) приєднання кисню до субстрату.

1) Реакції дегідрування – перенос атомів Н від субстрата **S** до акцептору **A**:



Дегідрогенази – ферменти класу оксидоредуктаз, що каталізують реакції відщеплення гідрогену (тобто протонів і електронів) від субстрату, що окиснюється, і переносять його на інший субстрат, який відновлюється.

Функцію первинних акцепторів атомів гідрогену, що відщеплюються від відповідних субстратів, виконують дегідрогенази 2 типів: піридинзалежні дегідрогенази, що містять коферменти нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД⁺)

або нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺), і флавінзалежні дегідрогенази, простетичною групою яких є флавінаденіндинуклеотид (ФАД) або флавінмононуклеотид (ФМН). Коферменти НАД⁺ (або НАДФ⁺) неміцно зв'язані з апоферментом і тому можуть в клітині знаходитися як у зв'язаному з апоферментом стані, так і бути відділеними від білкової частини.

Дегідрогенази поділяються на анаероби (елімінують Н із субстрату, але не здатні використовувати в якості акцептора кисень) і аеробні (в якості акцептора водню використовують кисень).

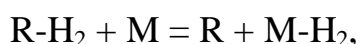
Піридинзалежні дегідрогенази належать до анаеробних, є водорозчинними ферментами, які окиснюють полярні субстрати.

2) Реакції переносу електронів від субстрату до акцептору: каталізуються цитохромами дихального ланцюга мітохондрій.

3) Реакції переносу 1-2 атомів кисню каталізуються оксигеназами (монооксигенази, диоксигенази).

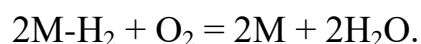
4) Реакції розщеплення токсичних органічних перекисів (пероксидів) і Н₂О₂, каталізуються пероксидазою і каталазою.

Відомо більше 150 видів дегідрогеназ. В умовах лабораторного модельного експеримента можливо спостерігати активність дегідрогеназ у процесі дихання. При цьому як донор протонів служать органічні речовини у складі рослинного матеріалу, а як акцептор – тіазиновий барвник метиленовий синій, водний розчин якого забавлений у темно-синій колір. При дії відновників метиленовий синій переходить у безбарвну лейкоформу:



де R-H₂ – відновлена форма субстрату; M – метиленовий синій; R – окислений субстрат; M-H₂ – лейкоформа метиленової сині. Саме це перетворення метиленового синього відбувається за участю органічних речовин рослинного матеріалу під дією дегідрогенази, що дозволяє спостерігати активність вказаного ферменту.

На наступному етапі експерименту при контакті відновленої лейкоформи метиленового барвника з киснем повітря відбувається її мимовільне окиснення до вихідної форми; при цьому спостерігають відновлення синьо-фіолетового забарвлення:



ХІД РОБОТИ

Відібрати 10 зерен гороху, очистити їх від шкірки і розділити на сім'ядолі. З бульби картоплі вирізати 10 однакових шматочків. Підготовлений

таким чином рослинний матеріал помістити в порцелянові чашки. Відібрати 5 шматочків бульби картоплі та 10 сім'ядолей зерен гороху та помістити в дві пробірки. До кожної пробірки налити води та прокип'ятити її вміст протягом 3 хв за допомогою нагрівача. При цьому відбувається дезактивація ферменту дегідрогеназ. Воду з пробірок злити та остудити рослинний матеріал до кімнатної температури.

Рослинний матеріал, що залишився (5 шматочків бульби картоплі та 10 сім'ядолей зерен гороху) помістити у третю і четверту пробірки. У всі чотири пробірки з рослинним матеріалом налити розчин метиленового синього та залишити на 10 хв. Після цього розчин барвника акуратно злити з пробірок в колбу та ретельно промити матеріал у пробірках водопровідною водою. Пробірки з промитим рослинним матеріалом, що набув відповідного забарвлення, залити до країв дистильованою водою і закрити пробками, що запобігатиме контакту матеріалу з киснем повітря. Проводити нагрівання вмісту пробірок на водяній бані при температурі 25–30°C, спостерігаючи за зміною забарвлення досліджуємого матеріалу (відбувається знебарвлення пофарбованого матеріалу) протягом 15–20 хв. Далі акуратно злити з пробірок воду і висипати рослинний матеріал у порцелянові чашки. Спостерігати за відновленням синього забарвлення під дією кисню повітря. Результати занести у таблицю.

