

Н.Н. Новиков, Т.В. Таразанова

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ  
ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

Москва 2012

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –  
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

Н.Н. Новиков, Т.В. Таразанова

## ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

*Допущено Учебно-методическим объединением вузов  
Российской Федерации по агрономическому образованию  
в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся  
по направлению 110100.62 «Агрохимия и агропочвоведение»*



Москва  
Издательство РГАУ-МСХА  
2012

УДК 581.19

ББК 28.57

Б 63

*Рецензенты:* Заведующий кафедрой биохимии и зерноведения Московского государственного университета пищевых производств, доктор технических наук, профессор Г.П. Карпиленко; профессор кафедры физиологии растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, доктор биологических наук М.Н. Кондратьев.

**Новиков Н.Н., Таразанова Т.В.**

**Б 63** **Лабораторный практикум по биохимии растений: Учебное пособие / Н.Н. Новиков, Т.В. Таразанова. М.: Издательство РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2012, 97 с.**

**ISBN 978-5-9675-0689-5**

Учебное пособие содержит современные сведения о методах биохимии, позволяющих изучить состав и свойства основных химических веществ растений, их содержание в растительной продукции, получить навыки аналитической работы по определению катализитической активности ферментов и других биохимических показателей, которые используются при оценке качества и безопасности сельскохозяйственной продукции. В учебное пособие включены лабораторные работы в соответствии с программными требованиями учебной дисциплины «Биохимия растений».

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению «Агрохимия и агропочвоведение».

Допущено Учебно-методическим объединением вузов Российской Федерации по агрономическому образованию в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению 110100.62 «Агрохимия и агропочвоведение»

**ISBN 978-5-9675-0689-5**

© Новиков Н.Н., Таразанова Т.В., 2012

© ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА

имени К.А. Тимирязева, 2012

© Издательство РГАУ-МСХА, 2012

## ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению «Агрохимия и агропочвоведение», которые изучают дисциплину «Биохимия растений». В лабораторный практикум включены лабораторные работы по определению биохимических показателей, характеризующих химический состав растений и накопление в растительном сырье полезных химических веществ, каталитическую активность ферментов, оказывающих влияние на качество и безопасность растительной продукции.

Цель лабораторного практикума – ознакомление студентов с современными биохимическими методами исследований и оценки качества и безопасности растительной продукции, овладение навыками аналитической работы по определению биохимических показателей, которые используются при оценке качества урожая сельскохозяйственных культур и пригодности растительного сырья для хранения и переработки.

Каждая лабораторная работа, представленная в учебном пособии, содержит общие теоретические сведения об определяемом показателе и принцип его определения, ход выполнения работы и схемы расчетов, перечень реагентов и оборудования, методику приготовления рабочих растворов. Лабораторные занятия проводятся с подгруппой до 12-14 человек в условиях строгого выполнения правил техники безопасности. Для более глубокого изучения учебного материала указаны контрольные вопросы, которые студенты должны проработать при подготовке лабораторной работы к защите. Важным условием при проведении лабораторных работ является обязательное участие в работе каждого студента, который после выполнения лабораторной работы оформляет конспект, отвечает на контрольные вопросы и получает отметку преподавателя о выполнении работы.

## ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО БИОХИМИИ

Работа в химической лаборатории требует соблюдения установленных правил, обеспечивающих ее безопасное выполнение. Студенты допускаются к выполнению лабораторных работ только после прохождения инструктажа по технике безопасности и правилам проведения химических работ, регистрации допуска к работе в специальном журнале. Студенты несут личную ответственность за несоблюдение требований по технике безопасности и правил работы в химической лаборатории.

При выполнении лабораторных работ по биохимии рекомендуется особое внимание обратить на выполнение следующих требований:

Приступать к выполнению лабораторной работы разрешается только после тщательного изучения методики ее проведения, подбора необходимой посуды, реактивов, оборудования и разрешения преподавателя.

Каждый студент должен работать на специально отведенном для него месте, быть внимательным при пользовании химической посудой, реактивами и оборудованием. Запрещается излишнее хождение по лаборатории.

Не использовать для работы грязную посуду. Не пользоваться реактивами без этикеток и не оставлять рабочие растворы и образцы без надписей.

Не пробовать химические вещества на вкус, а нюхать пары или газообразные вещества нужно осторожно, направляя их к себе движением руки и не вдыхая полной грудью.

Нельзя набирать пипеткой концентрированные растворы кислот и щелочей, а использовать специальные дозирующие устройства.

Запрещается выливать в раковину крепкие растворы кислот и щелочей, сильно пахнущих веществ, для них имеются специальные сосуды. Все работы с воспламеняющимися и вредными веществами необходимо производить в вытяжном шкафу. При работе с легковоспламеняющимися веществами запрещается использование открытого огня или включенных электроплиток.

Пробирку с жидкостью при нагревании нужно держать наклонно в сторону от себя и не направлять на другого студента. При работе на центрифуге не открывать ее крышку до полной остановки вращения ротора. Следить за тем, чтобы химические вещества не попадали на лицо и руки, а после окончания работы вымыть руки.

При работе с газовой горелкой следить за тем, чтобы пламя было не коптящим и не отрывающимся от горелки, а рядом с горелкой не находились легковоспламеняющиеся вещества.

В случае обнаружения неисправностей газо- и водопроводной сети, лабораторного оборудования, растекания ртути из разбитого термометра незамедлительно обратиться к дежурному лаборанту или преподавателю. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

По окончании работы необходимо выключить газовые горелки или другие нагревательные приборы, убрать посуду и свое рабочее место, закрыть воду, сдать лаборанту полученное оборудование.

При попадании кислоты на лицо или руки промыть обожженное место большим количеством воды и затем 1% раствором питьевой соды, при попадании щелочи промыть место ожога водой и затем слабым раствором уксусной кислоты.

При попадании кислоты в глаза тщательно промыть их водой и затем 1% раствором питьевой соды, при попадании в глаза щелочи промыть их сначала водой и затем слабым раствором борной кислоты, после чего и в том, и в другом случае немедленно обратиться к врачу.

При термических ожогах обожженную поверхность нужно обмыть этиловым спиртом или концентрированным раствором перманганата калия и затем смазать глицерином, а при сильном ожоге – мазью от ожогов.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ФЕНОЛЬНЫМ МЕТОДОМ

Сахарами называют разновидности углеводов, хорошо растворимые в воде и имеющие сладкий вкус. К сахарам относятся моносахариды, олигосахариды и некоторые производные моносахаридов. Если принять за 100% сладость продовольственного сахара – сахарозы, то по данному показателю другие сахара распределяются следующим образом:

сахароза .....	100	ксилоза .....	40
ксилит .....	200	мальтоза .....	32
фруктоза .....	173	галактоза .....	32
глюкоза .....	74	рамноза .....	32
сорбит .....	48	рафиноза .....	23
глицерин .....	48	лактоза .....	16

Сахара, имеющие свободные альдегидную или кетонную (фруктоза) группы, способны вступать в окислительно-восстановительные реакции, поэтому их называют редуцирующими сахарами. К редуцирующим сахарам относятся моносахариды, а из олигосахаридов мальтоза, лактоза, целлобиоза, гентиобиоза.

Редуцирующие сахара очень активно взаимодействуют с аминокислотами, образуя темноокрашенные продукты – *меланоидины*. На первом этапе взаимодействия аминокислот и редуцирующих сахаров образуются продукты их разложения: из сахаров – фурфурол или оксиметилфурфурол, а из аминокислот – альдегиды, углекислый газ и аммиак. На следующем этапе фурфурол или оксиметилфурфурол, вступая в соединение с аминокислотами, образуют меланоидины. Интенсивность реакции усиливается при повышенной температуре, которая создается при термической обработке растительной продукции в процессе сушки овощей, фруктов и продуктов из картофеля, выпечки хлеба, получения макарон и кондитерских изделий. Аналогичные явления наблюдаются при самосогревании зерна.

Промежуточные продукты меланоидинообразования – альдегиды создают специфический запах, характерный для тех или иных пищевых продуктов. Фурфурол имеет запах яблок, оксиметилфурфурол – запах меда, изовалериановый альдегид, образуемый из аминокислоты лейцина, – запах ржаного хлеба. Конечные продукты реакций взаимодействия аминокислот с редуцирующими сахарами – меланоидины вызывают потемнение растительных продуктов, что ухудшает их то-

варные свойства. В процессе хлебопечения реакции образования меланоидинов влияют на формирование цвета, вкуса и аромата ржаного и пшеничного хлеба.

В связи с возможным образованием меланоидинов, вызывающих потемнение и ухудшение товарных свойств растительной продукции при ее сушке и переработке, содержание редуцирующих сахаров в растительном сырье контролируется и разработаны соответствующие методы их определения. Наиболее распространенные методы определения содержания отдельных сахаров в растительной продукции – разновидности бумажной и тонкослойной хроматографии, а общего количества редуцирующих сахаров – метод Бергтрана и цианидный метод.

Определение редуцирующих сахаров по Бергтрану основано на их взаимодействии при нагревании с медновиннокислым комплексом (реактивом Фелинга), в ходе которого происходит окисление сахаров и образование осадка оксида меди (I). При этом масса полученного осадка пропорциональна концентрации сахаров в анализируемом растворе. Цианидный метод основан на титровании раствора редуцирующих сахаров раствором цианида железа (III) при нагревании и в присутствии индикатора. В ходе реакции сахара окисляются, а железо восстанавливается с образованием цианида железа (II). По количеству затраченного на титрование раствора цианида железа (III) рассчитывается содержание редуцирующих сахаров в растительном образце.

В живых организмах сахара являются основными субстратами дыхательных реакций, в ходе которых синтезируются важнейшие биоэнергетические продукты и промежуточные метаболиты, служащие исходным материалом для синтеза других жизненно необходимых для организмов химических веществ. В связи с этим они являются важными компонентами пищи человека и кормов для животных, в значительной степени определяющими их питательную ценность.

Сахара содержатся во всех органах растений, а в ряде растительных продуктов накапливаются в значительных количествах как запасные вещества (корнеплодах, овощах, плодах и ягодах). Преобладающими сахарами в этих растительных продуктах являются глюкоза, фруктоза и сахароза. Отдельные разновидности растительных продуктов различаются как по общему содержанию сахаров, так и по соотношению глюкозы, фруктозы и сахарозы.

Содержание сахаров в растительной продукции варьирует в значительных пределах в зависимости от генотипа выращиваемой культуры, природно-климатических условий, режима питания растений. Возможные средние пределы варьирования указанного показателя и соотношения сахаров в растительных продуктах представлены в таблице 1.

Для определения общего содержания сахаров в растительной продукции применяются указанные выше метод Бергтрана и цианидный метод после предварительного гидролиза сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы, способных восстанавливать реактив Фелинга или цианид железа (III). При определении сахаров в продуктах кондитерского производства применяется метод, основанный на окислении сахаров дихроматом калия в сильнокислой среде. Причем под воздействием данного окислителя окислению подвергаются не только сахара, но и их спиртовые производные.

**Таблица 1**  
**Содержание сахаров в растительной продукции**

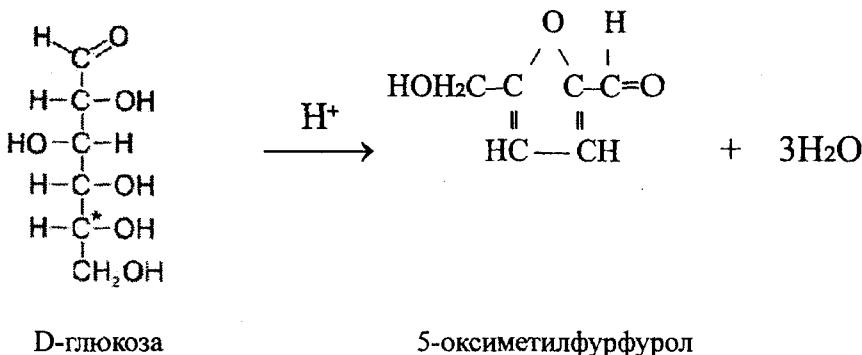
Растительные продукты	Общее содержание сахаров, %	Преобладающие разновидности сахаров
1	2	3
Зерно злаковых культур	2-5	Сахароза, мальтоза, рафиноза
Зерно зернобобовых культур	2-8	Сахароза, рафиноза
Ядра семян масличных растений	2-5	Сахароза
Клубни картофеля	0,5-1	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Корнеплоды сахарной свеклы	14-20	Сахароза
Корнеплоды столовой свеклы	6-12	Сахароза
Корнеплоды кормовой свеклы	6-12	Сахароза
Корнеплоды моркови	6-10	Сахароза, глюкоза
Корнеплоды репы	6-8	Глюкоза, фруктоза, сахароза
Корнеплоды редиса, редьки	5-8	Глюкоза, фруктоза, сахароза
Корнеплоды турнепса	6-12	Сахароза
Лук репчатый	5-10	Сахароза
Лук зеленый	1-2	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Капуста белокочанная	3-5	Глюкоза, фруктоза
Томаты, перец	2-5	Глюкоза, фруктоза
Огурцы	1-1,5	Глюкоза, фруктоза
Баклажаны	2-4	Глюкоза, фруктоза
Чеснок	4-6	Сахароза, фруктоза, глюкоза
Фасоль овощная, горошек зеленый	4-6	Фруктоза, сахароза
Арбузы	6-10	Фруктоза, глюкоза, сахароза

1	2	3
Дыни	7-10	Сахароза, фруктоза, глюкоза
Тыква	3-6	Глюкоза, фруктоза
Яблоки	6-14	Фруктоза, глюкоза, сахароза
Груши, айва	6-12	Фруктоза, глюкоза, сахароза
Сливы	6-12	Сахароза, глюкоза
Персики	10-15	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Абрикосы	8-10	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Апельсины, мандарины	6-8	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Лимоны	2-3	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Виноград	12-23	Глюкоза, фруктоза
Черешня, вишня	8-12	Глюкоза, фруктоза
Земляника	6-12	Глюкоза, фруктоза
Малина	6-8	Глюкоза, фруктоза
Смородина черная	5-10	Глюкоза, фруктоза
Смородина красная	4-8	Глюкоза, фруктоза
Крыжовник	5-12	Глюкоза, фруктоза
Хурма	16-20	Глюкоза, фруктоза, сахароза
Инжир	16-23	Фруктоза, глюкоза
Бананы	12-16	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Вегетативная масса бобовых трав (в расчете на сухую массу)	6-9	Глюкоза, фруктоза, сахароза
Вегетативная масса мятликовых трав (в расчете на сухую массу)	4-7	Сахароза, глюкоза, фруктоза
Зеленая масса кукурузы при уборке на сilos (в расчете на сухую массу)	9-12	Сахароза, глюкоза, фруктоза

Разработан также полумикрометод определения сахаров, который вследствие применения фенолового реагтива получил название *фенольного метода*.

**Принцип метода.** Метод основан на взаимодействии продуктов разложения сахаров в сильнокислой среде с фенолом, в результате которого образуются продукты конденсации, окрашенные в желто-оранжевый цвет. Интенсивность окраски в определенных пределах концентраций пропорциональна количеству сахаров в растворе. Под воздействием кислой среды при нагревании сахароза и другие оли-

госахариды подвергаются гидролизу с образованием моносахаридов, которые затем в результате дегидратации (отщепления молекул воды) превращаются в фурфурол или оксиметил-фурфурол. Образование оксиметилфурфурола из глюкозы можно представить в виде следующей реакции:



Фурфурол и оксиметилфурфурол далее вступают в реакции конденсации с фенолом, образуя продукты конденсации, окрашенные в желто-оранжевый цвет. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре.

Для реакции с фенолом используется раствор сахаров, очищенный от аминокислот, которые также могут взаимодействовать с фурфуролом и оксиметилфурфуролом с образованием меланоидинов. Поэтому при выделении сахаров из растительных проб проводится их избирательная экстракция этиловым спиртом, а затем после удаления спирта выпариванием получают водный раствор сахаров, который далее берется для колориметрического анализа. Расчет количества сахаров проводится на основе сопоставления оптической плотности анализируемого раствора и набора стандартных растворов с известной концентрацией сахара. Данный метод отличается высокой чувствительностью и позволяет определять количество сахаров в анализируемой пробе до 10 мкг.

**Оборудование.** Весы технические с точностью взвешивания до 0,01 г; весы аналитические; гомогенизатор или фарфоровая ступка с пестиком диаметром 10-15 см; preparativный набор для измельчения растительного материала; терморегулируемая водяная баня; склянки для спирта, концентрированной серной кислоты и раствора фенола с дозирующими устройствами; эксикатор; конические колбы объемом 100 мл с обратными холодильниками; мерные колбы с пластмассо-

выми или стеклянными притертными пробками объемом 50 мл; мерные колбы объемом 50, 100, 500 мл; воронки стеклянные диаметром 5-8 см; чашки фарфоровые диаметром 10 см; пробирки стеклянные термостойкие объемом 20 мл; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр с набором кювет; пипетки дозирующие для отбора аликвот 1-10 мл; стаканы стеклянные объемом 150 мл; палочки стеклянные; фильтры беззольные; склянки для хранения реактивов.

**Реактивы.** Фенол химически чистый; кислота серная химически чистая с плотностью 1,84 г/см<sup>3</sup>; сахароза химически чистая; спирт этиловый 96%; вода дистиллированная.

**Приготовление растворов.** 1% водный раствор фенола: 5 г фенола помещают в стеклянный стакан объемом 150 мл и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды; полученный раствор количественно переносят через воронку в мерную колбу объемом 500 мл, доводят объем в колбе до метки, закрывают пробкой и перемешивают. Полученный раствор переливают в темную склянку. В целях безопасности приготовление данного реактива выполняется в вытяжном шкафу.

Стандартный раствор сахарозы: навеску химически чистой сахарозы 100 мг  $\pm$  0,01 мг, предварительно высушенной в термостате при температуре 60°C с последующим охлаждением в эксикаторе, растворяют в 100 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. В 1 мл полученного раствора содержится 1 мг сахарозы.

80% раствор этилового спирта: 416,7 мл 96% этилового спирта разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают.

**Ход определения.** Для экстракции сахаров берется навеска растительного материала (картофель, корнеплоды, овощи, плоды, ягоды, вегетативная масса растений) 1-2 г, содержащая до 50 мг сахаров, и подвергается измельчению в фарфоровой ступке или гомогенизаторе и затем количественно переносится с использованием 10 мл этилового спирта в коническую колбу объемом 100 мл с обратным холодильником. Необходимый объем спирта отбирается с помощью дозирующего устройства.

Колба с обратным холодильником помещается на водяную баню и выдерживается на ней в течение 15 минут при температуре 60°C. После охлаждения надосадочную жидкость (спиртовой экстракт сахаров) фильтруют через беззольный фильтр в колбу объемом 50 мл с пластмассовой или притертой стеклянной пробкой. К осадку в колбе с обратным холодильником приливают еще 10 мл этилового спирта и повторяют экстракцию сахаров в течение 15 минут, после охлаждения надосадочную жидкость снова фильтруют в колбу с притертой пробкой. Затем по указанной методике проводится третья экстракция

сахаров, после чего спиртовой экстракт и остатки растительного материала из колбы с обратным холодильником переносят на фильтр; колбу с обратным холодильником и осадок на фильтре промывают 2-3 раза небольшим количеством теплого 80% раствора этилового спирта. Объем раствора в колбе доводят до метки 80% этиловым спиртом и тщательно перемешивают.

При анализе воздушно-сухого материала навеску уменьшают до 0,25-0,5 г в зависимости от содержания сахаров. Растительный материал растирают в фарфоровой ступке и указанную навеску измельченного растительного материала помещают в колбу с обратным холодильником, приливают с помощью дозирующего устройства 10 мл этилового спирта, затем в течение 15 минут выдерживают на водяной бане при температуре 60°C, после чего надосадочную жидкость фильтруют в мерную колбу с притертой пробкой. Последующие две экстракции сахаров проводятся на водяной бане по указанной выше методике и экстракты фильтруют в мерную колбу с притертой пробкой. Осадок на фильтре промывают теплым 80% раствором этилового спирта, объем раствора в колбе доводят до метки и содержимое колбы тщательно перемешивают.

Для приготовления водного раствора сахаров дозирующей пипеткой отбирают 5 мл спиртового экстракта и помещают в фарфоровую чашку, которую ставят на водяную баню и оставляют на ней до полного выпаривания спирта. Выпаривание спирта проводится при температуре 60°C. Осадок сахаров в фарфоровой чашке растворяют в 10 мл дистилированной воды, тщательно перемешивая образующийся раствор стеклянной палочкой. Полученный водный раствор сахаров переносят в мерную колбу на 50 мл. Фарфоровую чашку несколько раз ополаскивают небольшими порциями дистилированной воды, сливая ее в мерную колбу. Объем раствора в мерной колбе доводят дистилированной водой до метки и содержимое колбы тщательно перемешивают.

Реакция сахаров с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты проводится в вытяжном шкафу с использованием термостойких пробирок на 20 мл. В пробирку сначала приливают дозирующей пипеткой 1 мл водного раствора сахаров, затем добавляют 1 мл 1% раствора фенола, полученную смесь перемешивают. Затем, удерживая пробирку за верхнюю часть, к полученной смеси приливают с помощью дозирующего устройства 5 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают, оставляют на 10 минут, после чего выдерживают на водяной бане 20 минут при температуре 30°C для формирования устойчивого окрашивания полученного раствора. Окрашенный раствор должен быть прозрачным, а если он мутный, то реакцию сахаров с фенолом нужно повторить до получения прозрачного окрашенного раствора.

Интенсивность окраски полученного раствора оценивают колориметрированием на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 490 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см. Оптическую плотность каждого раствора определяют не менее двух раз. Разница по оптической плотности между аналитическими повторениями не должна превышать 0,01. Количество сахаров в анализируемой пробе устанавливают по градуировочному графику.

Нулевую отметку шкалы оптической плотности на приборе настраивают по контрольному раствору, который получают при взаимодействии с феноловым реагентом в присутствии концентрированной серной кислоты 1 мл дистиллированной воды.

Для построения градуировочного графика по указанной выше методике подвергают окрашиванию набор растворов сахара с известной концентрацией, которые готовят путем разбавления исходного стандартного раствора сахарозы с концентрацией 1 мг/мл. В мерные колбы на 50 мл вносят пипеткой соответственно 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 мл исходного стандартного раствора сахарозы и объем раствора в колбах доводят до метки дистиллированной водой. В каждой колбе будет содержаться соответственно 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 мг сахарозы. Полученные водные растворы сахара в мерных колбах тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы берется по 1 мл раствора сахара и вносится в стеклянные термостойкие пробирки, в которых проводится их реакция с феноловым реагентом в присутствии концентрированной серной кислоты. После образования устойчивой окраски по указанной выше методике окрашенные растворы сахара колориметрируют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре. Полученные значения оптической плотности используют для построения градуировочного графика. По вертикальной оси откладывают значения оптической плотности окрашенных растворов сахара с известной концентрацией, а по горизонтальной оси – соответствующие количества сахарозы в мг, внесенные в мерные колбы на 50 мл.

