

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
РАСТЕНИЙ**

МЕТОДИЧЕСКОЕ УКАЗАНИЕ

к лабораторным занятиям по
биохимии растений с основами
теории для студентов
агробиологических специальностей

Краснодар, 2013

Составители: проф. Федулов Ю.П., доц. Доценко К.А.,
доц. Тосунов Я.К.

Утверждены учебно-методической комиссией
факультета защиты растений, агрохимии и почвоведения
протокол № 5 от 20.05.2013 года

Рецензент доктор химических наук,
профессор Доценко С.П.

СОДЕРЖАНИЕ

Правила по технике безопасности.....	4
Рекомендуемая литература.....	6
Раздел 1. Отбор средних проб и методы анализа.....	6
Раздел 2. Органические кислоты.....	11
Определение общей кислотности.....	14
Определение свободных органических кислот.....	16
Раздел 3. Витамины.....	18
Определение аскорбиновой кислоты.....	32
Определение аскорбиновой кислоты в окрашенных вытяжках.....	33
Раздел 4. Ферменты.....	35
Определение активности аскорбиноксидазы.....	36
Определение активности нитратредуктазы.....	38
Определение активности уреазы.....	40
Определение гидролитической активности липазы.....	42
Определение активности пероксидазы.....	45
Определение активности каталазы.....	47
Определение активности полифенолоксидазы.....	51
Раздел 5. Азотистые вещества.....	53
Определение аминного азота нингидриновым методом.....	56
Колориметрическое определение белка.....	59
Запасные белки и изучение их свойств.....	60
Раздел 6. Жиры.....	63
Определение кислотного числа.....	66
Раздел 7. Углеводы.....	68
Объемный метод определения крахмала.....	73
Определение содержания водорастворимых форм углеводов.....	75

Лабораторные занятия по биохимии растений представляют собой работу по освоению биохимических методов исследования растений, и дает возможность студентам изучать основные положения курса биохимии растений, параллельно с выполнением практических работ.

В лабораторных исследованиях студенты анализируют свежий материал, подготовленный специально к занятиям, а также фиксированные или высушенные образцы культур, выращенных на вегетационном участке кафедры физиологии и биохимии растений.

Перед практическими работами каждого раздела даны краткие теоретические предпосылки, что дает возможность студентам освоить данную тему. Лабораторные работы написаны подробно и доходчиво, что позволяет работать самостоятельно, без устных указаний и разъяснений со стороны преподавателя.

Для обобщения результатов, студентам предлагается полученные данные занести в таблицу, провести сравнительный анализ и написать вывод.

П р а в и л а

по технике безопасности для студентов, работающих в лабораториях кафедры физиологии и биохимии растений

1. При работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус, на ощупь и нюхать.
2. Запрещается производить опыты в грязной посуде.
3. При переливании кислот и щелочей нельзя близко наклоняться к посуде во избежание попадания брызг на лицо, руки и другие участки тела.
4. Пробирки с жидкостью при нагревании надо держать наклонно в сторону от себя и соседей.
5. Категорически запрещается нагревать воду и растворы в закрытых сосудах.

6. Нельзя выливать в раковину крепкие кислоты и щелочи.

7. Нельзя набирать концентрированные кислоты, щелочи и другие реактивы в пипетку ртом, в этом случае следует пользоваться мерным цилиндром.

8. Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и газообразными веществами производятся под тягой.

9. Категорически запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды и питья.

10. Категорически запрещается откручивать электропатроны или засовывать туда посторонние предметы.

Обязанности студента

1. Являться на занятия вовремя (опоздавший к занятиям не допускается).

2. В случае пропуска занятия по уважительной причине отработать в ближайшее время.

3. Быть теоретически подготовленным к занятию.

4. На лабораторных занятиях быть в халате.

5. Во время занятия соблюдать чистоту на рабочих местах и в лаборатории, а также определенный порядок в выполнении заданий.

6. Бережно относиться к имуществу кафедры.

7. Выполнять указания дежурных по группе.

Студенту запрещается

1. Входить в лабораторию в верхней одежде.

2. Переносить с места на место приборы, реактивы, посуду и другое оборудование лаборатории.

3. Загромождать рабочие столы, стулья приборы и проходы посторонними предметами.

4. Сорить и писать на халатах и столах.

5. Шуметь, разговаривать по телефону и писать SMS.

6. Трогать, вскрывать, включать и перемещать оборудование и другие предметы, не имеющие отношения к выполняемым работам.

7. Бесцельно ходить по кафедре, отвлекать одноклассников от работы и выходить из лаборатории в течение учебного часа.

8. Все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и газообразными веществами производятся под тягой.

9. Категорически запрещается пользоваться лабораторной посудой для еды и питья.

10. Категорически запрещается откручивать электропатроны или засовывать туда посторонние предметы.

Рекомендуемая литература

1. **Кретович В.Л.** Биохимия растений. М.: Высш. школа, 1987.
2. **Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А.** Физиология растений. М.: Высшая школа, 2006.
3. **Якушкина Н.И.** Физиология растений. Учеб. для вузов.- М: ВЛАДОС, 2005.
4. **Плешков Б.П.** Биохимия сельскохозяйственных растений, М., Колос. - 1987.
5. **Ленинджер А.** Биохимия. М.: Мир, 1974.
6. **Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф.** и др.; под ред. И. П. Ермакова. – 2-е изд., испр. Физиология растений – М.: Издательский центр «Академия», 2007.
7. **Третьяков Н.Н., Конкин Е.И., Макрушин Н.М.** и др. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений, под ред. Н. Н.Третьякова. – М.: Колос, 1998.

РАЗДЕЛ 1. ОТБОР СРЕДНИХ ПРОБ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА

При отборе проб следует иметь в виду, что биохимические свойства различаются не только у разных видов культурных

растений, но даже у отдельных растений в пределах одного вида и сорта. Условия выращивания и, прежде всего, уровень обеспеченности растений элементами минерального питания оказывают существенное влияние на химический состав и качество продукции у различных культур и сортов. Это влияние определяется изменением активности ферментов в онтогенезе растений. Поэтому сравнение химического состава различных культур и сортов должно проводиться с учетом указанных изменений.

Биохимическими методами учитывают биологические свойства изучаемых объектов и происходящие в них химические процессы. Методы отбора, составления и подготовки проб для анализа имеют исключительно важное значение. Отбор и составление средних проб зависят не только от объекта, но и от задачи, которую разрешает каждый конкретный анализ и обеспечивает сравнимость результатов биохимического анализа.

Подготовка материала к анализу активности ферментов

В каждой живой клетке ферменты находятся в виде смесей и комплексов с различными белками и другими веществами. Ферменты принадлежат к белкам и поэтому ввиду лабильности большинства из них все операции с первых же стадий работы необходимо проводить при охлаждении.

Когда подходящий источник найден, фермент необходимо перевести в раствор (экстрагировать). Для этого обычно требуется разрушить клеточную стенку.

Разрушение клеток. Растирание в порошок или гомогенизация растительных тканей является необходимой подготовительной операцией для биохимических опытов разного типа, включая выделение компонентов клетки, экстракцию ферментов и других химических веществ клетки.

Суспензию материала для исследования можно готовить самыми различными способами, причем выбор способа определяется характером и целью опыта. Во многих случаях наиболее разрушительным является растирание с песком в ступке.

После растирания в течение нескольких минут (лучше на холоде), полученный гомогенат необходимо профильтровать для удаления крупных кусков ткани перед центрифугированием или другими операциями.

Для разрушения клеток часто используют метод замораживания-оттаивания, обработку растворителями (такими как ацетон), автолиз (либо сам по себе, либо в присутствии толуола, этилацетата или сульфата натрия) или лизис с помощью специально добавленных ферментов.

Фракционирование. В полученном экстракте помимо фермента, подлежащего очистке, присутствуют и ряд других веществ большего или малого молекулярного веса. Малые молекулы могут быть удалены диализом. Диализ представляет собой дифференцированную диффузию через мембрану, непроницаемую для растворенных коллоидных веществ (белков и некоторых полисахаридов), но проницаемую для воды, солей, низкомолекулярных органических соединений и т.д. Если, например, нужно удалить сульфат аммония из раствора белка, то раствор белка помещают в специальный мешок из полупроницаемого материала (ацетилцеллюлозы), который затем помещают в сосуд с большим количеством воды. Очистка состоит в основном из серий фракционирования, при которых ферментный белок отделяется от других присутствующих в растворе белков. Более быстрая очистка достигается сменой различных методов фракционирования, а не повторением одного и того же приема. Фракционирование обязательно должно контролироваться определением активности фермента.

При всех способах фракционирования следует уделять особое внимание двум факторам, которые весьма сильно влияют на результаты, а именно рН и концентрацию электролита (в особенности первому из них). Часто для осаждения нуклеопротеидов и нерастворенных частиц реакцию доводят до рН 5,0, дают несколько минут стоять, а затем центрифугируют. При

этом мутный экстракт обычно становится совершенно прозрачным. Это первая ступень фракционирования.

Фракционная денатурация нагреванием. Весьма удобный как предварительная ступень при работе с термостабильными ферментами. Прогревая раствор в течение определенного времени при температуре немного ниже той, при которой фермент разрушается, можно иногда вызвать коагуляцию большого количества балластного белка, а затем отделить этот белок на центрифуге и отбросить. В присутствии субстрата раствор фермента удается иногда нагреть на 10°C выше той температуры, которая в отсутствии субстрата вызывает разрушение фермента.

Фракционное осаждение органическими растворителям. Это один из главных методов очистки белков. Чаще всего пользуются спиртом и ацетоном. При этом поддерживают низкую температуру.

Фракционирование солями. Метод применяется очень широко. Чаще всего используют сульфат аммония, так как он хорошо растворим в воде и не оказывает вредного действия на большую часть ферментов. Более того, на многие ферменты он оказывает даже стабилизирующее действие, а потому при работе с ним нет необходимости проводить фракционирование при низкой температуре. Количество сульфата аммония обычно выражают в процентах насыщения (55-60 %).

Фракционная адсорбция. В качестве адсорбентов используют главным образом гель фосфата кальция или гель гидроокиси алюминия. Для адсорбции нежелательных примесей используют древесный уголь. Иногда используют гидроокись цинка. Лучше всего адсорбция идет при pH 5-6. Далее фермент элюируется с активных фракций адсорбента. Элюцию проводят водой. Часто фермент элюируют слабощелочными растворами, например фосфатным буфером с pH 7,6.

Хроматографирование на колонке. Фермент, растворенный в буфере, вносят в колонку, предварительно уравновешенную тем же буфером. Затем колонку с внесенным в нее белком промывают

этим же буфером и после указанных процедур начинают элюцию белка с помощью «солевого градиента», то есть при постепенном повышении концентрации соли. Элюат собирают на фракционном коллекторе. Затем в этих фракциях определяют ферментативную активность и концентрацию белка. Для этих целей чаще пользуются ионообменными смолами (амберлит, различные производные целлюлозы - ДЭАЭ-цедлюлоза). В настоящее время часто используют различные сефадексы. При этом в использовании «солевого» градиента для элюции нет необходимости.

Кристаллизация. Обычный метод состоит в добавлении соли к достаточно концентрированному раствору фермента до появления слабого помутнения. Затем раствор оставляют стоять и при этом постепенно (очень медленно) повышают концентрацию соли.

Общие принципы при определении активности ферментов

Активность ферментов очень сильно зависит от рН среды, присутствия электролитов и других веществ, активизирующих либо, наоборот, ингибирующих их действие.

Активность ферментных препаратов определяется по их действию на соответствующий субстрат в условиях, оптимальных для активности изучаемого фермента (оптимальная концентрация субстрата, рН среды, температура, коферменты и т. д.). За ферментативным действием можно наблюдать по исчезновению субстрата либо появлению продуктов катализируемой реакции.

Активность ферментов следует определять по начальной скорости реакции, т. е. по величине химических превращений, протекающих за короткий промежуток времени в самом начальном периоде реакции. В это время еще не происходит существенных изменений в составе реакционной смеси, которые могут оказать влияние на действие фермента.

Параллельно с определением активности фермента необходимо проводить «холостые» определения с акти-

винованным тем или иным способом ферментом, поскольку в ряде случаев могут быть спонтанные изменения субстрата, не имеющие прямого отношения к каталитическому действию изучаемого фермента.

Методы количественного изучения ферментных реакций

Спектрофотометрические методы. Эти методы основаны на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, являющимися активными группами ферментов, субстратами или продуктами реакции. Спектры этих соединений могут иметь максимумы поглощения при определенной длине волны, как в ультрафиолетовой, так и в видимой области. Флавиновые ферменты, например, имеют максимум поглощения при 450 нм, высота которого обратимо снижается при восстановлении фермента. Коферменты НАД и НАДФ имеют спектры поглощения при 340 нм в восстановленном, но не в окисленном состоянии, и это дает возможность использовать спектрофотометрический метод при изучении действия большого числа дегидрогеназ.

Манометрические методы. Используются при определении активности ферментов в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии.

Метод Тунберга. Основан на измерении времени, необходимого для восстановления (обесцвечивания) определенного количества метиленового синего или другого аналогичного красителя (трифенилтетразолхлорида - ТТХ). Для предотвращения последующего окисления красителя атмосферным кислородом, опыт необходимо проводить в пробирках Тунберга.

Электродные методы. Измерение рН реакций, в ходе которых образуются кислоты.

Хроматографические методы. Обнаруживают образование продукта реакции.

Химические определения. Например, колориметрический метод Фиске-Суббароу для определения фосфата, как продукта реакции или молочной кислоты по Баркер-Самерсону.

РАЗДЕЛ 2. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

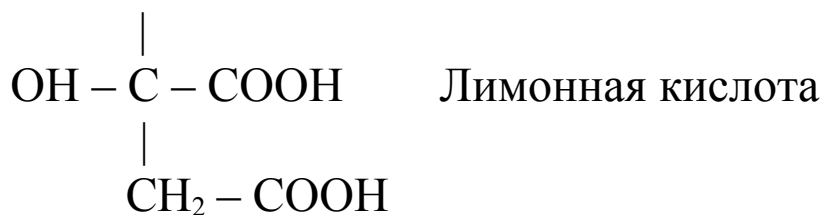
Органические кислоты растений разнообразны по своему строению и широко распространены в различных органах. Они подразделяются на две большие группы - летучие (перегоняющиеся с водяным паром) и не летучие. Органические кислоты содержатся в растениях, как в свободном виде, так и в виде солей и эфиров. Они являются продуктами превращения углеводов (цикл ди- и трикарбоновых кислот и глиоксилатный цикл). Многие из них являются исходными соединениями для биосинтеза аминокислот, сахаров, жиров, витаминов и некоторых других биологически активных соединений.

Количественное содержание органических кислот в растениях подвержено изменениям в зависимости от вида и сорта растений, времени суток и сезона, почвенно-климатических условий, а также удобрений и поливов. Накопление в растении той или иной кислоты связано со всем комплексом превращения органических кислот во время развития растения, с типом обмена, веществ вообще и его зависимостью от условий внешней среды. Так в процессе созревания и хранения плодов и овощей происходят не только изменения общего количества свободных (титруемых) органических кислот, но и существенно изменяется и их состав.

Большой практический интерес представляют лимонная, яблочная, винная, щавелевая, янтарная и другие кислоты.

Лимонная кислота очень широко распространена в растениях. В растениях южных широт ее содержание выше, чем северных. В ягодах: смородине, малине, землянике концентрация лимонной кислоты выше, чем яблочной. В плодах цитрусовых содержится главным образом лимонная кислота (в лимонах до 9% сухой массы), апельсинах, клюкве (около 1,5%), в соке дикого граната (до 8%). Лимонная кислота образует соли, из которых наиболее характерной является ее трехкальциевая соль $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, эта соль в горячей воде растворяется труднее, чем в холодной.





Лимонная кислота очень широко применяется в пищевой промышленности, медицине, для технических целей. Сырьем для производства лимонной кислоты могут служить лимоны, листья табака, махорки, хлопчатника и некоторых других культур; получать ее можно и микробиологическим путем, используя способность некоторых грибов превращать сахар в лимонную кислоту. Для оценки качества сырья большое значение имеют точные методы определения лимонной кислоты. Кроме того, следует учитывать, что лимонная кислота занимает одно из центральных мест в обмене органических кислот и при изучении этих процессов, как правило, также бывает необходимо определение содержания лимонной кислоты.