Варіант дослідження	Забарвлення рослинного матеріалу		
	Після експозиції в барвнику	Після експозиції у водяній бані	Після експозиції на повітрі
Картопля (кіп'ятіння)			
Горох (кіп'ятіння)			
Картопля (без кіп'ятіння)			
Горох (без кіп'ятіння)			

Проаналізуйте отримані результати та пояснити зміну забарвлення рослинного матеріалу щодо різних варіантів дослідження. Зробіть висновок про умови активності дегідрогеназ.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. Класифікація процесів біологічного окислення.
2. Запишіть механізм реакції дегідрування як процесу внутрішньоклітинного окислення біосубстратів.
3. Роль дегідрогенази в процесі біологічного окислення.
4. Типи дегідрогеназ в залежності від природи коферментів.
5. Які властивості метиленового синього покладені в основу моделювання активності дегідрогеназ в лабораторних умовах. Наведіть формулу вказаного барвника.

Питання для самоконтролю

1. У чому полягає функція дихання як десиміляційного процесу? Доведіть, що дихання – це окисно-відновний процес.
2. Чому аеробне дихання ефективніше порівняно з анаеробним?
3. Охарактеризуйте каталітичні системи клітинного дихання.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 12

Визначення дихального коефіцієнту проростаючого насіння рослин

Мета: визначити дихальний коефіцієнт для проростаючого насіння різних рослин та зробити висновок про природу окислених речовин, що використовуються в процесі дихання.

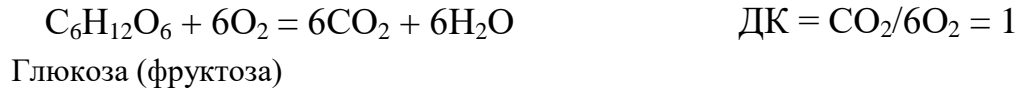
Матеріали та обладнання: штативи; гумові корки з вставленими в них зігнутими під прямим кутом тонкими градуйованими трубками; пісковий годинник на 5 хв; ножиці; пінцети; фільтрувальний папір; проросле насіння різних деревних порід; вазелін; 20% розчин КОН; насіння дослідних рослин.

Дихальний субстрат в значній мірі впливає на газообмін у процесі дихання. Щоб характеризувати співвідношення між виділеною вуглекислотою $V(\text{CO}_2)$, і увібраним киснем $V(\text{O}_2)$, користуються показником, який називається дихальним коефіцієнтом (ДК).

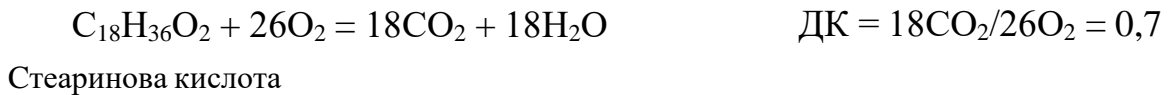
$$\text{ДК} = \frac{V(\text{CO}_2)}{V(\text{O}_2)},$$

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:

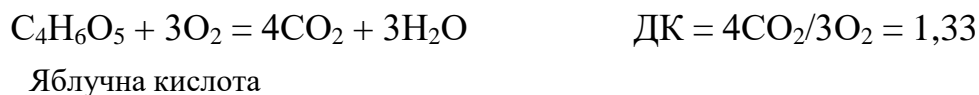
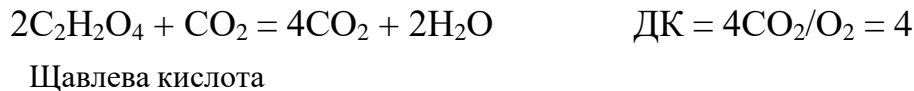


Коли в процесі дихання використовуються жири, наприклад, при диханні насіння олійних рослин, то ДК буде менше ніж одиниця, бо в молекулі жиру менше кисню, ніж у молекулі вуглеводу і для окислення жиру витрачається більше кисню:



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:



Визначення величини дихального коефіцієнта широко використовують для характеристики процесів дихання як організмів в цілому, так і їх 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. Значення 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 величина ДК більша або менша за одиницю, то в трубці крапля переміщується.