**Обработка и оценка результатов.** По оптической плотности анализируемого раствора с помощью градуировочного графика определяют массу водорастворимых сахаров (мг) в мерной колбе на 50 мл, которые содержались в 5 мл спиртового экстракта сахаров, взятого для выпаривания. Вычисление массовой доли сахаров в растительной пробе, взятой для анализа, с учетом разбавления производится по следующей формуле:

$$C = \frac{M_{\text{сах}} \cdot 50 \cdot 100}{H \cdot 5},$$

где С – массовая доля сахаров в растительной пробе, %;

М<sub>сах</sub> – масса сахаров, определенная по градуировочному графику, мг;

50 – общий объем спиртового экстракта сахара, мл;

Н – навеска растительного материала, мг;

5 – объем спиртового экстракта сахара, взятый для выпаривания, мл;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Рассчитанный показатель сравнивают с литературными сведениями, представленными в таблице 1, и делают соответствующие выводы о точности анализа и соответствии полученного результата теоретическим данным.

## Контрольные вопросы

1. Какие углеводы относятся к сахарам и редуцирующим сахарам?
2. Какова биологическая роль сахаров в растительном организме?
3. Как влияют сахара на формирование качества растительной продукции?
4. Что такое меланоидины и как они влияют на качество растительной продукции?
5. Каковы особенности различных видов растительной продукции по содержанию и составу сахаров?
6. Какими методами определяют общее содержание сахаров и редуцирующих сахаров в растительных продуктах?
7. Почему при определении сахаров фенольным методом проводится их экстракция из растительных проб этиловым спиртом?
8. Как получают водный раствор сахаров?
9. По какой методике окрашивают раствор сахаров с использованием фенолового реагента?
10. Как проводится колориметрирование окрашенных растворов сахаров?
11. Как строят градиуровочный график для количественного определения сахаров?
12. Каковы принципы расчета массовой доли сахаров в анализируемой пробе растительного материала?
13. Каковы особенности локализации сахаров в растительных продуктах?
14. Как влияют природно-климатические факторы и режимы питания растений на содержание сахаров в растительной продукции?

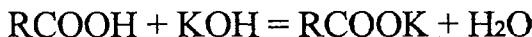
## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ЖИРОВ

В растительных жирах после их выделения из масличного сырья в небольших количествах содержатся фосфолипиды и стероидные липиды (0,5-3%), свободные жирные кислоты (0,5-1,5%), тоюоферолы (50-100 мг%), пигменты (каротиноиды, хлорофилл). Кроме того, жиры некоторых растений могут содержать алкалоиды, гликозиды, дубильные вещества, эфирные масла.

Концентрация свободных жирных кислот возрастает при длительном хранении растительных масел или растительных продуктов, содержащих жиры, вследствие активизации в них гидролитических процессов, которые могут происходить с участием ферментов (липаз, фосфолипаз) или неферментативным путем. Источниками ферментов являются исходное растительное сырье и микробная инфекция. Гидролиз ацилглицеринов жира неферментативным путем усиливается при повышении температуры.

Наличие свободных жирных кислот ухудшает вкусовые качества растительного жира и инициирует в нем окислительные процессы, связанные с образованием пероксидов и гидропероксидов жирных кислот, альдегидов и кетонов, которые являются основными продуктами прогоркания жира. Для оценки содержания в жирах свободных жирных кислот используется специальный показатель, называемый кислотным числом. Кислотное число выражается в мг гидроксида калия, затраченного на нейтрализацию свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Для свежего очищенного растительного жира этот показатель обычно находится в пределах 0,5-2, в процессе длительного хранения жира он может возрастать до 3-3,5. Если кислотное число жира больше 3,5, его используют на технические цели, а если превышает 5 – такой жир направляют на повторную очистку. Для нерафинированных масел допускается кислотное число, не превышающее 6. Кислотное число жира, выделенного из недозревших или прорастающих семян, может достигать 20-40.

**Принцип метода.** Пробу растительного масла смешивают с насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$ , а затем содержащиеся в масле свободные жирные кислоты титруют в присутствии индикатора водным раствором гидроксида калия в соответствии со следующей реакцией:



**Оборудование.** Весы лабораторные с точностью взвешивания  $\pm 0,01$  г; микробюретка на 5 мл; колбы конические вместимостью 100

мл; колба мерная на 1 л с пробкой и поглотительной трубкой, заполненной натронной известью; воронка стеклянная диаметром 6-8 см; цилиндры мерные на 50 и 250 мл; стакан химический на 1 л; склянка для хранения насыщенного раствора NaCl.

**Реактивы.** Хлористый натрий; гидроксид калия (фиксанал); 1% спиртовой раствор фенолфталеина; 1% водный раствор тимолфталеина; вода дистиллированная (свободная от диоксида углерода).

**Приготовление растворов.** 0,1 М водный раствор KOH: готовится из фиксанала в мерной колбе на 1 л; ампулу фиксанала пробивают специальным стержнем и промывают дистиллированной водой в мерную колбу через воронку, доводят объем раствора в колбе до метки и затем содержимое колбы тщательно перемешивают. Для защиты от поглощения из воздуха диоксида углерода колбу закрывают пробкой с поглотительной трубкой, заполненной натронной известью.

Насыщенный раствор NaCl: в химическом стакане емкостью 1 л нагревают 800 мл дистиллированной воды до температуры 80°C и в ней растворяют до полного насыщения хлористый натрий; после охлаждения полученный раствор фильтруют в склянку и далее используют для анализа.

1% раствор фенолфталеина: 1 г фенолфталеина растворяют в 100 мл 50% этилового спирта.

1% раствор тимолфталеина: 1 г тимолфталеина растворяют в 100 мл 80% этилового спирта.

**Ход определения.** Для анализа берутся образцы растительного масла с разным содержанием свободных жирных кислот. Навеску растительного масла для определения кислотного числа устанавливают по таблице 2. Коническую колбу на 100 мл ставят на весы и приливают в нее пипеткой необходимый объем растительного масла, равный по массе установленной навеске. Навеска растительного масла взвешивается с точностью  $\pm 0,01$  г.

Затем в колбу приливают измерительным цилиндром 50 мл насыщенного раствора хлористого натрия и 5 капель раствора фенолфталеина, полученную смесь перемешивают и титруют из микробюретки 0,1 М раствором KOH до образования устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. По шкале бюретки определяют объем раствора KOH, затраченный на титрование. В качестве контроля проводится также титрование раствором KOH 50 мл насыщенного раствора хлористого натрия, в который приливали навеску растительного масла. Объем раствора KOH, затраченный на титрование контроля, вычитают из результата титрования анализируемой пробы растительного масла и полученное значение показателя используется при расчете кислотного числа.

Таблица 2

## Рекомендуемые навески жира для определения кислотного числа

Ожидаемое кислотное число	Масса навески жира, г
меньше 1	10
1-4	< 2,5
4-15	> 1,0
15-75	0,5
более 75	0,1

При определении кислотного числа светлых и темноокрашенных масел при титровании лучше использовать в качестве индикатора 1% водный раствор тимола, который дает более контрастное синее окрашивание.

Определение кислотного числа проводят в двухкратном повторении, расходжение между которыми не должно превышать 0,05 мг КОН.

**Обработка и оценка результатов.** Кислотное число жира вычисляют по следующей формуле:

$$КЧ = \frac{5,611 \cdot V \cdot K}{H},$$

где КЧ – кислотное число в мг КОН в расчете на 1 г жира;

V – объем 0,1 М раствора КОН, затраченный на титрование свободных жирных кислот в пробе растительного масла за вычетом результата титрования контроля, мл;

K – поправка к титру раствора КОН (в данном случае K = 1, так как раствор приготовлен с использованием фиксанала);

H – навеска растительного масла, г;

5,611 – масса КОН в мг, содержащаяся в 1 мл 0,1 М раствора КОН.

На основе рассчитанного по указанной формуле кислотного числа дается оценка качества растительного масла. С использованием коэффициента пересчета на олеиновую кислоту, равного 0,503, определяют примерное содержание свободных жирных кислот в анализируемом растительном масле, выраженное в процентах, по следующей формуле:

$$\text{Содержание ж. к. (\%)} = \frac{КЧ \cdot 282,3 \cdot 100}{56,11 \cdot 1000} = КЧ \cdot 0,503,$$

где КЧ – кислотное число; 282,3 – молярная масса олеиновой кислоты, г/моль; 56,11 – молярная масса KOH, г/моль; 1000 – пересчет кислотного числа из мг в г; 100 – коэффициент пересчета в проценты.

### Контрольные вопросы

1. Каков химический состав нерафинированного растительного масла?
2. Под влиянием каких факторов повышается содержание свободных жирных кислот в растительных маслах?
3. Что такое кислотное число и как этот показатель используется для оценки качества растительных масел?
4. В чем состоит принцип определения кислотного числа жиров?
5. Какова последовательность выполнения анализа при определении кислотного числа растительных жиров и какие при этом используются реагенты?
6. В чем состоят особенности титрования растительных масел в смеси с насыщенным раствором NaCl водным раствором KOH?
7. Каковы принципы расчета кислотного числа и примерного содержания свободных жирных кислот в растительных жирах?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДНОГО ЧИСЛА РАСТИТЕЛЬНЫХ ЖИРОВ ПО ГАНУСУ

Питательная ценность растительных жиров определяется не только их высокой энергетической ценностью, но и содержанием полиненасыщенных жирных кислот (линовой, линоленовой), которые не синтезируются в организмах человека и животных и должны поступать в эти организмы с пищей. Поэтому растительные жиры представляют собой важные источники незаменимых жирных кислот для человека и сельскохозяйственных животных. В маслах льна, конопли, мака, подсолнечника, сои, хлопчатника, арахиса содержание этих кислот достигает 40-80% общего количества жирных кислот.

Технические свойства растительных жиров также зависят от содержания в них остатков жирных кислот с двумя и тремя двойными связями: чем их больше в составе масла, тем оно легче окисляется и быстрее высыхает на воздухе и тем выше качество олифы, лаков и красок, производимых на основе этих жиров.

Для характеристики содержания в жирах ненасыщенных жирных кислот используется показатель – йодное число, которое выражается количеством граммов йода, способного связываться со 100 граммами жира. Поскольку йод связывается с жирами при разрыве двойных связей в остатках ненасыщенных жирных кислот, этот показатель характеризует степень непредельности ацилглицеринов жира. Чем больше двойных связей в кислотных остатках жира, тем выше его йодное число. Животные жиры, преимущественно включающие остатки насыщенных жирных кислот, имеют низкие йодные числа (30-70). Растительные жиры, содержащие в своем составе главным образом остатки ненасыщенных жирных кислот, отличаются более высокими йодными числами – 80-180. Растительные масла с хорошими техническими свойствами имеют йодные числа в пределах 140-180, пищевые масла – 90-130.

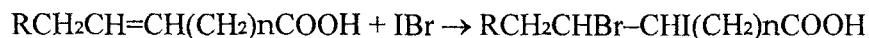
Йодные числа растительных масел, выделяемых из семян масличных культур, характеризуются следующими данными: подсолнечное – 120-140, соевое – 120-130, конопляное – 140-150, льняное – 150-180, касторовое (из семян клещевины) – 80-90, горчичное – 100-110, арахисовое – 90-100, кукурузное – 110-130, рапсовое – 90-110, маковое – 130-140, хлопковое – 100-110.

Йодные числа растительных масел изменяются в процессе созревания семян масличных растений. Масло из незрелых семян отличается повышенным содержанием насыщенных кислот, вследствие чего оно имеет низкое йодное число. По мере созревания семян уси-

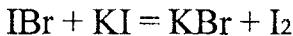
ливается синтез ненасыщенных жирных кислот, в связи с чем йодное число масла повышается на 20-30 единиц и более. Так, например, в процессе созревания семян подсолнечника количество пальмитиновой и стеариновой кислот уменьшается от 25-30% до 6-10% общего количества жирных кислот в масле, а содержание линолевой кислоты удваивается и составляет в масле зрелых семян 65-80%. Содержание в масле олеиновой кислоты также снижается. В семенах льна в процессе созревания повышается интенсивность синтеза линоленовой кислоты и включение ее в состав ацилглицеринов, тогда как количество других кислот в масле уменьшается.

Определение йодного числа основано на взаимодействии жира с активированным йодом. По методу Гануса активирование йода осуществляется бромом, который при растворении в уксусной кислоте образует с йодом соединение – бромистый йод. Полученную таким образом смесь называют реагентом Гануса.

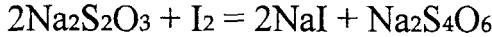
**Принцип метода.** К пробе растительного масла, растворенного в органическом растворителе, приливают реагент Гануса, содержащий бромистый йод, который взаимодействует с остатками ненасыщенных жирных кислот, входящими в состав ацилглицеринов данного масла. В ходе реакции происходит присоединение йода и брома по месту расщепления двойных связей в остатках жирных кислот:



Остаток непрореагировавшего бромистого йода обрабатывают раствором йодистого калия, в результате их взаимодействия образуется молекулярный йод:



Затем количество образовавшегося йода определяют титрованием раствором гипосульфита натрия:



Полученный результат вычитают из количества йода, содержавшегося в добавленном к пробе растительного масла реагенте Гануса, и таким образом находят количество йода, связанного с жиром. Далее расчетным путем вычисляют йодное число.

**Оборудование.** Весы технические; весы аналитические; колбы с пробками на 200 мл; мерная колба на 1 л; темные склянки на 1 л; дозирующие пипетки; бюретки; дозирующее устройство для реагента Гануса на 25 мл; измерительные цилиндры на 20 мл; капельница для индикатора; дозирующее устройство для хлороформа на 10 мл; стеклянный стакан на 200 мл; воронки химические диаметром 8 см.

**Реактивы.** Хлороформ химически чистый (не должен окрашиваться при смешивании с раствором йодистого калия); калий йодистый; крахмал водорастворимый; натрий серноватистокислый (гипосульфит); йод кристаллический; бром; ледяная уксусная кислота; дистиллированная вода.

**Приготовление растворов.** Реактив Гануса: в стеклянный стакан помещают навеску растертого до порошкового состояния йода 13 г и растворяют при размешивании стеклянной палочкой в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Полученный раствор с использованием уксусной кислоты количественно переносят в мерную колбу на 1 л и к нему приливают 2,6 мл (8,2 г) брома. Содержимое колбы тщательно перемешивают, доводят объем раствора в колбе до метки ледяной уксусной кислотой и снова перемешивают. По требованиям техники безопасности приготовление реактива Гануса проводится в вытяжном шкафу. Приготовленный таким образом реактив переливают в темную склянку и хранят под вытяжкой.

20% раствор йодистого калия: 100 г KI растворяют в 400 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и раствор хранят в темной склянке.

0,1 н раствор гипосульфита натрия: 24,81 г  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 500 мл свежепрокипяченной и охлажденной дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л, доводят объем раствора в колбе такой же водой до метки, закрывают пробкой и затем содержимое колбы перемешивают. Раствору дают стоять в течение 10 дней в темном месте, после чего устанавливают его точный титр. Возможно приготовление указанного раствора из фиксанала.

1% раствор крахмала: 1 г растворимого крахмала смешивают в стакане с 20 мл дистиллированной воды и полученную смесь при перемешивании приливают к 80 мл нагретой до 70°C воды, затем содержимое стакана нагревают до полного просветления раствора. Раствор крахмала охлаждают и хранят в холодильнике в течение недели.

**Ход определения.** В колбу с пробкой на 200 мл с помощью капельницы отвешивают навеску растительного масла в зависимости от ожидаемого йодного числа (табл. 3). При взятии навески капли масла не должны попадать на стенки колбы. К навеске растительного масла в колбе с помощью дозирующего устройства приливают 10 мл хлороформа, после чего колбу закрывают пробкой, смоченной в 20% растворе KI, и ее содержимое вращательными движениями перемешивают до полного растворения растительного масла. При плохом растворении масла смесь нагревают на водяной бане при температуре 30°C.

К раствору масла с помощью дозирующего устройства приливают 25 мл реактива Гануса. Колбу плотно закрывают пробкой, смоченной

в 20% растворе йодистого калия, и ее содержимое перемешивают. Добавление реактива Гануса и хлороформа проводится в вытяжном шкафу. Затем колбу со смесью ставят в темное место для прохождения реакции на время, определенное по таблице 3 при температуре выше 20°C, а при температуре 15-20°C время реакции увеличивают в 2 раза.

Таблица 3

**Рекомендуемые навески растительного масла для определения йодного числа**

Йодное число	Масса навески, г	Время взаимодействия с реагентом Гануса при температуре 25-30°C, час.
до 30	0,7-1	0,5
30-60	0,5-0,6	0,5
60-100	0,3-0,4	0,5
100-130	0,2-0,3	1
130-160	0,15-0,2	1
160-200	0,1-0,15	1
Масло льна	0,05-0,07	1

По истечении реакции в колбу с анализируемой смесью приливают 10 мл 20% раствора йодистого калия и 50 мл дистиллированной воды, тщательно смывая водой с пробки выделившийся йод. Содержимое колбы тщательно перемешивают и образовавшийся молекулярный йод оттитровывают 0,1 н раствором гипосульфита натрия до появления слабо-желтого цвета титруемой смеси, а затем добавляют 0,5 мл 1% раствора крахмала и продолжают медленно титровать при постоянном перемешивании окрашенную крахмалом в голубой цвет анализируемую смесь до ее полного обесцвечивания.

Параллельно с анализом опытной пробы по такой же методике проводится определение йода в реактиве Гануса. В колбу с пробкой приливают 10 мл хлороформа и добавляют 25 мл реактива Гануса. Колбу закрывают пробкой и ставят в темное место вместе с анализируемой пробой. По истечении указанного выше времени, необходимого для прохождения реакции реактива Гануса с растительным маслом, в контрольную колбу (в которой нет масла) приливают 50 мл воды и 10 мл 20% раствора йодистого калия, полученную смесь перемешивают и титруют 0,1 н раствором гипосульфита натрия до появления желтого окрашивания, а затем приливают в анализируемую смесь 0,5 мл 1% раствора крахмала и заканчивают титрование раствором гипосульфита натрия до исчезновения голубой окраски, которая образуется при взаимодействии крахмала с йодом. Из объема раствора

гипосульфита натрия, затраченного на титрование контрольной пробы, вычитают объем раствора гипосульфита натрия, затраченный на титрование анализируемой пробы, и полученный результат используют для расчета йодного числа.

**Обработка и оценка результатов.** Йодное число вычисляют по формуле:

$$\text{ЙЧ} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{H},$$

где ЙЧ – йодное число в г йода в расчете на 100 г масла;

$V_1$  – объем 0,1 н раствора гипосульфита натрия, затраченный на титрование контроля, мл;

$V_2$  – объем 0,1 н раствора гипосульфита натрия, затраченный на титрование оставшегося не связанным с растительным маслом йода, мл;

$K$  – поправка к титру 0,1 н раствора гипосульфита натрия;

0,01269 – масса йода, содержащаяся в 1 мл 0,1 н раствора гипосульфита натрия, г;

100 – пересчет на 100 г масла;

$H$  – навеска растительного масла, взятая для анализа, г.

Рассчитанное по указанной формуле йодное число сравнивают с теоретическими данными. На основе полученного при анализе йодного числа оценивают качество и состав жирных кислот анализируемого растительного масла.

## Контрольные вопросы

1. Как используется йодное число для оценки питательных и технических свойств растительных масел?
2. В каких пределах изменяется йодное число у различных жиров?
3. Как определяют йодное число?
4. В чем состоят особенности определения йодного числа по методу Гануса?
5. Для чего нужен контрольный вариант при определении йодного числа по Ганусу?
6. Каковы особенности титрования йода раствором гипосульфита натрия?
7. Как производится расчет йодного числа по результатам титрования контрольной и анализируемой пробы?
8. Как изменяется качество растительного масла под влиянием природно-климатических факторов?
9. Почему ухудшается качество растительного масла семян масличных растений при их избыточном азотном питании?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ

Аминокислоты – это первичные азотистые вещества растений, в молекулах которых имеются карбоксильные и аминные группировки, соединенные с органическим радикалом алифатической, ароматической или гетероциклической природы. У большинства из них аминогруппа присоединена к  $\alpha$ -углеродному атому. Однако известны также некоторые аминокислоты, у которых аминогруппа связана с другими углеродными атомами ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и др.).

Подавляющее большинство природных аминокислот синтезируется в организмах в виде L-форм, а D-формы аминокислот встречаются редко, чаще всего в клетках микроорганизмов. При химическом синтезе образуется рацемическая смесь L- и D-форм аминокислот. Ферментные системы растений, человека и животных специфически приспособлены катализировать биохимические реакции, происходящие с участием L-форм аминокислот, и не способны к превращениям D-форм, которые даже могут ингибировать биохимические процессы в организме. Только метионин может усваиваться организмами человека и животных как в L-форме, так и D-форме.

Важнейшая биологическая роль аминокислот – участие в синтезе белковых молекул. Аминокислоты, участвующие в синтезе белков, принято называть *протеиногенными*, их насчитывается 18. Кроме того, в синтезе белков принимают участие два амида – аспарагин и глутамин. Включение указанных аминокислот, а также аспарагина и глутамина в белковые полипептиды определяется кодонами генетического кода. После синтеза белковой молекулы в ней могут происходить модификации радикалов некоторых аминокислот, поэтому при анализе состава белков, кроме протеиногенных, обнаруживают некоторые другие аминокислоты (оксипролин, оксилизин и др.).

Наряду с аминокислотами важную роль в обмене азотистых веществ организмов играют некоторые иминокислоты (пролин, пипеколиновая кислота и др.), содержащие вторичную аминную группировку ( $=\text{NH}$ ). Они близки по физико-химическим свойствам к истинным аминокислотам и выполняют сходные биологические функции.

Важные функции в растительном организме выполняют производные аминокислот – амиды и бетаины, из которых наиболее хорошо изучены аспарагин, глутамин и гликоколбетаин. Аспарагин и глутамин участвуют в построении белковых молекул, являются продуктами обмена многих азотистых веществ. Гликоколбетаин – продукт азотного обмена у некоторых растений, служит активным донором метильных групп.

Аминокислоты, не участвующие в синтезе белков, являются важными метаболитами, с участием которых происходит синтез протеиногенных аминокислот, а также всех других азотистых веществ растительного организма: нуклеотидов, амидов, азотистых оснований, алкалоидов, некоторых липидов, многих витаминов, хлорофилла, фитогормонов (ауксинов, цитокининов), некоторых фитонцидов.

Растения и природные формы микроорганизмов способны синтезировать все необходимые им аминокислоты из других органических веществ, тогда как организмы человека и животных не способны к синтезу некоторых протеиногенных аминокислот. Эти аминокислоты называют *незаменимыми* и они должны поступать в организм с пищей.

Для взрослого человека незаменимыми являются 8 аминокислот: лизин, триптофан, метионин, треонин, лейцин, валин, изолейцин, фенилаланин. Для детей и некоторых групп животных незаменимыми также являются аргинин, гистидин и цистеин. При недостатке незаменимых аминокислот в организмах ослабляется синтез белков, что может быть причиной тяжелых заболеваний. А их недостаток в растительных кормах снижает выход животноводческой продукции в расчете на единицу массы затраченного корма, в результате чего повышается ее себестоимость.

В целях составления правильного пищевого рациона для каждого вида организмов с учетом возрастного и физического состояния определены ежедневные нормы потребления незаменимых аминокислот. Чаще всего в кормах сельскохозяйственных животных в недостаточном количестве содержатся такие незаменимые аминокислоты, как лизин, триптофан и метионин.