Яблочная кислота $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{COOH}$ чрезвычайно широко распространена в растениях. Она преобладает в рябине, кизиле, яблоках (вообще в семечковых и косточковых плодах). В ягодах барбариса ее содержится до 6%. Она отсутствует в citrusовых плодах и в клюкве. Яблочная кислота содержится в семенах злаков и бобовых, а также в листьях. В растениях табака и махорки ее содержится до 6,5%. Большое количество яблочной кислоты накапливается вегетативных органах сочных растений – суккулентов. Так, например, у агавы яблочная кислота составляет до 8-10% сухого вещества. Она содержится также в плодах томатов. Она применяется при изготовлении фруктовых вод и некоторых кондитерских изделий.

Винная кислота $\text{HOOC} - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH}) - \text{COOH}$. Встречается в растениях в виде оптически активной D-винной кислоты, а также в виде виноградной кислоты. Встречается преимущественно в растениях более южных широт. В значительном количестве D-винная кислота содержится в

винограде вместе с L-яблочной и виноградной кислотами. В других плодах и ягодах D-винная кислота либо содержится в весьма незначительном количестве, либо отсутствует. Винная кислота широко применяется при производстве фруктовых вод, для изготовления химических разрыхлителей теста, в текстильной промышленности при изготовлении протравы и красок, в медицине.

Щавелевая кислота $\text{HOOC} - \text{COOH}$ - важный промежуточный продукт цикла Кребса, связывающий между собой превращения углеводов и аминокислот. Играет важную роль в биосинтезе аспарагиновой кислоты, аланина и аспарагина. Щавелевая кислота чрезвычайно широко распространена в растениях, как в свободном виде, так и в виде солей. Особенно часто она содержится в растениях в виде щавелоокислого кальция, который накапливается иногда в больших количествах в форме сросшихся между собой кристаллов. Большие количества щавелевой кислоты содержат суккуленты. В плодах и ягодах она содержится в незначительном количестве - до 0,06%.

Янтарная кислота $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ образуется при дыхании в цикле Кребса и в небольшом количестве при спиртовом брожении. Содержится во многих растениях, в частности в ягодах красной смородины, в незрелой вишне, крыжовнике и винограде, а также в черешне и в яблоках.

При анализе органических кислот следует различать общую кислотность или общее содержание анионов кислоты (свободной или связанной) и концентрацию свободной кислоты или титруемую кислотность. В свободном состоянии органические кислоты содержатся обычно в плодах и ягодах и в виде кислых и нейтральных солей - в листьях, особенно бобовых культур.

Определяемые кислоты можно экстрагировать из свежей, замороженной или высушенной растительной ткани.

Работа 1. Определение общей кислотности

В плодах и овощах, а также в листьях многих растений часто накапливается значительное количество свободных кислот. Определение общего содержания кислот имеет большое значение при использовании плодов и овощей в пищу, при их консервировании, а также при изучении накопления и распада кислот в растениях. Величину общей кислотности можно определить алкалометрическим, а также ацидиметрическим титрованием с использованием соответствующих индикаторов или потенциометрически.

Принцип метода. Кислоты извлекаются из измельченного растительного материала в результате нагревания с водой при температуре 80-90° в течение 30 минут. Извлеченные кислоты оттитровывают раствором щелочи. Общее количество кислот обычно пересчитывают на яблочную кислоту.

Задание. Определить общее содержание кислот, зарисовать таблицу содержания общих кислот в зависимости от растительного образца. Сделать выводы.

Оборудование и реактивы. Водяная баня, колбы мерные емкостью 200 мл., колбы конические емкостью 200-300 мл., воронки, пипетки, фильтры, 1,0 н. и 0,1 н. NaOH, 1,2 н. HCl, фенолфталеин, лакмусовая бумага.

Ход работы. Берут навеску 2-10 г свежих плодов, овощей или листьев растений тщательно измельчают в ступке. Растительную массу переносят без потерь в мерную колбу объемом 200 мл. В колбу приливают около 150 мл дистиллированной воды и выдерживают в течение 30 минут в водяной бане при температуре 80-90°С. Затем колбу охлаждают водопроводной водой, доводят до метки и фильтруют в сухой стакан или колбу. Полученный фильтрат служит для определения общей кислотности. 50 мл фильтрата, содержащего кислоты, переносят в коническую колбу и добавляют в нее 50 мл 1 н. NaOH. Колбу нагревают на водяной бане при 80-90°С в течение 10 минут. При нагревании раствора с избытком щелочи ангидриды кислот расщепляются.

Затем в колбу добавляют 50 мл 1,2 н. HCl и снова нагревают на бане в течение 10 минут. При нагревании кислотного раствора из него удаляется углекислота. Затем раствор в колбе охлаждают.

Наряду с определением свободной кислотности в анализируемом образце проводят «холостое» определение. Для этого вместо раствора берут 50 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл 1,0 н. NaOH, нагревают на бане, затем вносят 1,2 н. HCl и снова нагревают.

После охлаждения растворов приступают к титрованию. Для этого в обе колбы добавляют по несколько капель спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. NaOH до ярко-розового оттенка раствора. Если раствор сильно окрашен и переход окраски раствора при добавлении щелочи определить трудно, то при титровании можно использовать лакмусовую бумажку. Капли жидкости из колбы при титровании переносят на кусочек фильтровальной бумаги и наблюдают изменение окраски.

Вычисление результатов

Количество миллиэквивалентов кислот, содержащихся в 100 мл раствора равняется:

$$M = \frac{(Y - X) \times Q \times 100}{V \times P},$$

где M - эквивалент по яблочной кислоте, %;

Y - объем 0,1 н. NaOH затраченный на титрование исследуемого образца;

X - объем 0,1 н. NaOH затраченный на титрование контрольной пробы;

A - общий объем вытяжки;

V - объем вытяжки, взятой для определения содержания общих кислот;

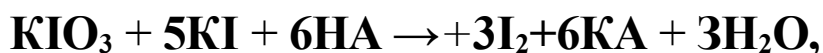
P - навеска исследуемого образца;

Q - 0,0067 коэффициент перевода расчета на яблочную кислоту;

100 - коэффициент перевода в проценты.

Работа 2. Определение свободных органических кислот

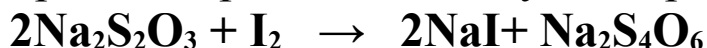
Сумму свободных органических кислот можно определить йодометрическим методом. При этом происходит следующая реакция:



где А - анион кислоты,

Оборудование и реактивы. Мерные колбы, конические колбы, фарфоровые ступки, пипетки, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, $\text{KI}+\text{I}_2$, BaCl_2 , раствор крахмала.

Ход работы. К раствору, содержащему свободные кислоты, прибавляют избыток нейтрального раствора йодистого калия. Выделившийся йод титруют раствором гипосульфита. При этом происходит следующая реакция:



Ход определения. Навеску свежего растительного материала (5-10 г) переносят в фарфоровую ступку и растирают с 5 мл 10%-ного раствора хлористого бария. Растертую массу переносят в центрифужную пробирку, ступку тщательно смывают небольшими порциями дистиллированной воды, и все промывные воды переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют 3-5 минут при 2-3 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость сливают в мерную колбу на 50 мл. К осадку в пробирке приливают 1 мл 10%-ного раствора хлористого бария, 8-10 мл дистиллированной воды и снова центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают в мерную колбу, а осадок еще раз промывают дистиллированной водой, центрифугируют и надосадочную жидкость вновь сливают в мерную колбу. Объем раствора в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 50 мл и перемешивают. Берут пипеткой 10 мл раствора, переносят в коническую колбу для титрования, добавляют в колбу 5 мл 10%-ного раствора

хлористого бария и 5 мл 0,1 н. йодидйодатного раствора, перемешивают, закрывают колбу пробкой и оставляют на 30 минут. После этого прибавляют 0,5 мл раствора крахмала и титруют 0,01н раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски.

Содержание свободных кислот в исследуемом материале в пересчете на яблочную кислоту рассчитывают по формуле:

$$X = (0,067 \times 50 \times T \times A \times 100) : (H \times 10),$$

где X - содержание свободных кислот в пересчете на яблочную кислоту, %;

0,067 - мэкв яблочной кислоты;

50- общий объем исследуемого раствора, мл;

T - поправка по титру 0,01 н раствора гипосульфита;

A - объем 0,01 н раствора гипосульфита, затраченный на титрование, мл;

100 - коэффициент для пересчета в проценты;

10 - объем исследуемого раствора, взятый для титрования, мл;

H - навеска свежего или абсолютно сухого растительного материала, взятого для анализа, г.

РАЗДЕЛ 3. ВИТАМИНЫ

В и т а м и н ы - это низкомолекулярные, биологически активные органические вещества, разнообразной химической природы, строго необходимые для нормальной жизнедеятельности организмов. К витаминам относятся свыше 50 различных химических соединений.

Витамины необходимы для нормальной физиологической деятельности живого организма. Они входят в состав простетических групп многих ферментов и осуществляют каталитические функции, оказывая огромное влияние на рост, развитие, продуктивность и здоровье животных. При отсутствии витаминов в пище возникают глубокие нарушения в процессах обмена веществ, которые ведут к тяжелым заболеваниям и

гибели животного организма. Эти заболевания носят название авитаминозов.

Научно-экспериментальное изучение витаминов было положено русским ученым Луниным Н.И., который в 1880 г. опубликовал работу, доказывающую, что в пище кроме известных химических веществ (белков, жиров, углеводов, минералов и воды), содержатся какие-то неизвестные, но жизненно необходимые вещества. Впоследствии эти выводы Лунина были подтверждены и другими учеными.

В 1897 г. появились работы голландского ученого Эйкмана, в которых были приведены экспериментальные материалы о заболевании полиневритом (болезнь бери-бери) кур, кормившихся очищенным (полированным) рисом, и о предохранении их от этого заболевания при добавлении к корму рисовых отрубей.

В 1911 г. польский биохимик Казимир Функ выделил препарат из отрубей риса, быстро излечивавший голубей, больных полиневритом. Так как данное вещество относится к группе жизненно необходимых веществ (*vita* -жизнь) и включало аминокгруппу, то Функ предложил его назвать витамином. И хотя открытые позднее вещества этого класса уже не содержали аминокгруппу, этот термин все же укрепился в науке.

В 1912 г. были опубликованы работы американского исследователя Гопкинса, который установил, что недостающие в различных рационах для животных вещества не могут синтезироваться в организме, проявляют свое действие в крайне незначительных количествах и обладают биокаталитическими свойствами.

В настоящее время установлено, что витамины необходимы для нормальной жизнедеятельности не только животных и человека, но также для высших растений и микроорганизмов.

Установлено, что имеется тесная связь между витаминами и ферментами. Они входят в состав более 200 различных ферментов в качестве компонентов их активных групп.

Открытие витаминов и последующее изучение их свойств - одно из самых крупных достижений биохимии, так как практическое использование этого открытия дало возможность сохранить здоровье и жизнь многим миллионам людей.

Основным поставщиком витаминов для человека и животных являются растения, где они синтезируются.

Все витамины обладают значительной термостабильностью, за исключением аскорбиновой кислоты и некоторых других, которые при нагревании в присутствии кислорода разрушаются.

Ориентировочно витамины классифицируют по принципу их растворимости в жирах и воде.

В основу названий витаминов положена их химическая структура, однако для некоторых сохраняют их буквенные обозначения.

Витамины, растворимые в жирах

Ретинол (группа А), каротиноиды (провитамин А)

Кальциферол (группа Д)

Токоферол (группа Е)

Филлохинон (группа К)

Комплекс ненасыщенных жирных кислот (группа F)

Витамины, растворимые в воде.

Тиамин (В₁)

Рибофлавин (В₂)

Ниацинамид (В₃)

Пантотеновая кислота (В₅)

Пиридоксин (В₆)

Фолиевая кислота (флорацин, В₉)

Цианокобаламин (В₁₂)

Оротовая кислота (В₁₃)

Пангамовая кислота (В₁₅)

Никотиновая кислота (РР)

Аскорбиновая кислота (С)

Биофлавоноиды (цитрин, Р)

Парааминобензойная кислота

Биотин (H)

Холин

Инозит

S- метилметионин (U)

Витамин А (ретинол). Группа витаминов, являющихся производными каротина. Отсутствие в пище витаминов группы А сказывается на нарушении роста, понижении стойкости к заболеваниям и ослаблению зрения, называемого куриной слепотой. Витамины группы А встречаются исключительно в тканях животных и продуктах животного происхождения. Однако в животных организмах и в организме человека они образуются из каротиноидов, широко распространенных в растениях. Из одной молекулы β -каротина могут образовываться 2 молекулы витамина A_1 . α - и γ -каротины могут образовывать 1 молекулу витамина A_1 . Поэтому β -каротин вдвое активнее по сравнению с α - и γ -каротинами.

Наиболее богатым источником витаминов группы А является рыбий жир и особенно жиры, содержащиеся в печени некоторых рыб: трески, палтуса, акулы и морских животных: кита, моржа, тюленя.

Особо важным источником витамина А в пище человека является листовая зелень (салат, шпинат, зеленый лук), морковь, томаты, болгарский перец, а также сливочное масло и яичный желток.

Витамин А нормализует состояние эпидермальной (покровной) ткани, формирование скелета, помогает поддерживать остроту зрения и стимулирует естественную защитную реакцию организма на инфекции.

Недостаток витамина А или ретинола, в пище животных и человека приводит к нарушению многих процессов в их организмах.

Специфическим признаком А-авитаминоза является развитие ксерофтальмии - заболевания роговой оболочки глаз. При

недостатке ретинола наблюдается также повышенная утомляемость и задержка роста организма, снижается его сопротивляемость инфекционным заболеваниям.

Группа витаминов D. Содержится только в животном организме. Обеспечение организма витамином D происходит за счет эндогенного его синтеза в коже при солнечном (ультрафиолетовом) облучении и поступлении с пищей. В растениях содержатся стиролы, из которых под влиянием облучения ультрафиолетовыми лучами образуются витамины группы D.

Биологическая роль витамина D заключается в его способности нормализовать всасывание солей кальция и фосфора из кишечника и таким образом обеспечивать нормальное отложение в костях фосфорнокислого кальция, а также укреплять иммунную систему.

Недостаток витамина D в организме вызывает нарушение кальциевого и фосфорного обмена, приводящее к развитию заболевания рахитом - типичным авитаминозом, встречающимся среди детей младшего возраста.

У животных, больных рахитом, понижены окислительные процессы, наблюдаются расстройства пищеварения, снижается сопротивляемость к инфекциям.

Витамин D в значительном количестве содержится в рыбьем жире, выделяемом из печени морских рыб; сливочном масле, сыре.

Витамин E (токоферол). Объединяет группу из семи витаминов, называемых токоферолами. По своему биологическому действию их подразделяют на токоферолы общевитаминного действия (альфа-токоферол) и антиокислительного действия (гамма-токоферол и др.).

Впервые вещество, обладающее E-витаминной активностью, было экстрагировано в 1936 г. из масла пшеничных зародышей.

Важнейшим свойством токоферолов является их способность повышать накопление во внутренних органах всех жирорастворимых витаминов. Они оказывают нормализующее

действие на мышечную систему. Витамин нормализует функцию щитовидной железы, участвует в процессах превращения в организме каротина в витамин А. Антиокислитель, предохраняет от кардиопатии, помогает организму использовать кислород.

Недостаток витамина Е в кормах приводит к нарушению половой функции животных: у самцов происходит нарушение образования спермиев и перерождение семейных желез (они теряют способность к оплодотворению), а у самок наблюдается бесплодие и преждевременные роды. Кроме этого у животных наблюдается мышечная дистрофия.

Витамин Е в организме человека не синтезируется. Наиболее богаты витамином Е зародыши злаков и листья зеленых растений. Наиболее существенный источник их – растительные масла.

Витамин К (филлохинон). Объединяет группу витаминов, характеризующуюся общностью своего биологического действия. Физиологическое значение его - участие в процессах свертывания крови, стимулируя синтез протромбина. Был впервые выделен из листьев люцерны в 1939 г. Витамины группы К (К₁-К₆) широко распространены в продуктах растительного и животного происхождения.

Лучшим источником их являются зеленые части растений. Особенно богаты ими бобовые.

В растениях филлохиноны участвуют в окислительно-восстановительных процессах и, в частности, в процессе окислительного фосфорилирования, где они служат промежуточными переносчиками электронов. Биосинтез филлохинонов происходит в зеленых частях растений.

К-авитаминоз характеризуется понижением содержания в крови протромбина, одного из важных компонентов ферментной системы свертывания крови, замедлением образования кровяного сгустка и подкожными и внутримышечными кровоизлияниями.

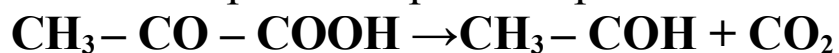
Кишечная микрофлора - постоянный поставщик витамина К для человека и животных.