ХІД РОБОТИ

Щоб визначити величину 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 – насіння 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. Прилад закріплюють у штативі. Поки триватиме дослід, температура повинна бути сталою.

В приладі, де в пробірці знаходилось насіння пшениці чи ячменю, крапля не зрушилаз 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, 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 киснем $V(O_2)$ і виділеного вуглекислого газу $V(CO_2)$ (l_1 , 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 $V(O_2)$ (l_2 , мм), оскільки виділена вуглекислота поглинається лугом.

Дихальний коефіцієнт розраховують за формулою:

$$DK = \frac{V(CO_2)}{V(O_2)} = \frac{l_2 - l_1}{l_2}$$

Результати дослідів заносять до таблиці.

Об'єкт	Швидкість руху краплі, мм/хв								ДК
	без луку (l_1)				з лугом (l_2)				
	1	2	3	середнє	1	2	3	середнє	

Роблять висновок про залежність величини дихального коефіцієнта від природи окислювальної речовини.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. Дайте визначення показнику «дихальний коефіцієнт».
2. У чому полягає функція дихання як окисно-відновного процесу?
3. Порівняйте ефективність аеробного і анаеробного дихання.
4. Фактори, що впливають на інтенсивність процесу дихання рослин?
5. Який температурний режим та газове середовище сприятимуть кращому зберіганню овочів у сховищах ?

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення дихального коефіцієнта.
2. Що є джерелом енергії для функціонування дихального ланцюга.
3. Які фактори впливають на інтенсивність процесу дихання?
4. Назвіть подібні та відмінні риси процесів фотосинтезу й дихання.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 13

Визначення каталазної активності в тканинах рослин за методом О. М. Баха і А. І. Опаріна

Мета: Визначити ферментативну активність каталази у тканинах рослин.

Матеріали та обладнання: рослинний матеріал; кальцію карбонат; дистильована вода; універсальний індикатор; пісок кварцовий; ваги;

годинник; термостат; центрифуга лабораторна; фарфорові ступки із товкачиком; циліндри мірні; центрифужні пробірки; хімічні стакани місткістю 50 мл, колби конічні місткістю 200 мл, бюретки, мірні скляні піпетки, шпателі, спиртовий термометр, 0,1 н розчин пероксиду водню (H_2O_2), 10% розчин сульфатної кислоти, 0,1 н розчин калію перманганату ($KMnO_4$).

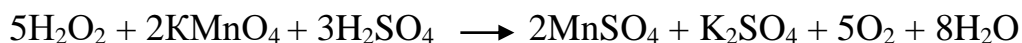
Біологічне окиснення – аеробне та анаеробне перетворення біологічних субстратів у живому організмі, яке супроводжується вивільненням енергії. У розвиток сучасних уявлень про механізм біологічного окиснення великий внесок зробили такі видатні вчені як О. М. Бах і В. І. Палладін. Теорія біологічного окислення, яка отримала назву перекисної теорії Баха, була створена у 1897 р. Згідно цієї теорії для активації кисню необхідним є розривання одного зв'язку в його молекулі для вивільнення валентності, необхідної для приєднання атому кисню з окиснюваною сполукою. За Бахом, для такого розриву зв'язку необхідна енергія, яка може бути забезпечена насиченими сполуками, які містять легко вивільнюваний запас енергії. Молекулярний кисень, сполучаючись із такими сполуками-активаторами або оксигеназами, утворює з ними органічні пероксидази. Утворені таким чином, вони розщеплюються під впливом ферментів пероксидаз, а атом кисню переноситься на інші нездатні до безпосередньої взаємодії з киснем повітря органічні субстрати.