Содержание свободных аминокислот в растениях зависит от вида органа или ткани, возраста растений, внешних условий и особенно подвержено большим изменениям в зависимости от интенсивности протекания тех биохимических процессов, которые сопряжены с их потреблением (синтез белков, нуклеиновых кислот и других азотистых веществ). Более высоким содержанием свободных аминокислот отличается сочная растительная продукция – клубни картофеля, корнеплоды, овощи, плоды и ягоды, вегетативная масса кормовых трав. В указанных растительных продуктах на долю небелковых азотистых веществ, основную часть которых составляют аминокислоты, приходится 40-60% от общего количества азотистых веществ.

Концентрация аминокислот повышается при ослаблении ростовых процессов, недостатке питательных элементов, избыточном азотном питании, усиении процессов распада белков при старении растений или прорастании семян. Концентрации отдельных аминокислот могут возрастать в результате метаболитных нарушений в организме и под

воздействием стрессов. Так, например, при вододефицитном стрессе в клетках растений происходит накопление аминокислоты пролина, а при избыточном аммонийном питании – накопление аспарагина, глутамина и аргинина.

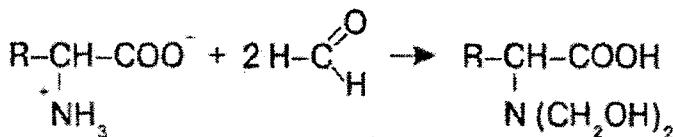
Как было отмечено ранее (стр. 6-7), аминокислоты довольно легко вступают в реакции с редуцирующими сахарами, образуя при этом темноокрашенные продукты – меланины, которые могут ухудшать качество и товарные свойства растительной продукции.

В результате ферментативного окисления ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина также образуются темноокрашенные продукты – меланины, вызывающие потемнение на воздухе очищенных клубней картофеля, измельченных корнеплодов, овощей и фруктов. Эти вещества совместно с меланинами определяют темный цвет ржаного хлеба и вызывают потемнение макарон при сушке.

Меланины синтезируются в ходе окислительной конденсации пирокатехина и диоксифенилаланина (ДОФА), который образуется при окислении ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина под действием фермента тирозиназы. На следующем этапе ДОФА, подвергаясь реакциям окисления, декарбоксилирования и циклизации, превращается в 5,6-диоксииндол и в индол-5,6-хинон. А последние вступают в реакции конденсации между собой и с молекулами пирокатехина. В результате щелочного гидролиза растительные меланины распадаются на пирокатехин, протокатеховую и салициловую кислоты, а также образуется небольшое количество 5,6-диоксииндола.

Аминокислоты, содержащиеся в растительном сырье, являются источниками образования вредных побочных продуктов в бродильном производстве – сивушных масел, которые представляют собой спирты (изоамиловый, изобутиловый, н-пропиловый), возникающие при дезаминировании и декарбоксилировании валина, лейцина, изолейцина, треонина. В сахарном производстве аминокислоты усиливают образование мелассы, в результате чего уменьшается выход сахара из корнеплодов сахарной свеклы.

**Принцип метода.** При взаимодействии аминокислот с формальдегидом происходит связывание молекул формальдегида с их аминными группами, а карбоксильные группы остаются свободными, в связи с чем полученные соединения можно оттитровать раствором щелочи.



По количеству щелочи, затраченной на титрование, затем определяют количественное содержание аминокислот в растворе. Для моноаминомоно-карбоновых кислот количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно числу связанных формальдегидом аминных групп. Для того чтобы ввести поправку на число дополнительных карбоксильных групп у дикарбоновых аминокислот, полученный раствор после добавления формальдегида предварительно нейтрализуют до  $\text{pH} = 7,0$ .

**Оборудование.** Лабораторные весы, колбы на 150 мл, мерные цилиндры на 10 и 50 мл, фарфоровые ступки диаметром 10 см с пестиками, фарфоровые чашки диаметром 8-10 см, марлевая ткань для фильтрования экстракта аминокислот, встрихиватель, микробюретка, стеклянные стаканы на 100 мл, пипетки на 1 мл, мерные колбы на 100, 200, 250 мл и на 1 л.

**Реактивы.** Гидроксид натрия кристаллический или в фиксанале, концентрированная соляная кислота (1,19 г/см<sup>3</sup>), фенолфталеин, бромтимол синий, 40% раствор формалина, борная кислота, хлористый калий, дистиллированная вода, 96% этиловый спирт.

**Приготовление растворов.** 0,05 М раствор  $\text{NaOH}$ : готовится из фиксанала путем разбавления дистиллированной водой (не содержащей  $\text{CO}_2$ ) в мерной колбе на 1 л.

0,05 М раствор  $\text{HCl}$ : готовится в мерной колбе на 1 л при растворении в воде 4,12 мл концентрированной соляной кислоты.

0,5% раствор фенолфталеина: 0,5 г фенолфталеина растворяют в 100 мл 50% этилового спирта.

0,04% раствор бромтимола синего: 0,1 г бромтимола синего измельчают в ступке и растворяют с 3,2 мл 0,05 М раствора  $\text{NaOH}$ , после чего полученную смесь количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу на 250 мл и доводят объем раствора в колбе до метки.

0,2 М раствор  $\text{NaOH}$ : 2 г  $\text{NaOH}$  растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 250 мл.

Формольная смесь: в колбе с пробкой смешивают 50 мл 40% раствора формалина с 2 мл 0,5% спиртового раствора фенолфталеина; полученную смесь титруют 0,2 М раствором  $\text{NaOH}$  до слаборозового окрашивания (несколько капель) и затем фильтруют. Формольная смесь готовится каждые 3 дня и должна иметь слаборозовую окраску, которую при необходимости восстанавливают добавлением 1-2 капель 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ . Раствор формалина для нейтрализации кислотности обрабатывают в течение суток порошком мела, после чего осадок мела удаляют фильтрованием.

Буферный раствор с  $\text{pH} = 9,2$ : 12,4 г  $\text{H}_3\text{BO}_3$  и 14,9 г  $\text{KCl}$  растворяют в 26,7 мл 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$  в мерной колбе на 200 мл и доводят объем раствора в колбе до метки дистиллированной водой.

0,2 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 5,444 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

Буферный раствор с  $\text{pH} = 7,0$ : в мерной колбе на 200 мл смешивают 50 мл 0,2 М раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 29,1 мл 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$  и доводят объем раствора в колбе дистиллированной водой до метки.

**Ход определения.** 5 г размолотого высушенного растительного материала помещают в коническую колбу на 150 мл, приливают 50 мл дистиллированной воды, закрывают пробку и встряхивают на встряхивателе в течение 30 минут. Затем полученную смесь переносят в фарфоровую чашку на марлю, уложенную в 4 слоя, и отжимают в чашку растительный экстракт, содержащий свободные аминокислоты.

При анализе сочного растительного материала (клубни картофеля, корнеплоды, овощи, плоды и ягоды) взвешенную растительную пробу растирают в фарфоровой ступке пестиком с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы, после чего приливают 50 мл дистиллированной воды и интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут. Растительный экстракт по выше указанной методике отжимают через 4 слоя марли в фарфоровую чашку.

Для проведения формольного титрования в стаканчике на 100 мл смешивают 2 мл растительного экстракта, содержащего свободные аминокислоты, с 18 мл дистиллированной воды и 5 каплями раствора бромтимола синего. Если полученная смесь имеет синюю окраску, ее осторожно по каплям нейтрализуют 0,05 М раствором  $\text{HCl}$ , а если желтую окраску – 0,05 М раствором  $\text{NaOH}$  до образования желто-зеленого окрашивания ( $\text{pH} = 7,0$ ). При этом добиваются получения такой интенсивности окрашивания, как и в контрольной пробе, которую готовят в отдельном стаканчике на 100 мл, приливая в него 20 мл буферного раствора с  $\text{pH} = 7,0$  и 5 капель раствора бромтимола синего.

В нейтрализованную до  $\text{pH} = 7,0$  смесь приливают из мерного цилиндра 2 мл формольного реагента и титруют опытную пробу 0,05 М раствором  $\text{NaOH}$  до образования сине-фиолетового окрашивания, сравнивая интенсивность окрашивания с цветом контрольной пробы, которую готовят в отдельном стаканчике на 100 мл, приливая в него 20 мл буферного раствора с  $\text{pH} = 9,2$ , 5 капель раствора бромтимола синего и 3 капли 0,5% спиртового раствора фенолфталеина. Для введения поправки в отдельном стаканчике на 100 мл смешивают 20 мл дистиллированной воды, 5 капель раствора бромтимола синего и 3 капли 0,5% спиртового раствора фенолфталеина и полученную смесь титруют 0,05 М раствором  $\text{NaOH}$ .

Если экстракт аминокислот бесцветный и прозрачный, объем экстракта для формольного титрования можно увеличить до 5-10 мл.

**Обработка и оценка результатов.** Содержание азота аминокислот в растительной пробе вычисляют по следующей формуле:

$$CA = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,7 \cdot 50 \cdot 100}{H \cdot 2},$$

где CA – содержание азота аминокислот в растительной пробе, мг%;

$V_1$  – объем 0,05 М раствора NaOH, затраченный на титрование опытной пробы, мл;

$V_2$  – объем 0,05 М раствора NaOH, затраченный на титрование 20 мл воды, мл;

0,7 – коэффициент пересчета на азот аминокислот, мг;

50 – общий объем экстракта аминокислот, полученный из растительной пробы, мл;

100 – коэффициент пересчета на 100 г растительной пробы;

H – навеска растительной пробы, г;

2 – объем экстракта аминокислот, взятый для формольного титрования, мл.

Полученный результат сравнивается с литературными данными и результатами анализа других растительных образцов. На основе рассчитанного показателя делается вывод о содержании свободных аминокислот в анализируемой растительной пробе и направленности происходящих в ней биохимических процессов.

### Контрольные вопросы

1. Какие стереоизомеры аминокислот синтезируются в живых организмах?
2. В чем состоят структурные и биологические особенности протеиногенных аминокислот?
3. Что выражает понятие «незаменимые аминокислоты»?
4. Какие образуются продукты при взаимодействии аминокислот с редуцирующими сахарами и как они влияют на товарные свойства растительной продукции?
5. Какие образуются продукты при взаимодействии аминокислот с кислородом воздуха и как они влияют на товарные свойства растительной продукции?
6. Какие вредные побочные продукты образуются из аминокислот в бродильном производстве?
7. В чем состоит принцип определения аминокислот методом формольного титрования?

8. Как получают экстракт свободных аминокислот из растительной пробы?
9. Каковы особенности формольного титрования экстракта аминокислот, выделенного из растительной пробы?
10. Как производится расчет содержания аминокислот в растительной пробе?
11. В зависимости от каких факторов изменяется концентрация аминокислот в растительных тканях?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

Белки представляют собой высокомолекулярные биополимеры, молекулы которых построены из остатков протеиногенных аминокислот, соединенных пептидными связями. Протеиногенные аминокислоты отличаются тем, что они кодируются в структуре белков кодонами генетического кода. Однако под воздействием физиологической среды остатки некоторых протеиногенных аминокислот в молекулах белков могут подвергаться модификации, в ходе которой образуются их структурные аналоги. Если белковые молекулы содержат только остатки аминокислот, соединенные пептидными связями, их называют протеинами. Кроме аминокислотных остатков молекулы белков могут включать другие группировки не аминокислотной природы и такие белки называют протеидами.

Белковые молекулы выполняют в организмах жизненно важные функции. Все биохимические реакции в клетках организмов происходят с участием каталитически активных белков – ферментов. Структурные белки участвуют в построении биологических мембран цитоплазмы и внутриклеточных органоидов. Активную роль в обмене веществ организмов играют регуляторные и транспортные белки, способные обратимо изменять конформацию своих молекул. Белки иммунной системы организма выполняют защитную функцию. В запасающих тканях растений откладываются запасные белки, которые служат источниками энергии и протеиногенных аминокислот для формирующихся проростков.

Белки в значительной степени определяют питательную ценность и технологические свойства растительной продукции. Они служат основными источниками незаменимых аминокислот для человека и животных. По средним нормам питания человеку необходимо потреблять 8-10 г полноценного белка в расчете на 1 МДж обменной энергии, содержащейся в пище; коровам – 8-12 г, свиньям – 10-14 г, птице – 12-15 г. Обменная энергия – часть общей энергии пищи человека или корма животных, доступная для использования в процессе обмена веществ организма.

Учитывая важную роль белков в питании человека и кормлении сельскохозяйственных животных, содержание белков контролируется в растительной продукции и относится к наиболее важным показателям качества зерна злаковых и зернобобовых культур, семян масличных растений, клубней картофеля, корнеплодов, овощей, плодов и ягод, вегетативной массы кормовых трав и кукурузы. Много белков накапливается в зерне зернобобовых культур – 20-30%, в сое и люпине.

не – 30-40%, в семенах масличных растений – 15-30%. Содержание белков в другой растительной продукции составляет, %:

Зерновки злаковых культур	8-18	Брюссельская капуста	5-6
Зерно кукурузы	8-11	Чеснок	6-8
Зерно риса	6-9	Плоды и ягоды	1-2
Клубни картофеля	1,5-2	Вегетативная масса (в расчете на сухое вещество перед цветением):	
Корнеплоды	1-1,5	бобовых трав	15-25
Овощи	0,5-2	мятликовых трав	5-15
Цветная капуста	2-4		

Количественное определение белков наиболее точно осуществляется методом Кильдаля по белковому азоту, который умножают на коэффициент пересчета в белки для соответствующего вида растительной продукции: зерно злаков – 5,7-5,8; зерно гречихи и зернобобовых культур – 6,0; семян масличных растений – 5,5; клубни картофеля, корнеплоды, овощи, плоды и ягоды, вегетативная масса растений – 6,25. Белковый азот определяют методом Кильдаля после удаления из анализируемой пробы небелковых азотистых веществ и озоления в серной кислоте осадка растворимых белков, а также структурных белков растительного остатка.

Очень часто при оценке химического состава растительной продукции используют более простые и быстрые методы определения белков, в которых используются цветные реакции на белки. Одним из таких методов является биуретовый метод, способный обеспечивать достаточно высокую точность определения белков в растворе при их концентрациях от 0,04 до 2 мг/мл.

**Принцип метода.** Биуретовый метод основан на способности катионов меди (II) при взаимодействии в щелочной среде с группировками пептидных связей белков формировать устойчивые комплексы, окрашенные в сине-фиолетовый цвет. Интенсивность окрашивания зависит от концентрации белков в растворе. Количество белков в растворе определяют при сопоставлении оптической плотности анализируемого окрашенного раствора и набора окрашенных белковых растворов с известной концентрацией белков.

**Оборудование.** Баня водяная терморегулируемая; весы технические с точностью взвешивания  $\pm 0,01$  г; весы аналитические; центрифуга с набором центрифужных пробирок; фотоэлектроколориметр или спектрофотометр с набором кювет; пипетки дозирующие на 1-10 мл; бюретки на 10-20 мл; ступки фарфоровые с пестиками диаметром 10 см; preparативный набор для измельчения растительного материала; мерные колбы с пробками на 50, 100, 200, 500 и 1000 мл; стеклян-

ные стаканы на 150-200 мл; пробирки на 20 мл; воронки стеклянные диаметром 5-8 см; беззольные фильтры.

**Реактивы.** Спирт этиловый 96%; гидроксид натрия; мочевина; калий-натрий виннокислый; медь сернокислая ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ); калий йодистый; уголь активированный; тимол; белок растительный чистый; вода дистиллированная (свободная от  $\text{CO}_2$ ).

**Приготовление растворов.** 0,2 М раствор  $\text{NaOH}$ : 8 г  $\text{NaOH}$  помещают в термостойкий стакан и растворяют в дистиллированной воде; после охлаждения полученный раствор переносят в мерную колбу на 1 л, доводят объем в колбе до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешивают.

4% раствор  $\text{NaOH}$ : 4 г  $\text{NaOH}$  помещают в термостойкий стакан и растворяют в дистиллированной воде; после охлаждения полученный раствор переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят объем в колбе до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешивают.

Спиртовой раствор щелочи: в мерную колбу на 200 мл приливают 100 мл 96% этилового спирта и доводят объем в колбе до метки 4% раствором  $\text{NaOH}$ , затем содержимое колбы тщательно перемешивают.

Раствор мочевины: в химический стакан объемом 1 л помещают 300 г мочевины и 0,5 г тимола, приливают 700 мл дистиллированной воды и полученную смесь нагревают до полного растворения мочевины и тимола; затем в раствор добавляют 3 г активированного угля, тщательно его перемешивают и фильтруют в мерную колбу на 1 л; объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и содержимое колбы тщательно перемешивают.

Биуретовый реагент: 9 г калия-натрия виннокислого помещают в химический стакан и растворяют в 400 мл 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ , затем в полученный раствор добавляют 3 г сернокислой меди и перемешивают его до полного растворения внесенного реагента; на следующем этапе в образовавшийся раствор добавляют 5 г йодистого калия и полученную смесь перемешивают до полного растворения йодида калия (если необходимо смесь нагревают); после охлаждения полученный раствор переносят количественно в мерную колбу на 1 л с использованием 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ , доводят объем раствора в колбе до метки и содержимое колбы тщательно перемешивают. Биуретовый реагент хранят в темной склянке.

Стандартный белковый раствор: 0,4 г чистого растительного белка растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл, в результате чего образуется белковый раствор с концентрацией белка 4 мг/мл.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 1-2 г растирают в ступке до получения однородной массы, затем приливают 3 мл спир-

того раствора щелочи и полученную смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут для экстрагирования белков. После этого смесь из ступки переносят в центрифужную пробирку и подвергают центрифугированию с центробежным ускорением 5000 г в течение 10 минут. Прозрачную надосадочную жидкость в центрифужной пробирке переливают в стеклянную пробирку и далее используют для получения окрашенного раствора. Для этого в стеклянную пробирку на 20 мл с помощью дозирующей пипетки вносят 0,2 мл белкового раствора, выделенного из растительной пробы, и к нему из бюретки добавляют 2,4 мл раствора мочевины и 2,4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и затем пробирку выдерживают в течение 10 минут на водяной бане при температуре 40°C для формирования устойчивого окрашивания. После охлаждения окрашенный раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 670 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см. После измерения оптической плотности окрашенного белкового раствора по градуировочному графику определяют количество белка в аликвоте 0,2 мл, взятой для приготовления окрашенного раствора.

Для построения градуировочного графика колориметрированию подвергаются окрашенные растворы с известной концентрацией белков. По вертикальной оси откладываются значения оптической плотности окрашенных растворов с известной концентрацией белков, а по горизонтальной оси количество белка в мг, содержащегося в 0,2 мл взятого для окрашивания белкового раствора. Набор растворов с известной концентрацией белков готовится в мерных колбах на 10 мл, в которые приливают соответственно 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 6; 8; 10 мл стандартного белкового раствора с концентрацией белков 4 мг/мл. Объем раствора в мерных колбах на 10 мл доводят до метки спиртовым раствором щелочи и их содержимое тщательно перемешивают. Из каждой колбы отбирают по 0,2 мл белкового раствора и производят их окрашивание по выше указанной методике с использованием раствора мочевины и биуретового реактива. В каждой аликвоте белкового раствора объемом 0,2 мл будет содержаться соответственно 0,12; 0,2; 0,28; 0,36; 0,48; 0,64; 0,8 мг белка.

Если оптическая плотность опытной пробы выходит за пределы градуировочного графика, то проводится повторное проведение окрашивания белкового раствора после его соответствующего разбавления. При этом не допускается разбавление окрашенного раствора, так как оно вносит ошибку в измерение оптической плотности.

**Обработка и оценка результатов.** Массовую долю белков в анализируемой растительной пробе рассчитывают с учетом разбавления по следующей формуле:

$$X = \frac{M_6 \cdot 3 \cdot 100}{H \cdot 0,1},$$

где X – содержание белков в анализируемой растительной пробе, %;

M<sub>6</sub> – масса белков в 0,2 мл спиртового раствора, выделенного из растительной пробы, мг;

H – навеска растительного материала, взятая для анализа, мг;

3 – общий объем выделенного из растительной пробы белкового раствора, мл;

0,2 – объем выделенного белкового экстракта, взятый для приготовления окрашенного раствора, мл;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Полученный результат сравнивают с теоретическими данными и оценивают качество растительной продукции по данному показателю.

### Контрольные вопросы

1. Какие функции выполняют белки в клетках организмов?
2. Какова роль белков в питании человека и кормлении животных?
3. Как различаются по содержанию белков различные виды растительной продукции?
4. Какими методами определяют содержание белков в растительной продукции?
5. Какие принципы положены в основу определения белков биуретовым методом?
6. Каковы особенности выделения белков из растительных проб для их количественного определения биуретовым методом?
7. Как проводится окрашивание белкового раствора с использованием биуретового реагента?
8. Какова методика построения градуировочного графика?
9. Как осуществляется расчет массовой доли белков в анализируемой растительной пробе по результатам колориметрирования окрашенных белковых растворов с использованием биуретового реагента?
10. Какое влияние оказывают природно-климатические факторы и режим питания растений на содержание белков в растительной продукции?

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

В биохимических опытах очень часто возникает необходимость оценивать концентрацию в растворе белков на промежуточных этапах их изучения с сохранением нативных свойств белковых молекул для проведения дальнейших исследований. Для этих целей разрабатываются модификации их количественного определения с помощью спектрального анализа. Одним из таких методов является определение белков на основе измерения оптической плотности их растворов в ультрафиолетовом диапазоне при длине волны 280 нм.

**Принцип метода.** Метод основан на способности группировок ароматических аминокислот в составе белковых молекул (тирофина, триптофана, фенилаланина) поглощать ультрафиолетовое излучение при длине волны 280 нм. Белки выделяют из растительной пробы соответствующим растворителем (вода, солевой раствор, щелочной буферный раствор и др.) с последующим центрифугированием и затем на спектрофотометре измеряют оптическую плотность полученного белкового раствора при длине волны 280 нм. Количество белков в растворе оценивают при сопоставлении оптической плотности анализируемого белкового раствора с оптической плотностью стандартного белкового раствора с известной концентрацией белков.

Если в анализируемом белковом растворе повышена концентрация нуклеиновых кислот, то они вносят ошибку в определение белков, так как способны поглощать ультрафиолетовое излучение при длине волны 280 нм, а максимум их поглощения наблюдается при длине волны 260 нм. Поэтому в данном случае спектрофотометрирование белкового раствора проводится при длинах волн 260 нм и 280 нм, а затем влияние нуклеиновых кислот на оптическую плотность белкового раствора исключается путем внесения соответствующей поправки.

**Оборудование.** Лабораторные весы; фарфоровые ступки с пестиками диаметром 6-8 см; центрифужные пробирки на 20 мл; среднескоростная центрифуга с центробежным ускорением до 15000 г; стеклянные пробирки на 20 мл; дозирующие пипетки на 0,1-1 мл, 1-5 мл; мерные колбы на 50, 100, 500, 1000 мл; стеклянные воронки диаметром 5-6 см; спектрофотометр с кварцевыми кюветами.

**Реактивы.** Натрий хлористый; белок растительный стандартный; вода дистиллированная.

**Приготовление растворов.** 1% раствор хлорида натрия: 1 г хлорида натрия растворяют в 99 г дистиллированной воды и полученный раствор тщательно перемешивают.

