Національний університет
водного господарства
та природокористування

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та природокористування

В.О. Володимирець

БІОХІМІЯ РОСЛИН

ІНТЕРАКТИВНИЙ КОМПЛЕКС НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Рівне 2006

Національний університет
водного господарства
та природокористування

УДК 58:577.1 (076)
ББК 28.5:28.072я73
В68

Затверджено вченою радою Національного університету водного господарства та природокористування. Протокол № 10 від 27.10 2006 р.

Рецензенти:

О.І. Терек, доктор біологічних наук, професор Львівського національного університету ім. І. Франка;
Д.В. Лико, доктор сільськогосподарських наук, професор Рівненського державного гуманітарного університету;
М.С. Кобилецька, кандидат біологічних наук, асистент Львівського національного університету ім. І. Франка

Володимирець В.О.

В68 Біохімія рослин: інтерактивний комплекс навчально-методичного забезпечення. – Рівне: НУВГП, 2006. – 127 с.

Навчально-методичний комплекс містить робочу програму, зміст і методичні вказівки до вивчення окремих змістовних модулів, методичні вказівки до виконання лабораторних робіт, тематику індивідуальної роботи, завдання для виконання контрольних робіт для студентів заочної форми навчання, дворівневі тестові завдання для перевірки засвоєння теоретичних знань лекційного курсу та знань методик якісного й кількісного аналізу, список рекомендованої літератури, що є складовими компонентами при вивченні дисципліни "Біохімія рослин" в умовах кредитно-модульної організації навчального процесу студентами спеціальності "Агрохімія та ґрунтознавство", а також студентами споріднених спеціальностей.

УДК 58:577.1 (076)
ББК 28.5:28.072я73

© В.О. Володимирець, 2006
© Національний університет водного господарства та природокористування, 2006

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ЗМІСТ

Вступ 5

1. Типова програма вибіркової навчальної дисципліни "Біохімія рослин"

1.1. Загальні відомості про дисципліну 7
1.2. Мета та завдання вивчення дисципліни 8
1.3. Тематичний план і розподіл навчального часу 8
1.4. Програмний матеріал змістовних модулів
Змістовний модуль 1. Статична біохімія 10
Змістовний модуль 2. Динамічна біохімія 12
1.5. Завдання для самостійної роботи 13
1.6. Оцінювання знань студентів 14

2. Методичні рекомендації до вивчення окремих модулів і тем дисципліни

Змістовний модуль 1. Статична біохімія 16
Змістовний модуль 2. Динамічна біохімія 23

3. Лабораторний практикум

Лабораторне заняття № 1. Якісне та кількісне визначення різних груп вуглеводів. Визначення вмісту сахарози в коренеплодах цукрових буряків 27
Лабораторне заняття № 2**.** Фізико-хімічні властивості ліпідів. Визначення жирових чисел 36
Лабораторне заняття № 3. Визначення вмісту щавлевої кислоти. Вивчення властивостей пігментів листка 44
Лабораторне заняття № 4. Визначення вмісту вітамінів у рослинному матеріалі 54
Лабораторне заняття № 5. Якісні реакції на амінокислоти. Визначення вмісту амінного азоту 62
Лабораторне заняття № 6. Розподіл амінокислот методом хроматографії на папері. Якісні реакції на білки та їх фізико-хімічні властивості 71
Лабораторне заняття № 7-8. Вивчення властивостей ферментів і визначення їх активності 80
Лабораторне заняття № 9. Якісне та кількісне визначення нуклеїнових кислот 90

4. Контрольні тестові завдання 97

5. Приклади завдань підсумкового контролю 115

Національний університет
водного господарства
та природокористування

6. Тематика індивідуальної роботи 119
7. Варіанти та завдання для виконання контрольної роботи студентам заочної форми навчання 121
8. Рекомендована література 125

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ВСТУП

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

Біохімія рослин обмежується вивченням рослинних організмів, яким властиві специфічні риси. Тому вона характеризується своїми особливостями, що пов'язані зі специфікою життєдіяльності рослин. Так, багато органічних речовин синтезуються лише в рослинах і поступають в інші організми з рослинною їжею, зокрема, незамінні амінокислоти, окремі вітаміни, деякі вуглеводи та ліпіди. Переважна більшість видів рослин за способом отримання енергії та живлення є фотолітотрофами, що обумовлює особливий характер метаболізму їхнього організму. Для рослин характерна досить велика різноманітність речовин вторинного синтезу, так званих вторинних метаболітів, куди, наприклад, відносять глікозиди, алкалоїди, фенольні сполуки, різні ефіри, фітонциди та ін. Особливістю рослинних організмів є також регуляція біологічних і фізіологічних процесів за участю фітогормонів та низькомолекулярних йонів.

Біохімія рослин тісно пов'язана з агрохімією та іншими сільськогосподарськими науками й має важливе значення для підготовки майбутніх фахівців із агрохімії та ґрунтознавства. Вона є фундаментальною біологічною наукою й теоретичною основою багатьох прикладних галузей, у тому числі й сільськогосподарського виробництва.

Безпосередній взаємозв'язок біохімії рослин із агрохімією та ґрунтознавством визначається тим, що органічна частина ґрунту в своїй основній масі утворена саме рослинним матеріалом, який визначає особливості ґрунтоутворюючих процесів і специфіку того або іншого типу ґрунту. Біохімічні та фізіологічні процеси рослинних організмів досить тісно пов'язані з різними властивостями й параметрами ґрунту та в підсумку визначають величину майбутнього врожаю. В агрохімії, особливо при аналізі рослинних зразків, широко використовуються різні біохімічні методи.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Запропонований комплекс містить усі основні навчально-методичні та навчальні матеріали, що необхідні для вивчення дисципліни “Біохімія рослин” студентам спеціальності “агрохімія та ґрунтознавство” при кредитно-модульній організації навчального процесу.

Вміщені в навчальному виданні лабораторні заняття ставлять за мету закріплення теоретичних знань шляхом набуття практичних навичок із статичної, динамічної й, у деякій мірі, функціональної біохімії рослин, опанування основними методами біохімічного аналізу. Під час проведення лабораторних занять студенти засвоюють методи якісного та кількісного визначення окремих біохімічних компонентів, досліджують їх метаболізм.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет водного господарства та природокористування

1. Типова програма вибіркової навчальної дисципліни ”Біохімія рослин”

1.1. Загальні відомості про дисципліну.

Предмет дисципліни: речовинний склад і метаболізм рослин.

/денна форма навчання/

Призначення: підготовка бакалаврів	Напрям, спеціальність, освітньо-кваліфікаційний рівень	Характеристика навчальної дисципліни
1	2	3
Кількість кредитів, відповідних ECTS: 3,0 **Модулів**: 2 **Змістовних модулів**: 2 **Загальна кількість годин**: 108 **Тижневих годин**: аудиторних – 4 СРС – 3	**Напрям підготовки**: 1301 “Агрономія”. **Спеціальність**: 6.130100 “Агрохімія та ґрунтознавство” **Освітньо-кваліфікаційний рівень**: бакалавр	**Вибіркова** Рік підготовки: 1-й Семестр: 2-й **Лекції**: 24 годин **Лабораторні**: 24 годин **Самостійна робота**: 60 годин **Вид контролю**: іспит

Примітка: співвідношення кількості годин аудиторних занять і самостійної роботи становить 44 % до 56 %.

/заочна форма навчання/

Призначення: підготовка бакалаврів	Напрям, спеціальність, освітньо-кваліфікаційний рівень	Характеристика навчальної дисципліни
1	2	3
Кількість кредитів, відповідних ECTS: 3,0 **Модулів**: 2 **Змістовних модулів**: 2 **Загальна кількість годин**: 108	**Напрям підготовки**: 1301 “Агрономія”. **Спеціальність**: 6.130100 “Агрохімія та ґрунтознавство” **Освітньо-кваліфікаційний рівень**: бакалавр	**Вибіркова** Рік підготовки: 2-й Семестр: 4-й **Лекції**: 8 годин **Лабораторні**: 8 годин **Самостійна робота**: 92 годин **Вид контролю**: іспит

Примітка: співвідношення кількості годин аудиторних занять і самостійної роботи становить 15 % до 85 %.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

1.2. Мета та завдання вивчення дисципліни.

Метою викладання дисципліни є вивчення речовинного складу рослинних організмів, структури, властивостей і біологічної ролі найважливіших сполук, які входять до складу рослин, окремих процесів метаболізму, що забезпечують нормальне функціонування організму.

Завданнями вивчення дисципліни є:

– розуміння біологічної ролі та значення різних груп органічних сполук у життєдіяльності рослинних організмів;

– з'ясування будови та структури найважливіших біохімічних компонентів;

– характеристика процесів метаболізму основних біохімічних сполук;

– з'ясування механізмів дії біологічно активних сполук рослин;

– біохімічна характеристика найважливіших життєвих процесів (фотосинтезу, дихання, різних видів бродіння, синтезу білків).

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

Навчальна програма розрахована на студентів, які навчаються за освітньо-кваліфікаційними програмами підготовки бакалаврів.

1.3. Тематичний план і розподіл навчального часу.

Тематичний план і розподіл навчального часу відповідають навчальному плану спеціальності "агрохімія та ґрунтознавство" й типовій програмі дисципліни "Біохімія рослин" студентам за напрямом підготовки "агрономія".

Зміст дисципліни розбитий на 12 тем, які включають основний матеріал із вивчення предмету дослідження в біохімії рослин, і відповідає меті та завданням цієї дисципліни. Ці теми об'єднані в два змістовні модулі, перший із яких включає матеріал із статичної біохімії, другий – матеріал із динамічної біохімії. Теми лабораторних

Національний університет
водного господарства
та природокористування

занять, враховуючи обмежений ліміт часу, відображають зміст першого модуля, оскільки він є базовим. На самостійну роботу винесено матеріал, який є легшим для засвоєння й носить переважно констатуючий характер. На індивідуальну роботу винесені теми, що носять додатковий характер і конкретизують окремі сторони основного матеріалу.

Засвоєння визначеного обсягу знань із "Біохімії рослин" дозволяє майбутнім спеціалістам реально розуміти й оцінювати процеси, що відбуваються у вирощуваних рослинах, і свідомо та кваліфіковано розробляти заходи щодо забезпечення відповідного рівня їх урожайності.

Назви тем змістовних модулів	Кількість годин, відведених на:			
	лекції	лабораторні роботи	самостійна робота	
Змістовний модуль 1. Статична біохімія				
Тема 1. Біохімія рослин як наука. Хімічний склад рослин.	2/0,5*	-	3/6	
Тема 2. Вуглеводи.	2/0,5	4/2	3/6	
Тема 3. Ліпіди.	2/0,5	4/2	2/6	
Тема 4. Фізіологічно активні рослинні речовини та речовини вторинного синтезу.	2/0,5	4/1	3/6	
Тема 5-6. Білки.	4/1	8/2	5/12	
Теми 7. Ферменти.	2/0,5	2/1	2/5	
Теми 8. Нуклеїнові кислоти.	2/0,5	2/-	2/6	
Разом	**16/4**	**24/8**	**20/47**	

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет водного господарства та природокористування

Змістовний модуль 2. Динамічна біохімія				
Тема 9. Метаболізм. Біохімія анаеробного перетворення вуглеводів.	2/1	-	2/6	
Тема 10. Біохімія аеробного перетворення вуглеводів.	2/1	-	3/6	
Тема 11. Біохімія фотосинтезу та хемосинтезу.	2/1	-	2/5	
Тема 12. Білковий обмін. Обмін нуклеїнових кислот.	2/1	-	3/6	
Разом	**8/4**	**-**	**10/23**	
Усього годин	***24/8***	***24/8***	***30/70***	
Підготовка до лабораторних робіт			***12/4***	
Підготовка до контрольних робіт			***18/18***	

2/0,5 - чисельник денна форма/знаменник заочна форма навчання*

1.4. Програмний матеріал змістовних модулів.