Комплекс ненасыщенных жирных кислот (витамин F). Полиненасыщенные жирные кислоты, которые не могут синтезироваться в организме человека и животных и обладающие высоким биологическим действием, были отнесены к незаменимым. Комплекс этих кислот называли витамином F. К ним относятся линолевая, линоленовая и ара хидоновая кислоты. Наибольшим биологическим действием обладает арахидоновая кислота, которая содержится только в животных жирах. В организме человека она может образовываться из линолевой кислоты растительных масел.

При недостатке ненасыщенных жирных кислот наблюдается сухость кожи, появление экзем, выпадение волос, расслоение ногтей.

Водорастворимые витамины

Витамин В₁ (тиамин, аневрин). Свое название тиамин получил благодаря содержанию в нем атома серы. Аневрином витамин называют потому, что при недостатке его в пище возникает полиневрит. Тиамин играет очень важную роль в обмене веществ растений и животных. В виде фосфорного эфира - тиаминпирофосфата или тиаминдифосфата - он служит коферментом в двух важнейших типах ферментативных реакций: при неокислительном декарбоксилировании альфа-кетокилот, главным образом пировиноградной кислоты:



и при окислительном декарбоксилировании альфа-кетокилот;



Таким образом, недостаток тиамин приводит, прежде всего, к нарушению углеводного обмена. При его недостатке нарушаются нервные процессы - появляется мышечная слабость, перемежающиеся боли в области различных органов.

Тиамин образуется только в растениях и некоторых микроорганизмах. Синтез его в растениях идет лишь на свету.

Количество достигает максимума в фазе цветения. При созревании злаковых происходит отток тиамин из листьев и стеблей в семена. Таким образом, наиболее важным источником витамина в пище являются зерновые продукты, содержащие частицы отрубей и зародыша. Большое количество его содержат дрожжи и печень.

Тиамин термостабилен и выдерживает нагревание в кислой среде до 140° С.

Рибофлавин (витамин В₂). Название рибофлавин получил потому что он окрашен в желтый цвет и содержит остаток рибита. В соединении с фосфорной кислотой он входит в состав окислительно-восстановительных флавиновых ферментов. В соединении с фосфорной кислотой рибофлавин образует флавинмононуклеотид (ФМН). ФМН является активной группой флавиновых ферментов. С участием флавиновых ферментов происходит окисление аминокислот, органических кислот и других соединений. Они переносят водород от восстановленных НАДН₂ и НАДФН₂ на цитохромную систему. Недостаток витамина приводит к нарушению нормальной функции жизнеобеспечивающих систем в организме в целом. Этот витамин рассматривается как ростовой фактор, кроме того, он нормализует зрение.

Рибофлавин синтезируется только в растениях. Образование идет и на свету и в темноте с одинаковой скоростью. Содержание витамина В₂ при прорастании семян и росте растений увеличивается до фазы цветения. Содержание рибофлавина заметно падает при недостатке азота.

У человека он может синтезироваться микрофлорой кишечника. Витамин устойчив во внешней среде, хорошо переносит нагревание, но крайне неустойчив к солнечному свету, под влиянием которого переходит в неактивные формы (люмифлавин, люмихром) и теряет свои витаминные свойства. Важнейшие источники витамина В₂ - молоко, творог, сыр, яйца, печень, мясо, дрожжи, зеленый горошек, гречневая крупа.

Витамин В₃ (пантотеновая кислота) представляет собой гигроскопическую светло-желтую маслянистую жидкость. Синтезируется только в растениях. Входит в состав кофермента А, который принимает участие в большом числе биохимических реакций, необходимых для взаимопревращения углеводов и жиров. Человек и животные не способны синтезировать пантотеновую кислоту, и поэтому при недостатке ее в пище приостанавливается образование кофермента А, что приводит к серьезным нарушениям в обмене веществ, прежде всего в обмене жиров и углеводов. При этом отмечается выпадение волос и нарушение кожных покровов.

Наиболее богаты ею отруби, дрожжи, печень. У человека синтезируется микрофлорой кишечника. Витамин принимает участие в выработке антистрессовых гормонов.

Витамин В₆ (пиридоксин). В пищевых продуктах витамин встречается в трех видах: пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин. Все три вида примерно равноценны по своему биологическому действию и активности. В виде фосфорилированного производного пиридоксальфосфата витамин входит в состав активных групп ферментов, катализирующий реакции переаминирования, декарбоксилирования, десульфирования и дезаминирования аминокислот. При недостатке витамина В₆ тормозятся многие процессы обмена аминокислот и белков. Пиридоксин широко представлен в пищевых продуктах как животного, так и растительного происхождения.

Наибольшим содержанием витамина В₆ отличаются дрожжи, рисовые отруби, пшеничные зародыши, молоко, сыр.

Фолиевая кислота (флорацин, витамин В₉) впервые была выделена из листьев шпината. Синтезируется в растениях и некоторых микроорганизмах. В пищевых продуктах она находится преимущественно в связанной форме, не обладает биологической активностью и не проявляет витаминных свойств. В биологически активную форму переходит в процессе переваривания пищи под влиянием ферментов конъюгаз.

Основная функция фолиевой кислоты в организме - процесс трансформирования - перенос остатка формальдегида. В качестве донора формильной группы производное фолиевой кислоты участвует в биосинтезе нуклеотидов, в реакциях взаимных превращений аминокислот (серина и глицина). Фолиевая кислота стимулирует и регулирует кроветворение. На почве недостаточности витамина В₉ развиваются различные виды и формы анемии.

Фолиевая кислота крайне неустойчива при тепловой обработке пищи.

Особенно много ее в пивных дрожжах, печени говяжьей, в ягодах земляники, бобах, петрушке и шпинате.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) - один из немногих витаминов, который, вероятно, не образуется в растениях. Синтезируется в грибах и микроорганизмах. В его состав входят аминные группы, группа CN и атом кобальта. Это единственный витамин, содержащий металл в молекуле.

Чистый витамин В₁₂ представляет собой кристаллическое вещество рубинового цвета без вкуса и запаха, он устойчив к нагреванию и без потери активности переносит стерилизацию и последующее длительное хранение при комнатной температуре без доступа света.

При недостатке витамина В₁₂ или его отсутствии у животных развиваются различные формы анемии, ухудшается усвоение пищи, нарушается обмен белков, липидов, углеводов. Все эти нарушения исчезают при введении в организм витамина В₁₂. Совместное применение фолиевой кислоты и витамина В₁₂ обеспечивает наилучший эффект при анемии. Этот витамин принимает участие в биосинтезе биологически активных соединений, содержащих метильные группы, в восстановлении дисульфидных соединений с образованием веществ, содержащих SH-группы, в синтезе ряда аминокислот и нуклеиновых кислот.

Источник витамина - только продукты животного происхождения. Максимальное количество в печени, почках, сельди, мясе.

Витамин В₁₃ (оротовая кислота). Участвует в белковом обмене, выполняя роль стимулятора синтеза метионина и пиримидиновых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. Необходим для обмена фолиевой и пантотеновой кислот.

Витамин содержится в дрожжах, печени, в молоке и молочных продуктах.

Витамин В₁₅ (пангамовая кислота). Повышает использование кислорода в тканях и таким образом участвует в окислительных процессах, стимулируя их. Применяется при острых и хронических интоксикациях. Содержится пангамовая кислота в больших количествах в семенах растений. Особенно много в подсолнечнике, орехах, миндале. Из животных продуктов - в печени. В процессах обмена веществ пангамовая кислота участвует как донор метильной группы. Она необходима для синтеза холина, метионина, стероидов, стероидных гормонов.

Витамин РР (никотиновая кислота и никотинамид). Никотиновая кислота обладает выраженной специфичностью в лечении и предупреждении особого заболевания - пеллагры (нарушение общего состояния организма, расстройства кишечника, кожные изменения и нарушения психики). Биологической активностью обладает как никотиновая кислота, так и ее амид (ниацин, никотинамид). В растениях находится главным образом в виде кислоты, которая, превращаясь в амид, используется для синтеза важнейших окислительно-восстановительных ферментов, содержащих в активной группе НАД или НАДФ. Известно свыше 100 различных ферментов, в состав которых входит амид никотиновой кислоты. Таким образом, при недостатке никотиновой кислоты задерживается образование большой группы

ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в организмах.

Витамин РР устойчив во внешней среде, выдерживает нагревание и продолжительное хранение без разрушения и снижения своей активности, хорошо сохраняется в продуктах при их тепловой обработке в процессе приготовления пищи, а также консервировании (автоклавирование, сушка и др.).

Витаминная ценность продуктов зависит не только от содержания, но и от его формы. В горохе, фасоли и других бобовых культурах он находится в легко усвояемой форме, в зерновых (ржи, пшенице) - в прочно связанной форме и почти не усваиваем организмом.

В организме растений и животных витамин РР синтезируется из аминокислоты триптофана, достаточное количество которого возможно только при высоком уровне белка.

Витамин способствует течению энергетических реакций. Регулирует содержание сахара в крови (гликемию) и холестерина. Необходим для регулирования хода воспалительных процессов и нарушений пищеварения.

Никотиновая кислота широко представлена в пищевых продуктах растительного и животного происхождения. Особенно много ее в дрожжах.

Витамин С (аскорбиновая кислота). Важнейший водорастворимый витамин. В природных условиях встречается в трех формах; в виде аскорбиновой кислоты, дегидроаскорбиновой кислоты и аскорбигена (все три формы обладают витаминной активностью).

Основное количество (до 70%) витамина С в растениях представлено в виде аскорбигена, который является связанной формой аскорбиновой кислоты, наиболее устойчивой к окислению. Организмы человека, обезьяны и морской свинки не синтезируют витамин С.

При отщеплении от аскорбиновой кислоты двух водородных атомов она превращается в дегидроформу. Этим объясняется ее активное участие в окислительно-восстановительных реакциях.

Ферментативное окисление аскорбиновой кислоты может осуществляться прямым путем при участии специфической аскорбинатоксидазы (1.10.3.3.), а также косвенно через посредство хинонов и других окислительных продуктов. Хиноны при этом восстанавливаются, а аскорбиновая кислота, окисляясь и превращаясь в дегидроформу, служит акцептором водорода, подводимого к ней дегидрогеназами.

Как аскорбиновая, так и дегидроаскорбиновая кислоты являются весьма неустойчивыми соединениями. Превращение их в дикетогулоновую кислоту, не обладающую витаминной активностью, является необратимым процессом, который заканчивается обычно окислительным распадом.

Аскорбиновая кислота легко окисляется как в щелочной, так и в кислой среде. Продукт её окисления - дегидроаскорбиновая кислота, которая, восстанавливаясь (присоединяя два атома водорода), превращается в аскорбиновую кислоту. Благодаря этому свойству аскорбиновая кислота участвует в окислительно-восстановительных процессах в организме, играя роль переносчика водорода.

Окисление аскорбиновой кислоты может идти и неферментативным путем с участием кислорода в присутствии неорганических солей железа и меди.

Следовательно, аскорбиновая кислота играет важнейшую роль в процессе дыхания растений.

Прорастание семян сопровождается интенсивным накоплением аскорбиновой кислоты (как на свету, так и в темноте). В листьях, стеблях, плодах и корнях растений, выращенных в северных районах, витамина С значительно больше, чем в растениях, возделываемых на юге. Фосфорно-калийные удобрения повышают количество витамина в растениях, а азотные удобрения наоборот понижают.

Недостаточность витамина С развивается, как правило, на почве малого его поступления с пищей, однако она может возникнуть и эндогенно, при нарушениях всасывания витамина, обусловленных заболеванием желудочно-кишечного тракта, печени и поджелудочной железы.

Отсутствие витамина С вызывает у человека, обезьян и морских свинок тяжёлое заболевание - цингу, которая характеризуется повышенной проницаемостью стенок кровеносных сосудов, следствием чего являются кровоизлияния, кровоточивость и поражение десен, заболевание и расшатывание зубов. При цинге наблюдаются патологические явления в костной системе - ломкость костей как следствие нарушения синтеза коллагена. В синтезе коллагена (органической основы кости) принимает участие аскорбиновая кислота.

Наиболее богаты витамином С плоды шиповника, незрелые грецкие орехи, черная смородина, петрушка.

Для сохранения витамина С во время приготовления пищи не следует допускать длительной тепловой обработки продуктов, пищу надо готовить при закрытой крышке, закладывать овощи в кипящую воду или кипящий бульон.

Витамин Р (рутин). Свое название этот витамин получил потому, что впервые (1936 г.) был выделен в виде активного препарата из сока лимона. Витамин оказывает укрепляющее действие на прочность стенок кровеносных сосудов (капилляров). В биологических свойствах и действии он имеет много общего с витамином С и, кроме того, они взаимно усиливают свое физиологическое проявление в организме. При отсутствии витамина Р в пище у человека и животных повышается проницаемость капилляров, что сопровождается внезапными кровоизлияниями после сдавливания ткани, болью в конечностях, общей слабостью и быстрой утомляемостью.

Источником витамина Р для человека являются те же продукты, в которых много витамина С, например черная смородина и лимоны. Кроме того, витамин Р содержится в

значительных количествах в бруснике, чернике, клюкве, сливе, вишне, винограде и других продуктах, а также в гречихе и перце.

Парааминобензойная кислота. Этот витамин особенно необходим для роста и развития молодых животных. Эта кислота является важным фактором развития многих микроорганизмов желудочно-кишечного тракта человека и животных. Она необходима для биосинтеза фолиевой кислоты. В наибольшем количестве содержится в дрожжах и в зародышах пшеницы.

Биотин (витамин Н). Большую роль играет в реакциях карбоксилирования жирных кислот. Синтезируется витамин в растениях и некоторых микроорганизмах.

При недостатке витамина в пище замедляется рост, поражаются кожные покровы, выпадают волосы.

Холин. В жировом обмене важная роль принадлежит фосфатидам и их главному представителю - лецитину. Недостаток фосфатидов в пище и нарушение образования их в организме приводит к накоплению и отложению жира в печени и развитию ее ожирения, что чревато таким тяжелым заболеванием, как цирроз печени. В состав лецитина входит холин - самое действенное липотропное вещество, которое способно предотвращать развитие атеросклеротических изменений кровеносных сосудов.

Холин содержится в продуктах животного и растительного происхождения. Особенно много его в желтке яйца, печени, почках и в пшеничных зародышах.

Инозит. Физиологическое значение его заключается в том, что он способствует нормализации нервной системы и нервно-трофической деятельности. Инозит, соединяясь с шестью молекулами фосфорной кислоты, образует инозитфосфорную кислоту, которая в виде кальций-магниевой соли носит название фитина.

Максимальное количество витамина содержится в пшеничных отрубях, много в апельсинах, зеленом горошке, дыне, моркови, капусте, клубнике.

S-метилметионин (витамин U) представляет собой метилированное производное аминокислоты метионина. В организме человека не синтезируется. Витамин был выделен из листьев белокочанной капусты. Стимулирует обменные процессы в слизистой оболочке желудка и кишечника.

Много витамина содержится в капусте, томатах, спарже, зелени петрушки и в других листовых овощах.

Работа 1. Определение аскорбиновой кислоты

Принцип метода. Метод основан на окислительно-восстановительной реакции между аскорбиновой кислотой и окрашенным соединением 2,6-дихлорфенолиндофенолом (краской Тильманса). При этой реакции аскорбиновая кислота (восстановленная форма) переходит в дегидроаскорбиновую кислоту (окисленная форма). Водный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола окрашен в синий цвет. В кислой среде раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола имеет розовую окраску. Восстановленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола бесцветна (лейкоформа).

Задание. Определить содержание аскорбиновой кислоты в растительном материале, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Ступка с пестиком, мерная колба на 50 мл, пипетки на 10 и 5 мл, два стакана на 100 мл, воронка, фильтры, 1% HCl, 1% щавелевая кислота, краска Тильманса.

Ход работы. Навеску исследуемого материала в 1-5 г растирают в ступке с 10 мл 1%-ной соляной кислоты до образования гомогенной массы. Процесс растирания не должен продолжаться больше 10 мин. Полученную массу сливают из ступки (через стеклянную палочку и воронку) в мерную колбу на 50 мл. Ступку споласкивают несколько раз 1%-ной щавелевой кислотой, и раствор выливают в ту же колбу. Содержимое колбы доводят до метки 1%-ной щавелевой кислотой, закрывают

пробкой, сильно встряхивают и оставляют стоять 5 мин. Затем содержимое колбы отфильтровывают в сухую колбу.

Соляная кислота извлекает из растительной ткани как свободную, так и связанную аскорбиновую кислоту. Щавелевая же кислота улучшает стойкость аскорбиновой кислоты в экстрактах.