Стандартный белковый раствор: в мерной колбе на 100 мл растворяют 100 мг растительного белка с использованием 1% раствора хло-

рида натрия, объем раствора в колбе доводят до метки и содержимое колбы тщательно перемешивают.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 1 г (зерно злаковых, зернобобовых культур, семян масличных растений, картофель, корнеплоды, овощи, плоды и ягоды), взвешенную с точностью до 0,01 г, растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. К полученной смеси приливают 10 мл 1% раствора хлористого натрия и содержимое ступки интенсивно перемешивают в течение 15 минут. Затем смесь из ступки переносят в центрифужные пробирки и подвергают центрифугированию со скоростью 10-12 тысяч оборотов в минуту в течение 10 минут.

Полученный после центрифугирования белковый раствор переливают в стеклянную пробирку на 20 мл. Затем 0,2 мл этого раствора переносят дозирующей пипеткой в другую стеклянную пробирку на 20 мл, приливают 9,8 мл раствора хлорида натрия и содержимое пробирки тщательно перемешивают. Приготовленный таким образом разбавленный белковый раствор фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 280 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см. Затем по калибровочному графику определяют количество белков в анализируемом растворе.

Для построения калибровочного графика из стандартного белкового раствора путем разбавления готовят шкалу рабочих растворов с известной концентрацией белка. Для этого в 9 стеклянных пробирок на 20 мл вносят соответственно 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,2; 2,6 мл исходного стандартного белкового раствора, доводят объем раствора до 10 мл 1% раствором хлорида натрия и содержимое пробирок тщательно перемешивают. В приготовленных рабочих растворах будет содержаться соответственно 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,2; 2,6 мг белка. Рабочие белковые растворы фотометрируют по выше указанной методике при длине волны 280 нм и по полученным значениям оптической плотности строят калибровочный график.

**Обработка и оценка результатов.** Массовую долю белков в анализируемой растительной пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{M_b \cdot 10 \cdot 100}{H \cdot 0,2},$$

где  $X$  – массовая доля белков в растительной пробе, %;

$M_b$  – масса белков в фотометрируемой пробе, определенная по калибровочному графику, мг;

$H$  – объем белкового экстракта, выделенный из растительной пробы, мл;

100 – коэффициент пересчета в %;

Н – исходная навеска растительного материала, г;

0,2 – объем белкового раствора, взятый для приготовления фотометрируемой пробы, мл.

Если в анализируемой пробе содержатся нуклеиновые кислоты, концентрацию в ней белков определяют с учетом поправки на поглощение ультрафиолетового излучения нуклеиновыми кислотами по следующей формуле:

$$C_6 = 1,45E_{280} - 0,74E_{260},$$

где  $C_6$  – концентрация белков в анализируемом растворе, мг/мл;

$E_{280}$  – отсчет оптической плотности белкового раствора, определенный при длине волны 280 нм;

$E_{260}$  – отсчет оптической плотности белкового раствора, определенный при длине волны 260 нм;

1,45 – поправка на поглощение нуклеиновыми кислотами;

0,74 – поправка на поглощение группировками ароматических аминокислот, находящимися в составе белков.

Рассчитанную по указанной формуле концентрацию белков (мг/мл) умножают на объем раствора в пробирке (10 мл) и таким образом получают количество белков (Мб) в мг, которое содержится в 0,2 мл белкового экстракта, выделенного из навески растительного материала. Окончательный расчет массовой доли белков в растительной пробе выполняется по исходной формуле, представленной на странице 44.

На основе полученного результата оценивают качество растительной пробы, ее питательные, кормовые и технологические свойства.

### Контрольные вопросы

1. В чем состоят особенности определения белков спектрофотометрическим методом?
2. Как выделяют белки из растительной пробы?
3. Как учитывают поправку на нуклеиновые кислоты при определении белков спектрофотометрическим методом?
4. Какие белки можно определять спектрофотометрическим методом?
5. По какой методике проводится фотометрирование белковых растворов?
6. Каковы особенности приготовления шкалы рабочих растворов с известной концентрацией белков?
7. В чем заключается преимущество спектрофотометрического метода определения белков по сравнению с другими методами?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ ПО А.Н. БАХУ И А.И. ОПАРИНУ

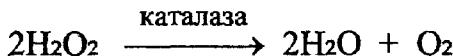
Нормальное осуществление биохимических реакций в живых организмах оказывается возможным благодаря тому, что в их клетках имеются биологические катализаторы, называемые ферментами. Они представляют собой специализированные формы белковых молекул, обладающих способностью катализировать биохимические превращения в клетках организмов. Каталитическая способность молекул ферментов выражается специальным показателем, который называют активностью фермента. Этот показатель можно определить по количеству прореагировавшего субстрата или по накоплению продуктов реакции в единицу времени. На основе указанных измерений оценивается скорость ферментативного превращения субстрата – вещества, на которое направлено действие фермента.

При определении активности ферментов в искусственной системе (вне организма) самая высокая скорость ферментативного превращения субстрата наблюдается в начале ферментативной реакции, а затем скорость реакции уменьшается вследствие понижения концентрации субстрата и одновременного накопления образующихся продуктов, инициирующих прохождение обратной реакции. Поэтому каталитическую активность ферментов рекомендуется определять по начальной скорости реакции и за возможно короткий промежуток времени. При этом создаются оптимальные условия для проявления каталитической способности ферментных молекул (оптимальные температура, pH и ионный состав среды).

Каталитическую активность ферментов принято измерять в катализах (сокращенно кат) или производных от катала единицах – микрокатализах (мккат), нанокатализах (нкат), пикокатализах (пкат). Один катал – это каталитическая активность, способная катализировать превращение 1 моля субстрата за 1 секунду при оптимальных условиях для действия фермента. В катализах и производных от него единицах измеряется общая активность фермента, которая зависит как от каталитических свойств ферментного белка, так и количества ферментных молекул, участвующих в данной реакции. Для характеристики каталитических свойств молекул ферментов используется показатель – удельная активность фермента, который выражается в катализах и производных от него единицах в расчете на единицу массы ферментного белка или на единицу массы биологического источника, из которого выделен фермент. В последнем случае показатель удельной активности выражает содержание фермента в биологическом источнике.

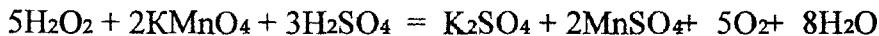
Важную функцию в организмах выполняет фермент каталаза (1.11.1.6), который предотвращает накопление пероксида водорода,

инициирующего пероксидное окисление большого набора органических веществ и способного оказывать повреждающее воздействие на клеточные мембранны. Этот фермент катализирует разложение пероксида водорода на воду и кислород:



Каталаза в качестве кофермента содержит группировку протогема, включающую железо в виде  $\text{Fe}^{3+}$ . Молекулы данного фермента представляют собой тетрамерные белки с молекулярной массой 250000, обладающие очень высокой каталитической активностью ( $2 \cdot 10^5$  кат в расчете на 1 моль каталитических центров). В биохимических исследованиях и при оценке качества растительной продукции широкое распространение имеет метод определения активности каталазы, разработанный А.Н. Бахом и А.И. Опаринным.

**Принцип метода.** Определение активности каталазы указанным методом основано на экстрагировании водой фермента из биологического материала, после чего в течение определенного времени проводится ферментная реакция при добавлении к раствору пероксида водорода водного экстракта каталазы. По окончании ферментной реакции в реакционной среде определяется количество пероксида водорода, которое не разложилось под действием фермента, титрованием в кислой среде раствором перманганата калия согласно следующей реакции:



Одновременно с анализируемой пробой проводится определение количества пероксида водорода, оставшегося неразложившимся после проведения реакции с пероксидом водорода инактивированного фермента (контрольный вариант). В данной реакции происходит частичное разложение пероксида водорода неферментативным путем. По разнице между титрованием контроля и анализируемой пробы определяется количество пероксида водорода, которое подверглось разложению на воду и кислород под действием каталазы, и полученный результат используют для расчета каталитической активности фермента.

**Оборудование.** Ступки фарфоровые с пестиками диаметром 8-10 см или гомогенизатор; марля для фильтрования; чашки фарфоровые диаметром 6-8 см; колбы конические на 50 мл и 150 мл; дозирующие пипетки на 1-10 см; дозирующее устройство на 5 мл для раствора серной кислоты; мерные колбы на 100 мл и на 1 л с пробками; темные склянки для растворов пероксида водорода и перманганата калия; бюретки для титрования на 20 мл, термостат.

**Реактивы.** Дистиллированная вода; концентрированный раствор пероксида водорода; концентрированная серная кислота; фиксанал перманганата калия.

**Приготовление растворов.** 1% раствор пероксида водорода: готовится свежий раствор перед каждым анализом путем разбавления концентрированного раствора в мерной колбе на 100 мл. Приготовленный раствор переливают в темную склянку.

10% раствор серной кислоты: в фарфоровый стакан на 500 мл наливают 300 мл дистиллированной воды, к которой с помощью дозирующего устройства приливают 60,6 мл концентрированной серной кислоты, полученную смесь перемешивают и после охлаждения переливают в мерную колбу на 1 л, ополаскивая стакан дистиллированной водой. Затем объем раствора в колбе доводят водой до метки и перемешивают. Приготовление данного реактива выполняется в вытяжном шкафу.

0,1 н раствор перманганата калия: готовится из фиксанала в мерной колбе на 1 л. Приготовленный раствор переливают в темную склянку.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 2 г (клубни картофеля, корнеплоды, проростки семян злаковых, зернобобовых, масличных культур, овощи, плоды и ягоды, вегетативная масса растений) взвешивают на лабораторных весах с точностью до 0,01 г и растирают в ступке или измельчают в гомогенизаторе до получения однородной массы. В случае необходимости в ступку для лучшего растирания растительного материала добавляется в небольшом количестве чистый кварцевый песок. К измельченному в ступке материалу приливается дозирующей пипеткой 20 мл дистиллированной воды для экстракции ферментного белка и полученную смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут. Затем в фарфоровую чашку помещают уложенную в 4 слоя марлю и на нее переносят полученную смесь из ступки, заворачивают края марлевой ткани и отжимают через 4 слоя марли растительный экстракт с растворенным ферментным белком.

В ходе последующего анализа в 2 конические колбы на 150 мл дозирующей пипеткой вносят по 5 мл ферментного экстракта и в одну из колб для инактивации ферментного белка (контроль) с помощью дозирующего устройства приливают 5 мл 10% раствора серной кислоты и смесь перемешивают. После этого в обе колбы дозирующей пипеткой приливают по 1 мл 1% раствора пероксида водорода, смеси перемешивают и помещают на 15 минут в терmostатированную камеру при температуре 30°C. Реакция проводится в отсутствие света, который активизирует самопроизвольный распад пероксида водорода

на кислород и воду. Отсчет времени ферментной реакции начинается в тот момент, когда к ферментному раствору приливается раствор пероксида водорода. По истечении 15 минут теперь уже в колбу с активным ферментом для его инактивации приливается 5 мл 10% раствора серной кислоты и в этот момент фиксируется точное время прекращения ферментативной реакции.

Количество неразложившегося пероксида водорода в контрольной колбе и в колбе с активным ферментом определяется титрованием 0,1 н раствором перманганата калия до получения слабо розового окрашивания, не исчезающего в течение одной минуты. Результаты титрования далее используются для расчета активности определяемого фермента.

**Обработка и оценка результатов.** Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 50 \cdot 20}{H \cdot 5 \cdot t},$$

где A – активность каталазы в мккат в расчете на 1 г растительной массы;

$V_1$  – количество раствора перманганата калия, затраченного на титрование контроля (с инактивированным ферментом), мл;

$V_2$  – количество раствора перманганата калия, затраченного на титрование пробы с активным ферментом, мл;

50 – коэффициент пересчета мл 0,1 н раствора перманганата калия в микромоли пероксида водорода;

20 – общий объем ферментного экстракта, полученного из навески растительного материала, мл;

H – навеска растительного материала, г;

5 – объем ферментного экстракта, взятый для проведения ферментативной реакции, мл;

$t$  – время ферментативной реакции в секундах.

Полученный показатель активности каталазы сравнивают с результатами анализа других растительных образцов и дают оценку происходящих в них биохимических процессов.

### Контрольные вопросы

1. Каковы общие принципы определения катализитической активности ферментов?
2. В каких единицах измеряется активность ферментов?

3. Какое значение для организмов имеет фермент каталаза?
4. Каковы принципы определения активности каталазы по методу А.Н. Баха и А.И. Опарина?
5. Как получают ферментный экстракт при определении активности каталазы?
6. Каковы особенности проведения реакции ферментного экстракта с раствором пероксида водорода?
7. Для чего нужен контрольный вариант при определении активности каталазы по методу А.Н. Баха и А.И. Опарина?
8. Как проводится титрование неразложившегося пероксида водорода раствором перманганата калия?
9. Как рассчитывают активность каталазы по результатам анализа?
10. Как используется показатель активности каталазы для оценки биохимических процессов, происходящих в растительной продукции?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗ В ПРОРАСТАЮЩИХ ЗЕРНОВКАХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Амилазы – однокомпонентные ферменты, которые катализируют гидролитическое расщепление  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связей в молекулах крахмала. У растений они представлены большими наборами изоферментов. К амилазам относятся  $\alpha$ -амилаза (3.2.1.1),  $\beta$ -амилаза (3.2.1.2), глюкоамилаза (3.2.1.3).

$\alpha$ -Амилазы действуют на  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связи в молекулах крахмала и расщепляют их на более мелкие фрагменты, представляющие собой низкомолекулярные полисахариды – декстрини. В молекулах амилопектина эти ферменты подвергают гидролизу  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связи между точками ветвления полисахаридной цепи, поэтому без их участия невозможно полное гидролитическое расщепление амилопектина. Для проявления каталитической активности  $\alpha$ -амилаз необходимо присутствие в реакционной среде хлорид-ионов, которые служат активаторами фермента.

Под действием  $\beta$ -амилаз происходит гидролитическое расщепление  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связей на концах полисахаридных цепей целых молекул или декстринов с образованием мальтозы. Действие этих ферментов прекращается при достижении точек ветвления молекул крахмала, в которых глюкозные остатки соединены  $\alpha(1\rightarrow6)$ -связями.

Глюкоамилазы так же, как и  $\beta$ -амилазы, катализируют гидролиз  $\alpha(1\rightarrow4)$ -связей на концах полисахаридных цепей, но в результате действия этих ферментов от концов полисахаридных цепей отщепляются молекулы глюкозы. Глюкоамилазы в наибольшем количестве содержатся в биологических источниках микробного происхождения и меньше их синтезируется в растительных продуктах.

Препараты, содержащие амилолитические ферменты, используются в производстве хлеба, пива, пищевого спирта, а также в качестве кормовых добавок в животноводстве для улучшения перевариваемости пищеварительной системой животных крахмала, содержащегося в кормах.

Особенно высокая активность амилаз наблюдается при прорастании семян, клубней и луковиц, когда в них происходит интенсивный распад полисахаридов крахмала и увеличивается концентрация декстринов, мальтозы и глюкозы, используемых для формирования тканей проростков. Высокая активность амилаз характерна для солода, который получают путем высушивания проросшего зерна злаковых культур.

При повышении активности амилаз в продовольственном зерне, используемом для производства хлеба, макарон и крупы, ухудшаются

его технологические свойства. В хлебопекарном тесте амилазы осахаривают крахмал, обеспечивая субстратами процесс брожения и образования диоксида углерода для разрыхления теста, формирования пористости хлебного мякиша. Повышенная амилазная активность в тесте (особенно  $\alpha$ -амилаз) инициирует чрезмерное газообразование и превращение крахмала в декстрины, что ухудшает свойства хлебного мякиша (заминаемость, солодовый привкус).

При изучении амилолитических ферментов зерна пшеницы выяснено, что активность  $\alpha$ -амилаз в зерновках возрастает при усилении азотного питания растений. Под действием азотных удобрений в зерновках пшеницы снижается концентрация водорастворимых белков, в составе которых содержатся белки, являющиеся ингибиторами амилаз. В связи с этим меньше ферментных белков связывается ингибиторами в неактивные комплексы и больше остается каталитически активных свободных форм  $\alpha$ -амилаз.

Исследования состава ферментных белков зерна показали, что повышение активности  $\alpha$ -амилаз в зрелых зерновках пшеницы, вызванное внесением азотных удобрений, при относительно сухой погоде в период их созревания обусловлено  $\alpha$ -амилазами «созревания», которые не полностью переходят в связанный форму. Высокий уровень  $\alpha$ -амилазной активности в зерновках, сформировавшихся во влажных условиях, в значительной степени связан с ферментными белками, которые синтезируются в результате начавшегося процесса прорастания зерна.

**Принцип метода.** Выделенный из растительной пробы ферментный экстракт, содержащий  $\alpha$  и  $\beta$ -амилазы, добавляют в раствор крахмала с заданным значением pH и в течение определенного времени смесь выдерживают при оптимальной температуре. Затем ферментативную реакцию останавливают путем инактивации амилаз и оставшийся негидролизованный крахмал определяют колориметрически по реакции с йодом, который дает с крахмалом сине-фиолетовое окрашивание. Общее количество крахмала в растворе определяют также колориметрически после проведения реакции с ферментной пробой, которая подвергается инактивации перед добавлением ее к раствору крахмала; или вместо ферментной пробы в инкубуируемую смесь добавляют такой же объем растворителя, который используется для экстракции ферментных белков. По разнице результатов, полученных в реакциях с инактивированными и активными ферментами, вычисляют суммарную активность  $\alpha$  и  $\beta$ -амилаз, выделенных из растительной пробы.

Активность  $\alpha$ -амилаз, содержащихся в ферментном экстракте, определяют с помощью указанных выше реакций после тепловой инактивации  $\beta$ -амилаз, которые подвергаются денатурации при тем-

пературе 70°C, тогда как  $\alpha$ -амилазы в данных условиях полностью сохраняют свою катализическую активность. Активность  $\beta$ -амилаз рассчитывают при вычитании из суммарной амилазной активности показателя активности  $\alpha$ -амилаз. Учитывая, что активаторами амилаз служат хлорид-ионы, для экстракции этих ферментов из растительной пробы используется раствор хлористого натрия.

**Оборудование.** Фарфоровые ступки с пестиками диаметром 8-10 см или гомогенизатор; лабораторные весы; марля для фильтрования; фарфоровые чашки диаметром 6-8 см; терморегулируемая водяная баня; термостат; дозирующие пипетки на 1-10 мл; мерные колбы с пробками на 50, 200 и 1000 мл; капельница для раствора йода; штатив с пробирками на 20 мл; фотоэлектроколориметр с набором кювет, темная склянка для хранения йодного реактива.

**Реактивы.** Хлористый натрий; водорастворимый крахмал; йодистый калий; кристаллический йод; концентрированная уксусная кислота, гидроксид натрия, дистиллированная вода; концентрированная соляная кислота; уксуснокислый кальций.

**Приготовление растворов.** 1% раствор хлористого натрия: в мерной колбе на 1 л растворяют 10 г химически чистого хлористого натрия.

0,2 М ацетатный буферный раствор (рН=5,5): 27,22 г ацетата натрия ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в 1 л дистиллированной воды; 2,3 мл концентрированной уксусной кислоты (1,05 г/см<sup>3</sup>) растворяют в 200 мл дистиллированной воды; затем смешивают 885 мл раствора уксуснокислого натрия и 115 мл раствора уксусной кислоты.

2% раствор крахмала: в химическом стакане на 400 мл 4 г водорастворимого крахмала смешивают с 50 мл дистиллированной воды и к ним приливают 150 мл горячей воды (70-80°C), затем полученную смесь при помешивании нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения крахмала. Охлажденный раствор крахмала далее используют для определения активности амилаз.

1 М раствор соляной кислоты: 41,16 мл концентрированной соляной кислоты (1,19 г/см<sup>3</sup>) растворяют в 200 мл дистиллированной воды и после охлаждения полученный раствор переливают в мерную колбу на 500 мл, объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

0,1 М раствор соляной кислоты: 50 мл 1 М раствора соляной кислоты разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

0,3% раствор йода в 3% растворе йодистого калия: 0,3 г йода и 3 г йодистого калия при нагревании растворяют в 50 мл дистиллированной воды, полученный раствор после охлаждения количественно переносят

в мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора в колбе до метки водой и перемешивают. Раствор хранят в темной склянке.

**Ход определения.** Навеску прорастающего зерна 1 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. К полученной смеси приливают 10 мл 1% раствора хлористого натрия и содержимое ступки интенсивно перемешивают в течение 15 минут. Затем смесь из ступки переносят на марлевую ткань, уложенную в 4 слоя на фарфоровую чашку, и отжимают растительный экстракт, содержащий амилолитические ферменты, в чашку.

Примерно половину ферментного раствора дозирующей пипеткой переносят из чашки в пробирку, добавляют несколько кристалликов уксуснокислого кальция для стабилизации  $\alpha$ -амилаз и помещают на 15 минут в водянную баню, в которой поддерживается температура 70°C. При такой температуре происходит тепловая денатурация  $\beta$ -амилаз. После отстаивания прозрачный ферментный раствор из пробирки, содержащий активные  $\alpha$ -амилазы, используют для дальнейшего анализа.

На следующем этапе в 3 стеклянные пробирки на 20 мл дозирующей пипеткой приливают по 3 мл ацетатного буферного раствора (pH=5,5) и 2% раствора крахмала, содержимое пробирок перемешивают и 5 минут выдерживают в термостате при температуре 40°C. Затем в одну из пробирок приливают 1 мл ферментного экстракта с активными  $\alpha$  и  $\beta$ -амилазами, в другую пробирку 1 мл ферментного экстракта с активными  $\alpha$ -амилазами (после инактивации  $\beta$ -амилаз), а в третью пробирку – 1 мл 1% раствора хлористого натрия, содержимое пробирок перемешивают и все пробирки помещают на 10 минут в термостат, в котором поддерживается температура 40°C. Когда в пробирки приливают активные ферментные экстракты, фиксируют точное время начала реакции. По истечении 15 минут в указанные пробирки приливают по 2 мл 1 M раствора соляной кислоты, содержимое пробирок перемешивают и фиксируют точное время прекращения ферментативной реакции (в кислой среде происходит инактивация амилаз).

Оставшийся в пробирках негидролизованный крахмал определяется окрашиванием с использованием йодного реагента. Для этого из каждой пробирки отбирают пробы по 0,5 мл и вносят их в мерные колбы на 50 мл, в которые предварительно наливают по 40-45 мл дистиллированной воды и 1 мл 0,1 M раствора соляной кислоты. Содержимое колб перемешивают, доводят объем до метки водой, снова перемешивают. Затем в колбы добавляют из капельницы по 3 капли раствора йода в растворе йодистого калия и содержимое колб пере-

мешивают. Окрашенные растворы колориметрируют на фотоэлектро-колориметре при длине волны 595 нм, используя кюветы с толщиной фотометрируемого слоя 1 см.