Змістовний модуль 1. СТАТИЧНА БІОХІМІЯ (максимально можлива кількість балів обов'язкового контролю – 92,0 балів)

Тема 1. Біохімія рослин як наука. Хімічний склад рослин (2 год.).

Предмет вивчення біохімії рослин, її зв'язок із агрохімією та іншими природничими науками. Практичне значення й завдання біохімії рослин. Методи біохімічних досліджень. Історія становлення та розвитку біохімії рослин. Елементний і речовинний склад рослинних організмів. Уміст і роль води та неорганічних речовин в організмі рослин.

Тема 2. Вуглеводи (2 год.).

Уміст і біологічна роль вуглеводів. Будова, властивості та класифікація вуглеводів. Характеристика найважливіших

Національний університет
водного господарства
та природокористування

представників і груп вуглеводів (моносахариди, мальтоза, целобіоза, сахароза, рафіноза, крохмаль, целюлоза, геміцелюлоза, пектини, агар-агар).

Тема 3. Ліпіди (2 год.).

Різноманітність ліпідних речовин, їх біологічна роль і властивості. Класифікація ліпідів. Характеристика найважливіших груп ліпідів (нейтральні жири, воски, фосфоліпіди, гліколіпіди).

Тема 4. Фізіологічно активні рослинні речовини та речовини вторинного синтезу (2 год.).

Уміст, біологічна роль, будова та властивості рослинних речовин – органічних кислот, фенольних сполук, глікозидів, алкалоїдів, пігментів, вітамінів, регуляторів росту.

Тема 5-6. Білки (4 год.).

Різноманітність білкових речовин, їх функції. Хімічна будова білків. Білокутворюючі амінокислоти та їх властивості. Структурні рівні організації білків. Фізико-хімічні властивості білків. Характеристика окремих груп простих і складних білків.

Тема 7. Ферменти (2 год.).

Поняття про ферменти. Загальні властивості ферментів. Механізми дії ферментів і їх вплив на процеси, що відбуваються в рослинах. Кінетика ферментативних реакцій. Одиниці активності ферментів. Класифікація ферментів.

Тема 8. Нуклеїнові кислоти (2 год.).

Відкриття та класифікація нуклеїнових кислот, їх біологічна роль. Нуклеотиди. Первинна структура нуклеїнових кислот. Будова, структура та властивості ДНК. Характеристика окремих типів РНК.

Лабораторні заняття:

денна форма –

Лабораторне заняття № 1. Якісні реакції на моно- та полісахариди. Якісне визначення вуглеводів. Визначення вмісту сахарози в коренеплодах цукрових буряків (4 год.).

Лабораторне заняття № 2. Фізико-хімічні властивості ліпідів. Визначення констант жиру (4 год.).

Лабораторне заняття № 3. Вивчення властивостей пігментів фотосинтетичної системи рослин. Визначення вмісту різних вітамінів у рослинному матеріалі (4 год.).

Лабораторне заняття № 4. Якісні реакції на амінокислоти. Визначення вмісту амінного азоту (4 год.).

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Лабораторне заняття № 5. Розподіл амінокислот методом хроматографії на папері. Якісні реакції на білки. Визначення ізоелектричної точки білків (4 год.).

Лабораторне заняття № 6. Вивчення властивостей ферментів. Виділення та встановлення складу нуклеопротеїнів (4 год.).

заочна форма –

Лабораторне заняття № 1. Якісні реакції на моно- та полісахариди. Якісне визначення вуглеводів. Фізико-хімічні властивості ліпідів (4 год.).

Лабораторне заняття № 2. Вивчення властивостей пігментів фотосинтетичної системи рослин. Якісні реакції на амінокислоти (2 год.).

Лабораторне заняття № 3. Якісні реакції на білки. Вивчення властивостей ферментів (2 год.).

Контроль засвоєння теоретичного матеріалу – 62,0 бал.
За відпрацювання лабораторних занять – 18,0 бал.
Самостійна робота – 12,0 балів

Змістовний модуль 2. ДИНАМІЧНА БІОХІМІЯ (максимально можлива кількість балів обов'язкового контролю – 36,0 балів)

Тема 9. Метаболізм. Біохімія анаеробного перетворення вуглеводів (2 год.).

Поняття про метаболізм рослинного організму та його складові етапи. Анаеробне перетворення вуглеводів, його види. Гліколіз, його біологічне значення, біохімічна характеристика. Бродіння, його види. Спиртове бродіння.

Тема 10. Біохімія аеробного перетворення вуглеводів (2 год.).

Аеробне перетворення вуглеводів, його біохімічна характеристика. Цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса). Дихальний ланцюг. Окислювальне фосфорилювання.

Тема 11. Біохімія фотосинтезу та хемосинтезу (2 год.).

Загальний механізм процесів фотосинтезу. Фотосинтетичне фосфорилювання. Темнова фаза фотосинтезу. Цикл Кальвіна. Особливості фотосинтезу в рослин C_4-типу. Біохімічні процеси хемосинтезу.

Тема 12. Білковий обмін. Обмін нуклеїнових кислот (2 год.).

Процеси розкладу амінокислот і білків мікроорганізмами ґрунту.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Загальні процеси дисиміляції білків та амінокислот. Загальні шляхи біосинтезу амінокислот у рослинних організмах. Біосинтез білків. Загальна схема біосинтезу нуклеїнових кислот.

Контроль засвоєння теоретичного матеріалу – 28,0 балів.
Самостійна робота – 8,0 балів.

1.5. Завдання для самостійної роботи.

№	Теми самостійної роботи	Кіль-кість годин
Змістовний модуль 1. Статична біохімія		
1	Зв'язок біохімії рослин із агрохімією та іншими природничими науками, практичне значення й завдання біохімії рослин, історія виникнення та розвитку біохімії рослин, роль у цьому вітчизняних учених, речовинний склад рослин, вміст і роль води та неорганічних речовин в організмі рослин.	3/6*
2	Біологічна роль вуглеводів, характеристика окремих представників вуглеводів (пентози, гексози, глікани).	3/6
3	Біологічна роль ліпідів, характеристика гліколіпідів і восків.	2/6
4	Характеристика окремих представників органічних кислот, фенольних сполук, глікозидів, алкалоїдів, регуляторів росту.	3/6
5-6	Функції білкових речовин, їх фізико-хімічні властивості, характеристика окремих груп простих і складних білків.	5/12
7.	Класифікація ферментів, одиниці активності ферментів.	2/5
8.	Характеристика різних типів РНК – інформаційної, транспортної, рибосомальної.	2/6
Змістовний модуль 2. Динамічна біохімія		
9.	Функції метаболізму, біологічне значення та енергетика гліколізу.	2/6
10.	Механізми здійснення окислювального фосфорилювання, функціонування дихального ланцюга.	3/6

Національний університет водного господарства та природокористування

11.	Характеристика біохімічних процесів хемосинтезу.	2/5
12.	Характеристика процесів розкладу амінокислот і білків у ґрунті, загальна характеристика процесів синтезу нуклеїнових кислот.	3/6
	Разом	**30/70**

5/8 - чисельник денна форма/знаменник заочна форма навчання*

1.6. Оцінювання знань студентів.

Оцінювання знань і вмінь студентів проводиться по кожному з двох змістовних модулів, за які студент може набрати максимально можливу кількість балів обов'язкового контролю.

Обов'язковий контроль включає в себе:

1) бали, отримані студентом при перевірці теоретичного матеріалу з тем програми дисципліни, що включені в змістовний модуль, у відповідності з конкретно розробленими завданнями (на оцінку "5" та "4" дозволяється перездача не більше трьох таких завдань);
2) бали, отримані студентом при перевірці теоретичного матеріалу на підсумковому контролі;
3) бали, отримані студентом за присутність і роботу на лабораторному занятті (максимально 2 бали за кожне заняття, за умови, що всі заняття дисципліни повинні бути відпрацьовані);
4) бали, отримані студентом за своєчасне та якісне оформлення зошита або інших матеріалів, які передбачені лабораторним заняттям (максимально 1 бал за кожне заняття, за умови, що всі заняття дисципліни повинні бути оформлені);
5) бали, отримані студентом за виконання самостійної роботи згідно програми дисципліни;
6) бали, отримані студентом за виконання індивідуальної роботи.

Додаткову кількість балів, яка додається до загальної суми балів обов'язкової контролю, студент може отримати:

1) за участь у науковій конференції університету (максимально 5 балів);
2) за участь у наукових конференціях інших закладів (максимально 8 балів);

Національний університет водного господарства та природокористування

3) за участь в олімпіадах у межах університету (максимально 8 балів);
4) за участь у загальнодержавних або регіональних олімпіадах (максимально 20 балів);
5) за активну наукову роботу (максимально 10 балів).

Максимально можлива кількість балів обов'язкового контролю приймається за 100 %, які відповідають 100 балам системи ECTS. До загальної суми балів, набраних студентом за обов'язковий контроль, додаються додаткові бали. Таким чином, відсоток набраної студентом сумарної кількості балів від максимально можливої кількості обов'язкового контролю визначає підсумкову оцінку з даної дисципліни згідно рекомендацій "Положення про кредитно-модульну систему…".

Шкала оцінювання згідно системи ECTS: 1-34 балів – незадовільно (F); 35-59 балів – незадовільно (FX); 60-63 балів – достатньо (E); 64-73 балів – задовільно (D); 74-81 балів – добре (C); 82-89 балів – дуже добре (B); 90-100 балів – відмінно (A). Залік зараховується, якщо набрано не менше 65 балів.

Розподіл балів обов'язкового контролю, присвоюваних студентам (у чисельнику – % від максимально можливої суми, в знаменнику – абсолютна кількість балів)

Змістовний модуль № 1										Змістовний модуль № 2			Підсумковий контроль	Всього
Тема 1	Тема 2	Тема 3	Тема 4	Тема 5-6	Тема 7	Тема 8	Самостійна робота	Лабораторні заняття	Всього	Тема 9-12	Самостійна робота	Всього		
6,0% / 10,0	5,5% / 9,0	3,5 % / 6,0	8,0% / 14,0	5,5% / 9,0	3,5 % / 6,0	5,0 % / 8,0	7,0% / 12,0	11,0% / 18,0	55,0% / 92,0	17,0% / 28,0	5,0% / 8,0	22,0% / 36,0	23,0% / 38,0	100% / 166,0

Національний університет
водного господарства
та природокористування

2. Методичні рекомендації до вивчення окремих модулів і тем дисципліни

Змістовний модуль 1. СТАТИЧНА БІОХІМІЯ

Тема 1. Біохімія рослин як наука. Хімічний склад рослин.