Для титрования из полученного фильтрата берут пипеткой в стаканы две параллельные порции по 10 мл и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором краски Тильманса до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5-1 мин.

Количество аскорбиновой кислоты в образце рассчитывают по формуле:

$$X = (A \times T \times B \times 100) : (P \times C),$$

где X - содержание аскорбиновой кислоты, мг на 100 г сырого вещества;

A - количество краски, пошедшее на титрование, мл;

T - титр краски, равный 0,088. 1 мл краски соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты;

B - общий объем экстракта;

P - навеска, г,

C - количество экстракта, взятое для титрования, мл.

Работа 2. Определение аскорбиновой кислоты в окрашенных вытяжках

Принцип метода. Этот метод позволяет определять аскорбиновую кислоту в таких окрашенных растворах, где прямое титрование 2,6-дихлорфенол-индофенолом невозможно. По этому методу избыток прибавленной краски обнаруживают при помощи органической смеси. Эта смесь, состоящая из равных объемов толуола и амилового спирта, растворяет 2,6-дихлор-фенолиндофенол, но не растворяет растительные пигменты и не смешивается с водой, оставаясь в верхнем слое. Смесь добавляют только после приливания нужного количества

краски. Прибавлять краску после приливания смеси нельзя, так как смесь растворит краску и выведет из сферы реакции.

Задание. Определить содержание аскорбиновой кислоты в растительном материале, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Ступка с пестиком, мерная колба на 100 мл, пипетки на 10 и 5 мл, два стакана на 100 мл, воронка, фильтры, 4% HCl, 1% щавелевая кислота, краска Тильманса, органическая смесь (толуола и амилового спирта - 1:1).

Ход работы. Измельченную навеску (5 - 10 г, в зависимости от содержания аскорбиновой кислоты) переносят в ступку, приливают 10-15 мл 4% HCl, и растирают до однородной массы: затем смывают содержимое ступки 4% HCl (общий объем 4% HCl - 50 мл) в мерную колбу на 100 мл и доливают водой до метки. Таким образом, получается вытяжка исследуемого материала в 2% HCl. Вытяжку отфильтровывают в сухую колбу.

Для титрования берут вытяжку 2 - 5 мл, в зависимости от содержания аскорбиновой кислоты в пробирку. Предварительно грубо оттитровывают отдельную пробу вытяжки с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (краска Тильманса). Для этого в вытяжку приливают 1-4 мл краски Тильманса в зависимости от содержания в ней витамина С. После прибавления краски и взбалтывания пробы через 0,5 минуты приливают 2 мл органического растворителя. Отверстие пробирки закрывают пальцем, после чего опрокидывают ее 2-3 раза. Пробирку сильно встряхивать не следует, так как при этом органический растворитель с трудом отделяется от водного слоя. Необходимо добиться того, чтобы в верхний органический слой имел слабо-розовую окраску, не исчезающего в течение 0,5-1 мин.

Избыток краски, в верхнем слой, указывает, что к следующей пробе нужно прибавить немного меньше раствора краски (например, на 0,1-0,05 мл), чем было взято в 1-м

титровании. Если верхний слой окажется неокрашенным, прибавляемый объем краски должен быть немного увеличен (на 0,05-0,03 мл). Таким образом, методом подбора постепенно находят истинное число титрования.

Количество аскорбиновой кислоты в образце рассчитывают по той же формуле.

РАЗДЕЛ 4. ФЕРМЕНТЫ

Ферментами называются коллоидные органические соединения, которые образуются в животных и растениях и являются катализаторами протекающих в них биохимических процессов.

По своей химической природе ферменты принадлежат к белковым веществам, к которым у ряда ферментов присоединены с различной степенью прочности простетические группы, обладающие большей или меньшей сложностью.

В простетическую группу некоторых ферментов, построенных по типу сложных белков, входят витамины и различные металлы.

У однокомпонентных ферментов роль активных групп выполняют определенные химические группировки, входящие в белок.

Физические и химические свойства ферментов обусловлены их белковой природой. Они термолабильны, не диализуются сквозь полупроницаемые перепонки, способны высаливаться и дают характерные для белка качественные реакции.

Ферменты являются биологическими катализаторами, отличаясь от неорганических катализаторов более высокой эффективностью и строгой специфичностью.

Правила, рекомендованные в 1961 г. Комиссией по ферментам, позволяют унифицировать величины, в которых выражается количество ферментов. Согласно этим правилам, за единицу любого фермента принимается то количество его, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата в

минуту при оптимальных условиях. Удельная или специфичная активность ферментного препарата выражается числом единиц фермента на 1 мг белка, а концентрация фермента в растворе - числом единиц фермента на 1 мл.

Активность неочищенных или малоочищенных ферментных препаратов при биохимическом изучении растений выражается до сих пор в произвольно выбранных ферментных единицах, как правило, рассчитываемых на единицу веса анализируемого вещества.

Работа 1. Определение активности аскорбиноксидазы

Аскорбиноксидаза относится к классу оксидоредуктаз (1.10.3.3), она катализирует окисление аскорбиновой кислоты (витамин С) в дегидроаскорбиновую кислоту. Ферментативное окисление аскорбиновой кислоты может осуществляться прямым путем при участии специфической аскорбиноксидазы а также косвенно - через посредство хинонов и других окисленных продуктов. Хиноны при этом восстанавливаются, а аскорбиновая кислота, окисляясь и превращаясь в дегидроаскорбиновую, служит акцептором водорода, подводимого к ней дегидрогеназами.

Фермент аскорбиноксидаза является медьсодержащим протеином. Встречается во многих растениях. Наибольшая активность фермента проявляется при рН 6,0. Этот фермент содержится в значительных количествах в тыкве, кабачках, салате, фасоли и ряде других растений.

Фермент инактивируется синильной кислотой, сероводородом и окисью углерода.

Принцип метода. Активность аскорбиноксидазы определяют йодометрическим измерением количества аскорбиновой кислоты.

Задание. Определить активность аскорбиноксидазы и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Термостат, фарфоровая ступка с пестиком, мерные колбы на 25 и 50 мл. конические

колбы на 100 мл, 0,01 н. KJ_2O_8 , KJ 10%-ный, 0,001 н. $Na_2S_2O_3$, 1%-ый раствор крахмала, фосфатный буфер 0,15 М с рН 7,0, аскорбиновая кислота (раствор с содержанием 1 мг в 1 мл).

Ход работы. 20 г мякоти тыквы растирают в ступке с 10-15 мл 0,15 М фосфатного буфера с рН около 7 и растертую массу переносят в мерную колбу объемом 50 мл с доведением объема взвеси до метки фосфатным буфером. Через 1 час настаивания содержимое колбы фильтруют и фильтрат используют в качестве препарата фермента.

Две порции препарата по 10 мл помещают в колбочки на 50 мл и одну из них нагревают до кипения и кипятят 1–2 минуты для инактивации фермента, а затем охлаждают. Колбы ставят в термостат при температуре 37° и после добавления 10 мл раствора аскорбиновой кислоты инкубируют смесь в течение 30 минут. Затем содержимое обеих колб нагревают до кипячения и после охлаждения доводят водой до метки.

По 10 мл прозрачной жидкости переносят в конические колбы емкостью 100 мл и добавляют по 5 мл 10%-ного раствора KJ , 10 мл 5% HCl , 10 капель 1%-ного раствора крахмала и 10 мл 0,01 н. KJ_2O_8 в каждую из колб.

Через пять минут после прибавления последнего реактива растворы титруют 0,001 н. $Na_2S_2O_3$ до исчезновения синей окраски.

Вычисление результатов. Результаты определения проводят по следующей формуле:

$$X = (A - B) \times T \times 0,088 : H,$$

где X - активность аскорбатоксидазы, выраженная в миллиграммах окисленной аскорбиновой кислоты под действием фермента из 1 г растительной ткани за период инкубации;

A - миллилитров 0,001 н. раствора гипосульфита, израсходованного на оттитровывание избытка йода в опытном определении;

- Б - миллилитров 0,001 н. раствора гипосульфита, израсходованного на титрование контрольной пробы;
- Т - поправка к титру 0,001 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;
- 0,088 - количество миллиграммов аскорбиновой кислоты, соответствующее каждому миллилитру 0,001 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;
- Н - навеска вещества, соответствующая объему препарата, взятого для титрования (в г).

Работа 2. Определение активности нитратредуктазы

Нитратредуктаза - фермент, катализирующий первый этап восстановления нитратов до аммиака в растениях (восстановление нитратов до нитритов), относится классу оксидоредуктаз. Нитратредуктаза - металлофлавопротеид, коферментом которого, является молибден.

Колориметрический метод определения активности фермента основан на учете количества нитрита, образовавшегося за определенный период времени

Принцип метода. Ткани растений инфильтруются в вакууме раствором, содержащим избыток нитрат-ионов, затем эти ткани инкубируются при оптимальных для работы нитратредуктазы условиях, через определённый промежуток времени фермент инактивируется, а по количеству образованных нитрат-ионов судят об его активности. Определение активности нитратредуктазы основано на учете количества образовавшихся нитритов при действии препарата фермента на нитраты.

Задание. Определить активность нитратредуктазы, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Фосфатный буфер - 0,06 М рН - 7,0, 1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; 2) KH_2PO_4 ; 3) Тритон 1%: на 100 мл H_2O 1) - 1,1876 г., 2) - 0,9078 г., 3) - 0,2 мл.; яблочная кислота - 0,1 М, для её нейтрализации необходимо на 100 мл кислоты прилить 5 мл 20 % КОН,

KNO_3 - 0,2 М, реактив Грисса: контрольный раствор - 2 мл воды с добавлением 3 мл реактива Грисса.

Ход работы: Проба растительного материала (в частности листьев) формируется из навески измельчённых листьев весом в 250 мг (размер кусочков 2 мм) и помещается во флаконы ёмкостью 10 мл.

Флаконы ставятся в кювету со льдом, чтобы приостановить работу фермента, после чего их заливают инкубационной смесью, содержащей 2,5 мл 0,06 М фосфатного буфера (рН = 7,0), 0,5 мл свежеприготовленного 0,1 М раствора яблочной кислоты, предварительно нейтрализованной КОН, 1 мл 0,2 М KNO_3 и 1 мл дистиллированной воды. Для смачивания добавляется детергент Тритон - X 100 до конечной концентрации 0,01 %. (Тритон добавляется в буфер из расчёта 0,1 мл на 1000 мл полной смеси).

Флаконы помещают в эксикатор с краном и проводят вакуумфильтрацию, для чего сначала откачивают воздух, а затем медленно его впускают, ткани инфильтрируются раствором. Опять из эксикатора откачивают воздух и оставляют его на 30 мин. Вакуум создаётся для оптимизации условий работы фермента. Вакуумфильтрация проводится в вакуумном термостате с температурой 37⁰С при 1 атм. Затем вакуум сбрасывается.

После окончания инкубации реакцию прекращают с помощью высокой температуры (кипячением на водяной бане в течение 5 мин) или добавлением 1 мл ледяной уксусной кислоты, затем осаждаются белки добавлением насыщенного 30% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ по 1 мл.

После этого содержимое флаконов фильтруют, а фильтрат используют для определения нитритов. Для этого к 2 мл фильтрата добавляют 3 мл реактива Грисса и измеряют оптическую плотность окрашенного раствора на ФЭК. Колориметрируют через 15 мин при длине волны $\lambda = 540$ нм при синем светофильтре.

Активность фермента выражается в микрограмм нитрита образовавшегося за 1 час на 1 г растительной ткани.

Расчет проводят по формуле:

$$X = (A \times B) : (B \times T),$$

где X - активность фермента в мкг нитритита в час на грамм растительной ткани;

A - количество (мкг) нитрита в 1 мл колориметрированного раствора, определенное по калибровочной кривой;

B - объем фильтрата, мл;

M - масса растительной ткани г;

T - время экспозиции, час.

Таблица 1. Приготовление калибровочной кривой, содержащего 1 мл 0,001 мг азота или 0,0033 мг NO₂

Концентрация нитрита мкг/мл	Для приготовления 5 мл раствора требуется	
	0,1 М NaNO ₂ мл	H ₂ O, мл
0,33	0,5	1,5
0,66	1,0	4,0
0,99	1,5	3,5
1,32	2,0	3,0
1,65	2,5	2,5

Работа 3. Определение активности уреазы

Избыточный аммиак у большинства растений обезвреживается при образовании амидов - аспарагина и глутамина. Кроме того, аммиак в растениях обезвреживается и при образовании мочевины, которая играет такую же роль запасного азота как аспарагин и глутамин. Она не ядовита для растений, хорошо усваивается растениями с помощью фермента уреазы или карбамидамидогидролаза (3.5.1.5), расщепляющего мочевины до аммиака и углекислого газа по схеме:



Уреаза - фермент, довольно широко распространенный в растениях.

Принцип метода. Определение активности уреазы основано на учете количества аммиака, образовавшегося в единицу времени под действием препарата фермента, выделенного из растения на мочевину.

Задание. Определение активности уреазы, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Колбы конические емкостью 50 мл., воронки, пипетки градуированные, 0,1 н. HCl, 2%-ный раствор мочевины в фосфатном буфере (pH 7,0), HgCl₂ 1%-ный раствор, метиловый красный 0,05%-ный раствор.

Ход работы. Для приготовления препарата уреазы к 8 г соевой муки (или муки фасоли, бобов, люпина и т. д.) прибавляют 46 мл воды и 2 мл 0,1 н. HCl. Смесь тщательно перемешивают, добавляют несколько капель толуола и оставляют на 1,5-2 часа. За этот срок большая часть уреазы переходит из муки в раствор. Суспензию фильтруют через складчатый фильтр, муку промывают на фильтре небольшими порциями воды подкисленной HCl (несколько капель 10%-ной HCl на 400-500 мл воды). Фильтрат доводят до объема 100 мл и используют для определения активности фермента.

В коническую колбу на 50 мл вносят 10 мл препарата уреазы и 5 мл 2%-ного раствора мочевины в фосфатном буфере с pH 7,0. Раствор в колбе перемешивают и после добавления капли толуола колбу ставят в термостат при температуре 37° С на 30-60 минут (в зависимости от предполагаемой активности фермента).

После соответствующей экспозиции в колбу прибавляют 10 капель 0,05%-ного раствора метиленового красного, приливают из бюретки 0,1 н. раствора H₂SO₄ до появления явно кислой реакции, смесь кипятят для удаления CO₂ и избыток H₂SO₄ оттитровывают 0,1 н. NaOH.

Единица уреазы - количество фермента, которое способно образовать из мочевины за 5 минут при температуре 37°C и pH 7,0 1 мг азота аммиака.

Контрольное определение проводят подобным же образом с инактивированным ферментом.

Принимая, что количество расщепленной мочевины пропорционально времени действия фермента, количество единиц уреазы можно рассчитать по формуле:

$$C = \frac{(a - b) \times 5 \times 1.4}{t},$$

где С - количество единиц уреазы;

а - количество миллилитров 0,1 н. раствора H_2SO_4 , израсходованное на связывание аммиака в опытном образце;

в - количество миллилитров 0,1 н. раствора H_2SO_4 , израсходованное на связывание аммиака в контроле;

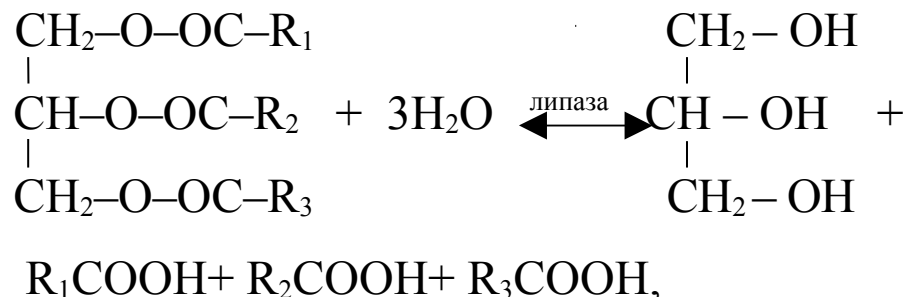
1,4 - количество миллиграммов азота, соответствующее 1 мл 0,1 н. H_2SO_4 ;

t - время, на протяжении которого действовал фермент.

При определении количества единиц уреазы в 1 г исходного материала полученный результат умножают на 1,25.

Работа 4. Определение гидролитической активности липазы

Липазы, относящиеся к группе эстераз, являются ферментами, катализирующими расщепление и синтез жиров в соответствии с уравнением.



где R_1 , R_2 и R_3 - радикалы высокомолекулярных жирных кислот: пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и др.