**Обработка и оценка результатов.** Суммарную активность амилолитических ферментов рассчитывают по формуле:

$$A_{\alpha + \beta} = \frac{(D_3 - D_1) \cdot 60 \cdot 10}{D_3 \cdot 1 \cdot t},$$

где  $A_{\alpha + \beta}$  – суммарная активность амилаз в мг гидролизованного крахмала за 1 мин в расчете на 1 г растительной массы;

$D_3$  – показание фотоэлектроколориметра при определении оптической плотности окрашенного раствора в варианте без добавления к раствору крахмала ферментного экстракта (добавляли 1% раствор хлористого натрия);

$D_1$  – показание фотоэлектроколориметра при определении оптической плотности окрашенного раствора в варианте с добавлением к раствору крахмала ферментного экстракта, содержащего активные  $\alpha$  и  $\beta$ -амилазы;

60 – количество крахмала в 3 мл 2% раствора, мг;

10 – общий объем ферментного экстракта, полученного из навески растительного материала, мл;

1 – объем ферментного экстракта, взятый для проведения ферментативной реакции гидролиза крахмала, мл;

$t$  – время ферментативной реакции в минутах. Активность  $\alpha$ -амилаз определяют по указанной выше формуле, в которой  $D_1$  заменяют на  $D_2$  (показание фотоэлектроколориметра при определении оптической плотности окрашенного раствора в варианте с добавлением к раствору крахмала ферментного экстракта с активными  $\alpha$ -амилазами). Активность  $\beta$ -амилаз рассчитывают по разности между суммарной амилазной активностью и активностью  $\alpha$ -амилаз.

Если в вариантах с добавлением активных ферментов весь крахмал за время реакции гидролизуется, то при добавлении йодного реагента не образуется синего окрашивания. В этом случае определение активности амилаз нужно повторить, но при этом необходимо уменьшить время ферментативной реакции.

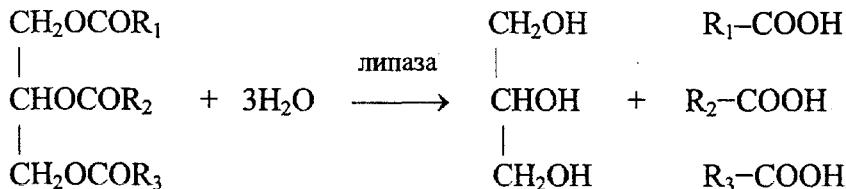
После выполнения работы сравнить показатели активности амилолитических ферментов в растительных пробах, которые получены из прорастающих семян разных злаковых культур с различными сроками проращивания (1, 2, 3 суток и т. д.).

## Контрольные вопросы

1. Как действуют  $\alpha$ -амилазы,  $\beta$ -амилазы и глюкоамилазы на крахмал?
2. Какое значение имеют амилазы при оценке качества зерна?
3. Как применяются ферментные препараты амилаз в пищевой переработке?
4. Почему ухудшаются технологические свойства зерна при повышении активности  $\alpha$ -амилаз?
5. Под действием каких факторов повышается активность амилаз в зерне?
6. В чем состоят особенности определения активности амилаз с использованием йодного реагтива?
7. Как удается определить активность  $\alpha$  и  $\beta$ -амилаз?
8. Какова методика выделения амилаз из растительной пробы?
9. Как проводится ферментная реакция амилаз с раствором крахмала?
10. Как получают окрашенный раствор негидролизованного крахмала после проведения реакции с амилазами?
11. Каковы принципы расчета суммарной амилазной активности и активности  $\alpha$  и  $\beta$ -амилаз?
12. Как изменяется активность амилаз при прорастании зерновок злаковых культур?
13. Какова активность амилаз в зреющем зерне, сформировавшемся при сухой и влажной погоде?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗ В СЕМЕНАХ МАСЛИЧНЫХ И ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Липазы относятся к классу ферментов «Гидролазы» (подкласс эстераз) и очень широко распространены в растениях и клетках микроорганизмов. С их участием происходит гидролитический распад ацилглицеринов жира, в связи с чем эти ферменты объединены общим названием – *триацилглицероллипаза* (3.1.1.3). В результате действия липаз образуются глицерин и свободные жирные кислоты:



$\text{R}_1, \text{R}_2$  и  $\text{R}_3$  – остатки жирных кислот

В ходе реакции гидролиза фермент последовательно катализирует расщепление первой сложноэфирной связи триацилглицерина, затем второй и далее третьей.

Большинство липаз находится в клетках растений или микроорганизмов в растворимом состоянии и имеют оптимум каталитического действия при  $\text{pH} = 8$ . Для проявления каталитической активности липаз необходимо присутствие в физиологической среде катионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

От активности липаз зависит интенсивность мобилизации жиров в листьях и семенах растений для включения образующихся продуктов в обмен веществ, а также способность растительных продуктов к прогорканию, особенно при повышении температуры и влажности во время хранения муки, крупы, растительных масел. У каждого вида растений имеется свой набор липаз, отличающихся растворимостью, оптимумом  $\text{pH}$  и ионного состава среды. Липазы в значительном количестве содержатся в семенах зерновых и масличных культур, особенно их много в семенах клещевины.

**Принцип метода.** Определение активности липаз основано на титровании раствором щелочи свободных жирных кислот, образующихся при взаимодействии с растительным маслом выделенных из растительных источников ферментов. Ферментную реакцию можно также проводить при смешивании с растительным маслом измельченных семян зерновых и масличных культур.

**Оборудование.** Фарфоровые ступки с пестиками диаметром 8-10 см; водяная баня; бюретка на 10 мл с трубкой, заполненной натрон-

ной известью; конические колбы с пробками на 150 мл; дозирующие пипетки на 1-10 мл; лабораторные весы; мерные колбы на 500 и 1000 мл; капельница для индикаторного раствора; марля для фильтрования; фарфоровые чашки диаметром 6-8 см.

**Реактивы.** Дигидрофосфат калия; гидрофосфат натрия; дистиллированная вода (свободная от диоксида углерода); гидроксид калия; 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

**Приготовление растворов.** 1/15 М фосфатный буфер (рН=7,4): 11,866 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 1 л дистиллированной воды; 4,537 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 500 мл дистиллированной воды; затем 182 мл раствора дигидрофосфата калия смешивают с 818 мл раствора гидрофосфата натрия.

0,05 М раствор KOH: 2,806 г KOH помещают в фарфоровый стакан и растворяют в 300 мл дистиллированной воды, затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу на 1 л, объем раствора в колбе доводят водой до метки, содержимое колбы тщательно перемешивают и определяют точный титр полученного раствора.

1% раствор фенолфталеина: 1 г фенолфталеина растворяют в 100 мл 50% этилового спирта.

**Ход определения.** В фарфоровую ступку помещают 2 г сухих или 3 г прорастающих семян и растирают пестиком с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. Затем в ступку приливают 20 мл фосфатного буферного раствора (рН=7,4) и смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут. После этого суспендированную смесь переносят на марлю,ложенную в 4 слоя в фарфоровой чашке, и отжимают ферментный экстракт в чашку. Дозирующей пипеткой отбирают 2 пробы ферментного экстракта по 5 мл и помещают их в конические колбы, одну из которых ставят на 10 минут в кипящую водяную баню для инактивации ферментов.

После охлаждения нагретой колбы в обе колбы (с активными и инактивированными ферментами) приливают пипеткой объем растительного масла, имеющий массу  $3 \pm 0,01$  г, полученную смесь перемешивают и колбы ставят на 30 минут в термостат при температуре 30°C, при этом фиксируют точное время начала ферментативной реакции. По истечении 30 минут смеси в колбах титруют с 3 каплями раствора фенолфталеина водным 0,05 М раствором KOH.

**Обработка и оценка результатов.** Активность липаз вычисляют по формуле:

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot K \cdot 2,8}{H \cdot t},$$

где А – активность липаз в мг гидроксида калия, затраченного на титрование образующихся за 1 час при гидролизе жира кислот, в расчете на 1 г растительной массы;

$V_1$  – объем 0,05 М раствора гидроксида калия, затраченный на титрование образующихся под действием липаз жирных кислот, мл;

$V_2$  – объем 0,05 М раствора гидроксида калия, затраченный на титрование аналитической пробы с инактивированными ферментами, мл;

$K$  – поправка к титру 0,05 М раствора гидроксида калия;

$H$  – навеска растительного материала, г;

2,8 – количество гидроксида калия в 1 мл 0,05 М раствора KOH, мг;

$t$  – время ферментативной реакции в часах.

Полученный показатель активности липаз в конкретной растительной пробе сравнивают с другими данными, характеризующими уровень активности липаз в семенах различных зерновых и масличных культур, а также изменение активности липаз в процессе прорастания семян. На основе полученного результата оценивают качество семян масличных культур и возможность их длительного хранения.

### Контрольные вопросы

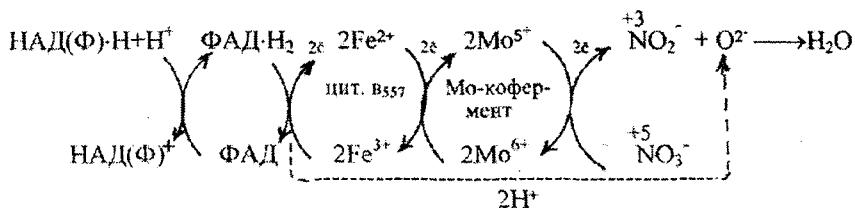
1. Какие реакции катализируют липазы?
2. Каковы особенности ферментных белков липаз?
3. Как влияют липазы на качество растительной продукции?
4. Под воздействием каких факторов повышается активность липаз?
5. Какой принцип положен в основу определения активности липаз?
6. Как получают ферментный экстракт липаз?
7. В чем состоят особенности проведения ферментной реакции и титрования образующихся под действием липаз жирных кислот раствором KOH?
8. Каковы принципы расчета активности липаз?
9. Как изменяется активность липаз при прорастании семян зерновых и масличных культур?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

В большинстве почв, особенно окультуренных, довольно активно происходит процесс нитрификации, в ходе которого аммонийная форма азота, образующаяся в почве при распаде органических остатков, а также внесенная в виде удобрений, превращается в нитраты. Поступивший нитратный азот в растениях, прежде чем включиться в состав азотистых веществ, подвергается восстановлению в аммонийную форму с помощью специальных ферментных систем. На первом этапе под действием фермента *нитратредуктазы* происходит превращение нитратов в нитриты, а затем нитриты с участием фермента *нитритредуктазы* восстанавливаются с образованием аммонийной формы азота, которая используется для синтеза аминокислот, амидов и других азотистых веществ.

Нитратредуктазы высших растений, зеленых водорослей и грибов (1.6.6.1; 1.6.6.2; 1.6.6.3) представляют собой металлофлавопротеиды с молекулярными массами 200-330 тыс., включающие два типа субъединиц: имеющие флавиновые группировки (ФАД, ФМН) и содержащие молибденовый кофермент. Донором электронов для восстановления нитратного азота у растений служит НАД·Н, у грибов – НАДФ·Н. От восстановленных динуклеотидов электроны и протоны переходят на флавиновую группировку нитратредуктазы. Затем электроны передаются на цитохром  $c_{557}$ , служащий в составе фермента промежуточным переносчиком электронов от флавинового на молибденовый кофермент, а протоны высвобождаются и могут взаимодействовать с анионами кислорода, которые образуются при восстановлении нитратного азота.

Молибденовый кофермент содержит катионы молибдена, лабильно связанного с ароматической группировкой, которая присоединяется к белковой части фермента. Катионы молибдена, обратимо изменяя степень окисления, способны акцептировать электроны от цитохрома  $c_{557}$  и передавать их на азот нитрата, который связывается с активным центром фермента. В результате восстановления азота нитрат превращается в нитрит, а высвобождающийся анион кислорода  $O^{2-}$  соединяется с протонами, образуя молекулу воды. Механизм восстановления нитратов до нитритов под действием нитратредуктазы может быть представлен в виде следующей схемы:



У растений наиболее высокая нитратредуктазная активность обнаруживается в меристематических тканях. У большинства растений при активном фотосинтезе и достаточном количестве углеводов, являющихся источниками образования НАД·Н, процесс восстановления нитратов практически полностью происходит в корнях. Однако при недостатке света и низких температурах, ослабляющих синтез углеводов, а также избыточном азотном питании значительная часть нитратов поступает в вегетативную часть растений и подвергается восстановлению в листьях. Вместе с тем известны растения, у которых практически не обнаруживается нитратредуктазной активности в корнях. У них превращение нитратного азота в аммонийный осуществляется в основном в листьях. К таким растениям относятся свекла, хлопчатник, марь, дурнишник и др.

Нитратредуктаза – типичный индуцируемый фермент. Его активность резко возрастает при поступлении в растения нитратов вследствие того, что происходит индукция синтеза фермента. Когда же концентрация нитратов в клетках растений уменьшается, синтез ферментного белка прекращается и нитратредуктазная активность снова понижается до исходного уровня. Кроме нитратов, индукторами синтеза нитратредуктазы могут быть цитокинин и органические нитросоединения, то есть возможна индукция синтеза этого фермента под воздействием химических регуляторов. В то же время катионы аммония подавляют в растениях синтез нитратредуктазы.

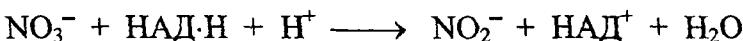
Известны группы растений, имеющие природно невысокий уровень нитратредуктазной активности, вследствие чего они накапливают высокие концентрации нитратов. К таким видам относятся растения семейства тыквенные, шпинат, редька и др. Однако у большинства растений повышение содержания нитратов наблюдается при определенных неблагоприятных условиях выращивания, связанных с недостатком световой энергии, низкой температурой, недостатком фосфора, калия, ряда микроэлементов, избыточными дозами азотных удобрений. Поэтому для каждой группы растительных продуктов установлена предельно допустимая концентрация нитратов.

При недостатке света ослабляются процессы фотосинтеза и дыхания, в результате чего понижается скорость образования восстановленных динуклеотидов и восстановленного ферредоксина, являющихся донорами электронов для восстановления нитратов, поэтому значительная часть нитратов остается невосстановленной и не используется для синтеза азотистых веществ растений. Аналогичное явление наблюдается в условиях пониженных температур, когда замедляются биосинтетические процессы, связанные с регенерацией доноров электронов для нитратвосстанавливающей системы, тогда

как поступление нитратов в растения продолжается, вследствие чего их концентрация в растительных тканях увеличивается.

Заметное влияние на функционирование нитратвосстановливающей системы растений оказывает обеспеченность их микроэлементами — молибденом, железом, магнием, марганцем, медью, которые служат активаторами нитратредуктазы, нитритредуктазы и других ферментов азотного обмена. Особенно важна роль молибдена, входящего в состав молибденового кофермента нитратредуктазы. При недостатке молибдена и других микроэлементов замедляется процесс восстановления нитратов и происходит их накопление в растительных продуктах. Еще большее накопление нитратов в растениях наблюдается при внесении избыточных доз азотных удобрений, а также при низкой обеспеченности растений фосфором и калием, когда формируется низкий урожай, и в этих условиях даже умеренные дозы азотных удобрений могут оказаться избыточными.

**Принцип метода.** Метод основан на колориметрическом определении нитритов, которые образуются из нитратов под действием фермента нитратредуктазы в соответствии с реакцией:



**Оборудование.** Фарфоровые ступки с пестиками диаметром 8-10 см; лабораторные весы; фарфоровые чашки диаметром 6-8 см; марля для фильтрования; стеклянные пробирки на 20 мл со штативами; мерные колбы на 50, 100, 500, 1000 мл; конические колбы на 50 мл; дозирующие пипетки на 1-10 мл; термостат; фотоэлектроколориметр с набором кювет; дозирующее устройство для уксусной кислоты на 1 мл; стеклянные воронки диаметром 5 см; бумажные фильтры диаметром 6 см.

**Реактивы.** Дигидрофосфат натрия; гидрофосфат натрия; нитрат калия; НАДН; концентрированная уксусная кислота; сульфат аммония; сульфаниловая кислота;  $\alpha$ -нафтиламин; нитрит натрия; дистиллированная вода (свободная от диоксида углерода).

**Приготовление растворов.** 0,05 М фосфатный буфер (рН=8,0): в 1 л дистиллированной воды растворяют 17,911 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,780 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Затем 53 мл раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  смешивают с 947 мл раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .

0,1 М раствор нитрата калия: 5,055 г нитрата калия растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл.

0,028 М раствор НАДН: 1,86 г НАДН растворяют 0,05 М фосфатным буферным раствором в мерной колбе на 100 мл.

10% раствор уксусной кислоты: 97,1 мл концентрированной уксусной кислоты растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л.

Насыщенный раствор сульфата аммония: в 500 мл горячей воды (70°C) растворяют сульфат аммония до полного насыщения раствора, затем полученный раствор охлаждают, фильтруют и переливают в склянку для хранения.

Реактив Грисса: 4,8 г сульфаниловой кислоты и 2,4 г  $\alpha$ -нафтиламина растворяют в 10%-ной уксусной кислоте и доводят объем раствора до 1 л.

Стандартный раствор нитрита натрия: 100 мг нитрита натрия растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л.

**Ход определения.** В фарфоровую ступку помещают 2 г растительного материала (проростки семян, вегетативная масса растений, клубни картофеля, корнеплоды, овощи, плоды, ягоды) и растирают пестиком с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. Затем в ступку приливают 20 мл фосфатного буферного раствора (рН=8,0) и смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут. После этого полученную суспензию отжимают в фарфоровую чашку через 4 слоя марли и таким образом получают ферментный экстракт.

В ходе дальнейшего анализа отбирают дозирующей пипеткой 2 аликвоты ферментного экстракта по 2 мл и переносят в стеклянные пробирки на 20 мл. В одну из пробирок приливают 1 мл 10% раствора уксусной кислоты для инактивации фермента и содержимое пробирки перемешивают. Затем в эту же пробирку приливают 3 мл насыщенного раствора сульфата аммония для осаждения белков и содержимое пробирки снова перемешивают. После этого в обе пробирки (с активным и инактивированным ферментом) приливают по 1 мл 0,1 М раствора нитрата калия и 0,028 М раствора НАД·Н, содержимое пробирок перемешивают и ставят на 30 минут в термостат при температуре 27°C. При этом фиксируют точное время начала ферментативной реакции.

По истечении указанного времени в пробирку с активным ферментом для его инактивации приливают 1 мл 10% раствора уксусной кислоты, а после перемешивания 3 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Полученную смесь повторно перемешивают и отстаивают в течение 10 минут. В дальнейшем содержимое пробирок фильтруют в конические колбы на 50 мл. Из каждого фильтрата отбирают дозирующей пипеткой аликвоты по 5 мл и переносят в стеклянные пробирки. К фильтрату в каждой пробирке приливают по 1 мл реактива Грисса и содержимое пробирок перемешивают. Через 30 минут окрашенные растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре при длине волн 540 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см.

Для построения градуировочного графика берут 10 мерных колб вместимостью 50 мл и приливают 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 мл исходного стандартного раствора нитрита натрия в каждую. Объемы растворов в колбах доводят дистиллированной водой до метки и их содержимое перемешивают. Из каждой колбы пипеткой переносят в стеклянные пробирки по 5 мл раствора нитрита натрия и приливают по 1 мл реактива Грисса, содержимое пробирок перемешивают и через 30 минут колориметрируют окрашенные растворы на фотоэлектроколориметре. По полученным данным строят градуировочный график: на горизонтальной оси откладывают количество мкг нитрита натрия в 5 мл внесенного для окрашивания раствора (соответственно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мкг), а на вертикальной оси – оптическую плотность окрашенных растворов.

**Обработка и оценка результатов.** Активность нитратредуктазы вычисляют по формуле:

$$A = \frac{M \cdot 20 \cdot 8}{H \cdot 2 \cdot 5 \cdot t},$$

где  $A$  – активность нитратредуктазы в мкг нитрита натрия, который образуется под действием фермента за 1 час, в расчете на 1 г растительной массы;

$M$  – масса нитрита натрия, определенная по градуировочному графику на основе оптической плотности окрашенного раствора, мкг;

$20$  – объем ферментного экстракта, полученный из навески растительного материала, мл;

$8$  – объем реакционной смеси при проведении ферментной реакции, мл;

$H$  – навеска растительного материала, г;

$2$  – объем ферментного экстракта, взятый для проведения ферментативной реакции, мл;

$5$  – объем фильтрата реакционной смеси, взятый для окрашивания с реагентом Грисса, мл;

$t$  – время ферментной реакции в часах.

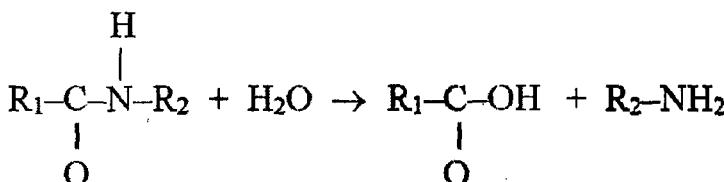
Полученный результат сравнивают с другими данными, характеризующими активность нитратредуктазы в разных растительных продуктах, выращенных при разном уровне азотного питания растений, при разной обеспеченности растений световой энергией и элементами питания. По уровню нитратредуктазной активности оценивают возможное содержание нитратов в растительной продукции.

## Контрольные вопросы

1. Каковы строение и свойства ферментного белка нитратредуктазы?
2. Каков механизм действия нитратредуктазы?
3. Как различаются разные группы растений по уровню нитратредуктазной активности?
4. Почему повышается содержание нитратов в растительной продукции при недостатке световой энергии и при низких температурах?
5. Почему повышается содержание нитратов в растительной продукции при избыточном азотном питании и недостатке других элементов питания?
6. Каковы принципы определения активности нитратредуктазы?
7. Как получают ферментный экстракт нитратредуктазы из растительной пробы?
8. В чем состоят особенности проведения ферментной реакции с участием нитратредуктазы?
9. Как определяется количество нитритов, образующихся под действием фермента нитратредуктазы?
10. Какова методика построения градуировочного графика при определении активности нитратредуктазы?
11. Каковы принципы расчета активности нитратредуктазы в растительной продукции?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

*Протеолитические ферменты* (3.4), или *протеазы*, катализируют гидролиз пептидных связей в молекулах белков и пептидов по схеме:



( $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$  – полипептидные цепи белков или пептидов)

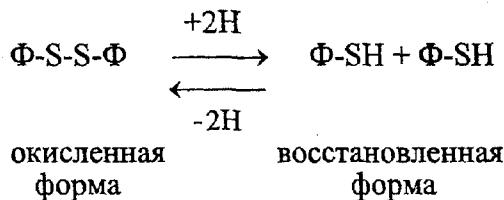
Протеазы подразделяют на *протеиназы* и *пептидазы*. Протеиназы катализируют гидролитическое расщепление пептидных связей в молекулах белков, а пептидазы действуют только на пептиды. Из протеиназ наиболее хорошо изучены строение и свойства *пепсина* (3.4.23.1), *трипсина* (3.4.21.4), *химотрипсина* (3.4.21.1) и *папаина* (3.4.22.2).

Пепсин выделяется слизистой оболочкой желудка в виде неактивного белка пепсиногена, который активируется в кислой среде в результате частичного гидролиза определенных пептидных связей. Этот фермент преимущественно расщепляет пептидные связи, соединяющие какой-либо аминокислотный остаток с остатком ароматических аминокислот. В катализическом действии пепсина важную роль играют карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот. В катализическом действии трипсина и химотрипсина участвуют аминокислотные остатки серина, гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Выяснено, что трипсин направлению катализирует гидролиз пептидных связей, которые образованы с участием аминокислотных остатков аргинина и лизина. В результате действия пепсина, трипсина и химотрипсина белки гидролизуются с образованием пептидов и свободных аминокислот. Эти ферменты получены в кристаллическом виде и определены их аминокислотные последовательности.