Вивчаючи цю тему, спочатку необхідно чітко з'ясувати предмет вивчення біохімії взагалі та біохімії рослин зокрема. Слід звернути увагу на те, що біохімія, як і інші біологічні науки, вивчає живі системи, однак вивчає їх на молекулярному та надмолекулярному рівнях – речовинний склад, його особливості, перетворення речовин у процесі життєдіяльності. Необхідно знати окремі розділи біохімії та що вони вивчають. Потрібно з'ясувати в чому полягають особливості предмету вивчення біохімії рослин як окремого розділу біохімії, розуміти місце біохімії в системі біологічних і ботанічних наук, чим саме воно визначається. Слід проаналізувати взаємозв'язок біохімії рослин із різними біологічними та іншими природними науками, а також прикладними науками й напрямками. Особливу увагу слід звернути на взаємозв'язок біохімії рослин із агрохімією та ґрунтознавством, з'ясувати в чому він проявляється. При вивченні матеріалу про практичне значення біохімії необхідно звернути увагу на ті прикладні науки, напрямки та галузі виробничої сфери, що безпосередньо або опосередковано використовують знання та досягнення біохімічної науки, що саме біохімія рослин для них дає. Слід знати основні завдання, що стоять перед сучасною біохімією в теоретичному, та, особливо, в практичному відношеннях, зокрема в сфері сільськогосподарського виробництва, переробки його сировини та зберігання отриманого врожаю. Щодо засвоєння матеріалу про методи біохімічних досліджень, то потрібно знати перелік найважливіших класичних і сучасних інструментальних методів, їх конкретне застосування. При вивченні матеріалу про історію виникнення та розвитку біохімії рослин слід знати коротку характеристику кожного з чотирьох періодів, які в ній виділяють. При цьому звертають увагу на найважливіші досягнення в кожному з періодів і пов'язують їх із науковою діяльністю конкретних учених. Слід знати прізвища вітчизняних учених і їх внесок у розвиток біохімічної науки.

При вивченні елементного та речовинного складу рослин спочатку слід з'ясувати предмет вивчення таких синтетичних наук як біогеохімія та біонеорганічна хімія, що більш детально займаються

Національний університет
водного господарства
та природокористування

вивченням елементного складу живих організмів, з'ясуванням ролі конкретних хімічних елементів і їх неорганічних форм у життєдіяльності організмів, встановленням шляхів їх надходження в живі системи. Необхідно проаналізувати поширення хімічних елементів у рослинному світі, окремо виділивши біофільні елементи й звернути увагу на 18 елементів, які найчастіше зустрічаються в тілі рослин і мають для них винятково важливе значення (слід знати коротку характеристику цих елементів). Необхідно дати визначення та навести приклади органогенних і зольних елементів. Далі слід навести та проаналізувати схему поділу хімічних елементів на групи Б. Полинова за їх присутністю в рослинах. Потрібно знати відносний уміст у тілі рослин найважливіших хімічних елементів, а також коротку характеристику трьох груп хімічних елементів за їх умістом у рослинах. Потім слід навести формулу та визначення коефіцієнта біологічного поглинання, його зміст при різних значеннях (коли він більший одиниці та коли він менший одиниці). Необхідно також проаналізувати залежність елементного та речовинного складу від різних внутрішніх і зовнішніх чинників. Потім потрібно з'ясувати в чому проявляється різноманітність речовинного складу рослин і назвати основні групи речовин, які зустрічаються в рослинних організмах. При вивченні зазначеної теми слід більш детально зупинитися на неорганічних речовинах. Зокрема, потрібно знати вміст води, її характерні та специфічні (аномальні) властивості в зв'язку з будовою молекули, форми знаходження та біологічну роль води в рослинних організмах. При характеристиці мінеральних солей необхідно звернути увагу на їх уміст, форми знаходження, а також слід з'ясувати загальну біологічну роль мінеральних солей у життєдіяльності рослин.

<u>Тема 2.</u> Вуглеводи.

При вивченні цієї теми, насамперед, слід з'ясувати походження назв "вуглеводи" та "гліциди". Необхідно знати, що представляють собою за хімічною природою вуглеводи. Далі слід вивчити вміст і біологічну роль вуглеводів в організмі рослин. Потім необхідно з'ясувати, на які групи поділяються вуглеводи й що кожна з них собою представляє. Особливу увагу при вивченні теми потрібно звернути на моносахариди, оскільки на їх прикладі розглядаються основні теоретичні питання структури не лише всіх вуглеводів, але й інших класів речовин. Крім того, з залишків моносахаридів

Національний університет
водного господарства
та природокористування

побудовані речовини інших груп вуглеводів. При цьому необхідно з'ясувати поділ моносахаридів на групи за наявністю альдегідної або кетонної груп, за числом атомів вуглецю, за наявністю різних додаткових функціональних груп. Потрібно звернути увагу на номенклатуру моносахаридів і засвоїти правила нумерації атомів вуглецю в їх формулах. Для розуміння структури вуглеводів слід знати які атоми називаються хіральними, вміти їх розпізнавати в формулах і пов'язувати з ними оптичну активність та стереоізомерію вуглеводів. Необхідно знати, що представляють собою D- і L-форми моносахаридів, їх поширення в живих організмах, уміти розпізнавати ці форми за приведеними формулами, писати L-форми за приведеними D-формами й навпаки. Потрібно знати, що представляють собою енантіомери та суть явища мутаротації. При вивченні будови моносахаридів слід уміти розрізняти структурні формули Фішера, якими зображають їх відкриті або ациклічні форми, та проекційні формули Хеуорса, якими зображають їх циклічні форми. Потрібно добре засвоїти правила складання фуранозних і піранозних циклічних форм вуглеводів на основі відомих відкритих форм. При цьому необхідно розуміти сам механізм утворення циклічних форм і появу глікозидної групи ОН. Потрібно знати чим відрізняються між собою α- та β-циклічні форми вуглеводів і які форми називаються аномерами. Слід вивчити загальні фізичні та основні хімічні (здатність до відновлення, окислення з утворенням трьох рядів кислот, дегідратація) властивості моносахаридів. Для характеристики окремих представників моносахаридів потрібно знати формули відкритих форм і знаходження в рослинних організмах таких речовин, як гліцеральдегід, дигідроксиацетон, еритроза, арабіноза, рибоза, 2-дезоксирибоза, рибулоза, глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза, седогептулоза. Для характеристики полісахаридів першого та другого порядків (для речовин: мальтоза, целобіоза, сахароза, рафіноза, крохмаль, целюлоза, геміцелюлоза, пектини, ага-агар) слід знати їх загальні фізичні властивості, поділ на окремі групи, коротку характеристику, знаходження в рослинних організмах, структурні формули, з залишків яких моносахаридів утворені, назви мономерних залишків у складі молекул полісахаридів першого порядку, якими зв'язками залишки сполучені. Потрібно також знати принципи методів лабораторного якісного визначення моносахаридів (реакція Троммера, реакція Фелінга, реакція відновлення аміачного розчину гідроксиду срібла, реакція Мілиша, реакція на пентози), сахарози,

Національний університет
водного господарства
та природокористування

крохмалю та кількісного визначення глюкози й сахарози в цукровому буряку мікрометодом М. Дюбуа.

Тема 3. Ліпіди.

При вивченні цієї теми, необхідно засвоїти матеріал про вміст, поширення та біологічну роль ліпідів у рослинних організмах. Необхідно знати хімічну природу ліпідів і їх загальні фізичні властивості. Потім потрібно вивчити перелік основних груп ліпідів. При характеристиці нейтральних жирів слід знати їх хімічну природу, загальну формулу та формули основних складових компонентів жирів (вищих жирних насичених і ненасичених кислот, вищих спиртів), суть жирових чисел або констант. Необхідно засвоїти написання формул нейтральних жирів за приведеними назвами. При характеристиці гліколіпідів слід знати їх хімічну природу, поділ на групи, поширення в рослинних організмах, приклади формул окремих представників. При характеристиці фосфоліпідів слід знати їх поділ на групи та хімічну природу, їх біологічну роль, загальну формулу гліцерофосфоліпідів, формули окремих представників (фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину, фосфатидилхоліну, 1-фосфатидилміоінозит-3,4-дифосфату). При характеристиці стероїдів слід знати їх хімічну природу, представленість у рослинних організмах, біологічну роль, загальну структурну формулу пергідроциклопентанфенантрену, що є основою стероїдів. При характеристиці восків слід знати їх загальний склад і поширення в рослинних організмах. Необхідно також знати лабораторні методи дослідження розчинності жирів і стабілізації жирових емульсій, омилення жирів, отримання вільних жирних кислот і нерозчинних кальцієвих мил, принципи методів визначення жирових чисел.

Тема 4. Фізіологічно активні рослинні речовини та речовини вторинного синтезу.

При вивченні цієї теми, насамперед слід з'ясувати, що представляють собою фізіологічно активні речовини та речовини вторинного синтезу й які основні групи речовин до них відносяться. При вивченні органічних кислот слід знати формули окремих найбільш розповсюджених карбонових кислот із різних їх груп (одно-, двох- і трикарбонових, насичених і ненасичених, гідрокси-, альдегідо- та кетокислот), їх біологічну роль, форми знаходження та представленість у рослинних органах. При вивчені фенольних сполук слід знати їх загальну біологічну роль, формули окремих

Національний університет
водного господарства
та природокористування

представників різних типів (гідрохінону, C_6-C_1-типу, C_6-C_3-типу, C_6-C_3-C_6-типу). При вивченні рослинних алкалоїдів слід засвоїти загальне поняття про ці речовини, їх хімічну природу, загальні властивості, представленість в рослинних організмах, практичне використання, знати назви окремих представників і, як приклад, формулу одного з них. При вивченні рослинних глікозидів слід засвоїти загальне поняття про їх хімічну природу, представленість у рослинних організмах, практичне використання, знати назви окремих представників і, як приклад, формулу одного з них. При вивченні фотосинтезуючих пігментів необхідно з'ясувати, які групи пігментів до них належать, де вони локалізовані в клітині, представленість у рослинах, якими загальними властивостями володіють, біологічну роль кожної з них. Для характеристики хлорофілів слід знати, які види хлорофілів зустрічаються в рослинних організмах, їх хімічну природу, загальну формулу хлорофілів *а* та *в*, структурну формулу хлорофілу *а*. Для характеристики каротиноїдів слід знати їх поділ на групи, хімічну природу цих груп, назви окремих представників, загальну формулу каротинів і ксантофілів, структурну формулу β-каротину. Для характеристики фікобілінів слід знати їх поділ на групи та хімічну природу. При вивченні вітамінів потрібно з'ясувати їх загальну біологічну роль як фізіологічно активних речовин, поділ на групи, представленість у рослинних організмах. Слід розуміти, що представляють собою рослинні провітаміни. При характеристиці жиро- (вітаміни групи A, D, E, K) і водорозчинних (вітаміни B_1, B_2, B_6, C, H) необхідно знати їх назви, хімічну природу, найбільш важливі представники кожної з груп, структурну формулу одного з них, загальну біохімічну роль, знаходження в рослинах. Для вітаміну B_{12} потрібно знати його коротку загальну характеристику. При вивченні фітогормонів слід знати їх поділ на групи, конкретну фізіологічну роль кожної з груп, загальну хімічну природу, місце синтезу в рослинах, окремі представники для кожної з груп, а також структурні формули ß-індолілоцтової кислоти, кумарину, кумарової кислоти. Необхідно також знати лабораторні методи отримання витяжки фотосинтезуючих пігментів, їх розділення, принципи методів вивчення властивостей цих пігментів, принципи лабораторних методів якісного визначення вітамінів групи A, K, E, вітаміну B_2, B_5, C, кількісного визначення щавлевої кислоти, вітаміну C і P.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Тема 5-6. Білки.