Каталаза – фермент класу оксидоредуктаз, що здійснює каталіз розкладу пероксиду водню до води й молекулярного кисню. Незначною мірою вона також сприяє окисненню деяких спиртів та різних сполук пероксидами. Цей ензим є досить поширеним у рослинних тканинах і є одним із найактивніших. Цей фермент широко розповсюджений в організмах, які існують у присутності кисню, він запобігає накопиченню та захищає клітинні органели і тканини від пошкодження пероксидом, який постійно утворюється в результаті численних метаболітичних реакцій. Таким чином, ферментативна активність каталази забезпечує антиоксидантний захист живого організму.

Цей ензим є досить поширеним у рослинних тканинах і є одним із найактивніших. Він має один з найбільш високих показників обороту серед багатьох ферментів. Одна молекула каталази здатна кожен секунду перетворювати мільйони молекул водню пероксиду у воду та кисень.

Дослідження активності ензимів проводять на основі якісних реакцій та кількісних закономірностей із застосуванням субстрату (речовини, яка перетворюється під дією ензиму) або на основі реєстрації продуктів реакції, що утворюються під впливом ензиму.

Активність каталази можна визначити за кількістю пероксиду водню (H_2O_2), який розкладається під дією вказаного ензиму. Для проведення дослідження у реакційну суміш вносять надлишок пероксиду водню. Паралельно ставлять контрольний дослід, у якому каталазу дезактивують сірчаною кислотою. У пробі, що досліджується, частина внесеного H_2O_2 розкладається під дією дії ензиму. Решту H_2O_2 , що не розклався, визначають шляхом титрування розчином KMnO_4 в кислому середовищі. При цьому відбувається наступна реакція:



Об'єм H_2O_2 , який розклався під дією ензиму, розраховують за різницею об'ємів титрантів, які було використано для титрування дослідної і контрольної проби.

ХІД РОБОТИ

Пробопідготовка. Зважити 2-3 г свіжого рослинного матеріалу (моркви, картоплі, капусти, цибулі, тощо), розтерти його в фарфоровій ступці з кварцовим піском. Виміряти рН отриманої суміші за допомогою універсального індикаторного папіру. Якщо рН середовища зразка кисле (менше 7,0), підлучити його додаванням кальцію карбонату (внести на на кінчику шпателя). Під час розтирання поступово додавати до рослинного матеріалу невеликими порціями 40 мл води. Отриману масу кількісно перенести до центрифужної пробірки, змиваючи стінки ступки 10 мл дистильованої води, і центрифугувати 10-15 хв при 3-5 тис. об/хв. Надосадову рідину з центрифужних пробірок перелити до хімічного стакану.

Для дослідження активності ферменту із стакану відібрати дві аліквоти по 20 мл і помістити їх у конічні колби місткістю 200 мл. В колбу, яка слугуватиме контролем, внести 5 мл розчину сульфатної кислоти, що призведе до інактивації каталази. Після цього в обидві колби внести по 20 мл розчину водню пероксиду. При додаванні реактивів вміст колб ретельно перемішувати. Розкладання H_2O_2 проводять протягом 30 хв при температурі 20°C , яку підтримують за допомогою термостату. Через 30 хв у досліджувану колбу додати 5 мл розчину сірчаної кислоти для інактивування ферменту. Надлишок H_2O_2 , що не розклався, відтитрувати в колбах 0,1 н розчином калію перманганату до появи рожевого забарвлення, що не зникає протягом 1 хв.

Активність каталази (Е) виражається у мікромольх H_2O_2 , який піддався розкладу під дією ензиму протягом 1 хв в розрахунку на 1 г рослинного зразку. Розрахунок проводять за формулою

$$E = \frac{(V_k - V_e) \cdot T \cdot 50 \cdot 50}{m \cdot 20 \cdot 30},$$

де V_k – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, що витрачений для титрування контрольного зразка, мл;

V_e – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, що витрачений для титрування досліджуваного зразка, мл;

T – титр 0,1 н розчину $KMnO_4$, г/мл;

50 – коефіцієнт для перерахунку маси H_2O_2 , що розклався в процесі реакції, у мікромолі;

50 – загальний об'єм отриманого екстракту, мл;

20 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл;

30 – час ферментативної реакції, хв.;

m – маса рослинного матеріалу, взятого для дослідження, г.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. У чому суть визначення активності каталази в тканинах рослин за методом О. М. Баха і А. І. Опаріна?
2. Який аналітичний метод використовується для встановлення кількості пероксиду водню, який розкладається під дією вказаного ензиму?
3. В яких одиницях виражається активність каталази?