К протеиназам также относится растительный фермент *папаин*, выделенный из млечного сока дынного дерева. В молекуле папаина содержится 212 аминокислотных остатков, которые при формировании третичной структуры образуют три дисульфидные связи. В гидролитической реакции, которую катализирует папаин, участвуют сульфгидрильная группа ( $-\text{SH}$ ) цистеина и амидазольная группировка гистидина.

В растениях различают два вида протеиназ, одни из них содержат в активном центре сульфгидрильную группу (HS-группу) и поэтому их называют *тиоловыми протеиназами*. Другие растительные протеиназы не содержат в активном центре тиоловых группировок и они по строению каталитического центра имеют сходство с протеиназами животного происхождения – пепсином и трипсином.

Характерное свойство тиоловых протеиназ – их способность активироваться цианидами и сульфгидрильными соединениями, содержащими HS-группы (цистеин, восстановленный глутатион и др.). Указанные соединения переводят окисленную форму фермента восстановленную, которая и обладает гидролитической активностью. Схематически процесс восстановления тиоловых протеиназ можно представить следующим образом:



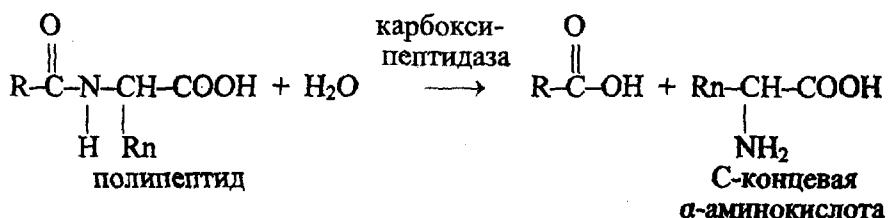
Под действием окислителей фермент переходит в окисленную дисульфидную форму.

В растениях, кроме папаина, типичными представителями этих ферментов являются *бромелайн*, полученный из плодов и стеблей ананаса; *физин*, содержащийся в млечном соке фиалкового дерева. В листьях многих растений найдены протеиназы, активируемые сульфгидрильными соединениями. К тиоловым протеиназам также относятся многие протеолитические ферменты, выделяемые из пшеничного солода. Из семян и плодов многих растений выделены также нетиоловые протеиназы. К ним относятся *арвенсин* из семян гороха; *арахаин*, содержащийся в семенах арахиса; *соланаин*, выделенный из плодов паслена. К этой же группе ферментов относятся протеиназы многих грибов.

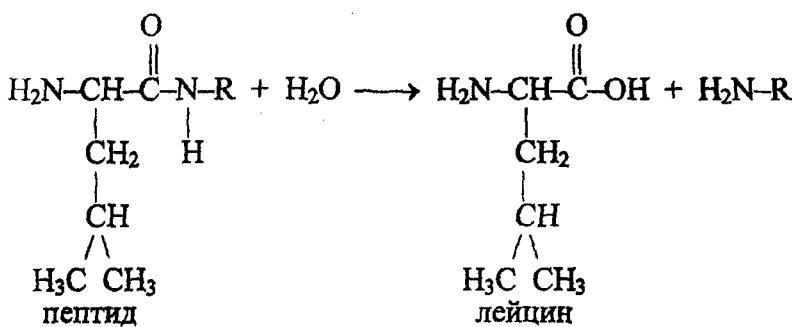
Пептидазы включают три группы ферментов: *аминопептидазы*, катализирующие гидролитическое отщепление аминокислотных остатков от N-концов пептидов; *карбоксипептидазы*, катализирующие гидролитическое отщепление аминокислотных остатков от C-концов пептидов; *дипептидазы*, катализирующие гидролиз пептидных связей в дипептидах с образованием свободных аминокислот.

К пептидазам, отщепляющим аминокислотные остатки от C-конца полипептидных цепей, относится карбоксипептидаза А

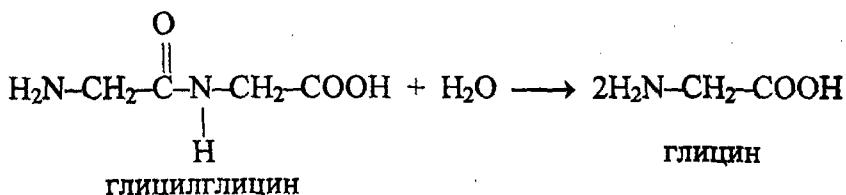
(3.4.17.1), которая синтезируется в поджелудочной железе животных. Этот фермент содержит в активном центре  $Zn^{2+}$ , образующий хелатные связи с двумя имидазольными группами гистидина и карбоксильной группой глутаминовой кислоты. В катализическом действии карбоксипептидазы А также участвуют аминокислотные остатки аргинина и тирозина.



Типичным представителем аминопептидаз является *лейцинаминопептидаза* (3.4.11.1), катализирующая гидролитическое отщепление от N-концов полипептидов остатков лейцина:



К дипептидазам относится фермент *глицилглицинпептидаза* (3.4.13.11), катализирующая гидролиз дипептида глицилглицина:



Фермент *пролиназа* (3.4.13.8) расщепляет дипептиды, у которых в образовании пептидной связи участвует карбоксильная группа пролина.

Пептидазы в большинстве своем металлосодержащие ферменты, которые могут проявлять каталитическую активность при различных условиях физиологической среды в клетках растений и других организмов. При совместном действии всего комплекса протеолитических ферментов белки гидролизуются до свободных аминокислот.

Сведения об активности протеолитических ферментов имеют важное практическое значение. Особенно они важны при оценке качества продукции зерновых культур. На ранних стадиях созревания зерновок злаковых культур в них наблюдается высокая активность протеолитических ферментов. Однако при созревании в зерновках усиливается синтез белков – эндогенных ингибиторов протеаз, которые связывают ферментные белки в неактивные комплексы, в результате чего к моменту полного созревания зерна в нем почти не обнаруживается протеолитическая активность. Связывание протеаз в неактивные комплексы может также осуществляться запасными белками зерна и мембранными структурами клеток.

Однако при влажных условиях во время созревания зерна ослабляется синтез запасных белков и белков – ингибиторов протеаз, вследствие чего к концу созревания в зерновках остается повышенная протеазная активность. И если такое зерно используется для приготовления хлеба, то в процессе формирования хлебопекарного теста под действием протеолитических ферментов происходит значительная деградация молекул запасных белков, что приводит к ослаблению клейковинного комплекса. В результате понижается газоудерживающая способность и усиливается разжижение теста, вследствие чего снижается качество выпекаемого хлеба. При использовании зерна с повышенной протеазной активностью для производства макарон и крупы также наблюдается ухудшение качества этих продуктов вследствие ослабления комплекса их клейковинных белков.

При поражении зерна клопом-черепашкой ухудшение его качества происходит в результате того, что эти насекомые вводят в созревающие зерновки активный комплекс протеолитических ферментов, вызывающих деградацию белков зерна, и прежде всего клейковинных белков. От действия протеолитических ферментов в значительной степени зависит и качество солода, которое получают из проросшего зерна.

При определении активности протеолитических ферментов учитывают количество гидролизованного субстрата (белков) или образующихся продуктов гидролиза (свободных аминокислот). Для оценки

суммарной активности протеолитических ферментов очень часто используется метод, разработанный Ансоном.

**Принцип метода.** По методу Ансона активность протеаз оценивают по количеству аминокислоты тирозина, образующейся, как и другие протеиногенные аминокислоты, в процессе гидролиза белков под действием этих ферментов. Концентрацию тирозина определяют колориметрическим методом с использованием реактива Фолина или спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

**Оборудование.** Фарфоровые ступки с пестиками диаметром 8-10 см; лабораторные весы; марля для фильтрования; фарфоровые чашки диаметром 6-8 см; дозирующие пипетки на 1-10 мл; конические колбы на 50 мл; воронки диаметром 5-6 см; бумажные фильтры; мерный цилиндр на 25 мл; стеклянные пробирки на 20 мл в штативах; фотозелектроколориметр или спектрофотометр с набором кювет; термостат, мерные колбы на 100, 500, 1000 мл; темная склянка на 150 мл.

**Реактивы.** Химически чистый альбумин, 0,05 М фосфатный буфер с pH=8,0; трихлоруксусная кислота (ТХУ); карбонат натрия; реактив Фолина; дистиллированная вода (свободная от диоксида углерода).

**Приготовление растворов.** 0,05 М фосфатный буфер (pH=8,0): в 1 л дистиллированной воды растворяют 17,911 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; в 100 мл дистиллированной воды растворяют 0,780 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Затем 53 мл раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  смешивают с 947 мл раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .

0,5% раствор альбумина: 0,5 г чистого белка альбумина растворяют раствором 0,05 М фосфатного буфера в мерной колбе на 100 мл.

14% раствор ТХУ: 70 г ТХУ растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл.

0,5 М карбонат натрия: 52,995 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л.

Раствор реактива Фолина: 10 мл реактива Фолина разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл, объем раствора в колбе доводят до метки, перемешивают и переливают в темную склянку.

**Ход определения.** На лабораторных весах взвешивают навеску просрощих семян 2 г (злаковых, зернобобовых, масличных и других растений) с точностью до 0,01 г и растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. Затем в ступку приливают 20 мл дистиллированной воды и смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут, после чего ферментный экстракт отжимают через 4 слоя марли в фарфоровую чашку и далее используют как источник протеаз для проведения ферментативной реакции.

В 2 конические колбы на 50 мл дозирующей пипеткой приливают по 4 мл 0,5% раствора альбумина и 4 мл дистиллированной воды, в

одну из колб также приливают 10 мл 14% раствора ТХУ для осаждения белков (инактивация ферментов); содержимое пробирок перемешивают и помещают на 15 минут в термостат при температуре 40°C. Затем в обе колбы приливают по 2 мл ферментного раствора, их содержимое перемешивают и фиксируют точное время начала ферментативной реакции, после чего колбы помещают на 30 минут в термостат при указанной выше температуре для проведения ферментативной реакции гидролиза белков альбумина протеазами. По истечении 30 минут во вторую колбу приливают 10 мл 14% раствора ТХУ, содержимое колбы перемешивают и фиксируют точное время прекращения ферментативной реакции, затем полученную смесь оставляют на 15 минут для осаждения белков.

После отстаивания надосадочную жидкость в колбах фильтруют в стеклянные пробирки и в фильтрате определяют содержание тирозина. В 2 стеклянные пробирки вносят по 1,5 мл фильтрата и 4 мл 0,5 М раствора карбоната натрия, содержимое пробирок перемешивают и в каждую из них добавляют 0,8 мл разбавленного раствора реактива Фолина, содержимое пробирок снова перемешивают и через 20 минут колориметрируют на фотоэлектроколориметре при длине волн 630 нм и толщине фотометрируемого слоя 1 см.

При определении содержания тирозина на спектрофотометре полученный фильтрат наливают в кварцевую кювету спектрофотометра и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 280 нм.

В результате колориметрирования окрашенного раствора или спектрофотометрирования фильтрата получают оптическую плотность раствора с активными протеазами (раствор ТХУ приливали после проведения ферментной реакции) и инактивированными протеазами (раствор ТХУ приливали до проведения ферментной реакции).

**Обработка и оценка результатов.** Активность протеаз вычисляют по формуле:

$$A = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 20}{H \cdot 2 \cdot t},$$

где A – активность протеаз в единицах оптической плотности раствора тирозина, образовавшегося за 1 час под действием этих ферментов, в расчете на 1 г растительной массы;

D<sub>1</sub> – оптическая плотность раствора в варианте с активными протеазами;

D<sub>2</sub> – оптическая плотность раствора в варианте с инактивированными протеазами;

20 – объем ферментного экстракта, выделенного из растительной пробы, мл;

2 – объем ферментного экстракта, взятый для проведения ферментной реакции, мл;

H – навеска растительного материала, г;

t – время ферментативной реакции в часах.

Полученный результат сравнивают с другими определениями протеазной активности в проросших семенах различных сельскохозяйственных культур, а также в семенах при разной длительности проращивания. На основе этих данных оценивают качество семян.

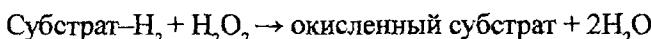
### Контрольные вопросы

1. Какие существуют группы протеаз и какие они катализируют биохимические реакции?
2. Как действуют на белковые молекулы протеиназы и пептидазы?
3. Каковы особенности растительных протеиназ по строению катализитического центра?
4. Как действуют на пептиды аминопептидазы, карбоксипептидазы и дипептидазы?
5. Как влияют протеолитические ферменты на качество растительной продукции?
6. В чем состоят принципиальные особенности определения активности протеаз по методу Айсона?
7. По какой методике получают ферментный раствор и проводят его реакцию с белковым субстратом при определении протеазной активности?
8. Как проводится колориметрическое или спектрофотометрическое определение тирозина, образовавшегося в результате гидролиза белков под действием протеолитических ферментов?
9. По какому принципу ведется расчет активности протеаз и в каких единицах выражается каталитическая активность этих ферментов?
10. Как используются сведения о каталитической активности протеаз при оценке качества растительной продукции?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

При окислении в организмах кислородом органических субстратов в качестве основных продуктов образуются пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) или органические пероксиды, которые могут окислять различные вещества. Одним из хорошо известных ферментов, способных катализировать реакции пероксидного окисления химических веществ в живых клетках, является *пероксидаза* (1.11.1.7.), которая с пероксидом водорода образует комплексное соединение, в результате чего пероксид переходит в активированное состояние, превращаясь в акцептор водорода.

Растительные пероксидазы – двухкомпонентные ферменты, локализованные главным образом в пероксисомах. В состав катализитического центра этих ферментов входит протогем. Действие пероксидазы можно представить в виде следующей реакции:



Пероксидазы катализируют окисление пероксидом водорода фенольных соединений, жирных кислот, аминокислот и аминов, терпенов, восстановленного глютатиона. Эти ферменты обладают высокой термоустойчивостью, поэтому после стерилизации растительной продукции тепловой обработкой для последующего хранения и переработки в ней контролируется активность пероксидаз. При ферментации чая и табака пероксидазы наряду с полифенолоксидазами участвуют в образовании окрашенных и ароматизирующих веществ в составе этих продуктов.

**Принцип метода.** Определение активности пероксидаз в растительной продукции основано на проведении ферментативной реакции окисления пирогаллола пероксидом водорода с образованием окрашенного соединения пурпурогаллина, количество которого оценивают колориметрированием на фотоэлектроколориметре.

**Оборудование.** Ступки фарфоровые с пестиками диаметром 8-10 см или гомогенизатор; марля для фильтрования; чашки фарфоровые диаметром 6-8 см; колбы конические на 50 мл; дозирующие пипетки на 1-10 см; дозирующее устройство на 5 мл для раствора серной кислоты; мерные колбы на 100 мл и на 1 л с пробками; темная склянка для раствора пероксида водорода; термостат, фотоэлектроколориметр.

**Реактивы.** Дистиллированная вода (свободная от диоксида углерода); концентрированный раствор пероксида водорода; концентрированная серная кислота; 0,05 М фосфатный буфер ( $pH=7,0$ ); пирогаллол.

**Приготовление растворов.** 1% раствор пероксида водорода: готовится свежий раствор перед каждым анализом путем разбавления концентрированного раствора в мерной колбе на 100 мл. Приготовленный раствор переливают в темную склянку.

10% раствор серной кислоты: в фарфоровый стакан на 500 мл наливают 300 мл дистиллированной воды, к которой с помощью дозирующего устройства приливают 60,6 мл концентрированной серной кислоты, полученную смесь перемешивают и после охлаждения переливают в мерную колбу на 1 л, ополаскивая стакан дистиллированной водой. Затем объем раствора в колбе доводят водой до метки и перемешивают.

0,05 М фосфатный буфер ( $\text{pH}=7,0$ ): в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой растворяют 17,911 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; в мерной колбе на 500 мл дистиллированной водой растворяют 3,901 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Затем 390 мл раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  смешивают с 610 мл раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .

1% раствор пирогаллола: 5 г пирогаллола растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 2 г (клубни картофеля, корнеплоды, проростки семян злаковых, зернобобовых, масличных культур, овощи, плоды и ягоды, вегетативная масса растений) взвешивают на лабораторных весах с точностью до 0,01 г и растирают в ступке или измельчают в гомогенизаторе до получения однородной массы. В случае необходимости в ступку для лучшего растирания растительного материала добавляют небольшое количество чистого кварцевого песка. К измельченному в ступке материалу приливают дозирующей пипеткой 20 мл 0,05 М фосфатного буфера ( $\text{pH}=7,0$ ) для экстракции ферментного белка и полученную смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут. Затем в фарфоровую чашку помещают уложенную в 4 слоя марлю и на нее переносят измельченный растительный материал из ступки, заворачивают края марлевой ткани и отжимают через 4 слоя марли растительный экстракт с растворенным ферментным белком в коническую колбу на 50 мл.

В ходе последующего анализа в 2 конические колбы на 50 мл дозирующей пипеткой вносят по 4 мл ферментного экстракта и в одну из колб для инактивации ферментного белка (контроль) с помощью дозирующего устройства приливают 5 мл 10% раствора серной кислоты, смесь перемешивают. После этого в обе колбы дозирующей пипеткой приливают по 5 мл 1% раствора пирогаллола и по 1 мл 1% раствора пероксида водорода, смеси перемешивают и помещают на 15 минут в терmostатированную камеру при температуре 25°C. Реакция про-

водится в отсутствие света, который активирует самопроизвольный распад пероксида водорода на кислород и воду. Отсчет времени ферментативной реакции начинается в тот момент, когда к ферментному раствору приливается раствор пероксида водорода. По истечении 15 минут теперь уже в колбу с активным ферментом для его инактивации приливается 5 мл 10% раствора серной кислоты и в этот момент фиксируется точное время прекращения ферментативной реакции.

После проведения ферментативной реакции окрашенные растворы образующимся под действием пероксидаз пурпурогаллином колориметрируют на фотоэлектротоколориметре с использованием зеленого светофильтра при толщине фотометрируемого слоя 5 мм.

**Обработка и оценка результатов.** Активность пероксидаз рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(D_1 - D_2) \cdot 20}{H \cdot 4 \cdot t},$$

где A – активность пероксидаз в единицах оптической плотности раствора пурпурогаллина, образовавшегося за 1 час под действием этих ферментов, в расчете на 1 г растительной массы;

$D_1$  – оптическая плотность раствора в варианте с активными пероксидазами;

$D_2$  – оптическая плотность раствора в варианте с инактивированными пероксидазами;

20 – объем ферментного экстракта, выделенного из растительной пробы, мл;

H – навеска растительного материала, г;

4 – объем экстракта пероксидаз, взятый для проведения ферментативной реакции;

$t$  – время ферментативной реакции в часах.

Полученный результат сравнивают с другими определениями пероксидазной активности в различных растительных образцах и дают оценку происходящих в них биохимических процессов.

### **Контрольные вопросы**

1. Каковы строение и механизм действия фермента пероксидазы?
2. Окисление каких веществ катализируют пероксидазы?
3. Какое значение имеют пероксидазы в обмене веществ организмов?
4. В чем состоят принципы определения каталитической активности пероксидаз?

5. Как выделяют пероксидазы из растительного материала и каковы особенности проведения ферментативной реакции пероксидного окисления пирогаллола?

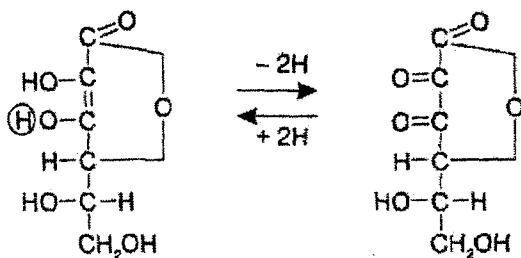
6. Как проводят колориметрирование окрашенного раствора пурпурогаллина, образовавшегося под действием пероксидаз?

7. Каковы принципы расчета активности пероксидаз?

8. Как можно использовать сведения об активности пероксидаз при оценке биохимических процессов в растениях и качества растительной продукции?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ЙОДАТНЫМ МЕТОДОМ

Аскорбиновая кислота (витамин С) проявляет биологическую активность в виде L-формы, синтезируется из глюкозы или галактозы и в водном растворе имеет кислотные свойства вследствие диссоциации отмеченного в формуле кружочком протона одного из енольных гидроксилов.



аскорбиновая кислота

дегидроаскорбиновая кислота

Основная функция аскорбиновой кислоты – участие в качестве восстанавливающего агента в реакциях гидроксилирования, в ходе которых происходит включение кислорода воздуха в органические субстраты, при этом аскорбиновая кислота окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты. Дегидроаскорбиновая кислота также обладает витаминной активностью, так как очень легко превращается в аскорбиновую кислоту. Благодаря легкой окисляемости аскорбиновая кислота предохраняет от окисления другие соединения.

Аскорбиновая кислота повышает устойчивость организма человека к инфекции и простудным заболеваниям. Длительное отсутствие в пище человека витамина С приводит к заболеванию цингой. Для поддержания нормальных функций организма рекомендуется ежедневная норма витамина 30-70 мг.

Аскорбиновая кислота не синтезируется организмами человека, обезьяны и морской свиньи, тогда как другие животные и птицы способны к синтезу этого витамина. Однако в ряде опытов показано, что добавление в зимний период аскорбиновой кислоты в кормовые рационы сельскохозяйственных животных существенно повышает их рост и продуктивность.

Аскорбиновая кислота очень активно синтезируется в листьях растений. Особенно много ее в молодой зелени. В ходе онтогенеза

содержание аскорбиновой кислоты в листьях постепенно снижается, а после цветения резко уменьшается вследствие усиления гидролитических процессов. Концентрация аскорбиновой кислоты в растительной продукции зависит от природно-климатических условий, а также обеспеченности растений питательными элементами.

Многие плоды и ягоды, выращенные в южных регионах, накапливают значительно меньше витамина С, чем при их возделывании в более северных районах, что обусловлено особенностями погоды. Как показывают опыты, в условиях прохладного лета в листьях и плодах растений синтезируется больше аскорбиновой кислоты, чем при жаркой и засушливой погоде.

Богаты аскорбиновой кислотой листья растений, свежие овощи, плоды и ягоды. Ниже показано содержание витамина С в некоторых растительных продуктах, мг%:

Черная смородина	100-400	Лимон	40-60
Шиповник	1000-4000	Перец сладкий	100-400
Капуста:		Баклажаны	2-10
белокочанная	20-60	Кабачки	10-15
цветная	50-150	Щавель	50-70
Картофель	10-25	Редис	20-30
Морковь	5-10	Столовая свекла	5-20
Томаты	20-30	Виноград	1-5
Лук зеленый	40-60	Зеленый горошек	30-50
Огурец	2-10	Кормовая свекла	3-6
Петрушка	100-200	Кормовые травы перед цветением	40-60
Укроп	150-200	Молодая зелень (в расчете на сухую	
Яблоки	5-30	массу)	400-500
Вишня	5-15	Брусника	100-200
Земляника	40-60	Молоко	1-2
Малина, красная смородина	20-40		

Томаты, выращенные в открытом грунте, богаче аскорбиновой кислотой, чем выросшие в теплице. Однако указанная закономерность повидимому не является универсальной. Известны плодово-ягодные культуры, которые способны больше накапливать аскорбиновой кислоты в условиях южных регионов – груши, айва, абрикосы, персики, черника, земляника и др.