При вивченні цієї теми необхідно ознайомитись із історією відкриття та вивчення білків і походженням назви цього важливого класу речовин. Потім необхідно з'ясувати присутність і вміст білкових речовин у рослинних організмах, у чому проявляється їх величезна різноманітність, життєво важливі та різноманітні функції білків. Слід також з'ясувати загальну хімічну природу білків, встановити природу їх мономерів, поділ на справжні білки та поліпептиди. При вивченні амінокислот, як складових компонентів білків, необхідно знати визначення терміну "α-амінокислоти", їх загальну формулу, стереоізомерію, принцип поділу на протеїногенні та вільні, класифікацію протеїногенних амінокислот залежно від обраних ознак. Необхідно вивчити структурні формули всіх основних протеїногенних амінокислот і їх форм (22 формули), знати приклади назв вільних амінокислот. При характеристиці фізико-хімічних властивостей α-амінокислот необхідно зазначити зовнішній вигляд їх кристалічних форм, здатність до розчинності та йонізації, знати схему їх дисоціації, визначення термінів "ізоелектрична точка" та "ізойонна точка". Для характеристики чотирьох структурних рівнів організації білкових речовин необхідно знати, що представляє собою кожен із структурних рівнів, якими типами зв'язків він підтримується й особливості цих зв'язків (особливу увагу слід звернути на особливості пептидного зв'язку), якими видами або формами він представлений, уміти схематично зображати різні види вторинної та третинної структури білків, писати рівняння утворення поліпептиду з окремих амінокислот. Необхідно знати, що приймається за початок і кінець поліпептидного ланцюга, визначення термінів, які використовуються для опису структурних рівнів білків, що представляють собою домени та аморфні ділянки макромолекул, приклади білків для яких встановлена первинна структура й білків із четвертинною структурою, а також взаємний зв'язок структурних рівнів. Для характеристики фізико-хімічних властивостей білків необхідно звернути увагу на їх високу відносну молекулярну масу, на розчинність, колоїдні властивості й проникність, на заряд і здатність до йонізації й чим вони обумовлені, на денатурацію й денатуруючі фактори, на загальні типи хімічних реакцій для білків; слід знати визначення термінів "ізоелектрична точка білка", "ізойонна точка білка". Для характеристики груп білків необхідно навести приклади ознак, за якими можна класифікувати білки, з'ясувати відмінність між

Національний університет
водного господарства
та природокористування

простими й складними білками, вміти давати коротку характеристику найважливішим групам простих і складних білків. Необхідно також знати принципи лабораторних методів проведення кольорових реакцій на окремі групи амінокислот і білки, реакцій осадження білків, принципи мікрометоду кількісного визначення вмісту амінного азоту мідним способом, методів розподілу амінокислот на хроматографічному папері та визначення ізоелектричної точки білків.

Тема 7. Ферменти.

При вивченні цієї теми необхідно з'ясувати, що представляють собою ферменти, їх роль в обміні речовин, характерні властивості ферментів і суть механізму прискорення ними біохімічних реакцій із його графічним зображенням. Потім слід вивчити хімічну природу ферментів, визначення термінів "апофермент", "простетична група", "кофермент (кофактор)", "субстрат", знати приклади найбільш поширених коферментів і простетичних груп. Слід чітко засвоїти, що представляє собою активний центр ферменту, його функцію та природу. При характеристиці кінетики ферментативних реакцій необхідно вміти записувати схему протікання ферментативного процесу, графічно зображати та пояснювати хід ферментативної реакції, залежність її швидкості від концентрації субстрату та температури, а також зображати константу Міхаеліса; знати, яка зі стадій ферментативного процесу є найповільнішою, а яка є найшвидшою, що представляє собою фермент-субстратний комплекс і за яким механізмом він утворюється, що представляють собою інгібітори та типи інгібування, знати визначення терміну "константа Міхаеліса" та її зв'язок із конкретною реакцією. Далі необхідно вивчити, які одиниці використовуються для вираження активності ферментів і їх зміст, за якими ознаками можна класифікувати ферменти, на яких критеріях побудована сучасна класифікація ферментів і її суть, назви всіх класів ферментів і які загальні перетворення речовин вони каталізують, приклади ферментів кожного класу. Потрібно також знати лабораторні методи вивчення загальних властивостей ферментів, принципи методів визначення активності каталази та тирозинази.

Тема 8. Нуклеїнові кислоти.

При вивченні цієї теми спочатку слід ознайомитись із історією відкриття та вивчення нуклеїнових кислот, їх знаходженням у різних органелах, знати походження назви цієї важливої групи речовин.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Потім необхідно з'ясувати загальну хімічну природу нуклеїнових кислот. Для характеристики нуклеотидів як мономерних одиниць нуклеїнових кислот потрібно знати з яких частин складається нуклеотид, як ці частини сполучені між собою, форми представленості в ньому пентоз. При характеристиці азотистих основ нуклеотидів потрібно з'ясувати, на які дві групи вони поділяються, яка хімічна природа кожної з груп, які азотисті основи до кожної групи належать; потрібно знати формулу, біохімічну та хімічну назву кожної з п'яти азотистих основ, що представляють собою мінорні азотисті основи й приклади таких основ. Потрібно також знати, що представляють собою нуклеозиди, самостійну біохімічну роль нуклеозидів і нуклеотидів. Для характеристики ДНК необхідно з'ясувати її біологічну роль, із яких нуклеотидів вона складається, що представляє собою первинна структура ДНК, як відбувається сполучення нуклеотидних залишків у полінуклеотидний ланцюг, що приймається за початок і кінець цього ланцюга, що представляє собою вторинна структура ДНК, якими формами вона представлена та їх коротка характеристика, на якому принципі вона побудована та як він реалізується на хімічному рівні, особливості утворення третинної та вищих структур організації ДНК, їх коротку характеристику; уміти формулювати та записувати правило Чаргаффа, знати загальні фізико-хімічні властивості ДНК (величина молекулярної маси, заряд молекули, поведінка при нагріванні та температура плавлення, денатурація та основні денатуруючі фактори). Для характеристики РНК і різних її типів необхідно з'ясувати, з яких нуклеотидів вона складається, особливості її вторинної структури, поділ на типи, біологічну роль, місце локалізації в клітині, особливості нуклеотидного складу, вторинної та вищих структур різних її типів. Потрібно також знати лабораторні методи виділення нуклеопротеїдів, принципи методів якісного визначення складових компонентів нуклеопротеїдів, якісного визначення ДНК методом Діше та кількісного визначення ДНК методом Броді.

<u>Змістовний модуль 2.</u> ДИНАМІЧНА БІОХІМІЯ

<u>Тема 9.</u> Метаболізм. Біохімія анаеробного перетворення вуглеводів.

При вивченні цієї теми слід з'ясувати, що представляє собою метаболізм, на які частини він поділяється, які реакції лежать в їх основі та що вони собою представляють, фізико-хімічні основи та

Національний університет
водного господарства
та природокористування

функції метаболізму. Для характеристики анаеробного перетворення вуглеводів необхідно вивчити суть такого перетворення, де та при яких умовах воно відбувається, якими процесами представлене. Потрібно знати загальну суть і схему перетворення при гліколізі, детальну біохімічну характеристику обох етапів гліколізу (послідовність речовинних перетворень і їх особливості, назви ферментів, які каталізують кожне перетворення), поняття про субстратне фосфорилювання, енергетичну характеристику та біологічну роль гліколізу, загальне поняття про бродіння, його види, якими організмами здійснюється, детальну біохімічну характеристику молочнокислого та спиртового бродінь.

Тема 10. Біохімія аеробного перетворення вуглеводів.

При вивченні цієї теми насамперед слід з'ясувати суть аеробного перетворення вуглеводів, де та при яких умовах воно відбувається. Потім потрібно вивчити загальний зміст підготовчого етапу аеробного перетворення, вміти писати його біохімічну характеристику. Для характеристики циклу трикарбонових кислот потрібно знати його суть, загальне рівняння, детальну біохімічну характеристику (послідовність речовинних перетворень і їх особливості, назви ферментів, які каталізують кожне перетворення), енергетичну характеристику та біологічну роль аеробного окислення вуглеводів. Для характеристики дихального ланцюга слід знати, що він собою представляє та де він локалізований, його складові компоненти, їх природу та функції, вміти писати схему дихального ланцюга. Необхідно з'ясувати також, що представляє собою окислювальне фосфорилювання, біохімічне значення та механізм його здійснення згідно хеміоосмотичної теорії, процеси синтезу АТФ як результат функціонування дихального ланцюга.

Тема 11. Біохімія фотосинтезу та хемосинтезу.

При вивченні цієї теми насамперед слід з'ясувати, що представляє собою процес фотосинтезу, де й при яких умовах він відбувається, анатомічну будову хлоропластів як органел фотосинтезу, роль різних пігментів у ньому, склад, локалізацію та функції обох фотосистем, поділ процесу на фази, біологічну роль фотосинтезу. Необхідно вміти записувати та пояснювати загальне рівняння фотосинтезу, знати визначення цього процесу. Для характеристики світлової фази фотосинтезу потрібно знати її суть і функціональну роль, при яких

Національний університет
водного господарства
та природокористування

умовах вона відбувається, вміти зображати та коротко характеризувати Z-схему світлової фази та її компоненти, розуміти суть циклічного та нециклічного фотосинтетичного фосфорилювання, роль у цьому води. Для характеристики темнової фази фотосинтезу потрібно знати її суть і функціональну роль, при яких умовах вона відбувається, які біохімічні механізми фіксації CO_2 у рослин відомі. При характеристиці механізмів фіксації CO_2 слід знати особливості цих механізмів у рослин C_3- та C_4-типу, для яких груп рослин вони характерні й як пов'язані з умовами їх зростання, від чого отримали свою назву, їх детальну біохімічну характеристику (послідовність речовинних перетворень і їх особливості, назви ферментів, які каталізують кожне перетворення), ефективність фотосинтезу для різних механізмів. При вивченні хемосинтезу необхідно засвоїти суть і визначення цього процесу, його особливості, для яких груп організмів він характерний, знати приклади таких організмів, вміти для прикладу записувати початкові етапи окисно-відновних перетворень при хемосинтезі для окремих груп мікроорганізмів (за вибором), знати шляхи фіксації CO_2 в цьому процесі.

<u>Тема 12.</u> Білковий обмін. Обмін нуклеїнових кислот.

При вивченні цієї теми перш за все слід з'ясувати, які процеси відбуваються з білковими речовинами при їх розкладі в ґрунті, суть цих процесів, проміжні та кінцеві речовини розкладу, якими групами організмів вони здійснюються, їх конкретні приклади. Потім необхідно вивчити, де й під дією яких речовин відбувається розщеплення білків у рослинних клітинах. У подальшому потрібно з'ясувати шляхи перетворення амінокислот – за участю аміногрупи (трансамінування, відновне, гідролізне, окислювальне та внутрішньомолекулярне дезамінування), за участю карбоксильної групи (декарбоксилювання), за участю бічних радикалів, розуміти їх суть, уміти писати схеми перетворення або конкретні приклади перетворень, знати кінцеві продукти розкладу амінокислот. При вивченні шляхів біосинтезу амінокислот насамперед необхідно з'ясувати їх загальну особливість у рослин і вихідні сполуки для синтезу. Потім слід розглянути схеми шляхів первинного засвоєння NH_3 із утворенням трьох головних сполук. Потрібно знати три основні шляхи біосинтезу амінокислот, для прикладу – загальні схеми біосинтезу окремих протеїногенних амінокислот.