Питання для самоконтролю

1. Фізіологічні функції ферменту каталази.
2. Що називають субстратом у ферментативних процесах?
3. За якими речовинами, що є учасниками ферментативної реакції, можливо провести вимірювання активності ферментів в лабораторних умовах?

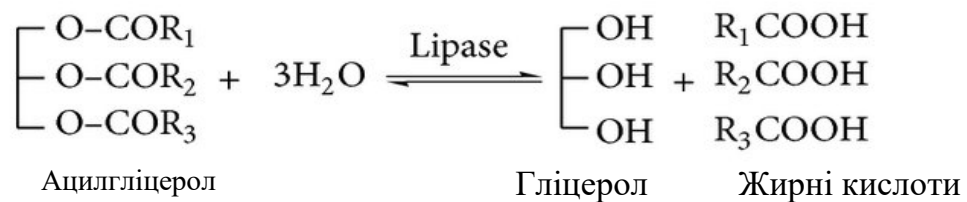
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 14

Визначення ліполітичної активності насіння

Мета роботи: визначити ліполітичну активність в насінні олійних культур.

Матеріали та обладнання: центрифуга на 15 тис. обертів; пластмасові центрифужні пробірки з кришками на 10 мл; аналітичні терези; термостат; бюретка для титрування на 10 мл; колби місткістю 50 мл; пробірки; ступки; 0,2% розчин NaOH для титрування; 0,5% розчин фенолфталеїну у 60% етанолі; цитрат-фосфатний буфер з рН 4,6 (51,8 мл 2,87% розчини Na_2HPO_4 і 48,2 мл 2,1% розчини лимонної кислоти (для льону олійного); цитрат-фосфатний буфер з рН 4,8 (50,7 мл 2,87% розчини Na_2HPO_4 і 49,3 мл 2,1% розчини лимонної кислоти (для ріцини); насичений розчин NaCl, який містить 0,05% тритон X-100; насіння льону олійного, соняшнику або ріцини.

Розпад жирів найбільш енергійно відбувається при проростанні насіння олійних культур. На початку проростання насіння запасні білки насіння розпадаються до амінокислот. Саме з амінокислот у подальшому утворюються ферменти, які виступають каталізаторами для мобілізації запасних ліпідів. До числа таких ферментів відносять ліпази, в результаті дії яких ацилгліцероли жиру гідролізуються до гліцеролу (гліцерину) та вільних жирних кислот:



Ліпази відносяться до класу ферментів «Гідролази» (підклас естераз) та об'єднані загальною назвою – триацилгліцеролліпаза.

Для рослин, які накопичують жири як запасний матеріал (льон, соняшник, ріцина) дуже важливим показником є ліполітична активність насіння. Жири, нагромадженні у сферосомах, використовуються для підтримання росту паростка, поки він не перетвориться в фотосинтезуючу рослину. Ліпази сферосом діють на поверхні розподілу жир-вода, використовуючи іони H^+ та OH^- води для розщеплення естерних зв'язків. Ліпаза сферосом має оптимальну активність в кислому середовищі в діапазоні рН 4,2-5,2, при цьому для різних видів і навіть сортів значення рН

відрізняється.

Швидкість ферментативної реакції можна визначити по кількості субстрату, розщепленого за одиницю часу. Активність ліпази визначають за кількістю утворених жирних кислот, що вивільняється за означений проміжок часу. Кількість жирних кислот визначають методом кислотно-основного титрування з використанням луку як титранту у присутності індикатору фенолфталеїну (метод алкаліметрії).

Для виділення ліпази з рослинного матеріалу її попередньо активують, створивши середовище з відповідною кислотністю. При цьому активна ліпаза переходить безпосередньо в шар жиру, де починає його розщеплювати. Відділяють шар жиру від водної фази за допомогою центрифугування. З шару жиру активну ліпазу осаджують додаванням насиченого розчину натрій хлориду.