В результате действия липаз жир расщепляется на глицерин и свободные жирные кислоты.

Липазы распространены во многих растительных объектах, они присутствуют почти во всех органах и тканях растений, но больше всего их в семенах, особенно в семенах масличных растений. Активность липаз из разных растений различна, они отличаются также по оптимуму pH, температурному оптимуму и ряду других свойств. При прорастании семян липазы расщепляют содержащийся в них жир и продукты распада подвергаются затем дальнейшим превращениям.

Активность липаз имеет большое значение при хранении муки и круп, особенно содержащих много жира. При увеличении влажности этих продуктов и повышенной температуре хранения липазы быстро расщепляют жиры с образованием свободных жирных кислот, что приводит к повышению кислотности продуктов и их быстрой порче, прогорканию.

Принцип метода. В качестве источника фермента используется семя масличных растений. Так как под действием липаз из жира освобождаются жирные кислоты, активность липаз определяют по увеличению кислотности в реакционной смеси при прямом титровании щелочью

$RCOOH + NaOH \rightarrow RCOONa + H_2O$, и показателем активности служит количество щелочи, требующееся для нейтрализации образовавшихся жирных кислот.

Задание. Определить активность липазы зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Растительный материал (семена масличных культур), ступки, колбы конические емкостью 100 мл с притертыми пробками, этиловый спирт, пипетка градуированная, 0,1 н. уксусная кислота, 0,1н.

спиртовой раствор NaOH, фенолфталеин, дистиллированная вода, воронка, фильтровальная бумага, термостат.

Ход работы. Навеску исследуемого материала из 4 г семян, очищают от кожуры, тщательно растирают в ступке и переносят в коническую колбу емкостью 100 мл с притертой пробкой. Ступку смывают 2-3 раза небольшим количеством (по 2–3 мл) воды, общий объем воды должен составить 18 мл. В связи с тем, что оптимум рН большинства растительных липаз равен 4,5–5,0, в колбы добавляют еще 2 мл 0,1н уксусной кислоты и устанавливают в термостат на 2 ч при температуре + 50 °С.

За этот срок значительная часть растительного масла расщепляется липазами, имеющимися в семенах.

Одновременно с используемыми пробами ставят контрольные. Для контрольных проб берут также навеску из растертого материала и поступают с ними таким же образом, но перед тем, как ставить в термостат, их предварительно кипятят в течение 3-5 минут для инактивации ферментов.

После экспозиции массу фильтруют и 10 мл фильтрата титруют 0,1н. спиртовым раствором NaOH, в присутствии 3-4 капель фенолфталеина до появления слабо-розовой окраски.

Активность фермента определяется по формуле:

$$A = \frac{(X - Y) \times Q \times C \times 60}{PRT},$$

где А - активность липазы, выражающийся в миллиграммах жирных кислот, образовавшихся в результате деятельности фермента за 1 ч в 1 г исследуемого материала;

С - разведение навески (в данном случае - 20);

Х - количество 0,1 н. NaOH, пошедшее на титрование опытного образца, мл;

У - количество 0,1 н. NaOH, пошедшее на титрование контрольного образца, мл;

Q - коэффициент соотношения 1 мл NaOH к жирным кислотам, равный 3,2 мг;

60 - коэффициент пересчета в часы;

P - навеска исследуемого материала, взятого для опыта, г;

T - время экспозиции, в мин.;

R - количество фильтрата взятое для титрования, мл.

Терминальные оксидазы растений

Ферментная система, заканчивающая процесс окисления водорода, отнятого от того или иного субстрата, получила название "конечной" или "терминальной". К этим ферментам относятся пероксидаза, каталаза и полифенолоксидаза.

У разных растительных организмов природа "конечной" оксидазной системы различны. Так, например, если в клубнях картофеля роль "конечной" оксидазы играет главным образом полифенолоксидаза, то в прорастающих семенах ячменя и пшеницы эта роль принадлежит цитохромной системе. У белокочанной капусты ведущая роль в качестве "конечной" оксидазы играет аскорбиноксидаза.

Работа 5. Определение активности пероксидазы

В результате действия некоторых оксидаз образуется перекись водорода, которая может играть роль окислителя. Под действием пероксидазы происходит окисление различных фенолов и ароматических аминов. Окисление субстратов пероксидаза осуществляет с помощью перекиси водорода или каких-либо других органических перекисей. С перекисью водорода фермент образует промежуточное комплексное соединение, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода. Реакция окисления идет по схеме:



где AH_2 - донор водорода,

A - окисленный донор

Пероксидаза окисляет полифенолы, гликозиды, дубильные вещества, ароматические амины и другие вещества. Ряд органических соединений, имеющих неопределенные связи между

двумя атомами углерода, реагируя с кислородом воздуха, образуют перекиси (терпены, каротиноиды, ненасыщенные жирные кислоты). Поскольку пероксидаза особенно легко окисляет полифенолы, она играет важную роль в дыхании растений, так как наряду с полифенолоксидазой может катализировать окисление дыхательных хромогенов.

Пероксидаза часто входит в состав сложных ферментных комплексов. Так, например, ферментная система, окисляющая индолилуксусную кислоту (ИУК), содержит флавиновый протеид, участвующий в образовании перекиси водорода, и фермент пероксидазу, который с помощью H_2O_2 окисляет ИУК в физиологически неактивный 3-метиленоксиндол.

Пероксидаза представляет собой двухкомпонентный фермент, активная группа которого содержит трехвалентное железо, соединенное с остатками четырех пирольных колец в виде гематина.

Этот фермент очень широко распространен в тканях растительного и животного происхождения. Наибольшее количество пероксидазы содержится в корнях хрена, редьки и ряда других корнеплодов.

Принцип метода. Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина под действием фермента, содержащегося в растениях, до образования продукта синего цвета р-хиноидинамида, определенной концентрации, заранее устанавливаемой на фотоэлектроколориметре (А.Н. Бояркин, 1951).

Задание. Определить активность пероксидазы, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Колориметр, колбы на 50 мл., пипетки, песочные часы на 3 мин., фарфоровая ступка, центрифуга, 3%-ная H_2O_2 , раствор бензидина в 1%-ной ледяной уксусной кислоте, ацетатный буфер рН 4,7

Ход работы. Навеску растительного материала (50-200 мг) растирают в ступке с ацетатным буфером рН 4,7 и переносят в мерную колбу на 50 мл. После 10 мин настаивания с периодическим перемешиванием, пероксидаза переходит в

раствор, а вытяжку центрифугируют при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для определения активности фермента.

В две кюветы фотоэлектроколориметра шириной 2 см наливают по 2 мл фермента и 2 мл воды. Измерения производят на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре. В контрольную кювету приливают два мл воды, устанавливают стрелку гальванометра на нуле и в опытную пробирку быстро приливают 2 мл 3%-ной перекиси водорода и сразу же после начала вливания перекиси водорода включают секундомер. Под действием пероксидазы происходит реакция окисления, бензидина с образованием соединения синего цвета, и стрелка гальванометра начинает отклоняться влево. Секундомер останавливается, когда стрелка достигает экстинции $E = 0,125$ или $E = 250$. Желательно для определения активности фермента брать такую навеску растительного материала, чтобы стрелка достигала выбранного значения через 20-50 секунд.

Активность фермента вычисляют по скорости реакции в условных единицах и выражают на 1 г растительного материала. Вычисление ведут по формуле:

$$A = (E \times A \times B) : (H \times C \times T),$$

где А - активность фермента на 1 г навески;

Е - экстинция (0,125 или 0,250);

А - объем вытяжки (50 мл) ;

Б - степени разведения вытяжки в кювете (4);

Н - навеска растительного материала, г;

С- толщина слоя жидкости в кювете (2 см);

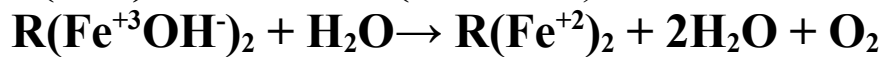
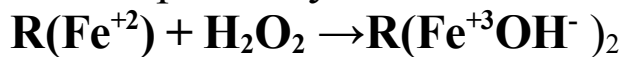
Т - время, с.

Работа 6. Определение активности каталазы

Каталаза - оксидоредуктаза, действующая на H_2O_2 в качестве акцептора. Она является сложным ферментом, состоящим из белкового комплекса и простетической группы, каталаза так же, как и пероксидаза принадлежит к гемопроteidным

ферментам, в состав которых входит железо. Примечательно, что по строению эти ферменты близки к хлорофиллу. Роль каталазы в организме заключается в том, что она разрушает ядовитую для клеток перекись водорода, образующуюся в процессе дыхания. Каталаза содержится в животных и растительных организмах. Она катализирует расщепление перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. При этом атом железа простатической группы подвергается попеременному окислению и восстановлению. У каталазы обнаружено 5 изоферментов.

Перекись водорода способна в одинаковой степени легко отдавать и принимать электроны, т.е. служить то окислителем, то восстановителем (разница в окислительно-восстановительном потенциале всего 0,30 в). Поэтому взаимодействие каталазы с перекисью водорода идет в две стадии. В первой стадии реакций перекись водорода служит окислителем:



Суммируя эти две реакции, получаем:



Так как каталаза принимает непосредственное участие в реакции, то по количеству разложившейся перекиси водорода в единицу времени можно судить о количестве фермента, Оптимальная кислотность действия каталазы находится при рН около 7,0

Принцип метода. Метод определения активности каталазы основан на учете по количеству выделяемого кислорода в единицу времени.

Перед работой ознакомьтесь с устройством газометрического прибора для определения активности каталазы (рис.1) и убедитесь в герметичности всех соединений. Основные части прибора составляют приемная камера, бюретка (на 25 или 50 мл), емкость для запаса воды (ею может служить воронка). Все они соединены между собой резиновыми шлангами так, что бюретка и емкость для воды представляют

замкнутую систему сообщающихся сосудов. Поэтому, перемещая их относительно друг друга в вертикальном направлении, можно изменить уровень воды в бюретке при установке нуля.

Приемная камера может быть двух типов: в виде U - образной емкости с отверстием в верхней точке изгиба или в виде широкогорлой склянки на 100 -150 мл.

Емкости закрываются пробками с вмонтированными в них стеклянными трубками, которые с помощью резинового шланга через тройник соединены с бюреткой.

Бюретка и емкость для воды крепятся на штативе в вертикальном положении. На резиновом шланге, соединяющем приемную камеру с бюреткой, и на свободном резиновом конце, отходящем от тройника, устанавливают клапаны- зажимы.

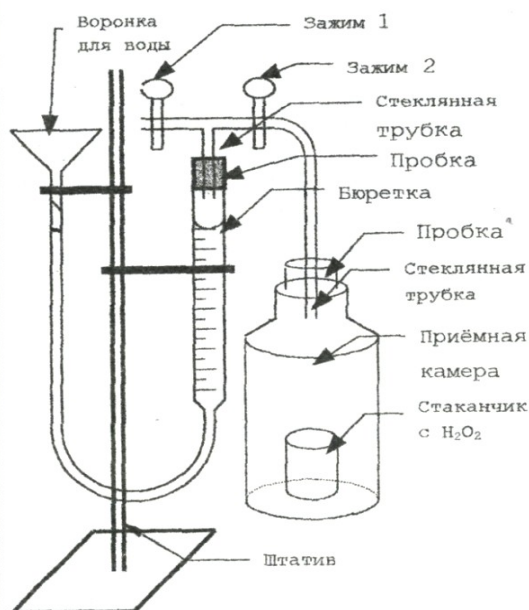


Рис. Устройство газометрического прибора

Задание. Определить активность каталазы по количеству выделяемого кислорода в единицу времени. На основании полученных данных зарисовать таблицу и сделать сравнительный вывод.

Оборудование и реактивы. Растительный материал, ступка с пестиком, пипетка на 10 мл, часы, песок, мел, 10% раствор H_2O_2 , газометрический прибор для определения активности каталазы.

Ход работы. Навеску растительного материала в 5 г тщательно растереть в ступке с небольшим количеством мела (в сырой материал добавляют еще и песок). Растительный материал переносят в приемную камеру газометрического прибора. Ступку ополаскивают 20 мл H_2O , которую также выливают в прибор. На дно приемной камеры устанавливают небольшой стаканчик с 5 мл H_2O_2 . Прибор собирают и устанавливают в нулевое положение. Для этого открывают оба зажима тройника и, перемещая воронку вверх или вниз, устанавливают уровень воды в бюретке на уровне верхнего деления. Затем плотно закрывают приёмную камеру и перекрывают сообщение бюретки с атмосферой зажимом 1.

Подготовив прибор, включают часы, одновременно вводя в исследуемый материал H_2O_2 , перевернув приёмную камеру на 90° , чтобы из установленного внутри стаканчика H_2O_2 полностью вылилась на дно приёмной камеры. Вернув приёмную камеру в исходное положение, необходимо слегка встряхнуть её для равномерного перемешивания мезги и H_2O_2 .

С момента начала опыта ведут наблюдения за выделением O_2 , отмечая его объем по уровню опустившегося мениска в бюретке.

По условиям данного опыта наблюдение продолжают в течение 3 мин, а отсчет производится через каждую минуту. Если выделение кислорода прекращается раньше, то опыт прерывают на соответствующей минуте наблюдения.

По ходу эксперимента может оказаться, что O_2 выделится больше, чем вмещает объем бюретки. В этом случае перекрывают зажимом 2 выделение кислорода из приёмной камеры в бюретку, записывают показания прибора и открывают зажим 1. Кислород выходит из бюретки, а уровень воды

восстанавливается в нулевом положении. После этого закрывают зажим 1, затем открывают зажим 2 и продолжают опыт. Результаты измерений после выпускания O_2 из бюретки суммируются с количеством кислорода в бюретке перед её открытием.

Все результаты наблюдений заносят в таблицу и делают вывод об активности каталазы в растениях разных вариантов.

Таблица 2. Активность каталазы в мл O_2 за 1 мин. на 1 г.

Наименование культуры и варианта опыта	Объем O_2 , мл, выделившийся за 1 мин. Периоды наблюдений, мин.			Общий объем O_2 , выделенный за время опыта, мл	Активность каталазы, мл O_2 за 1 мин. на 1 г
	1	2	3		
1					
2					

Работа 7. Определение активности полифенолоксидазы.

Среди оксидаз большое значение имеет полифенолоксидаза. Она содержится в грибах и высших растениях. Этот фермент представляет собой содержащий медь белок. Фенольные

соединения, окисляясь кислородом воздуха при участии фермента полифенолоксидазы, превращаются в соответствующие хиноны. Последние восстанавливаются за счет атомов водорода дыхательного субстрата, и вновь становятся доступными для действия полифенолоксидазы. Таким образом, система полифенол и полифенолоксидаза служит переносчиком атомов водорода на конечных этапах дыхания. Кроме окисления дифенолов полифенолоксидаза окисляет также трифенолы, например, пирогаллол. Именно действием полифенолоксидазы объясняется потемнение поверхности разрезанного яблока или картофельного клубня. Ее действием объясняется также потемнение плодов и овощей при сушке. Полифенолоксидаза инактивируется синильной кислотой и сероводородом. У полифенолоксидазы обнаружено 6 изоферментов. Много полифенолоксидазы в картофеле, сахарной свекле, яблоках и других растениях.

Принцип метода. Исследуемое вещество в виде водной суспензии при рН около 6 в присутствии аскорбиновой кислоты и пирокатехина встряхивают в течение 2 мин. При этом идет окисление аскорбиновой кислоты. Точно через 2 мин. реакция прекращается добавлением метафосфорной кислоты, и остаток аскорбиновой кислоты определяют титрованием йодатом калия. Из полученных данных находят количество окисленной аскорбиновой кислоты и вычисляют активность фермента (мкмоль окисленной за 1 мин. аскорбиновой кислоты на 1 г исследуемого вещества).

Оборудование и реактивы. Фарфоровая ступка с пестиком, мерная колба на 50 мл, колба на 250 мл, пипетка на 10 мл, фосфатный буфер с рН 6,4, 0,04 н. раствор аскорбиновой кислоты, 0,2 %-ный раствор пирокатехина, 5 %-ный раствор мета-или ортофосфорная кислота, 0,01 н. раствор йодата калия, 0,5 %-ный раствор крахмала.