При вивченні біосинтезу білка слід знати визначення терміну

Національний університет
водного господарства
та природокористування

“трансляція”, місце локалізації та основні компоненти, що необхідні для проходження біосинтезу, етапи трансляції. Для короткої характеристики етапів трансляції потрібно з’ясувати суть кожного з них, процеси, що відбуваються при цьому, й роль конкретних компонентів. Особливу увагу слід звернути на процеси активації амінокислот, їх розпізнавання та приєднання до т-РНК, на суть кодон-антикодонової взаємодії, на роль сайтів А та Р, роль ініціюючих і термінуючих кодонів.

При вивченні біосинтезу нуклеїнових кислот, спочатку потрібно засвоїти перелік процесів, які ведуть до утворення нових молекул ДНК або РНК, знати їх суть, місце проходження та коротеньку характеристику. В подальшому слід з’ясувати особливості синтезу будівельних блоків для побудови нуклеїнових кислот. При цьому основна увага повинна бути звернута на синтез пуринових і піримідинових азотистих основ. Потрібно засвоїти схему порядку синтезу різних нуклеотидів, знати формули інозинової та оротової кислот, а також схему, що відображає походження різних атомів у гетероциклах азотистих основ.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

3. Лабораторний практикум

Лабораторне заняття № 1

Тема: Якісне та кількісне визначення різних груп вуглеводів. Визначення вмісту сахарози в коренеплодах цукрових буряків

Мета заняття: Засвоїти методи якісного та кількісного визначення вмісту різних груп вуглеводів у рослинному матеріалі

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вуглеводи є важливою складовою частиною живих організмів. Основна маса органічного вуглецю в біосфері знаходиться саме в складі вуглеводів. У рослинних тканинах їх вміст становить понад 80 % від сухої маси. Вуглеводи є тими речовинами, які первинно утворюються в зелених рослинах у процесі фотосинтезу та дають початок іншим органічним речовинам.

Вуглеводи як запасні речовини нагромаджуються в коренях, бульбах, плодах, насінні багатьох дикорослих і культурних рослин. Значна маса вуглеводів зосереджена в клітинних оболонках у вигляді целюлози, геміцелюлоз, пектинів. Усередині протопласта вуглеводи можуть нагромаджуватись у вигляді включень крохмалю, інуліну та інших форм. У гіалоплазмі вуглеводи знаходяться у вільній формі або в формі похідних сполук вуглеводів, а їх залишки входять до складу більш складних речовин і надмолекулярних комплексів (наприклад, рибоза й дезоксирибоза входять до складу нуклеотидів, різні олігосахариди входять до складу плазмалеми).

У різних органах і тканинах рослин співвідношення між окремими групами вуглеводів має свої особливості. Так, у плодових і овочевих культурах переважають моносахариди та сахароза, в насінні зернових і бобових культур, а також у бульбах картоплі – крохмаль, у деревині та соломі злаків – целюлоза, геміцелюлози та пентозани. В плодах, як правило, переважають розчинні форми вуглеводів.

В організмі рослин вуглеводи виконують ряд важливих функцій – енергетичну (при окисленні 1 г вуглеводів виділяється біля 16,9 кДж енергії), будівельну (використовуються для синтезу багатьох важливих речовин), захисну (є основними компонентами клітинних оболонок, утворюють різні слизи й рослинні клеї, камеді), опорну (складають основу цитоскелету рослин), регуляторну (різні групи

Національний університет
водного господарства
та природокористування

вуглеводів регулюють величину продихових щілин, осмотичний тиск), запасаючу (в рослинах органічні речовини найчастіше відкладаються в формі різних вуглеводів). Крім названих функцій, вуглеводи можуть виконувати й деякі специфічні функції.

За хімічною природою вуглеводи представляють собою альдегіди та кетони багатоатомних спиртів, їх похідні та полімери цих сполук.

За складністю будови вуглеводи, як правило, поділяють на моносахариди (сюди відносяться вуглеводи та їх похідні, що не здатні розщеплюватись без втрати своїх характерних властивостей), полісахариди I порядку або олігосахариди (сюди відносяться вуглеводи, що гідролізуються з утворенням 2-10 моносахаридів) і полісахариди II порядку або глікани (сюди відносяться високомолекулярні полімерні вуглеводи, що складаються від 11 до декількох тисяч залишків моносахаридів або їх похідних).

У рослинних організмах із моносахаридів найчастіше зустрічаються – арабіноза, ксилоза, рибоза й дезоксирибоза, глюкоза, манноза, галактоза, рибулоза, фруктоза; з олігосахаридів – мальтоза, целобіоза, сахароза, трегалоза, рафіноза, стахіоза; з гліканів – крохмаль, целюлоза, геміцелюлоза, пектини, агар-агар.

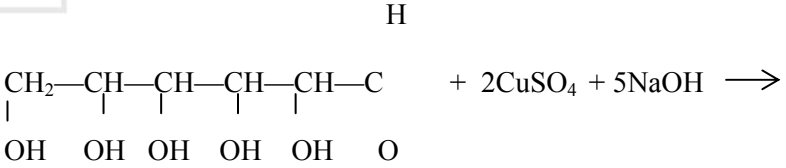
Кожній із груп вуглеводів притаманні свої характерні фізичні та хімічні властивості, що лежать в основі методів їх якісного й кількісного визначення в рослинному матеріалі.

Національний університет водного господарства та природокористування

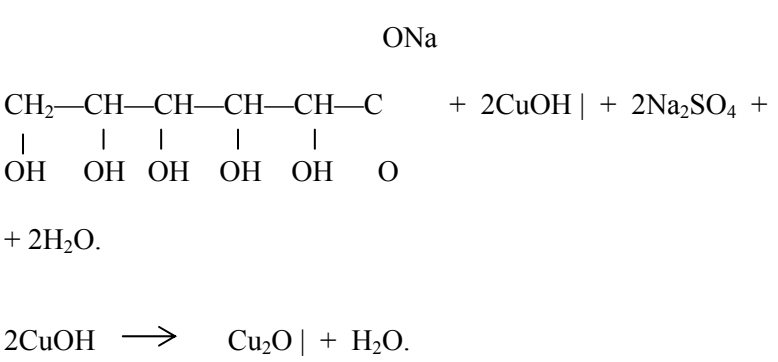
ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Якісна реакція на глюкозу (реакція Троммера)

Принцип методу. Розчини гексоз, наприклад, глюкози та фруктози в лужному середовищі відновлюють при нагріванні оксид міді (II) в оксид міді (I), а самі окислюються до альдонових кислот. Цю реакцію для глюкози в загальному вигляді можна зобразити рівнянням



Національний університет
водного господарства
та природокористування



$$CH_2—CH—CH—CH—CH—C + 2CuOH\downarrow + 2Na_2SO_4 +$$
$$\quad | \quad | \quad | \quad | \quad |$$
$$OH \quad OH \quad OH \quad OH \quad OH \quad O$$

$$+ 2H_2O.$$

$$2CuOH \longrightarrow Cu_2O\downarrow + H_2O.$$

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, скляні палички, піпетки градуйовані, крапельниця, нагрівач, пробіркотримач, 5 %-ий розчин глюкози, 5 %-ий розчин гідроксиду натрію, 5 %-ий розчин сульфату міді (II).

Хід роботи. В пробірку внести 3 мл розчину глюкози, додати 1 мл розчину гідроксиду натрію, 5 крапель розчину сульфату міді (II) і суміш перемішати. При цьому спостерігається випадання осаду гідроксиду міді (II), який при перемішуванні або струшуванні пробірки розчиняється й розчин набуває синього кольору. Потім вміст пробірки обережно нагріти до кипіння. При цьому спостерігається випадання жовтого осаду гідроксиду міді (I) або червоного осаду оксиду міді (I).

2. Якісна реакція на глюкозу (реакція Фелінга)

Принцип методу. В реактиві Фелінга присутні йони міді, що перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами (солями винної кислоти). Механізм реакції гексоз (і всіх редукуючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий, як і в реакції Троммера. Перевагою реактиву Фелінга є те, що мідь при надлишку реактиву не випадає у вигляді оксиду міді (II). Дисахариди та полісахариди взаємодіють із реактивом Фелінга після кип’ятіння з мінеральними кислотами.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, скляні палички, піпетки градуйовані, нагрівач, пробіркотримач, 5 %-ий розчин глюкози, реактив Фелінга (для його приготування змішати однакові об’єми двох розчинів безпосередньо перед роботою; для приготування першого розчину 200 г сегнетової солі та 150 г гідроксиду натрію

Національний університет водного господарства та природокористування

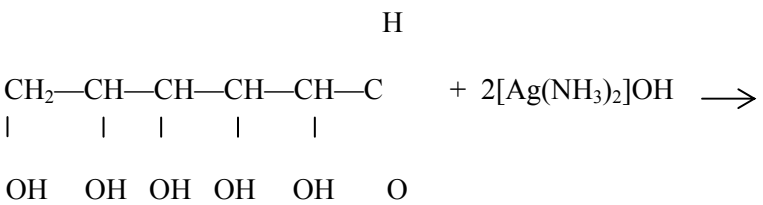
розчинити в дистильованій воді й довести об'єм до 1 л; для приготування другого – 40 г перекристалізованого сульфату міді (II) розчинити в дистильованій воді об'ємом 1 л).

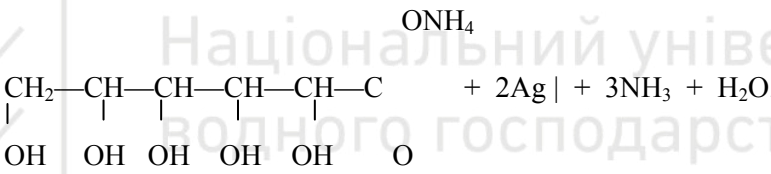
Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину глюкози й 1 мл реактиву Фелінга. Суміш перемішати та нагріти до кипіння. При цьому спостерігається випадання червоного осаду оксиду міді (I).

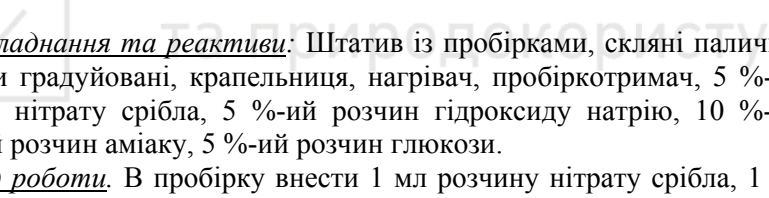
3. Відновлення аміачного розчину гідроксиду срібла глюкозою

Принцип методу. Глюкоза відновлює аміачний розчин гідроксиду срібла, що утворюється при взаємодії нітрату срібла з гідроксидом натрію та водним розчином аміаку, до металічного срібла. Реакція в загальному має вигляд

$$AgNO_3 + 3NH_4OH \longrightarrow [Ag(NH_3)_2]OH + NH_4NO_3 + 2H_2O.$$







Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, скляні палички, піпетки градуйовані, крапельниця, нагрівач, пробіркотримач, 5 %-ий розчин нітрату срібла, 5 %-ий розчин гідроксиду натрію, 10 %-ий водний розчин аміаку, 5 %-ий розчин глюкози.