Концентрация витамина С резко снижается при ухудшении режима питания растений макро- и микроэлементами, а также при наруше-

нии агротехники возделывания культуры. Снижение содержания этого витамина происходит при избыточном азотном питании. Содержание аскорбиновой кислоты в плодовоощной продукции может снижаться в процессе хранения, в наибольшей степени это характерно для картофеля (в 1,5-2 раза) и в меньшей степени для цитрусовых. Особенно сильно понижается концентрация витамина С при нарушении технологических режимов хранения.

Значительные потери аскорбиновой кислоты могут наблюдаться при варке, сушке и переработке растительных продуктов. Это обусловлено тем, что она является очень нестойким соединением, которое довольно легко подвергается разрушению под воздействием окислителей (окислительные ферменты, следы меди или железа), повышенной температуры и солнечных лучей, щелочного гидролиза. Почти полное разрушение витамина С происходит при естественной сушке сена в полевых условиях. Некоторые вещества являются стабилизаторами витамина С, к ним относятся белки, аминокислоты, поваренная соль, сахара, крахмал, жиры. Каротиноиды предотвращают переход аскорбиновой кислоты в дегидроформу.

В растительной продукции аскорбиновая кислота содержится в трех формах – в виде восстановленной формы (аскорбиновая кислота), окисленной формы (дегидроаскорбиновая кислота) и в виде аскорбино-генов, в которых аскорбиновая кислота связана с другими соединениями и может высвобождаться при гидролизе. В зрелых плодах и овощах преимущественно накапливается восстановленная форма аскорбиновой кислоты, а в незрелых и перезрелых продуктах возрастает доля дегидроаскорбиновой кислоты, которая менее устойчива к действию окислителей и поэтому больше теряется при хранении и переработке плодовоощной продукции. В капусте значительная часть аскорбиновой кислоты содержится в виде аскорбинона, поэтому при хранении данного продукта потери витамина небольшие. В квашеной капусте аскорбиновая кислота также хорошо сохраняется, так как образующаяся молочная кислота повышает стабильность этого витамина.

Методы определения аскорбиновой кислоты в растительной продукции основаны на ее редуцирующих свойствах. Одним из них является йодатный метод.

**Принцип метода.** При определении витамина С этим методом проводится реакция восстановления аскорбиновой кислотой йодата калия до свободного йода, который окрашивают при добавлении раствора крахмала и количественно оценивают.

**Оборудование.** Ступки фарфоровые с пестиками диаметром 8-10 см; мерные колбы на 100 мл; воронки диаметром 6-8 см; колбы конические на 100 мл; дозирующие пипетки на 1-10 мл; цилиндры мерные

на 25 мл; стаканы стеклянные на 100 мл; микробюретка, лабораторные весы.

**Реактивы.** Соляная кислота концентрированная; йодистый калий; йодат калия; водорастворимый крахмал; дистиллированная вода.

**Приготовление растворов.** 2% раствор соляной кислоты: 45,5 мл концентрированной HCl (1,19 г/см<sup>3</sup>) растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л.

1% раствор йодистого калия: 1 г KI растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл.

0,001 н раствор йодата калия: 0,3567 г KIO<sub>3</sub> растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л и затем готовят рабочий раствор путем разбавления в 10 раз полученного исходного раствора.

0,5% раствор крахмала: 0,5 г водорастворимого крахмала разводят в 20 мл холодной дистиллированной воды и полученную смесь приливают в стакан с 80 мл горячей воды (80°C), затем при помешивании содержимое стакана нагревают до полного растворения крахмала.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 5 г растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы и количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу на 100 мл (несколько раз ополаскивая ступку и пестик водой), доводят объем смеси в колбе до метки и содержимое колбы тщательно перемешивают. Затем полученную смесь фильтруют через сухой фильтр в коническую колбу на 100 мл. Фильтрат сразу же используется для дальнейшего анализа и не подлежит хранению.

После этого дозирующей пипеткой отбирают 10 мл фильтрата и переносят в коническую колбу на 100 мл. Затем к фильтрату, содержащему аскорбиновую кислоту, приливают 1 мл 2% раствора соляной кислоты, 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала и 10 мл дистиллированной воды. Полученную смесь перемешивают и титруют из микробюретки 0,001 н раствором йодата калия до появления синего окрашивания. Одновременно с анализируемой пробой проводится титрование смеси используемых реагентов, в которую вместо фильтрата, содержащего аскорбиновую кислоту, приливают 10 мл дистиллированной воды.

**Обработка и оценка результатов.** Содержание аскорбиновой кислоты рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,08806 \cdot 100}{H},$$

где С – содержание аскорбиновой кислоты в 100 г растительного материала в мг (мг%);

$V_1$  – объем раствора йодата калия, затраченный на титрование раствора аскорбиновой кислоты, мл;

$V_2$  – объем раствора йодата калия, затраченный на титрование смеси реагентов, не содержащей аскорбиновой кислоты, мл;

$K$  – поправка к титру раствора йодата калия;

0,08806 – коэффициент пересчета мл 0,001 н раствора йодата калия в мг аскорбиновой кислоты;

100 – коэффициент пересчета в мг%;

$H$  – масса растительного материала, соответствующая 10 мл раствора аскорбиновой кислоты, г (учитывая, что общий объем раствора аскорбиновой кислоты 100 мл, а взято для дальнейшего анализа 10 мл, указанная масса составляет десятую часть от исходной навески растительного материала).

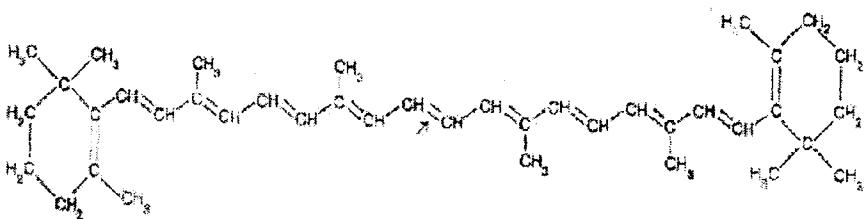
Полученный результат сравнивают с теоретическими сведениями о содержании аскорбиновой кислоты в различной растительной продукции с учетом влияния на этот показатель природно-климатических условий, режима питания растений, способа и срока хранения продукции и делают выводы о качестве анализируемого растительного продукта.

### Контрольные вопросы

1. Какова биологическая роль аскорбиновой кислоты в организмах растений, человека и животных?
2. Сколько содержится аскорбиновой кислоты в клубнях картофеля, корнеплодах, овощах, плодах и ягодах, вегетативной массе кормовых трав?
3. Как изменяется содержание аскорбиновой кислоты в листьях растений в процессе их роста и развития?
4. Как влияют на содержание аскорбиновой кислоты в растениях природно-климатические условия?
5. Каково влияние режима питания растений на накопление аскорбиновой кислоты в растительной продукции?
6. При каких условиях происходят потери аскорбиновой кислоты?
7. Что такое аскорбиногены?
8. Как определяют содержание аскорбиновой кислоты в растительной продукции?
9. Какая реакция происходит при титровании раствора аскорбиновой кислоты раствором йодата калия?
10. По какому принципу ведется расчет содержания аскорбиновой кислоты при ее определении йодатным методом?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНА В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

В организме человека и животных витамин А образуется из растительных продуктов – каротинов. Под действием фермента оксигеназы происходит расщепление молекулы каротина по центральной двойной связи с образованием альдегидной формы витамина А – ретиналя. Каждая молекула  $\beta$ -каротина дает начало двум молекулам витамина А, а  $\alpha$  и  $\gamma$ -каротинов – по одной молекуле витамина А, в связи с чем  $\beta$ -каротин обладает вдвое большей витаминной активностью.



$\beta$ -каротин (стрелкой показана центральная двойная связь)

Каротины входят в состав хлоропластов листьев и хромопластов не фотосинтезирующих органов растений, их синтез более активно проходит на свету. В составе хлоропластовых мембран они выполняют роль дополнительных пигментов при фотохимическом поглощении света.  $\beta$ -Каротин также принимает участие в явлениях фототропизма у высших растений.

Больше всего каротина содержится в листьях растений и листовых овощах, корнеплодах моркови, рябине, облепихе, абрикосах, томатах и сладком перце. Особенно богата каротином молодая зелень, тогда как в процессе вегетации содержание этого витамина в вегетативной массе растений снижается. При формировании корнеплодов моркови концентрация в них каротина возрастает в 3-5 раз. Значительно возрастает содержание каротина при созревании плодов и овощей. В большинстве растительных продуктов преобладает  $\beta$ -каротин.

Накопление каротина в растительных продуктах зависит от условий выращивания растений. Его содержание в листьях существенно снижается при низком уровне азотного питания растений, а при внесении азотных удобрений может повышаться в 1,5-2 раза. Высокое содержание каротина в плодах и овощах наблюдается только при оптимальном питании растений макро- и микроэлементами.

Каротин разрушается под воздействием ультрафиолетовых лучей и при повышенной температуре в присутствии кислорода, поэтому при сушке вегетативной массы растений на открытом солнце значительная часть его подвергается деградации и наблюдаются значительные потери этого провитамина. Содержание каротина контролируют в кормах, особенно в зимний период.

Содержание каротина в растительных продуктах может быть представлено следующими данными, мг %:

Морковь	6-8	Облепиха	5-8
Лук-перо	5-6	Облепиховое масло	20-40
Салат	3-5	Молодая зелень	10-15
Петрушка	10-12	Силос кукурузный	1-2
Томаты	1-2	Ботва овощей	3-4
Абрикосы	1-3	Сено	2-3
Перец сладкий	8-12	Листья бобовых трав	5-9
Кормовая свекла,		Смородина,	
турнепс	2-5	крыжовник	0,5-1
Зерно пшеницы	0,02	Листья мятыковых трав	2-5

В клетках растений каротины образуют комплексы с липопротеидами, поэтому, хотя и являются полиненасыщенными соединениями, обладают высокой устойчивостью. При хранении растительных продуктов без нарушения нормативных режимов не наблюдается больших потерь каротина. Но когда нарушается структура клеток, каротины быстро разрушаются под действием света и кислорода воздуха. При варке овощей под слоем воды без доступа кислорода воздуха каротин хорошо сохраняется.

В связи с тем что молекулы каротинов обладают гидрофобностью, их экстрагируют из растительных источников неполярными растворителями, подвергают очистке от других пигментов и определяют количественно колориметрическим методом.

**Принцип метода.** При определении каротина колориметрическим методом его экстрагируют из растительного материала бензином и пропускают бензиновый экстракт через колонку, заполненную оксидом алюминия, для поглощения других пигментов. Очищенный бензиновый экстракт каротина желтого цвета колориметрируют на фотоэлектроколориметре и затем сопоставляют оптическую плотность анализируемого раствора с оптической плотностью стандартного раствора бихромата калия, откалиброванного по каротину.

**Оборудование.** Ступки с пестиками диаметром 8-10 см; стеклянная колонка длиной 30 см и внутренним диаметром 1 см; весы лабораторные; фотоэлектроколориметр; мерные колбы на 50 и 100 мл; дозирующие пипетки на 1-10 мл.

**Реактивы.** Бензин (прозрачный); оксид алюминия ( $Al_2O_3$ ); сульфат натрия ( $Na_2SO_4$ ); бихромат калия ( $K_2Cr_2O_7$ ); дистиллированная вода.

**Подготовка реагентов и оборудования.** Оксид алюминия: его адсорбционную способность проверяют при пропускании через колонку, заполненную этим адсорбентом, раствора пигментов. Проверенный адсорбент хранят в герметически закрытой банке.

Сульфат натрия: обезвоживают путем прокаливания и сохраняют в герметически закрытой банке.

Стандартный раствор бихромата калия: 720 мг бихромата калия растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл. Интенсивность окраски полученного стандартного раствора идентична по оптической плотности окраске бензинового экстракта, имеющего концентрацию каротина 0,00416 мг/мл.

Заполнение адсорбентом хроматографической колонки: нижний конец колонки плотно заполняют слоем стекловаты 2 см, а сверху стекловаты засыпают порошок оксида алюминия слоем 2 см и уплотняют его стеклянной палочкой.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 3 г растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы. При анализе сырого растительного материала для его обезвоживания в ступку добавляют 6 г прокаленного сульфата натрия (2 г на 1 г сырой растительной массы). К измельченному растительному материалу приливают 5 мл бензина и полученную смесь интенсивно перемешивают пестиком в течение 15 минут в вытяжном шкафу.

Смесь измельченного растительного материала в бензине переносят из ступки в колонку, размещая ее на поверхности оксида алюминия. Под нижний конец колонки устанавливают мерную колбу на 50 мл. Осторожно уплотняя содержимое колонки стеклянной палочкой, добиваются чтобы бензиновый экстракт протекал через колонку медленно. Порциями по 5-10 мл ополаскивают 3 раза ступку и пестик бензином и сливают его в колонку. Экстракцию бензином проводят до тех пор, пока объем бензинового экстракта в мерной колбе не достигнет 50 мл. Последние капли бензина, выходящего из колонки, должны быть бесцветными. Если цвет бензинового экстракта в мерной колбе зеленый, то его повторно пропускают через хроматографическую колонку.

Оптическую плотность бензинового раствора каротина измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 440 нм. Одновременно измеряют также оптическую плотность стандартного раствора бихромата калия.

**Обработка и оценка результатов.** Содержание каротина в растительной пробе вычисляют по формуле:

$$СК = \frac{0,00416 \cdot V \cdot D_1 \cdot 100}{H \cdot D_2},$$

где СК – содержание каротина в растительном образце, мг%;

0,00416 – количество каротина в 1 мл стандартного раствора (по раствору бихромата калия), мг;

V – объем бензинового раствора каротина, равный 50 мл;

D<sub>1</sub> – оптическая плотность раствора каротина в бензине;

100 – пересчет содержания каротина в мг%;

H – навеска растительного материала, г;

D<sub>2</sub> – оптическая плотность стандартного раствора бихромата калия.

Полученный результат сравнивают с теоретическими сведениями о содержании каротина в различной растительной продукции с учетом влияния на этот показатель природно-климатических условий, режима питания растений, способа и срока хранения продукции и делают выводы о качестве анализируемой растительной продукции.

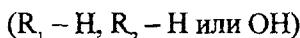
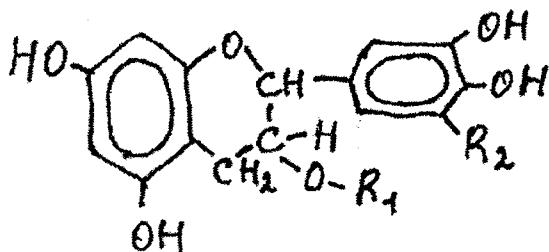
### Контрольные вопросы

1. Какова биологическая роль каротина в организмах растений, а витамина А в организмах человека и животных?
2. Сколько содержится каротина в корнеплодах, овощах, плодах и ягодах, вегетативной массе кормовых трав?
3. Как изменяется содержание каротина в листьях растений в процессе их роста и развития?
4. Каково влияние режима питания растений на накопление каротина в растительной продукции?
5. При каких условиях происходят потери каротина?
6. Как изменяется содержание каротина при созревании овощей, плодов и ягод?
7. Как определяют содержание каротина в растительной продукции?
8. По какому принципу ведется расчет содержания каротина при его определении колориметрическим методом?

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА Р В РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

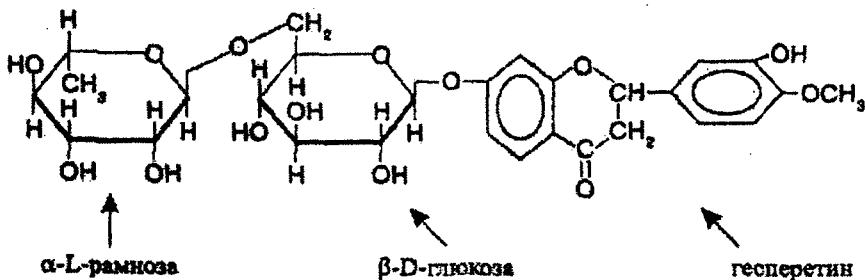
Вещества, обладающие Р-витаминной активностью, впервые были выделены из лимона, поэтому получили название цитрина. Действие этих веществ на биохимические процессы в организме тесно связано с аскорбиновой кислотой. К комплексу витамина Р относят флавоноидные соединения, относящиеся к катехинам, флаванонам и флавонолам. Наиболее высокой Р-витаминной активностью обладают катехины, относящиеся к группе восстановленных флавоноидных соединений.

Катехины благодаря наличию двух асимметрических атомов углерода в составе кислородсодержащей циклической группировки присутствуют в растениях в виде четырех пространственных изомеров, содержащих в качестве заместителей гидроксильные группы. Строение катехинов можно представить следующей формулой:

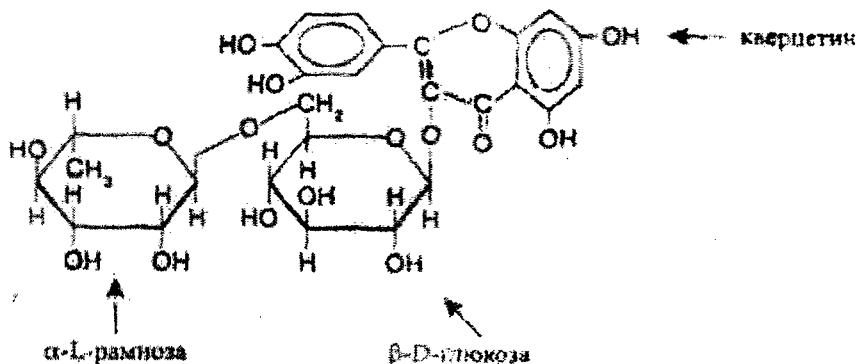


В растениях наиболее распространены катехин (правовращающий) и эпикатехин (левовращающий), у которых радикалы  $R_1$  и  $R_2$  замещены на водород. В меньшем количестве содержатся галлокатехин (правовращающий) и эпигаллокатехин (левовращающий), у них радикал  $R_1$  замещается на  $H$ ,  $R_2$  — на гидроксил. Значительная часть катехинов связывается в виде эфиров с галловой кислотой, которая взаимодействует с гидроксилом циклической кислородсодержащей группировки ( $R_1$  замещается на остаток галловой кислоты).

Довольно высокой Р-витаминной активностью обладают также флавоноидные соединения, содержащиеся в растениях в виде гликозидов, — гесперидин и рутин. Молекулы гесперидина образованы из остатков  $\alpha$ -L-рамнозы,  $\beta$ -D-глюкозы и метоксифлаванона — гесперетина, соединенных О-гликозидными связями:



Рутин представляет собой  $\alpha$ -L-рамнозил- $\beta$ -D-глюкозилпроизводное флавонола кверцетина:



Вещества, относящиеся к комплексу витамина Р, принимают участие в окислительно-восстановительных реакциях. Благодаря их легкой окисляемости они предохраняют от окисления другие соединения. Вследствие недостатка витамина Р понижается упругость кровеносных сосудов и проницаемость капилляров, что является причиной точечных кровоизлияний. Суточная потребность человека в витамине Р – 25-50 мг.

Много этого витамина содержится в растительных продуктах, богатых аскорбиновой кислотой – черной смородине, сладком перце, плодах цитрусовых. Однако известны растительные продукты с низким содержанием аскорбиновой кислоты, но богатые цитрином – чайный лист, некоторые сорта яблок, зерно гречихи. При хранении и переработке плодовоовощной продукции потери веществ, обладающих Р-витаминной активностью, существенно ниже, чем аскорбиновой кислоты.

Содержание витамина Р в некоторых растительных продуктах находится в следующих пределах, мг-%:

Яблоки	20-45	Капуста и корнеплоды	30-50
Баклажаны, красный перец, листовые овощи	50-250	Вишня	100-250
Черная смородина	до 1000	Клюква	200-300

Катехины содержатся во многих плодах и ягодах – яблоках, грушах, айве, персиках, абрикосах, вишне, землянике, смородине, малине, бруснике и др. Особенно много катехинов накапливается в молодых побегах чайного растения (до 30% от сухой массы).

Гесперидина очень много содержится в плодах цитрусовых – лимонах, апельсинах, мандаринах, причем наиболее богата гесперидином кожура цитрусовых плодов. Рутин в большом количестве найден в коре дуба, чайном листе, листьях яблони, листьях и плодах гречихи, хмеле, ягодах винограда. По витаминной активности гесперидин и рутин уступают катехинам.

**Принцип метода.** Определение флавоноидных веществ, обладающих Р-витаминной активностью, основано на окислении их перманганатом калия с использованием в качестве индикатора индигокармина, который после окисления флавоноидов дает с перманганатом калия желтое окрашивание.

**Оборудование.** Весы лабораторные; фарфоровые ступки с пестиками диаметром 6-8 см; колбы конические термостойкие на 150 мл; воронки диаметром 6-8 см; дозирующие пипетки на 10 мл; мерные цилиндры на 10 мл; фильтры бумажные; мерные колбы на 1 л.

**Реактивы.** Дистиллированная вода; перманганат калия (в виде фиксанала); индигокармин; концентрированная серная кислота.

**Приготовление растворов.** 0,01 М раствор перманганата калия: в мерной колбе на 1 л готовится из фиксанала 0,1 М водный раствор перманганата калия, из которого при разбавлении дистиллированной водой получают 0,01 М раствор.

Раствор индигокармина: 1 г индигокармина помещают в стакан из термостойкого стекла и растворяют в 50 мл концентрированной серной кислоты, затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу на 1 л, заполненную на 0,7 объема дистиллированной водой; после перемешивания и охлаждения объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

**Ход определения.** Навеску растительного материала 1 г (вегетативная масса растений, овощи, плоды, ягоды) растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством кварцевого песка до получения однородной массы и количественно переносят в коническую колбу из термостойкого стекла с использованием 50 мл дистиллированной

воды. Полученную смесь кипятят в течение 5 минут, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в другую коническую колбу.

Для титрования берется 10 мл фильтрата, к которому в конической колбе на 150 мл добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель раствора индигокармина, дающего синее окрашивание титруемого раствора. Полученный раствор титруют из бюретки 0,01 М раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски, не исчезающей в течение 30 секунд.

**Обработка и оценка результатов.** Содержание витамина Р вычисляют по следующей формуле:

$$X = \frac{0,0064 \cdot V \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot H},$$

где Х – содержание витамина Р в пересчете на рутин, мг%;

0,0064 – количество мг флавоноидов в пересчете на рутин, которое окисляется при добавлении 1 мл 0,01 М раствора перманганата калия;

V – объем 0,01 М раствора перманганата калия, затраченный на титрование, мл;

50 – общий объем раствора витамина Р, полученного из растительной пробы, мл;

100 – коэффициент пересчета содержания витамина Р в мг%;

10 – объем раствора витамина Р, взятый для титрования раствором перманганата калия, мл;

H – навеска растительного материала, г.

Полученный результат сравнивают с литературными данными и результатами анализа других образцов, представляющих собой разные растительные продукты. На основе выполненного анализадается оценка качества данного растительного продукта по содержанию витамина Р.