Ход работы. Отвешивают 1 г свежего растительного материала, растирают в фарфоровой ступке с дистиллированной водой, переносят в мерную колбу или цилиндр на 50 мл и

перемешивают. Полученный раствор взбалтывают и, не давая осадку осесть, набирают 10 мл суспензии, которую выливают в колбу для титрования на 250 мл. Прибавляют 1 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,4, приливают 5 мл 0,04 н. раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и прибавляют 5 мл 0,2 %-ного раствора пирокатехина, одновременно включая секундомер и встряхивая раствор. Для лучшего поступления кислорода воздуха раствор встряхивают равномерно в течение 2 мин. Точно через 2 мин. реакцию прекращают добавлением 5 мл 5%-ного раствора мета-или ортофосфорной кислоты. Необходимое количество кислоты отмеривают в чистый стаканчик еще до начала опыта. Остаток аскорбиновой кислоты определяют титрованием 0,01 н. раствором: йодата калия в присутствии 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала до появления не исчезающей синей окраски. Одновременно проводят контрольное титрование. Для этого набирают 10 мл суспензии в колбу для титрования, прибавляют 5 мл метафосфорной кислоты, 5 мл 0,04 н. раствора аскорбиновой кислоты и титруют 0,01 н. раствором KIO_3 в присутствии крахмала. На основании полученных данных вычисляют активность полифенолоксидазы по следующей формуле;

$$A = 50 \times 5 (a - б) : 10 \times H \times 2 = 12,5 (a - б) : H,$$

где А - активность полифенолоксидазы (в мкмоль окисленной за 1 мин. аскорбиновой кислоты на 1 г исследуемого вещества);

50 - общий объем суспензии исследуемой ткани, мл;

Н - навеска исследуемого вещества, г;

10 - объем суспензии, взятый в колбу для определения активности фермента мл;

2 - время проведения реакции, мин;

а - объем 0,01 н. раствора KIO_3 , затраченный на титрование контрольной пробы, мл;

б - объем 0,01 н. раствора KIO_3 , затраченный на титрование исследуемой пробы, мл;

5 - коэффициент для пересчета миллилитров 0,01 н. раствора аскорбиновой кислоты в микромоли.

РАЗДЕЛ 5. АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА РАСТЕНИЙ И ИХ ПРЕВРАЩЕНИЯ

Так как внутренняя организация клетки является сложным образованием, то и химический состав ее разнообразен, как с точки зрения элементов, так и соединений, из которых: они построены. В состав цитоплазмы и органоидов входят различные соединения, составной частью которых является азот (небелковые и белковые формы азота).

Небелковые формы азота включают: нитратный азот, аммонийный азот, амидный азот, аминный азот, азот оснований.

Белковый азот - это азот, входящий в простые белки (протеины): альбумины, глобулины, проламины, глютелины и сложные белки (протеиды): липопротеиды, гликопротеиды, хромопротеиды и нуклеопротеиды.

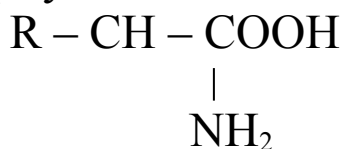
Белок является важнейшей составной частью пищи человека и животных, жизненно важными структурными компонентами протоплазмы и ферментов. В состав цитоплазмы и органоидов входят различные белки и белковые образования, которые составляют основную массу протоплазмы. В живых организмах они содержатся в различных количествах. В растениях их меньше, чем в организме животных. В вегетативных органах растений количество белков составляет от 5 до 15% на вес сухого вещества. В семенах злаков их количество составляет 10-20%, а в семенах бобовых и масличных культур до 20-35%.

Белковые вещества являются высокополимерными образованиями, выполняющими самые разнообразные функции. В своем составе содержат: углерод - до 53%, азот - до 18%, водород - до 7%, кислород - до 23%, сера - до 1,3%.

Белковые молекулы построены из аминокислот. Хотя в растениях обнаружено более 100 аминокислот, лишь 20 из них используются для построения белковых молекул. Это так называемые протеиногенные аминокислоты.

Аминокислоты - производные кислот жирного или ароматического ряда, содержащие одновременно аминогруппу и карбоксильную группу.

Строение аминокислот изображается следующей общей формулой:



Природные аминокислоты в основном являются α -аминокислотами. Аминокислоты могут содержать две или более аминогруппы, а также две карбоксильные группы (дикарбоновые аминокислоты). Радикал R может представлять собой остатки жирных кислот, ароматические кольца, различные гетероциклы и т.д. Таким образом, аминокислоты различаются по остатку R.

В зависимости от наличия циклов в молекулах аминокислот все они делятся на ациклические, или алифатические, и циклические. В зависимости от числа аминных и карбоксильных групп в молекуле ациклические аминокислоты делятся на три группы: моноаминокарбоновые кислоты, моноаминодикарбоновые кислоты и диаминомоно-карбоновые кислоты.

Все аминокислоты в чистом виде - бесцветные кристаллические вещества, большинство из которых растворимо в воде. Водные растворы аминокислот стабильны, и их можно автоклавировать при температуре 100-120°C.

Необходимым веществом для синтеза аминокислот является аммиак. В растительных тканях нитраты, являющиеся основным источником азота в большинстве случаев, восстанавливаются до аммиака по схеме:



Этот процесс идет ступенчато и катализируется несколькими ферментами. На первой стадии нитраты, под действием **нитратредуктазы** восстанавливаются до нитритов. Донором протонов и электронов является НАД-Н (или НАДФ-Н). В

реакции в качестве промежуточного переносчика водорода принимает участие флавиновый фермент, для проявления активности которого необходим молибден.

Следующим этапом является восстановление нитрита до гипонитрита. Эта реакция катализируется **нитритредуктазой**. Для активности фермента необходимы медь, железо и магний. Далее под действием **гипонитритредуктазы** гипонитрит превращается в гидроксилламин. Для активации реакции необходимы медь, железо и марганец. На последнем этапе под действием **гидроксилламинредуктазы** из гидроксилламина образуется аммиак. Для реакции необходимы магний и марганец.

Общая схема восстановления нитратов представляется в следующем виде:



Необходимые четыре пары электронов доставляются восстановленными НАД или НАДФ с участием флавиновых ферментов, для активирования которых необходимы металлы.

Интенсивность восстановления нитратов тесно связана с двумя основными процессами, в результате которых выделяется энергия, - дыханием и фотосинтезом.

Образуемый после восстановления нитратов аммиак используется для синтеза аминокислот. Чаще всего он реагирует с кетокислотами. Реакция прямого аминирования кетокислот - главный путь их синтеза в растениях. Основными источниками кетокислот являются цикл ди- и трикарбоновых кислот и реакции анаэробного распада углеводов. Из пировиноградной кислоты образуется аланин, из щавелевоуксусной кислоты - аспарагиновая кислота, из α -кетоглутаровой - глутаминовая кислота, являющаяся основным источником аминокислоты в реакциях переаминирования.

Карбоксильная группа молекулы одной аминокислоты может реагировать с аминокислотой другой с выделением молекулы воды, причем возникает амидная связь, называемая пептидной.

Образование пептидной связи между аминокислотами происходит с затратой энергии и осуществляется в клетке весьма сложным путем. В образовании пептидных связей белковой молекулы принимают участие только α - карбоксильные и α -аминные группы.

Аминокислоты, образовавшиеся в растениях при восстановительном аминировании, переаминировании или другим путем, подвергаются непрерывному обмену. В основном они используются для синтеза белков, а также азотистых оснований и других соединений, подвергаются декарбоксилированию и дезаминированию, полностью окисляются, служа источником энергии для организма.

Работа 1. Определение аминного азота нингидриновым методом

При достаточно детальном анализе форм азотистых соединений в растениях часто бывает необходимо определение не только суммарного количества небелковых азотистых соединений в растениях, но и азота аминных групп. Особенно большое значение имеет определение аминного азота при изучении активности протеолитических ферментов, а также при изучении степени гидролитического расщепления белков под влиянием кислот и щелочей.

Нингидрин - (трикетогаринденгидрат) с аминокислотами образует окрашенный в синий цвет раствор. Как сильноокислая, так и щелочная среда препятствуют реакции. Оптимальная кислотность раствора при рН 4,5. Кроме α - аминокислот с нингидрином дают окрашивание белки, пептоны и полипептиды.

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенного раствора, нингидрина с аминокислотами.

Задание. Определить содержание аминного азота, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. Фотоэлектроколориметр, фарфоровая ступка с пестиком, водяная баня, 10%-ный раствор

уксусной кислоты, колбы плоскодонные, воронка, фильтр, пипетки на 2 и 10 мл, пробирки, нингидриновый реактив, 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты, 60% спирт.

Ход работы. Взвешивают 0,5 г свежего растительного материала, растирают в ступке с 5 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты и разбавляют водой до 100 мл. Смесь тщательно взбалтывают и фильтруют в сухую колбу через сухой фильтр, отбрасывая первую порцию фильтрата. Из остального фильтрата набирают пипеткой 2 мл, переносят в сухую пробирку и прибавляют 3 мл нингидринового реактива, 0,1 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают, закрывают воронкой, ставят в кипящую воду и нагревают 15 мин. Одновременно нагревают и пробирку с контрольным раствором, состоящим из 2 мл дистиллированной воды, 3 мл реактива и 0,1 мл раствора аскорбиновой кислоты. После нагревания пробирки вынимают из воды и дают охладиться на воздухе в течение 15 мин. при периодическом взбалтывании. После охлаждения объем окрашенного раствора доводят 60%-ным спиртом до 5 мл и перемешивают.

Оптическую плотность окрашенного раствора измеряют в фотоэлектроколориметре при 580 нм в кювете на 5 мм, сравнивая с контрольным раствором. Из полученных измерений по калибровочной кривой находят концентрацию аминного азота в калориметрируемом растворе и вычисляют содержание его в исследуемом веществе по следующей формуле:

$$X = (0,1 \times 100 \times 5 \times C) : 2N,$$

где X - количество аминного азота, мг на 100 г исследуемого вещества;

C - концентрация аминного азота в колориметрируемом растворе, мкг/мл;

5 - объем калориметрируемого раствора, мл;

N - навеска исследуемого вещества, г;

100 - общий объем исследуемого раствора, мл;

2 - объем исследуемого раствора, взятый для реакции с нингидриновым реактивом, мл;

0,1 - коэффициент для пересчета микрограммы в миллиграммы на 100 г вещества.

Построение калибровочной кривой

В сухие пробирки набирают следующие количества стандартного раствора аминокислоты лейцина или аланина: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; 1,8; 2,0 мл раствора, содержащего 5 мкг азота в 1 мл, и доводят безаммиачной водой каждой пробирку до 2 мл. В одну из пробирок (контрольную) набирают только 2 мл воды. Затем во все пробирки прибавляют по 3 мл нингидринового реактива, по 0,1 мл 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, растворы перемешивают, пробирки закрывают воронками и опускают в водяную баню с кипящей водой на 15 мин. После этого пробирки охлаждают в течение 15 мин. при периодическом взбалтывании, доводят объем раствора до 5 мл прибавлением 60%-ного этилового спирта и измеряют оптическую плотность при 580 нм в кюветах на 5 мм или на 10 мм. Раствором для сравнения служит раствор контрольного опыта, не содержащий азота. На основании полученных данных строят калибровочную кривую.

Работа 2. Колориметрическое определение белка

Белки дают цветные реакции с различными реактивами (реактивом Фолина, дающие синее окрашивание). Для определения концентрации белков в растворах используют колориметрический метод Лоури, который принято считать стандартным.

Принцип метода. Метод основан на реакции белков с реактивом Фолина, дающей синее окрашивание, причем при определенных концентрациях белка интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации белка в растворе. Метод используют для определения белка в растворах с концентрацией от 10 до 300 мкг в 1 мл. Если концентрация белка в исследуемом

растворе более высокая, то необходимо провести соответствующее разбавление.

Задание. Определить содержание белка, зарисовать таблицу и сделать вывод.

Оборудование и реактивы. NaOH 0,5н. Реактив А - 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. растворе NaOH, реактив В - 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе виннокислого калия, реактив С - готовится перед определением смешиванием 50 частей реактива А и одной части реактива В. На следующий день после приготовления реактив С для употребления не годен, реактив Фолина, прибор ФЭК, кюветы на 10 мм, мерная колба на 50 мл, пипетки на 10 и 2 мл, воронка, 3 пробирки, ступка с пестиком, водяная баня, фильтры.

Ход работы. 200-500 мг свежих листьев или корней изучаемой культуры промыть дистиллированной водой, растереть в ступке и перенести в мерную колбу на 50 мл, прилить 30 мл 0,5н NaOH и поставить на кипящую водяную баню. Через 30 мин. колбу снять, охладить и содержимое довести 0,5н NaOH до метки. Содержимое колбы перемещать и отфильтровать в пробирку (3 мл). Затем в пробирку прилить 0,8 мл исследуемого раствора, прибавить 4 мл реактива «С», смесь перемещать и через 10 мин, прилить к ней 0,4 мл реактива Фолина и снова тщательно перемещать, через 30 мин. определить интенсивность окраски на фотоэлектроколориметре при длине волны 570 нм. Количество белка в растворе рассчитывают по калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят предварительно на основании ряда тесно приготовленных растворов нисходящей концентрации чистого белка (сывроточного глобулина, кристаллического альбумина, казеина и др.).

Для контрольной кюветы вместо вытяжки взять 0,5н NaOH.

$$X = \frac{A \times 50 \times 100}{M \times 0,8 \times 1000 \times 1000},$$

где X - содержание белка, %;

A - количество белка по кривой, мкг;

М - навеска материала, мг;

0,8 - мл кол-во раствора, взятого для анализа;

100 - перевод, в %;

1000×1000 - перевод в г.

Работа 3. Запасные формы белков и их свойства.

Принцип метода. Запасные формы белков по растворимости делятся на альбумины (растворимые в воде), глобулины (в слабых растворах нейтральных солей), проламины (в 70 % спирте), глютелины (в слабых растворах щелочей). У растений наиболее распространены глобулины. Они содержатся в основном в семенах бобовых и масличных культур (в горохе легумин и вицелин, в фасоле - фазеолин, в сое - глицелин). В семенах злаковых культур в большей части содержатся проламины: в пшенице - глиадин, ячмене - гордеин, кукурузе - зеин, овсе - авенин. Из фракции глютелинов находится в значительном количестве у риса орезенин и в пшенице - глютеин.

В виде запасных форм белка в семенах растений альбумины почти не встречаются.

Указанные фракции белков легко обнаруживаются с помощью ряда цветных реакций: биуретовой, ксантопротеиновой, реакции на серу, Реакции обуславливаются наличием в молекуле белка соответствующих группировок, обладающих сродством к тому или иному реактиву.

Задание. Установить с помощью соответствующих реакций наличие запасных форм белковых веществ в семенах различных культур. Выделив по растворимости различные фракции, описать результаты работы, сделать сравнительные выводы.

I. Запасные белки и изучение их свойств

Оборудование и реактивы. Растительный материал, две колбы, пробка к колбе, пять пробирок, 10 % раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, соль концентрированная H_2SO_4 , 20 %, 40 % раствор NaOH , 70 %

спирт, спиртовка, две воронки, складчатые фильтры, мерный цилиндр на 100 мл.

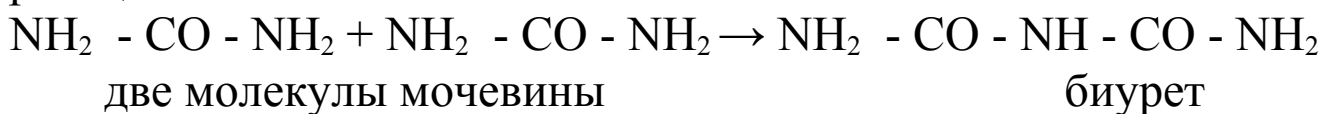
Ход работы. Для обнаружения запасных белков в семенах злаковых культур берется 25 г муки, добавляется наибольшая порция воды (10-15 мл) и замешивается крутое тесто. Через 20-30 мин. из теста осторожно вымываются отруби и крахмал. Оставшаяся резинообразная масса-клейковина содержит белки.

Для определения содержания фракционного состава белков от клейковины отделяют небольшие порции (с горошину) и обрабатывают соответствующими реактивами.

Для определения белков в бобовых культурах: берут 5 г муки, помещают в колбочку и заливают 30 мл 10 % раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Колбу закрывают пробкой, встряхивают 5 минут и оставляют стоять. Через 30 мин. раствор фильтруют через складчатый фильтр. С раствором глобулина можно, проделать следующие реакции,

I. Качественные реакции на белки.

I.I. Биуретовая реакция. К 2 мл вытяжки белка добавляют 1 мл 20% NaOH и 2-3 капли 1% раствора CuSO_4 , вводя последний по каплям (следует избегать избытка CuSO_4). При этом проявляется фиолетовая окраска за счет образования биурета по реакции:



При слабом течении биурет - реакции смесь слегка подогреть на спиртовке.