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину нітрату срібла, 1 мл розчину гідроксиду натрію та краплями водний розчин аміаку до розчинення сірого осаду, що утворюється. Потім до вмісту пробірки додати 3 мл розчину глюкози, перемішати та обережно нагріти до появи бурого забарвлення. Далі реакція відбувається без нагрівання. При цьому спостерігається випадання металічного срібла у вигляді

Національний університет
водного господарства
та природокористування

чорного осаду або його осадження на стінках пробірки у вигляді блискучого дзеркального нальоту.

4. Реакція з α-нафтолом (реакція Мілиша)

Принцип методу. При взаємодії концентрованих сірчаної або соляної кислот із вуглеводами та їх похідними відбувається дегідратація й утворення з них фурфуролу або оксиметилфурфуролу. Ці сполуки, вступаючи в реакцію з α-нафтолом, утворюють продукти конденсації фіолетового кольору.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, концентрована сірчана кислота, 1 %-ий розчин глюкози, 3 %-ий розчин сахарози, 1 %-ий спиртовий розчин α-нафтолу.

Хід роботи. В дві пробірки внести відповідно по 1 мл розчину глюкози та розчину сахарози. В кожну з них додати 1 мл розчину α-нафтолу. Потім в обидві пробірки обережно по стінках пробірки додати по 1 мл концентрованої сірчаної кислоти, яка опускається на дно пробірок. На дні або на межі розділу рідин спостерігається утворення фіолетового або фіолетово-червоного кільця.

5. Реакція на пентози

Принцип методу. Всі пентози при їх кип'ятінні в кислому середовищі в присутності бензидину дають червоне забарвлення, що з'являється внаслідок взаємодії бензидину з фурфуролом. Останній утворюється внаслідок дегідратації пентоз під впливом концентрованих кислот.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, водяна баня, годинник, 5 %-ий розчин арабінози, 4 %-ий розчин бензидину в оцтовій кислоті.

Хід роботи. В пробірку внести 0,5 мл розчину бензидину в оцтовій кислоті та додати сюди 1-2 краплі розчину арабінози. Пробірку кип'ятити на водяній бані впродовж 5 хв. При цьому з'являється червоне забарвлення.

6. Реакція на сахарозу

Принцип методу. При додаванні до розчину сахарози в лужному середовищі нітрату кобальту утворюється комплексна сполука фіолетового кольору. Ця реакція є специфічною та характерна лише для сахарози.

Національний університет водного господарства та природокористування

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, 3 %-ий розчин сахарози, 2 %-ий розчин нітрату кобальту, 5 %-ий розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. В пробірку внести 2 мл розчину сахарози, 1 мл розчину гідроксиду натрію та декілька крапель нітрату кобальту. При цьому спостерігається поява фіолетового забарвлення.

7. Реакція крохмалю з йодом

Принцип методу. При взаємодії крохмалю з йодом утворюються комплексні адсорбційні сполуки, що забарвлені в синій колір. При нагріванні забарвлення зникає, однак з'являється знову при охолодженні, що свідчить про утворення нестійкого комплексу крохмалю з йодом. Знебарвлення відбувається також при додаванні гідроксидів натрію або калію. Зникнення забарвлення при нагріванні й додаванні лугу, обумовлене тим, що в утворенні комплексів приймає участь молекулярний йод, але не йодид-йони.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, скляні палички, водяна баня, реактив Люголя (1 г йоду та 2 г йодиду калію розчинити в 15 мл дистильованої води й потім довести розчин водою до об'єму 300 мл), 1,0 %-ий розчин крохмалю, 10 %-ий розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. В пробірку внести 2 мл розчину крохмалю. Потім сюди додати 1-2 краплі розчину Люголя. Вміст пробірки перемішати. При цьому спостерігається утворення синього забарвлення. З цієї пробірки перенести 1 мл рідини в іншу пробірку та долити в неї 1 мл розчину гідроксиду натрію. При цьому спостерігається знебарвлення вмісту пробірки. Суміш, яка залишилась у попередній пробірці, нагріти на водяній бані. При цьому також спостерігається зникнення забарвлення, що знову з'являється при охолодженні.

8. Гідроліз крохмалю

Принцип методу. При нагріванні розчину крохмалю з мінеральними кислотами відбувається гідроліз крохмалю з утворенням глюкози, яку можна виявити характерними реакціями на моносахариди, а саме реакцією Троммера (реакція 1).

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, скляні палички, водяна баня, нагрівач, пробіркотримач, годинник, концентрована соляна кислота, 1 %-ий

Національний університет
водного господарства
та природокористування

розчин крохмалю, 15 %-ий розчин гідроксиду натрію, 1 %-ий розчин сульфату міді (II).

Хід роботи. В дві пробірки внести по 5 мл розчину крохмалю. В одну з них додати 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти та кип'ятити на водяній бані 15 хв. Друга пробірка є контрольною. Потім в обидві пробірки прилити 2 мл розчину гідроксиду натрію та 5 крапель розчину сульфату міді (II) й нагріти (проробити реакцію Троммера). В пробірці, де проводився гідроліз крохмалю соляною кислотою, при нагріванні спостерігається утворення червоного осаду оксиду міді (I) (реакція Троммера позитивна), а в контрольній пробірці такий осад не утворюється (реакція Троммера від'ємна).

9. Визначення вмісту глюкози за допомогою реакції відновлення оксиду міді (II) в оксид міді (I)

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності солей міді в певних умовах кількісно окислювати глюкозу. В його основі лежить реакція Троммера (реакція 1). В цій реакції відбувається утворення як альдонових кислот, так і гідроксиду міді (II), що вказує на відсутність кількісного зв'язку між глюкозою та оксидом міді (I). Однак, якщо до реакційної суміші додати сегнетову сіль, то утворюється комплекс, у якому мідь реагує з глюкозою в стехіометричному співвідношенні. Кількісно оксид міді (I), який еквівалентний окисленій глюкозі, визначають йодометричним методом, згідно реакції

$$Cu_2O + J_2 \longrightarrow CuO + CuJ_2 .$$

Ця реакція в присутності солей щавлевої або винної кислот протікає практично до кінця.

Кількісно надлишок йоду, що не прореагував із оксидом міді (I), можна визначити титруванням тіосульфатом натрію (індикатор – розчин крохмалю) згідно реакції

$$2Na_2S_2O_3 + J_2 \longrightarrow 2NaJ + Na_2S_4O_6 .$$

Обладнання та реактиви: Піпетки градуйовані, крапельниця, водяна баня, мікробюретка, конічні колби об'ємом 50 мл, годинник, досліджуваний розчин глюкози (з вмістом 1-4 мг/мл), реактив

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Фелінга, насичений розчин щавлевої кислоти, 0,05 моль/л спиртовий розчин йоду, 0,05 моль/л розчин тіосульфату натрію, 1 %-ий розчин крохмалю.

Хід роботи. В дві колби внести по 5 мл реактиву Фелінга. В одну з колб (проба) додати 10 мл досліджуваного розчину глюкози, а в другу (контроль) – 10 мл дистильованої води. Вміст обох колб нагріти до кипіння, кип'ятити 5 хв., а потім охолодити. Після цього в обидві колби долити по 10 мл насиченого розчину щавлевої кислоти та по 10 мл розчину йоду й після перемішування відстояти впродовж 5 хв. Після закінчення терміну відстоювання в колби внести по 5 крапель розчину крохмалю та відтитрувати розчином тіосульфату натрію до зникнення забарвлення, що з'явилося після додавання крохмалю.

Вміст глюкози (w, мг/мл) у досліджуваному розчині розрахувати за формулою

$$w = \frac{(V_k - V_p) \cdot f \cdot E \cdot V}{V_0},$$

де V_k і V_p – об'єми розчину тіосульфату натрію, затраченого на титрування відповідно контролю та проби, мл; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,05 моль/л розчину тіосульфату натрію; E – маса глюкози (3,52 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину тіосульфату натрію; V – загальний об'єм проби, мл; V_0 – об'єм досліджуваного розчину, взятого для аналізу, мл.

10. Визначення вмісту сахарози в коренеплодах цукрових буряків

Принцип методу. Для прижиттєвого визначення вмісту сахарози в коренеплодах цукрових буряків використовують мікрометод, запропонований М. Дюбуа. Він ґрунтується на здатності моно- й дисахаридів давати жовто-оранжеве забарвлення з розчином фенолу в концентрованій сірчаній кислоті.

Обладнання та реактиви: Ніж, торзійні ваги, голка медичного шприца діаметром 1 мм із металічним штоком, штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляні палички, бюретки, льодяна баня, ФЕК, концентрована сірчана кислота (густина 1,84), 5 %-ий розчин свіжоперегнаного фенолу, сахароза кристалічна, дистильована вода.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Хід роботи. Ножем перерізати шийку коренеплоду. Уколом голки на глибину 5 мм під кутом 45^0 відібрати з нижньої частини шийки коренеплоду дві паралельні (з протилежних сторін) проби. На торзійних вагах відважити 1,5-2,0 мг досліджуваної проби, виштовхуючи її з голки металічним штоком. Кожну з проб помістити в пробірки, в які попередньо влити 2 мл дистильованої води. Потім у ці пробірки бюретками додати 1 мл розчину фенолу та 5 мл сірчаної кислоти. Вміст пробірок добре перемішати та охолодити на льодяній бані до кімнатної температури. При цьому проба під впливом сірчаної кислоти повністю розчиняється. Через 20-25 хв. встановлюється (зберігається впродовж декількох годин) жовто-оранжеве забарвлення розчину.

Інтенсивність забарвлення розчину виміряти на ФЕКу в кюветі з робочою довжиною 1 см при довжині хвилі 480-490 нм відносно контрольного розчину, який готують зливанням 2 мл дистильованої води, 1 мл розчину фенолу та 5 мл сірчаної кислоти.

Вміст сахарози в пробі визначити за калібрувальною кривою, а її концентрацію в коренеплодах – за формулою

$$w(\text{сахарози}) = \frac{a}{m} \cdot 100\ \%\ ,$$

де w(сахарози) – відносний вміст сахарози в коренеплоді, %; а – вміст сахарози в пробі, що визначений за калібрувальною кривою, мкг; m – маса наважки, мкг.

Для приготування стандартного розчину сахарози в 1 л дистильованої води розчинити 50 мг кристалічної сахарози. Для побудови калібрувальної кривої використовують розчини з вмістом сахарози від 10 до 70 мкг у 2 мл дистильованої води.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Вміст, поширення та біологічна роль вуглеводів у рослинних організмах.
2. Поняття про вуглеводи, їх класифікація.
3. Моносахариди, їх класифікація та загальні властивості.
4. Стереоізомери моносахаридів, їх циклічні форми.
5. Будова та поширення найважливіших рослинних

Національний університет
водного господарства
та природокористування

моносахаридів.
6. Будова, загальні властивості та поширення найважливіших рослинних полісахаридів I і II порядків.
7. Якісні реакції на окремі групи вуглеводів.
8. Принцип кількісного визначення вмісту глюкози.
9. Принцип кількісного визначення вмісту сахарози в коренеплодах методом М. Дюбуа.