ХІД РОБОТИ

Пробопідготовка. Наважку (близько 5 г) подрібненого насіння розтирають у ступці з невеликою кількістю цитрат-фосфатного буферу до гомогенного кашоподібного стану. Отриману суміш вміщують в центрифужні пробірки і центрифугують при 15 хв (15 тис. об/хв). В результаті центрифугування суміш розділяється на три шари: верхній – жировий (містить слиз, жир та ліпазу); середній – водний (містить водорозчинні речовини); нижній – осад.

Відділяють жировий шар, додають до нього равний об'єм насиченого розчину NaCl, що містить 0,05% тритон X-100, збовтують суміш та центрифугують її протягом 15 хв (13 тис. об/хв). Спостерігають утворення чотирьох шарів: верхній, який містить слиз; жировий шар, який містить олію; водний шар і осад, в якому знаходиться ліпаза.

Для подальшого дослідження відокремлюють жировий шар і осад ліпази, який розчиняють в 0,5 мл відповідного буферу з зазначеним рН відповідно до культури, насіння якої досліджують.

В дві пробірки вміщують по 0,5 мл цитрат-фосфатного буфера, по 0,5 мл розчину ліпази і по 3 краплі олії, яку беруть з жирового шару. Одну з цих пробірок поміщають на інкубацію в заздалегідь нагрітій до 37°C термостат на 1 годину (дослід). До іншої пробірки (контроль) додають 2 краплі 0,5% розчину фенолфталеїну (розчин при цьому каламутніє) і титрують 0,2% розчином NaOH до появи стійкого блідо-рожевого забарвлення.

Після інкубації проводять титрування проби-дослід. За різницею об'ємів розчину NaOH, витрачених на титрування дослід (V₂) і контролю (V₁), розраховують ліполітичну активність (мл/год):

$$A = V_2 - V_1$$

Результати дослідів занесить до таблиці.

Об'єкт	V_1 , мл	V_2 , мл	A, мл/год

Зробіть висновки про активність ліпази в досліджуваному насінні олійної культури.

Завдання

Напишіть основні етапи методики виконання лабораторного дослідження.

Дайте відповіді на наступні питання.

1. Яким методом можна визначити швидкість ферментативної реакції? Проілюструйте на прикладі визначення ліполітичної активності в насінні олійних культур, наведіть відповідне рівняння ферментативного перетворення.

Питання для самоконтролю

1. Запасаюча функція жирів.
2. Фази біосинтезу ацилгліцеролів.
3. Стадії синтезу жирних кислот.
4. Назвіть стадії розпаду жирів.
5. Назвіть основний тип окиснення жирних кислот.
6. Ферменти, що каталізують розщеплення жирів.

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. Біохімія рослин: навч. посібник / М. С. Кобилецька, О. І. Терек. – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2017. – 270 с.
4. Лисиця А.В. Біохімія. Практикум: навчальний посібник. Суми: Університетська книга, 2019. 240 с.
5. Зименковський Б., Музиченко В., Ниженковська І. Biological and Bioorganic Chemistry in 2 books. Book 1. Bioorganic Chemistry. Київ: Медицина, 2019. 288 с.
6. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. 508 с.

Допоміжна

1. Боєчко Ф.Ф., Боєчко Л.О., Шмиголь І.В. Лабораторний практикум з біохімії: навчально-методичний посібник: Вид. 2-ге, перероб. і допов. Черкаси: ЧНУ ім. Богдана Хмельницького, 2015. 279 с.
2. Копильчук Г.П., Николайчук І.М. Лабораторний практикум із біохімії: навчально-методичний посібник. Чернівці: Чернівець. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. 144 с.
3. Жегунов Г.Ф. Практикум з біологічної хімії: навчально-методичний посібник для студентів. 2014. 304 с.
4. 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.
5. Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження: підруч./ О. Я. Склярів, Н. В. Фартушок, Л. Д. Сойка, І. С. Смачило. Київ: Медицина, 2009. 352 с.
6. Бондарчук Т. І., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І. та ін. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі: навч. посібник / за ред. О. Я. Склярів. Київ: Медицина, 2010. 360 с.