Молекулы любого белка содержат группировки, аналогичные биурету - CO - NH - (пептидная связь), поэтому биуретовая реакция характерна для всех белков.

1.2 Ксантопротеиновая реакция позволяет обнаружить присутствие белков, в состав которых входят циклические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан), производные

- аланина, в радикале которого водород замещен циклическими группами.

Для проведения ксантопротеиновой реакции к исследуемому материалу приливают немного концентрированной HNO_3 и смесь подогревают до кипения. При этом образуются нитросоединения, дающие осадок желтого цвета.

1.3. Реакция на серу.

Присутствие в ряде аминокислот серы (цистеин, цистин, метионин) позволяет обнаружить ее путем прибавления к белку равного объема 40% NaOH и 2-3 кристалликов уксуснокислого свинца.

Почернение раствора после осторожного нагревания до кипения происходит в результате взаимодействия Pb с H_2 , выделяющимися при разложении белка щелочью.

2. Чтобы убедиться в том, что данный белок нерастворим в воде, наливают в пробирку 1 мл раствора белка и приливают избыток воды. В результате появляется муть из-за выпадения глобулина в осадок. Если прибавить слабый раствор нейтральной соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, муть исчезнет.

3. Высаливание белка

При введении в вытяжку концентрированных растворов нейтральных солей происходит высаливание белка. Для получения этой реакции к 2-3 мл вытяжки приливается раствор концентрированной соли (можно всыпать кристаллы NaCl). Глобулин выпадает в осадок, и раствор мутнеет. При разбавлении водой выпавший в осадок глобулин снова переходит в раствор, и смесь осветляется.

4. Денатурация белка

При действии на вытяжку крепких кислот (азотной, серной, соляной) или солей тяжелых металлов (свинца, меди, ртути), при высокой температуре (осторожное кипячение) белок сворачивается необратимо и выпадает в осадок. Для получения осадка;

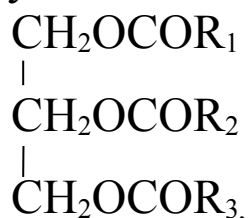
к 2-3 мл вытяжки приливают в равном количестве одну из крепких кислот, и белок, свертываясь, выпадает в осадок. Если осадок выпадает медленно, смесь следует осторожно нагреть;

к 2 мл вытяжки приливают столько же водного раствора соли тяжелого металла. Смесь кипятится. Помутнение соли указывает на сворачивание белка.

РАЗДЕЛ 6. ЖИРЫ

Растительные жиры, или масла – главный запасной продукт семян большинства растений; до 90% общего числа видов высших растений земного шара содержат в семенах запасные жиры. Жиры в семенах растений могут накапливаться в большом количестве – до 30-40% веса и до 50-60% веса ядра. Чистые растительные масла – бесцветные вещества; окраска природных масел обуславливается наличием в них продуктов распада хлорофилла и каротиноидов.

Жиры представляют собой смесь триглицеридов сложных эфиров глицерина и высших жирных кислот и построены по следующей общей схеме:



где R_1, R_2, R_3 – остатки жирных кислот.

Всего в состав растительных жиров может входить до 50 различных жирных кислот, но в наибольшем количестве в составе жиров, получаемых из растений умеренных широт, содержатся пальмитиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$, стеариновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$, олеиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, линолевая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ и линоленовая $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ кислоты.

Все жирные кислоты входящие в состав жиров, делятся на две группы: насыщенные, т.е. не содержащие двойных связей, и ненасыщенные, или непредельные, содержащие двойные связи.

Как видно из приведенных выше формул, к насыщенным кислотам относятся пальмитиновая, стеариновая, а к ненасыщенным - олеиновая, линолевая, линоленовая кислоты. Пальмитиновая и стеариновая кислоты - твердые при комнатной температуре, а олеиновая, линолевая и линоленовая - жидкие.

Весьма существенно, что встречающиеся в растительных маслах жирные кислоты обычно содержат четное число углеродных атомов.

Растительные масла очень разнообразны по своим свойствам. Для общей их характеристики, а также для характеристики входящих в их состав жирных кислот принят ряд констант, которые характеризуют свойства жиров. Основными константами жиров являются кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное число и перекисное число. Простейшей задачей анализа растительных масел является определение их общего содержания в семенах или других органах растений и установление характерных констант данного масла.

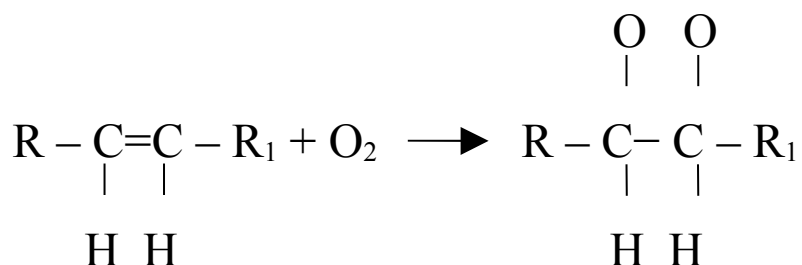
Кислотное число - количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г. жира. Это весьма важный показатель свойств и состояния жира, так как оно может легко увеличиваться при хранении, как жира, так и богатых жиром пищевых продуктов.

Йодное число - количество граммов йода, которое способно присоединяться к 100 г жира. Йодное число характеризует степень непредельности жирных кислот, входящих в состав жира. Так как присоединение йода происходит по месту двойных связей, имеющих в ненасыщенных жирных кислотах. Йодное число дает представление о содержании в жире этих ненасыщенных кислот. Йодные числа большинства животных жиров колеблются в пределах

30-70, а растительных – 120-160. Чем выше йодное число, тем жиже жиры и тем скорее они окисляются, тем более они пригодны для приготовления лаков, красок и олифы.

Число омыления - количество мг КОН, необходимое для нейтрализации, как свободных, так и связанных в виде глицерином кислот, жирных кислот, получающихся при омылении 1 г масла. Это число характеризует среднюю величину молекулярной массы глицеридов, которые входят в состав жиров.

При длительном хранении жиры приобретают неприятный горьковатый вкус и специфический запах - портятся, прогоркают. Прогоркание жиров может вызваться чисто химическими реакциями, связанными с действием света, воздуха и воды. Это может происходить и ферментативным путем. Так, под воздействием фермента липазы может произойти разложение жира аналогично реакции омыления. Некоторые свободные жирные кислоты, которые выделяются при таком разложении жиров, придают ему неприятный вкус и запах. Кислотное число жира при этом повышается. Прогоркание жиров может произойти и от жизнедеятельности микроорганизмов. Однако наиболее распространенным типом прогоркания жиров является прогоркание, обусловленное окислением ненасыщенных жирных кислот кислородом воздуха. При этом кислород присоединяется по месту двойных связей, образуя перекиси.



В результате дальнейшего разложения образовавшихся перекисей жирных кислот получают альдегиды, придающие жиру неприятный запах и вкус. Этот процесс ускоряется

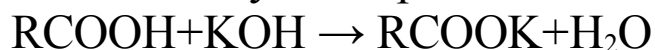
присутствием небольших количеств влаги, повышенной температурой и светом. При хранении жира без доступа воздуха, т. е. вакууме он не будет прогоркать. Для предотвращения окислительного прогоркания жиров к ним добавляют антиокислители. К таковым относятся токоферол, т. е. витамин Е.

Работа 1. Определение кислотного числа

Кислотное число, или кислотность, жира - количество миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

В жирах почти всегда имеются свободные жирные кислоты, причем в растительных жирах их концентрация обычно более высокая, чем в животных. Особенно много свободных кислот в масле из незрелых семян. В процессе созревания содержание свободных жирных кислот уменьшается и соответственно понижается кислотное число. Количество свободных кислот может увеличиваться и при длительном хранении семян масличных культур или полученного из них масла. Содержание кислот резко повышается при прорастании семян вследствие гидролиза жиров. Таким образом, величина кислотного числа масла может подвергаться заметным изменениям.

Принцип метода. Масло нейтрализуют титрованным раствором едкого калия, в результате чего между едким калием и находящимся в масле свободными жирными кислотами происходит следующая реакция:



По количеству KOH, затраченного на нейтрализацию кислот, судят о величине кислотного числа.

Задание. Определить кислотное число масла, зарисовать таблицу и сделать соответствующий вывод.

Материалы и оборудование: Водяная баня, колбы химические емкостью 50-100 мл, смеси эфира с 96%-ным спиртом, 0,1 н. KOH, фенолфталеин, тимолфталеин.

Ход работы. В чистую сухую колбу на аналитических весах отвешивают 3-5 г масла, прибавляют 30 мл предварительно нейтрализованной смеси эфира с 96%-ным спиртом и растворяют масло. Если масло растворяется плохо, смесь в колбе тщательно перемешивают и слабо нагревают на водяной бане при встряхивании.

После растворения жира в колбу добавляют несколько капель 1%-ного спиртового фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором КОН до появления ярко-розовой окраски. Если для исследования был взят темноокрашенный жир, в котором трудно наблюдать появление розовой окраски, то вместо фенолфталеина берут 1%-ный раствор тимолфталеина и титруют до появления синей окраски.

Вычисление результатов. Для вычисления величины кислотного числа используют следующую формулу:

$$X = \frac{A \times 5,61 \times T}{H},$$

где X - кислотное число масла, мг;

A - количество 0,1 н. раствора КОН, затраченное на титрование;

T - поправка к титру КОН;

H - навеска масла, взятая для анализа.

Содержание кислот в масле можно выражать также не кислотным числом, а количеством свободных кислот в процентах от веса масла. При обычном титровании масла для определения кислотного числа нельзя получить никаких данных о молекулярном весе кислот, входящих в его состав, и следовательно, нельзя прямо вычислить процентное содержание кислот в масле. Поэтому условно расчеты ведут на свободную олеиновую кислоту, которая является одной из наиболее распространенных кислот, входящих в большинство растительных масел в нашей стране. Для этого кислотное число умножают на коэффициент 0,503. Этот коэффициент получают из следующего уравнения:

$$\% \text{ свободных кислот} = \frac{\text{кислотное число} \times 282,3 \times 100}{56,11 \times 1000},$$

где 282,3 – молекулярный вес олеиновой кислоты;
 56,11 – молекулярный вес КОН;
 100 – пересчет на процентное содержание;
 1000 – пересчет миллиграммов в граммы.

РАЗДЕЛ 7. УГЛЕВОДЫ

Значение углеводов для растительных и животных организмов исключительно велико. На их долю приходится до 90% сухого вещества растений. Углеводы являются основным питательным и главным опорным материалом для растительных клеток и тканей.

Углеводы являются главным продуктом фотосинтеза и основным дыхательным материалом. Крахмал, клетчатка, сахара, пектиновые вещества и другие, широко распространенные соединения растительного происхождения относятся к углеводам. В процессе распада углеводов организмы получают основную часть энергии, которая необходима для поддержания жизни и биосинтеза других сложных соединений.

Углеводы состоят из углерода, водорода и кислорода. Некоторые из них, как, например, содержащийся в грибах глюкозамин, содержит также и азот.

Главным запасным углеводов грибов является гликоген. Особенно велико его содержание в дрожжах - оно достигает иногда до 40% при расчете на сухое вещество.

Углеводами или сахарами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$ а также производные этих соединений.

Углеводы обычно делятся на три основные класса: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды или простые сахара состоят из одной полиоксиальдегидной или полиоксикетонной единицы. Они содержат от трех до семи углеродных атомов. Все простые сахара - бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворяющиеся в воде. Большинство из них имеет сладкий вкус.

Наиболее распространенным моносахаридом является шестиуглеродный сахар D-глюкоза; это исходный моносахарид, от которого происходят все другие сахара. Молекулы D-глюкозы служат главным видом клеточного топлива у большинства организмов и выступают в роли строительных блоков, или предшественников, наиболее распространенных полисахаридов.

Олигосахариды содержат от 2 до 10 моносахаридных единиц соединенных гликозидной связью. Гидроксильная группа одной молекулы моносахарида соединяется с другой молекулой моносахарида с выделением воды.

В зависимости от числа молекул моносахаридов, которые входят в состав одной молекулы олигосахарида, различают дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и т.д. В растениях наиболее широко распространены дисахариды.

Среди дисахаридов особенно широко известны сахароза, лактоза и мальтоза. Сахароза или тростниковый сахар, представляет собой дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и фруктозы. Этот дисахарид чрезвычайно широко распространен в растительном мире. Построен из D-глюкозы и D-фруктозы, которые соединены между собой 1,2-связью. Сахароза не принадлежит к числу редуцирующих сахароз, и именно поэтому она является транспортной формой углеводов.

Лактоза содержится только в молоке, больше она в природе нигде не обнаружена. Гидролиз лактозы дает D-галактозу и D-глюкозу. Лактоза в 4-5 раз менее сладкая, чем сахароза.

Мальтоза или солодовый сахар, образуется при расщеплении крахмала под действием амилаз. Этих ферментов больше всего в солоде, поэтому она и получила это название. Мальтоза в свободном состоянии содержится в растениях в небольшом количестве. Мальтоза состоит из двух молекул D-глюкозы, которые соединены между собой связью между первым и четвертым атомами углерода.

Из трисахаридов наибольшее значение имеет рафиноза. Построена из остатков глюкозы, галактозы и фруктозы.

Полисахариды. Большинство углеводов, встречающихся в природе, существует в форме высокомолекулярных полисахаридов, которые содержат от нескольких десятков до тысяч остатков моносахаридов. Почти все они построены по одному и тому же принципу, что и олигосахариды. Большая часть полисахаридов построена из остатков D-глюкозы. К ним относятся наиболее распространенные полисахариды - крахмал, целлюлоза и гликоген. Все остатки моносахаридов в молекулах полисахаридов связаны между собой в цепи, которые могут быть неразветвленными и разветвленными.

Полисахариды в зависимости от их строения можно разделить на две группы: гомополисахариды и гетерополисахариды. Гомополисахариды состоят из остатков какого-либо одного моносахарида. Например, крахмал, гликоген, целлюлоза состоят из глюкозы. Гетерополисахариды состоят из остатков различных моносахаридов. К таким полисахаридам относятся гемицеллюлозы, камеди, слизи, некоторые другие вещества. Полисахариды в клетках растений находятся в водонерастворимой форме, благодаря чему они могут накапливаться там, в больших количествах, не оказывая влияние на осмотическое давление.

Крахмал существует в двух формах, а именно в форме амилозы и амилопектина. Амилоза состоит из длинных неразветвленных цепей, в которых все D-глюкозные единицы соединены 1,4-связями. Цепи эти полидисперсны, их молекулярный вес варьирует от нескольких тысяч до несколько сотен тысяч. В воде амилоза не дает истинного раствора, но образует гидратированные мицеллы, которые при добавлении йода окрашиваются в синий цвет. В таких мицеллах полисахаридные цепи амилозы скручены в спираль.

Цепи амилопектина сильно разветвлены. Ветви содержат в среднем по 12 остатков глюкозы и точки ветвления образуются приблизительно у каждого 12-го остатка. Основа молекулы амилопектина имеет гликозидные связи 1,4-типа, но в точках связи

ветвления относятся к 1,6-типу. Амилопектин также образует коллоидные или мицеллярные растворы, однако при добавлении йода эти растворы окрашиваются не в синий, а в красно-фиолетовый цвет. Молекулярный вес амилопектина может достигать до 1 млн. Амилопектин в горячей воде дает клейстер, а амилоза - не дает.

Содержание амилозы и амилопектина в крахмале различно у разных видов растений. Оно также может изменяться в зависимости от сорта растения и от того, из какой части растения он получен. Например, если содержание амилозы в крахмале из клубней картофеля составляет 22%, то в крахмале из молодых побегов картофеля - 46%. Если в крахмале из зерна обычной кукурузы содержится 22% амилозы, то в крахмале так называемой восковидной кукурузы, амилоза отсутствует полностью, вследствие чего крахмал из зерен этого растения окрашивается йодом в красно-коричневый цвет. С другой стороны, выведены сорта кукурузы, крахмал которых содержит до 82% амилозы.

Под действием фермента амилазы, содержащегося в особенно большом количестве в проросшем зерне, в слюне и в соке, выделяемом поджелудочной железой, происходит ферментативное осахаривание крахмала - он расщепляется с образованием мальтозы. В качестве промежуточного продукта при гидролизе крахмала образуются полисахариды разной молекулярной массы - декстрины.

Гликоген - резервный полисахарид животных организмов. Особенно много его в печени (до 10-20%) и мышцах (до 4-5%). Он найден также и в ряде растений. При полном гидролизе гликогена образуется D-глюкоза.