Лабораторне заняття № 2

Тема: Фізико-хімічні властивості ліпідів. Визначення жирових чисел

Мета заняття: З'ясувати основні фізико-хімічні властивості ліпідів, засвоїти методику визначення окремих констант жиру

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ліпіди об'єднують неоднорідні за хімічним складом речовини, до яких відносять жири та жироподібні речовини або ліпоїди. За своєю будовою ліпіди переважно представляють собою складні ефіри вищих жирних кислот із гліцеролом або деякими іншими спиртами специфічної будови. З вищих жирних кислот у складі ліпідів найчастіше зустрічаються насичені (пальмітинова, стеаринова, арахінова, бегенова) та ненасичені (олеїнова, ерукова, лінолева, ліноленова) кислоти. Зі спиртів, крім гліцеролу, в складі ліпідів зустрічаються миристиновий, цитиловий, стеариновий, олеїновий, нервоновий спирти, а також циклічний шестиатомний спирт міоінозитол.

Вміст ліпідів у клітинах листків, коренів і плодів становить 0,1-0,5 % від сирої маси рослин. Однак, у насінні рослин вміст ліпідів може складати десятки відсотків (наприклад, у насінні сої – 20-30 %, соняшника – 30-50 %, маку та рицини – 50-60 %). Дослідження показали, що приблизно в 90 % видового складу вищих рослин основною запасаючою речовиною в насінні є саме ліпіди. Рослинні жири або олії є головним запасним продуктом у насінні більшості рослин. В окремих видів рослин олії можуть становити до 30-40 % від загальної маси насінини.

Загальною властивістю, що об'єднує всі ліпідні речовини, є їх добра розчинність у неполярних органічних розчинниках (ефір, ацетон, хлороформ, бензол та ін.) і нерозчинність у воді. Всі вони

Національний університет
водного господарства
та природокористування

мають добре виражені гідрофобні властивості, оскільки містять у своєму складі багато гідрофобних радикалів і груп.

Компоненти, що входять до складу ліпідів, містять різне число атомів вуглецю, можуть мати один або декілька ненасичених зв'язків. Саме від складу та хімічної будови залежать їх фізичні та хімічні властивості.

У рослинних організмах ліпіди виконують ряд важливих функцій – енергетичну (при окисленні 1 г жиру виділяється 39 кДж енергії), запасаючу (відкладаються в клітинах у вигляді ліпідних крапель), захисну (восковий наліт на поверхні листків, плодів, бруньок та інших органів захищає від надлишкового випаровування й проникнення мікроорганізмів), структурну (в комплексі з білками є основними структурними компонентами різного типу мембран), регуляторну (впливають на активність ферментів).

Враховуючи значну різноманітність ліпідних речовин, їх поділяють на декілька груп: 1) нейтральні жири та вільні жирні кислоти; 2) фосфоліпіди; 3) гліколіпіди; 4) стероїди; 5) воски; 6) терпени.

Нейтральні жири або триацилгліцерини є однією з найбільш поширених груп ліпідів і представляють собою складні ефіри триатомного спирту гліцеролу та вищих жирних кислот. В організмі рослин нейтральні жири мають переважно рідку консистенцію й називаються оліями. Це пов'язано з тим, що в їх складі багато ненасичених жирних кислот. Властивості нейтральних жирів можна характеризувати так званими константами або жировими числами – кислотним, йодним, перекисним, ефірним, числом омилення та ін.

Фосфоліпіди містяться переважно в складі клітинних мембран. Із цієї групи в рослинах зустрічаються фосфатидилхоліни, фосфатидилінозити, фосфатидилгліцерини, цераміди. В основі їх будови знаходиться фосфатидна кислота, що представляє собою гліцерол, у якого дві спиртові групи етерифіковані жирними кислотами, а третя – ортофосфорною кислотою. Залишок ортофосфорної кислоти в складі фосфатидної кислоти часто утворює складноефірний зв'язок із різними полярними угрупованнями.

Із гліколіпідів у рослинах найчастіше зустрічаються глікозил-диацилгліцерини, молекула яких складається з гліцеролу, етерифікованого двома залишками жирних кислот, і однієї або двох молекул моносахаридів (найчастіше D-галактози), що зв'язані з гліцеролом β-глікозидним зв'язком.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Із стероїдів, які є похідними пергідроциклопентанфенантрену, в рослинах поширені фітостероли (найчастіше ситостерол і стигмастерол) та екдізони, що відіграють роль гормонів комах.

Воски представляють собою складні ефіри вищих моноатомних спиртів і вищих жирних кислот. У своєму складі вони також містять вільні вищі спирти, вільні вищі жирні кислоти з довгим ланцюгом, насичені вуглеводні, пахучі та фарбуючі речовини.

Терпени представляють собою сполуки, що утворені ізопреновими залишками. До терпенів відносять різні ефірні олії, смоляні кислоти та каучук, різні рослинні пігменти, а також вітамін А.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії

Принцип методу. Характерною властивістю жирів є їх добра розчинність у багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, діетиловий ефір та ін.) і нерозчинність у воді. При змішуванні жирів із водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища їх утворення. Наявність у воді речовин – емульгаторів (мила, жовчні кислоти, карбонати) робить емульсії більш стійкими. Стабілізація таких емульсій обумовлена тим, що в поверхневий водний шар, який оточує жирові краплини, спрямовуються поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонатів, які обволокують краплини жиру та перешкоджають їхньому злиттю.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниця, піпетки градуйовані, олія, етиловий спирт, бензол, хлороформ, 1 %-ий розчин карбонату натрію, дистильована вода.

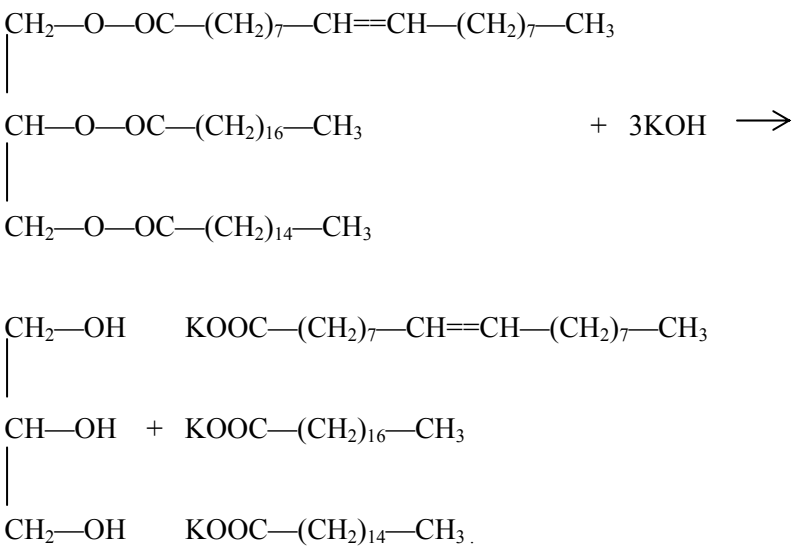
Хід роботи. В чотири пробірки внести по 0,2-0,3 мл олії, потім у першу додати 5 мл води, в другу – 5 мл спирту, в третю – 5 мл бензолу, в четверту – 5 мл хлороформу. Вміст усіх пробірок енергійно струсити. В першій пробірці олія та вода швидко розділяються на два шари, в другій – утвориться мутний розчин внаслідок недостатньої розчинності олії в спирті, в третій і четвертій – утворяться прозорі розчини.

У дві пробірки внести по декілька крапель олії. В одну з них додати 2 мл води, в іншу – 2 мл розчину карбонату натрію. Вміст пробірок інтенсивно струсити та спостерігати утворення емульсії. Відмітити відмінності в стійкості емульсій у кожній із двох пробірок.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

2. Омилення жиру

Принцип методу. Жири під впливом лугів гідролізуються з утворенням мила та гліцеролу



Обладнання та реактиви: Колба об’ємом 50 мл, піпетки градуйовані, мірний циліндр, водяна баня, годинник, олія, 0,5 моль/л спиртовий розчин гідроксиду калію (для приготування цього реактиву розчинити 40 г КОН у 30 мл води; залежно від концентрації спиртового розчину взяти відповідний об’єм водного розчину КОН і розбавити перегнаним у присутності NaOH (на 100 г спирту 5 г NaOH) спиртом. Спирт із таким співвідношенням NaOH кип’ятити зі зворотнім холодильником упродовж години, а потім перегнати. Спиртовий розчин КОН відстояти добу, відфільтрувати та зберігати в скляній посудині з темного скла, добре закупоривши (щоб захистити від попадання вуглекислого газу повітря)).

Хід роботи. В колбу з 1 мл олії додати 20 мл спиртового розчину гідроксиду калію, вміст колби перемішати, поставити на водяну баню та кип'ятити впродовж 60 хв. Після омилення розчин розвести до об’єму 20 мл дистильованою водою й у такий спосіб одержати розчин калієвого або натрієвого мила (калієвих або натрієвих солей жирних кислот).

Національний університет
водного господарства
та природокористування

3. Утворення вільних жирних кислот

Принцип методу. При додаванні до мила концентрованої соляної кислоти утворюються вільні жирні кислоти

$$KOOC—(CH_2)_{16}—CH_3 + HCl \longrightarrow KCl + HOOC—(CH_2)_{16}—CH_3.$$

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, розчин калієвого мила (використовують розчин, отриманий у попередньому досліді при омиленні жиру), концентрована соляна кислота.

Хід роботи. В пробірку з 2 мл розчину калієвого мила додати 0,5 мл концентрованої соляної кислоти. Жирні кислоти, що утворяться при цьому, нерозчинні у воді й будуть збиратися у верхній частині вмісту пробірки.

4. Утворення нерозчинних кальцієвих мил

Принцип методу. При додаванні до розчину калієвого мила розчину солей кальцію утворюються нерозчинні солі жирних кислот, наприклад,

$$2KOOC—(CH_2)_{16}—CH_3 + CaCl_2 \longrightarrow$$

$$2KCl + Ca\,[OOC—\,(CH_2)_{16}—CH_3]_2.$$

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, розчин калієвого мила (використовують отриманий раніше при омиленні жиру), 5 %-ий розчин хлориду кальцію.

Хід роботи. В пробірку з 2 мл розчину калієвого мила внести 1 мл розчину хлориду кальцію. При цьому спостерігається утворення нерозчинних кальцієвих мил.

5. Визначення числа омилення жиру

Принцип методу. Числом омилення називають число міліграмів їдкого калію, що необхідне для нейтралізації всіх, як вільних, так і тих, які входять до складу триацилгліцеринів, жирних кислот, що містяться в 1 г жиру.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, колби на 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, крапельниця, зворотній холодильник, водяна баня, годинник, соняшникова олія, 0,1 %-ий розчин

Національний університет
водного господарства
та природокористування

фенолфталеїну, 0,5 моль/л розчин соляної кислоти, 0,5 моль/л спиртовий розчин гідроксиду калію (див. дослід 2), дистильована вода.

Хід роботи. В одну колбу (досліджувана проба) внести 0,5 г олії, в іншу (контрольна проба) – 0,5 мл води. В обидві колби долити по 15 мл спиртового розчину гідроксиду калію й кип'ятити зі зворотнім холодильником на водяній бані впродовж 50 хв. до повного омилення гліцеринів і нейтралізації вільних жирних кислот. Потім в обидві колби долити по 10 крапель розчину фенолфталеїну та відтитрувати в теплому стані розчином соляної кислоти до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Число мг КОН або число омилення (N_e), що витратилось на нейтралізацію жирних кислот у 1 г жиру, розрахувати за формулою

$$N_e = \frac{(V_k - V_d) \cdot E \cdot f}{m},$$

де (V_k-V_d) – різниця результатів титрування відповідно контрольної та дослідної проб 0,5 моль/л розчином HCl, мл; E – маса KOH (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,5 моль/л розчину КОН; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,5 моль/л розчину HCl; m – наважка жиру, г.