### Контрольные вопросы

1. Какие флавоноидные соединения относятся к комплексу витамина Р?
2. Какова биологическая роль витамина Р?
3. В каких растительных продуктах содержится много катехинов?
4. Какие растительные продукты богаты гесперидином и рутином?
5. В чем состоят особенности метода определения в растительных продуктах витамина Р?
6. По какой методике проводится выделение из растительных проб флавоноидных веществ, обладающих Р-витаминной активностью, и титрование витаминного экстракта раствором перманганата калия?
7. Как выполняется расчет содержания витамина Р в растительной продукции?

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

**Активаторы ферментов** – вещества или ионы, повышающие каталитическую активность ферментов.

**Активность ферментов** – способность ферментных молекул осуществлять каталитическое действие.

**Активный (катализитический) центр фермента** – участок молекулы фермента, с которым взаимодействует субстрат в ходе ферментативной реакции.

**Алкалоиды** – продукты обмена веществ большой группы растительных организмов, обладающие сильным физиологическим действием на организмы человека и животных и включающие в своем составе азотистые гетероциклические, а в отдельных случаях ароматические (горденин, эфедрин) и стероидные (соланидин, соласодин) группировки.

**Альбумины** – водорастворимые белки.

**Амилазы** – ферменты, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах крахмала.

**Амилоза** – полисахарид крахмала, имеющий неразветвленную цепь моносахаридных остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, соединенных  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -связями.

**Амилопектин** – полисахарид крахмала, имеющий разветвленную цепь моносахаридных остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, которые в линейной цепи соединяются  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -связями, а в точках ветвления  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -связями.

**Аминопептидазы** – протеолитические ферменты, катализирующие гидролитическое отщепление аминокислотных остатков от N-концов полипептидов.

**Аскорбиновая кислота** (витамин С) – водорастворимый витамин, проявляющий биологическую активность в виде L-формы и участвующий в реакциях гидроксилирования, в ходе которых происходит включение кислорода воздуха в различные органические субстраты. Витамин С не синтезируется в организме человека и поэтому должен поступать в организм с пищей. При его недостатке наблюдается нарушения обмена веществ, связанные с ослаблением реакций гидроксилирования, которые вызывают повышенную утомляемость организма, головную боль, кровоизлияния и расщатывание зубов. Длительное отсутствие в пище человека аскорбиновой кислоты приводит к заболеванию цингой.

**Аскорбиногены** – химические вещества, в которых аскорбиновая кислота содержится в связанной форме и может высвобождаться при их гидролизе.

**Ацилглицерины** – сложные эфиры глицерина и жирных кислот.

**Белки** – биополимеры, молекулы которых образуются из остатков протеиногенных аминокислот, соединенных пептидными связями.

**Белковые ингибиторы ферментов** – белковые молекулы, способные образовывать с ферментами неактивные комплексы.

**Биологическая ценность белков** – показатель, выражающий сбалансированность белков по содержанию незаменимых аминокислот.

**Вещества вторичного происхождения (вторичные метаболиты)** – органические вещества в основном растительного происхождения, которые синтезируются в специальных ответвлениях биохимических путей, не подвергаются интенсивным превращениям, но определяют специфику обмена веществ у определенных групп растений.

**Витамины** – биологически активные вещества, строго необходимые для жизнедеятельности организмов в небольших количествах. Биологическая активность витаминов заключается в том, что они входят в качестве активных группировок в состав ферментов.

**Газоудерживающая способность теста** – способность хлебопекарного теста удерживать диоксид углерода, выделяющийся при спиртовом брожении, за счет упруго-эластичных свойств клейковины и обеспечивать нормальную пористость хлебного мякиша.

**Гемы** – простетические группы, включающие железо-порфириновые группировки.

**Гесперидин** – флавоноидный гликозид, обладающий Р-витаминной активностью и включающий в качестве агликона флаванон гесперетин, а в составе углеводной группировки дисахарид, который образован из остатков  $\alpha$ -L-рамнозы и  $\beta$ -D-глюкозы, соединенных  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -связью, и присоединен О-гликозидной связью к 7 углеродному атому гесперетина.

**Гидролазы** – ферменты, катализирующие расщепление химических связей с участием молекул воды.

**Гликозидазы** – ферменты, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах гликозидов, олиго- и полисахаридов.

**Гликозиды** – производные моно- и олигосахаридов, образующиеся в результате присоединения к полуацетальному гидроксилу вещества неуглеводной природы (агликона).

**Глютатион** – биологически активный пептид, образующийся из остатков аминокислот глутаминовой кислоты, цистеина и глицина.

**Дегидроаскорбиновая кислота** – продукт окисления аскорбиновой кислоты.

**Дегидрогеназы** – окислительно-восстановительные ферменты, катализирующие отщепление водорода от органических субстратов.

**Декстрины** – промежуточные продукты гидролиза крахмала под действием амилолитических ферментов.

**Денатурация белков** – необратимое изменение пространственной структуры белковых молекул, которое сопровождается потерей их нативных свойств.

**Дипептидазы** – протеолитические ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей в молекулах дипептидов.

**Дубильные вещества** – полимерные фенольные соединения, дающие при гидролизе мономерные вещества фенольной и нефенольной природы (галловую и эллаговую кислоты, моносахариды, катехины и лейкоантоксианы, хинную кислоту и др.).

**Жиры** – запасные липиды, представляющие собой смесь сложных эфиров глицерина и жирных кислот.

**Зимогены (проферменты)** – белковые предшественники при синтезе ферментов, которые превращаются в каталитически активные молекулы под воздействием специфических протеаз, восстановителей дисульфидных связей или в результате ковалентных модификаций.

**Изоферменты** – множественные молекулярные формы фермента, которые катализируют одну и ту же биохимическую реакцию, обладают одним типом субстратной специфичности, но различаются по первичной структуре и физико-химическим свойствам их белковых молекул.

**Ингибиторы ферментов** – вещества или ионы, подавляющие каталитическую активность ферментов.

**Индукцильные ферменты** – ферментные белки, синтез которых осуществляется (индуцируется) при поступлении в организм субстратов данных ферментов.

**Иодное число жира** – химический показатель, выражающий содержание в ацилглицеринах жира остатков ненасыщенных жирных кислот.

**Карбоксипептидазы** – протеолитические ферменты, катализирующие гидролитическое отщепление аминокислотных остатков от С-концов полипептидов.

**Каротиноиды** – жирорастворимые пигменты, включающие каротины и их кислородсодержащие производные – ксантофиллы.

**Каротины** – тетратерпены, входящие в состав пигментных комплексов фотосистем растений и водорослей, являющиеся биохимическими предшественниками (провитаминами) витамина А<sub>1</sub>.

**Катал** – единица активности ферментов. За 1 катал принимается каталитическая активность, способная катализировать превращение 1 моля субстрата за 1 секунду в заданной системе определения активности фермента.

**Каталаза** – фермент, катализирующий разложение пероксида водорода на кислород и воду.

**Катехины** – флавонOIDные соединения, содержащиеся в растениях в виде четырех пространственных изомеров (катехина, галлокатехина, эпикатехина, эпигаллокатехина) и обладающие Р-витаминной активностью.

**Кислотное число жира** – химический показатель, выражающий содержание в жире свободных жирных кислот.

**Клейковина** – белковый сгусток, образующийся при отмывании водой замешанного из измельченного зерна или муки теста.

**Кодоны генетического кода** – последовательности из трех нуклеотидных остатков в структуре генов, кодирующие остатки протеиногенных аминокислот в белковых полипептидах.

**Коферменты** – активные группировки в составе каталитических центров двухкомпонентных ферментов.

**Крахмал** – запасной полисахарид растений, молекулы которого образуются из остатков  $\alpha$ -D-глюкозы.

**Липазы** – ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирных связей ацилглицеринов жира с образованием глицерина и свободных жирных кислот.

**Липопротеиды** – разновидности белков, содержащие в своем составе липидные группировки.

**Липиды** – органические вещества, включающие жиры, фосфолипиды, гликолипиды, стероидные липиды, воски и их производные.

**Макроэргические соединения** – специализированные формы органических веществ, имеющие сильно поляризованные связи, при гидролизе которых происходит большое изменение свободной энергии (при стандартных условиях более 30 кДж/моль).

**Меланины** – химические вещества, образующиеся в свежих растительных продуктах при окислении ароматических аминокислот и фенольных соединений и обуславливающие потемнение этих продуктов.

**Меланоидины** – химические вещества, образующиеся в растительных продуктах при взаимодействии аминокислот с редуцирующими сахарами и вызывающие потемнение этих продуктов.

**Молярная активность фермента** – каталитическая активность в расчете на 1 моль фермента.

**Моносахариды** – органические вещества, представляющие собой линейные или замкнутые цепочки из 3-7 углеродных атомов и имеющие гидроксильные, а также альдегидные или кетонные группы.

**Мультиферментные комплексы** – объединенные в единый комплекс ферментные системы, катализирующие последовательные превращения промежуточных продуктов в процессе синтеза различных веществ в организме.

**Нативная конформация белковой молекулы** – термодинамически наиболее устойчивая в физиологической среде пространственная структура белковой молекулы, обеспечивающая выполнение свойственной данному белку биологической функции.

**Незаменимые аминокислоты** – аминокислоты, которые не синтезируются в организмах человека и животных, но необходимы для образования белковых молекул в этих организмах.

**Незаменимые жирные кислоты** – полиненасыщенные жирные кислоты, имеющие две или три двойные связи и не синтезирующиеся в организмах человека и животных.

**Нитратредуктаза** – фермент растений и микроорганизмов, катализирующий восстановление нитратов в нитриты.

**Нитритредуктаза** – фермент растений и микроорганизмов, катализирующий восстановление нитритов в аммонийную форму азота.

**Оксигеназы** – ферменты, катализирующие присоединение к различным субстратам кислорода.

**Олигосахариды** – органические вещества, включающие остатки двух или нескольких моносахаридов.

**Пептидазы** – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление пептидных связей в молекулах пептидов с образованием аминокислот.

**Пероксидазы** – ферменты, катализирующие реакции окисления различных субстратов с участием пероксида водорода.

**Полисахариды** – линейные или разветвленные полимеры, включающие остатки многих моносахаридов (от 10 до 10 тыс.)

**Прогоркание жиров** – химический процесс распада и окисления жиров, в ходе которого образуются продукты окисления в виде альдегидов и кетонов, приводящие к порче жира.

**Простетическая группа** – коферментная группировка, прочно связанная с ферментным белком.

**Протеазы (протеолитические ферменты)** – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление пептидных связей в молекулах белков.

**Протеиды** – белки, содержащие, кроме аминокислотных остатков, другие группировки не аминокислотной природы.

**Протеиназы** – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление пептидных связей в молекулах белков с образованием пептидов и аминокислот.

**Протеиногенные аминокислоты** – аминокислоты, участвующие в синтезе белков; остатки этих аминокислот в структуре белков кодируются кодонами генетического кода.

**Протеины** – белки, молекулы которых включают только аминокислотные остатки, соединенные пептидными связями, и не содержат других группировок не аминокислотной природы.

**Растительные масла** – растительные жиры, имеющие жидкую консистенцию вследствие того, что их ацилглицерины образуются преимущественно с участием ненасыщенных жирных кислот.

**Редуцирующие сахара** – моносахариды и олигосахариды, имеющие свободные альдегидные или кетонные группы и способные вступать в окислительно-восстановительные реакции.

**Рутин** – флавоноидный гликозид, обладающий Р-витаминной активностью и включающий в качестве агликона флавонол кверцетин, а в составе углеводной группировки дисахарид, который образован из остатков  $\alpha$ -L-рамнозы и  $\beta$ -D-глюкозы, соединенных  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -связью, и присоединен О-гликозидной связью к 3 углеродному атому кверцетина.

**Самосогревание зерна** – накопление тепла во влажной зерновой массе в результате усиления процесса дыхания.

**Сахара** – растворимые в воде моносахариды и олигосахариды, имеющие сладкий вкус.

**Сахароза** – дисахарид, молекулы которого образуются из остатков  $\alpha$ -D-глюкозы и  $\beta$ -D-фруктозы.

**Сивушные масла** – побочные продукты спиртового брожения, которые представляют собой смесь спиртов (амилового, изоамилового, изобутилового и др.), образующихся в результате окислительного дезаминирования аминокислот и придающие пищевому спирту, вину и пиву неприятный вкус и запах.

**Солод** – высушенное проросшее зерно, которое используется как источник активных амилолитических ферментов.

**Стероидные липиды** – класс липидов, являющихся производными циклопентанопергидрофенантрена.

**Субстраты ферментов** – химические вещества, которые подвергаются превращениям под действием ферментов.

**Сырой протеин** – показатель химического состава растительных продуктов, выражающий содержание белков и небелковых азотистых веществ, определяемых по количеству общего азота.

**Сырой жир** – показатель химического состава растительных продуктов, выражающий содержание жира и других несвязанных форм липидов, растворяющихся в диэтиловом эфире.

**Терпены** – органические вещества в основном растительного происхождения, построенные из остатков изопрена.

**Тиоловые протеиназы** – протеолитические ферменты, имеющие в активном центре тиоловые группировки (HS-группы).

**Токоферолы** – биологически активные вещества, относящиеся к комплексу витамина Е и включающие в своем составе группировку гидрохинона и фитола.

**Углеводы** – органические вещества, включающие моносахариды, олигосахариды, полисахариды и их производные.

**Удельная активность фермента** – каталитическая активность фермента в расчете на единицу массы ферментного препарата.

**Фенольные соединения** – органические вещества, содержащие ароматические группировки, в которых один или больше атомов водорода замещены на гидроксильные группы.

**Ферменты** – специализированные формы белковых молекул, обладающие каталитической активностью.

**Флавоноидные соединения** – полициклические соединения, которые являются производными флавана.

**Фосфолипазы** – гидролитические ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирных связей в молекулах фосфолипидов.

**Фосфолипиды** – липиды, включающие остатки глицерина, жирных кислот, ортофосфорной кислоты и специфических азотистых или других соединений.

**Цитрин (витамин Р)** – комплекс флавоноидных соединений (кетохины, гесперидин, рутин), обладающих Р-витаминной активностью.

**Эфирные масла** – легколетучие жидкости, обуславливающие аромат многих растительных продуктов, характерный вкус и запах овощей, плодов и ягод. В состав эфирных масел входят представители монотерпенов и сесквитерпенов и их кислородсодержащие производные, а также нетерпеновые спирты, альдегиды, некоторые карбоновые кислоты и углеводороды, сложные эфиры, кетоны.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КоА – кофермент А

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФМН – флавинмононуклеотид

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ДОФА – диоксифенилаланин

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### 1. Атомные массы некоторых химических элементов

Название элемента	Символ	Атомная Масса	Название элемента	Символ	Атомная масса
Азот	N	14,01	Магний	Mg	24,31
Алюминий	Al	26,98	Марганец	Mn	54,94
Аргон	Ar	39,95	Медь	Cu	63,54
Барий	Ba	137,34	Молибден	Mo	95,94
Бор	B	10,81	Мышьяк	As	74,92
Бром	Br	79,91	Натрий	Na	22,99
Водород	H	1,01	Никель	Ni	58,71
Вольфрам	W	183,85	Олово	Sn	118,69
Гелий	He	4,00	Палладий	Pd	106,40
Железо	Fe	55,85	Платина	Pt	195,09
Золото	Au	196,97	Радий	Ra	226,00
Йод	I	126,90	Ртуть	Hg	200,59
Кадмий	Cd	112,40	Рубидий	Rb	85,47
Калий	K	39,10	Свинец	Pb	207,19
Кальций	Ca	40,08	Селен	Se	78,96
Кислород	O	16,00	Сера	S	32,06
Кобальт	Co	58,93	Серебро	Ag	107,87
Кремний	Si	28,09	Стронций	Sr	87,62
Лантан	La	138,91	Сурьма	Sb	121,75
Литий	Li	6,94	Фтор	F	19,00
Титан	Ti	47,90	Хлор	Cl	35,45
Углерод	C	12,01	Хром	Cr	52,00
Уран	U	238,03	Цезий	Cs	132,91
Фосфор	P	30,97	Цинк	Zn	65,37

## 2. Буферные растворы

0,2 М ацетатный буфер (рН=3,6-5,8):

0,2 М раствор  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 27,22 г  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 М раствор уксусной кислоты ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ): в 1 л дистиллированной воды растворяют 11,49 мл концентрированной уксусной кислоты. Для получения буферных растворов с заданными значениями рН смешивают растворы  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_3\text{COOH}$  в указанных в таблице соотношениях.

рН при 18°C	0,2 М раствор $\text{CH}_3\text{COONa}$ , мл	0,2 М раствор $\text{CH}_3\text{COOH}$ , мл	рН при 18°C	0,2 М раствор $\text{CH}_3\text{COONa}$ , мл	0,2 М раствор $\text{CH}_3\text{COOH}$ , мл
3,6	75	925	4,8	590	410
3,8	120	880	5,0	700	300
4,0	180	820	5,2	790	210
4,2	265	735	5,4	860	140
4,4	370	630	5,6	910	90
4,6	490	510	5,8	940	60

0,05 М фосфатный буфер (рН = 5,8-8,0):

0,05 М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 17,911 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 М раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 7,802 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Для получения буферных растворов с заданными значениями рН смешивают растворы  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  в указанных в таблице соотношениях.

рН	0,05 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл	0,05 М раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , мл	рН	0,05 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл	0,05 М раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , мл
5,8	80	920	7,0	610	390
6,0	123	877	7,2	720	280
6,2	185	815	7,4	810	190
6,4	265	735	7,6	870	130
6,6	375	625	7,8	915	85
6,8	490	510	8,0	947	53

1/15 М фосфатный буфер (рН = 4,8-8,0):

1/15 М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 11,866 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1/15 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 9,073 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Для получения буферных

растворов с заданными значениями pH смешивают растворы  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в указанных в таблице соотношениях.

pH	1/15 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл	1/15 М раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл	pH	1/15 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , мл	1/15 М раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл
4,8	3,5	996,5	6,6	371	629
5,0	9,5	990,5	6,8	492	508
5,2	18	982	7,0	612	388
5,4	30	970	7,2	726	274
5,6	49	951	7,4	818	182
5,8	79	921	7,6	885	115
6,0	121	879	7,8	936	64
6,2	184	816	8,0	969	31

0,05 М фосфатный буфер (pH = 5,8-8,0):

0,2 М раствор  $\text{NaOH}$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 8 г  $\text{NaOH}$ ; 0,2 М раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : в 1 л дистиллированной воды растворяют 27,218 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Для получения буферных растворов с заданными значениями pH смешивают 50 мл раствора 0,2 М раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  с соответствующим объемом 0,2 М раствора  $\text{NaOH}$ , указанным в таблице, и доводят объем буферной смеси до 200 мл дистиллированной водой (свободной от диоксида углерода).

pH	0,2 М раствор $\text{NaOH}$ , мл	0,2 М раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл	pH	0,2 М раствор $\text{NaOH}$ , мл	0,2 М раствор $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл
5,8	3,6	50	7,0	29,1	50
6,0	5,6	50	7,2	34,7	50
6,2	8,1	50	7,4	39,1	50
6,4	11,6	50	7,6	42,4	50
6,6	16,4	50	7,8	44,5	50
6,8	22,4	50	8,0	46,1	50

### 3. Важнейшие кислотно-основные индикаторы

Наименования индикаторов	Изменение цвета		Интервал pH перехода окраски	Рабочие растворы
	кислая среда	щелочная среда		
Фенолфталеин	бесцветный	красный	8,0-9,6	0,1% в 50%-ном этиловом спирте
Тимолфталеин	бесцветный	Синий	9,3-10,5	0,1% в 80%-ном этиловом спирте
Тимоловый синий	желтый	Синий	8,0-9,6	0,1% водный р-р
Бромтимоловый синий	желтый	Синий	6,0-7,6	0,1% водный р-р
Метиловый красный	красный	желтый	4,2-6,2	0,2% водный р-р
Метиловый оранжевый	красный	оранжевый	3,1-4,4	0,1% водный р-р

### 4. Объемы концентрированных кислот для приготовления процентных растворов этих кислот, мл/л

Кислоты	Удельная плотность при 15°C, г/см <sup>3</sup>	Массовая доля исходного вещества, %	25 %	20 %	10%	5 %	2 %	1 %
HCl	1,19	37,23	634,8	496,8	236,4	115,4	45,5	22,6
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,84	95,60	167,7	129,9	60,6	29,3	11,5	5,6
CH <sub>3</sub> COOH	1,05	99,50	247,8	196,7	97,1	48,2	19,2	9,5

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 2002, – 528 с.
2. Григорьев Н.Г., Волков Н.П., Воробьев Е.С. и др. Биологическая полноценность кормов. – М.: Агропромиздат, 1989, – 287 с.
3. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Бондаренко Г.И. Ферментативное восстановление нитросоединений. – М.: ВИНИТИ, 1990, – 120 с.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991, – 453 с.
5. Казаков Е.Д., Карпиленко Г.П. Биохимия зерна и хлебопродуктов. – СПб.: Гиорд, 2005, – 510 с.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа, 1980, – 272 с.
7. Новиков Н.Н. Биохимия растений. – М.: Издательство МСХА, 2003, – 168 с.
8. Новиков Н.Н. Биохимия ферментов. – М.: Издательство РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2010, – 106 с.
9. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1985, – 255 с.
10. Щербаков В.Г., Лобанов В.П. Биохимия и товароведение масличного сырья. – М.: КолосС, 2003, – 360 с.
11. Попов Е.М. Структурная организация белка. – М.: Наука, 1997, – 604 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	3
Техника безопасности при выполнении лабораторных работ по биохимии .....	4
Определение сахаров в растительной продукции фенольным методом .....	6
Определение кислотного числа растительных жиров .....	15
Определение йодного числа растительных жиров по Ганусу ...	19
Определение свободных аминокислот в растительной продукции методом формольного титрования .....	24
Определение белков биуретовым методом .....	31
Спектрофотометрический метод определения белков .....	36
Определение активности каталазы по А.Н. Баху и А.И. Опарину .....	39
Определение активности амилаз в прорастающих зерновках злаковых культур .....	44
Определение активности липаз в семенах масличных и злаковых культур .....	50
Определение активности нитратредуктазы в растительной продукции .....	53
Определение активности протеолитических ферментов .....	59
Определение активности пероксидаз в растительной продукции .....	66
Определение аскорбиновой кислоты в растительной продукции йодатным методом .....	70
Определение содержания каротина в растительной продукции колориметрическим методом .....	75
Определение содержания витамина Р в растительной продукции .....	79
Словарь терминов .....	83
Список сокращений .....	90
Приложения .....	91
Список литературы .....	95

*Учебное издание*

**Новиков Николай Николаевич  
Таразанова Татьяна Васильевна**

# **ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ**

**Учебное пособие**

**Компьютерная верстка, оригинал-макет – Я.М. Ильина  
Обложка – Н.В. Савина**

Подписано в печать 16.07.2012 г. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 576. Усл. кр.-отт. 6,06.  
Тираж 100 экз. Изд. № 89. Зак. 326.

Издательство РГАУ-МСХА  
127550, Москва, Тимирязевская ул., 44  
Тел.: (499) 977-00-12, 977-40-64