Инулин - запасной полисахарид ряда растений семейств сложноцветных и колокольчиковых, который имеет формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$. В наибольшем количестве инулин содержится в клубнях георгина (до 50%). Инулин хорошо усваивается организмом человека и животных.

Клетчатка (целлюлоза) - структурный полисахарид, составляющий главную массу клеточных стенок растений.

Древесина состоит из целлюлозы приблизительно на 50%, а хлопок представляет собой почти чистую целлюлозу.

Целлюлоза служит главным структурным компонентом клеточных стенок растений. В стенках всех растительных клеток окружающие клетку целлюлозные волокна имеют правильную почти кристаллическую упаковку. Эти волокна цементируются матриксом, состоящим из трех других полимерных материалов, а именно из гемицеллюлозы, пектина и экстенсина. Главными компонентами матрикса являются гемицеллюлозы, в структурном отношении не похожие на целлюлозу.

Целлюлоза не переваривается в желудочно-кишечном тракте человека. Она переваривается лишь жвачными животными, в желудке которых имеются особые бактерии, гидролизующие клетчатку с помощью выделяемого ими фермента целлюлазы.

К числу прочих полисахаридов, являющихся компонентами клеточных стенок относятся: агар-агар морских водорослей, камеди.

Слизи и гумми. К этой группе коллоидных полисахаридов принадлежат растворимые в воде углеводы, образующие чрезвычайно вязкие и клейкие растворы. Типичными представителями этой группы являются гумми, выделяемые в виде наплывов вишневыми, сливовыми и миндальными деревьями в местах повреждения ветвей и стволов. Слизи содержатся в большом количестве в льняных семенах и в зерне ржи. Их наличие объясняет высокую вязкость употребляемого в медицине отвара из льняных семян или же водной болтушки ржаной муки.

Пектиновые вещества - высокомолекулярные соединения углеводной природы, содержащиеся в большом количестве в ягодах, фруктах, клубнях и стеблях растений. В растениях пектиновые вещества присутствуют в виде нерастворимого протопектина, представляющего собой соединение метоксилированной полигалактуроновой кислоты с галактаном и арабаном клеточной стенки. Протопектин переходит в растворимый пектин лишь после обработки разбавленными

кислотами или под действием особого фермента протопектиназы. Характерным и важным свойством пектина является его способность давать студни в присутствии кислоты и сахара. Это свойство широко используется в кондитерской промышленности при производстве желе, джема, мармелада, пастилы и фруктовых карамельных начинок. Пектиновые вещества играют важную роль при созревании, хранении и промышленной переработке различных плодов и овощей.

Работа 1. Объемный метод определения крахмала

В отдельных органах и тканях растений в преобладающем количестве содержатся разные углеводы: в плодах и овощах - моносахариды и сахара; в семенах злаков и бобовых культур, а также в клубнях картофеля - крахмал; в древесине и соломе - целлюлоза, гемицеллюлоза и пентозаны. Содержание того или иного углевода изменяется в зависимости от условий произрастания, возраста растения и т.д.

Принцип метода. Количественное определение большинства высокомолекулярных углеводов основано на свойстве их гидролизоваться при кипячении с разбавленными (крахмал, гемицеллюлоза) или концентрированными (целлюлоза) минеральными кислотами до конечного продукта - простых сахаров и на учете последних.

Объемный метод основан на получении комплексного соединения крахмала с йодом, последующем окислении крахмала бихроматом и йодометрическом учете избытка последнего.

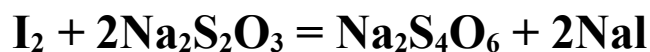
В объемном методе крахмал окисляется бихроматом в присутствии серной кислоты до углекислоты и воды:



В йодометрическом методе избыток бихромата калия реагирует йодистым калием, выделяя йод:



Выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала как индикатора:



Грамм-эквивалент крахмала ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) : 24 = 6,75

Задание. Определить содержание крахмала в растительных образцах, зарисовать таблицу и сделать соответствующий вывод.

Оборудование и реактивы. Фарфоровая ступка с пестиком, конические колбы на 200 мл, мерная колба на 100 мл, пипетка на 5 и на 10 мл, воронка, плита электрическая, фильтры, центрифуга, водяная баня, мерный цилиндр на 200 мл, 5%-ный раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 80%-ный раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5%-ный раствор йода, 0,25 н. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 20%-ный раствор йодистого калия, 0,1 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,5%-ный раствор крахмала

Ход работы. Навеску исследуемого материала, содержащего от 20 до 200 мг крахмала (3 г листьев, 0.25 г зерна, 1 г клубней картофеля) растирают в ступке с 5 мл 80%-ного раствора азотнокислого кальция. Растертую массу переносят в коническую колбу на 200 мл, смывают 20 мл 80%-ного раствора азотнокислого кальция, колбу накрывают стеклянной воронкой, ставят на плиту и кипятят (не сильно) 3 минуты. Крахмал переходит в раствор. После охлаждения воронку смывают водой. Содержимое колбы переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Набирают пипеткой 5 мл фильтрата (при анализе листьев - 10 мл) в центрифужную пробирку, прибавляют 2 мл раствора йода (5 г I_2 и 10 г KI в 1 л воды), перемешивают стеклянной палочкой, ополаскивают ее несколькими каплями воды и оставляют на 30 мин. При этом осаждается соединение крахмала с йодом, содержащее 14-16% йода. Через 30 мин. центрифугируют, прозрачный раствор сливают возможно полнее, осадок промывают 5%-ным раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ несколько раз, каждый раз прибавляя 5 мл, и перемешивают осадок стеклянной палочкой, которую затем промывают тем же раствором. Промывание повторяют 3-4 раза в зависимости от количества примесей (обычно листья необходимо промывать большее количество раз).

Промытый осадок крахмала с йодом сливают в коническую колбу емкостью 200 мл небольшими порциями воды - по 0,2-0,3 мл, хорошо перемешивая стеклянной палочкой. Общее количество воды не должно превышать 3 мл. В колбу прибавляют 10 мл 0,25 н. раствора $K_2Cr_2O_7$, приготовленного на 85%-ной H_2SO_4 , перемешивают и помещают на 15 мин. в кипящую водяную баню. При этом крахмал окисляется бихроматом до углекислоты и воды.

Затем колбу снимают, дают остыть, прибавляют 5 мл 20%-ного раствора йодистого калия, который, реагируя с избытком бихромата, выделяет йод. Йод оттитровывают 0,1 н. раствором гипосульфита натрия, под конец добавляя в качестве индикатора 1 мл 0,5%-ного раствора крахмала (йод, адсорбированный крахмалом, практически не сказывается на результатах определения).

Отдельно титруют 10 мл 0,25 н. раствора $K_2Cr_2O_7$ после разбавления его 120 мл воды и прибавляют 5 мл 20%-ного раствора йодистого калия. Из полученных данных вычисляется содержание крахмала в процентах (X) по следующей формуле:

$$X = [0,675 \times V \times K \times (a - б)] : (V \times H),$$

где X - содержание крахмала, %;

V - общий объем исследуемого раствора, мл;

V - объем исследуемого раствора, взятый для осаждения крахмала йодом, мл;

a - объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, затраченный при контрольном титровании бихромата, мл;

б - объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, затраченный при определении крахмала, мл;

K - нормальность раствора тиосульфата;

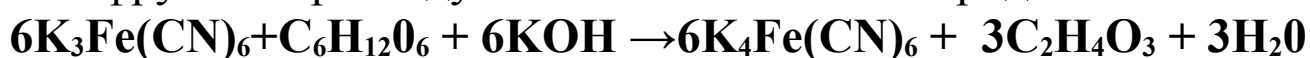
H - навеска исследуемого вещества, г ;

0,675 - нормальный титр крахмала, умноженный на 100 для пересчета в проценты.

Работа 2. Определение содержания водорастворимых форм углеводов

В большинстве растений количество углеводов достигает 80-90% сухого вещества. В отдельных органах и тканях растений преобладают разные углеводы: в большинстве плодов и овощей моносахариды и сахароза, в семенах злаков и бобовых культур, а также клубнях картофеля - крахмал, в древесине и соломе - целлюлоза, гемицеллюлоза, пентозаны.

Принцип метода. Железосинеродистый калий в щелочной среде восстанавливается редуцирующими сахарами до железистосинеродистого калия. При этом на 1 моль глюкозы или фруктозы расходуется 6 моль железосинеродистого калия:



Образующийся $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ осаждается серноокислым цинком, а неиспользованный избыток $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ определяется йодометрически в кислой среде:



Виду обратимости процесса необходимо связать образовавшийся $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ с помощью раствора ZnSO_4 , чтобы реакция протекала целиком слева направо по уравнению:



Выделившийся в реакции йод оттитровывают гипосульфитом после прибавления в раствор уксусной кислоты.

Зная, сколько $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ потребляется при окислении 1 части глюкозы, а также зная титры растворов, находим по прилагаемой таблице количество сахара.

Метод позволяет определить редуцирующие сахара в количестве от 5 мг в пробе.

Задание. Определить общее содержание водно-растворимой фракции углеводов (в пересчете на глюкозу), отдельно установить содержание редуцирующих сахаров, затем рассчитать количество сахарозы. Содержание редуцирующих сахаров и сахарозы выразить в процентном отношении к общим сахарам, принимая последнее за 100 %. Рассчитать и выразить содержание всех сахаров водно-растворимой фракции в процентах на единицу исследуемого материала.

Оборудование и реактивы: ступки, мерные колбы на 100 мл, водяная баня, $K_3Fe(CN)_6$, 10%-ный раствор $Pb(CH_3COO)_2$, 10%-ный раствор Na_2SO_4 , 5%-ный раствор $NaOH$, 9%-ной CH_3COOH , $ZnSO_4$, KI , крахмал.

Определение содержания общих сахаров водно-растворимой фракции

Подготовка пробы к анализу. 1 г семян или 1 г сочных плодов (овощей) растереть в ступке и массу перенести в мерную колбу на 100 мл, ступку ополоснуть 2-3 раза и слить воду в колбу, доведя объем раствора до $2/3$ ее объема.

В колбу ввести 5 мл 10%-ного раствора $Pb(CH_3COO)_2$ для осаждения белков, после чего прилить H_2O до метки. Раствор отфильтровать.

50 мл фильтрата перенести в мерную колбу на 100 мл. Избыток свинца осадить, прилить к фильтрату 5 мл 10%-ного раствора Na_2SO_4 . Колбу долить водой до метки и смесь профильтровать. Вторичный фильтрат использовать для определения содержания общих сахаров.

Определение содержания общих сахаров

а) 5 мл вторичного фильтрата перенести в коническую колбу на 100 мл, прилить 15 мл H_2O , 2 мл концентрированной HCl и нагреть 10 минут на кипящей водяной бане для гидролиза всех сахаров до моносахаров.

б) После нагревания раствор охладить, прилить к нему 2-3 капли фенолфталеина и нейтрализовать 20%-ным раствором $NaOH$. Щелочь вводится по каплям до устойчивой (не исчезающей в течение 30 с. розовой окраски). После введения каждой капли раствор следует перемешивать.

в) После нейтрализации к фильтрату прилить 10 мл 0,05 н. $K_3Fe(CN)_6$ и вновь прогреть на кипящей водяной бане 20 мин.

г) В охлажденный раствор прилить 10 мл смеси сернокислого цинка и йодистого калия (раствор готовится непосредственно перед употреблением в соотношении: (40 мл $ZnSO_4$ + 10 мл KI), 10 мл 9%-ной CH_3COOH и ввести 2-3 капли

крахмала. Свободный йод не прореагирующий с крахмалом, оттитровать 0,05 н. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до молочного цвета.

д) Параллельно провести контрольный опыт для определения соотношения $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Вместо вытяжки берется 20 мл дистиллированной воды, приливается 10 мл $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и ставится на кипящую водяную баню на 20 мин. Далее как в пункте «г».

Получив результаты двух титрований (опытного образца и контрольного опыта), рассчитывают общее содержание сахаров в пересчете на глюкозу (формула расчета приведена ниже).

Определение содержания моносахаров (редуцирующих сахаров)

10 мл вторичного фильтрата, вытяжки исследуемого образца перенести в коническую колбу на 100 мл, прилить 10 мл H_2O , 10 мл 0,05 н. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и нагревать на кипящей водяной бане 20 мин. Раствор после нагревания охладить и повторить все операции в пункте «г» при определении общих сахаров.

Для расчета содержания моносахаров используется количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ пошедшее на титрование и количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в контрольном опыте.

Расчет содержания моносахаров

Определяется количество непрореагировавшего $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ путем оттитривывания освободившегося йода в результате реакции:



$$A = (C \times T_1) : T_2,$$

где А - количество непрореагировавшего $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ мл;

С - исходное количество $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, взятое для опыта (10 мл);

T_1 - количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ пошедшее на титрование опытного образца мл;

T_2 - количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ пошедшее на титрование контрольного опыта мл;

После этого рассчитывается соответственно количество $K_3Fe(CN)_6$, восстановившегося до $K_4Fe(CN)_6$, за счет редуцирования сахаров по формуле:

$$M = C - A,$$

где: M - количество $K_3Fe(CN)_6$ восстановившегося до $K_4Fe(CN)_6$;

C - исходное количество $K_3Fe(CN)_6$, взятое для опыта (10 мл);

A - количество $K_3Fe(CN)_6$, непрореагировавшего в ходе опыта с сахарами мл.

Количество сахаров, соответствующее величине «M», находят по таблице Иссекутца. Сотые доли значений «M» определяют по пропорции.

Пример:

$K_3Fe(CN)_6$ - 6,42 мл

6,40 мл-10,41 мг ($C_6H_{12}O_6$)

0,02 мл - X_1

$X_1 = (0,02 \times 10,41) : 6,40 = 0,03$

$X = 10,41 + 0,03 = 10,44$ мг ($C_6H_{12}O_6$)

Расчет содержания общих сахаров

Расчеты по содержанию общих сахаров определяется аналогично, как расчеты по содержанию моносахаров, по формулам и по таблице Иссекутца.

Расчет содержания сахарозы

Содержание сахарозы определяется по разности между содержанием общих сахаров и моносахаров. При этом величину содержания общих сахаров следует удвоить, так как их содержание определялось в объеме вытяжки в два раза меньше (5мл), чем редуцирующих (10 мл), отсюда:

Сахароза = 2 X общих - X редуцирующих

Найденное количество сахаров пересчитывают (с учетом разбавления) на процентное содержание их в навеске по формуле:

$$C = (X \times P \times 100) : (V \times H),$$

где С- содержание сахаров в пробе %;

X - содержание сахара в пробе, мг;

P - разбавление (по условиям методики оно равно 200);

100 - коэффициент пересчета в проценты.

V - объем вытяжки, взятой для определения сахаров (общих – 5 мл, редуцирующих - 10 мл);

H - навеска образца, взятого для определения сахаров, мг;

Относительное содержание редуцирующих сахаров и сахарозы от их суммы рассчитывается по формуле:

$$V = (X_{\text{сах.}} \times 100) : 2 X_{\text{общ.}},$$

где V - удельное процентное содержание рассчитываемых сахаров от их общего содержания %;

X_{сах.} - содержание рассчитываемых сахаров в пробе, мг;

2X - общ. сах - удвоенное содержание общих сахаров (с учетом того, что они определялись в половине объема вытяжки по сравнению с моносахарами) мг.

Таблица 3. Содержание сахаров в растительных образцах

Растительный образец	Содержание сахаров, %				
	от массы образца			по отношению к общ. сахарам	
	общих сахаров	моносахаров	сахарозы	моносахаров	сахарозы

Таблица 4. Определение редуцирующего сахара по Иссекутцу

Целые	Десятые доли, мл									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0			0,255	0,415	0,575	0,735	0,870	1,03	1,18	1,34
1	1,51	1,67	1,83	2,00	2,16	2,31	2,47	2,60	2,76	2,94
2	3,10	3,26	3,42	3,58	3,74	3,90	4,06	4,22	4,38	4,54

3	4,72	4,88	5,04	5,20	5,36	3,54	5,70	5,85	6,03	6,20
4	6,37	6,54	6,71	6,88	7,05	7,22	7,39	7,55	7,72	7,88
5	8,06	8,22	8,39	5,56	8,72	8,89	9,06	9,22	9,38	9,54
6	9,72	9,89	10,06	10,23	10,41	10,58	10,75	10,92	11,10	11,28
7	11,46	11,64	11,82	12,00	12,18	12,39	12,54	12,73	12,91	13,11
8	13,28	13,48	13,63	13,88	13,97	14,14	14,31	14,49	14,66	14,93