6. Визначення кислотного числа жиру

Принцип методу. Кислотністю жиру або кислотним числом жиру називають число міліграмів їдкого калію, що необхідне для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в 1 г жиру.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, колба об'ємом 50 мл, піпетки градуйовані, крапельниця, бюретка, етиловий спирт, який нейтралізований за фенолфталеїном, 0,1 моль/л розчин гідроксиду калію, 0,1 %-ий розчин фенолфталеїну, соняшникова олія.

Хід роботи. В колбу з 1 г олії додати 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, 2-3 краплі фенолфталеїну та вміст ретельно перемішати для максимального розчинення вільних жирних кислот і відтитрувати розчином гідроксиду калію до появи незникаючого після збовтування рожевого забарвлення (забарвлення не повинне зникати впродовж 0,5-1 хв.).

Число мг КОН або кислотне число (N_a), що витратилось на титрування вільних жирних кислот в 1 г олії, буде дорівнювати

Національний університет водного господарства та природокористування

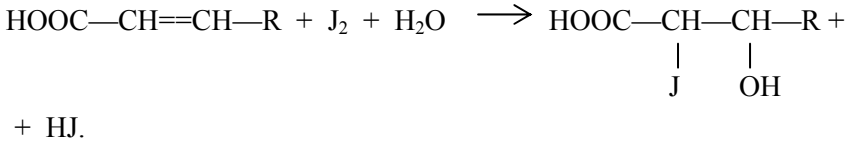
$$N_a = \frac{V \cdot E \cdot f}{m},$$

де V – об'єм 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію, витраченого на титрування досліджуваної проби, мл; Е – маса КОН (5,61 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію; m – наважка жиру, г.

7. Визначення йодного числа жиру

Принцип методу. Йодним числом жиру називають число грамів йоду, що прореагувало з 100 г жиру. Це число вказує на вміст у жирі ненасичених жирних кислот.

Визначення йодного числа ґрунтується на реакції приєднання йоду за місцем подвійного зв'язку, що протікає за рівнянням



$$HOOC—CH{=}{=}CH—R + J_2 + H_2O \longrightarrow HOOC—\underset{\displaystyle J}{\underset{|}{CH}}—\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}—R +$$

$$+ HJ.$$

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, дві конічні колби об'ємом 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, годинник, соняшникова олія, 0,1 моль/л спиртовий розчин йоду, 1 %-ий розчин крохмалю, 0,05 моль/л розчин тіосульфату натрію ($Na_2S_2O_3$), дистильована вода.

Хід роботи. В першу колбу помістити наважку олії масою 0,1-0,2 г (досліджувана проба), в другу – 0,1-0,2 мл води (контрольна проба), додати в них по 10 мл спиртового розчину йоду та перемішати. Через 15 хв. вміст колб відтитрувати розчином тіосульфату натрію спочатку до появи слабко-жовтого забарвлення, а потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, титрувати до зникнення синього забарвлення.

Йодне число (N_j) розрахувати за формулою

$$(N_j) = \frac{(V_k - V_d) \cdot E \cdot f \cdot 100}{(m \cdot 1000)},$$

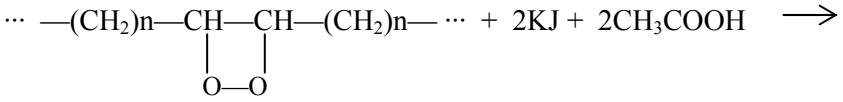
Національний університет
водного господарства
та природокористування

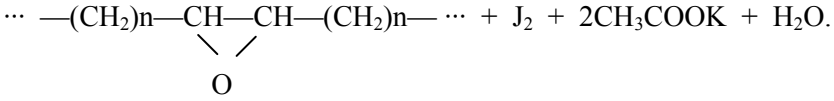
де (V_k-V_d) – різниця результатів титрування відповідно контрольної та дослідної проб 0,05 моль/л розчином тіосульфату натрію, мл; Е – маса J_2 (12,69 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; m – наважка жиру, г.

8. Визначення перекисного числа в прогірклому жирі

Принцип методу. Перекисним числом жиру називають число мілілітрів розчину тіосульфату натрію ($Na_2S_2O_3$), що необхідне для титрування вільного йоду, який виділився при окисленні йодиду калію пероксидним угрупованням 1 г жиру.

Метод ґрунтується на здатності пероксидних угруповань жиру реагувати з йодидом калію в кислому середовищі





Оскільки можливе утворення йоду при окисленні йодиду калію киснем повітря, необхідно паралельно проводити контрольні проби.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, дві конічні колби об'ємом 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, крапельниця, годинник, соняшникова олія, насичений розчин йодиду калію, хлороформ, 0,005 моль/л розчин тіосульфату натрію, 1 %-ий розчин крохмалю, льодяна оцтова кислота, дистильована вода.

Хід роботи. В першу колбу помістити наважку олії масою 1 г (досліджувана проба), в другу – 1 мл води (контрольна проба). Потім в обидві колби додати по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 6 мл хлороформу та 1 мл свіжоприготовленого насиченого розчину йодиду калію. Після цього вміст колб струшувати впродовж 5 хв., додати 10 крапель розчину крохмалю як індикатора й відтитрувати розчином тіосульфату натрію до зникнення синього забарвлення.

Перекисне число (N_p) розрахувати за формулою

$$\mathbf{N_p = (V_d - V_k) \cdot f} \ ,$$

Національний університет
водного господарства
та природокористування

де (V_d-V_k) різниця результатів титрування відповідно дослідної та контрольної проб 0,005 моль/л розчином $Na_2S_2O_3$, мл; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,005 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Вміст і поширення ліпідів у рослинних організмах.
2. Поняття про ліпіди, їх загальні фізичні властивості.
3. Біологічні функції ліпідів.
4. Структурні компоненти ліпідів. Класифікація ліпідів.
5. Будова та властивості нейтральних жирів.
6. Основні константи або жирові числа, їх зміст.
7. Характеристика та представники фосфоліпідів і гліколіпідів.
8. Характеристика рослинних стероїдів.
9. Загальні уявлення про воски та терпени.
10. Лабораторні методи визначення фізико-хімічних властивостей жирів.
11. Лабораторні методи визначення жирових чисел і їх принцип.

Лабораторне заняття № 3

Тема: Визначення вмісту щавлевої кислоти. Вивчення властивостей пігментів листка

Мета заняття: Засвоїти методику кількісного визначення вмісту щавлевої кислоти в рослинному матеріалі; з'ясувати загальні фізико-хімічні та хімічні властивості пігментів листка

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Щавлева кислота

Органічні кислоти є проміжними продуктами метаболізму. Вони містяться в усіх рослинах і утворюються в результаті численних біохімічних реакцій, серед яких основними слід вважати реакції ди- й трикарбонових кислот і гліоксилатного циклу. Багато органічних кислот є вихідними сполуками для біосинтезу амінокислот, вуглеводів, ліпідів, вітамінів і деяких інших біологічно активних речовин. Кислоти можуть використовуватись як енергетичний матеріал при диханні рослин.

Органічні кислоти знаходяться в рослинах у вільному стані

Національний університет
водного господарства
та природокористування

(переважно в плодах, а також у листках деяких рослин – щавлі, ревені, бегонії та ін.) та в формі кислих і нейтральних солей. Вміст їх в організмі рослин не є сталим і залежить від виду, сорту, віку, фізіологічного стану та від умов зростання й вирощування.

Найбільший вміст щавлевої кислоти (НООС – СООН) виявлений у плодах малини (0,05 %), смородини (0,03 %), груші (0,02 %). На відміну від інших органічних кислот, вміст щавлевої кислоти в плодах та інших органах незначний, але в деяких рослинах (наприклад, у старих сухих листках щавлю, буряка, черешках ревеню) її вміст може сягати до 10-16 % від сухої маси органу. В формі слаборозчинних солей кальцію, а також інших розчинних солей щавлева кислота широко поширена в плодах. Підвищений вміст її спостерігається в листках рослин із родів Лобода, Щириця, Квасениця. Багато щавлевої кислоти міститься в коренеплодах. Щавлева кислота токсична для тварин і, крім того, перешкоджає засвоєнню кальцію з корму. В окремих видів рослин щавлева кислота утворює солі з алкалоїдами.

Щавлева кислота, на відміну від інших органічних кислот, більш сильна та токсична. В багатьох рослинах вона знаходиться у вигляді кислої та середньої калієвої й кальцієвої солей. Часто щавлева кислота відкладається в тканинах рослин у вигляді кристалів оксалату кальцію, видимих під мікроскопом.

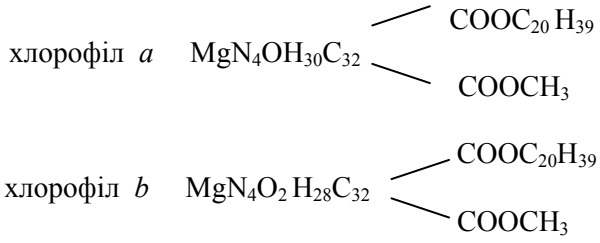
Пігменти листка

Пігментна система хлоропластів вищих рослин представлена двома типами пігментів: зеленими – хлорофіли *a* і *b* та жовтими – каротиноїди.

Основний функціонуючий пігмент – хлорофіл *a* виявлений, за винятком бактерій, у всіх фотосинтезуючих організмів. Цей пігмент служить безпосереднім донором енергії для фотосинтетичних реакцій, інші пігменти лише передають йому поглинену ними енергію. В більшості надземних вищих рослин вміст хлорофілу *a* в два-три з половиною рази вищий, ніж вміст хлорофілу *b*.

За хімічною природою хлорофіли *a* і *b* є складними ефірами дикарбонової кислоти хлорофіліну та двох спиртів – метилового й одноатомного ненасиченого спирту фітолу. Тому за хімічною номенклатурою хлорофіли можна розглядати як фітилметилхлорофіліди:

Національний університет
водного господарства
та природокористування



Структурною основою молекули хлорофілу є порфіринове ядро, що утворене чотирма пірольними кільцями, які зв'язані одне з одним метиновими містками. В центрі ядра знаходиться атом магнію, що утримується в цьому положенні за рахунок зв'язків із атомами азоту. Чотири атоми азоту надають ядру гідрофільного характеру. Істотною структурною особливістю хлорофілу є наявність у його молекулі ізоциклічного угруповання – циклопентану. Таким чином, асиметрична молекула хлорофілу включає гідрофільну "головку" та ліпофільний "хвіст", який представлений довгим ланцюгом фітолу.

Завдяки наявності кон'югованих подвійних зв'язків молекули хлорофілів беруть участь у первинному поглинанні та зв'язуванні світлової енергії.

Каротиноїди – це спряжені полієнові сполуки з 40 атомами вуглецю в ланцюзі, які можна розглядати як похідні п'ятивуглецевої сполуки ізопрену. Хроматофорну систему каротиноїдів також складають кон'юговані подвійні зв'язки. Каротиноїди поділяють на каротини та ксантофіли.

Каротини – це ненасичені вуглеводні з емпіричною формулою $C_{40}H_{56}$. За хімічною структурою вони можуть бути ациклічними, моноциклічними та біциклічними сполуками. В циклічних каротинах шестичленні кільця представлені двома типами: α-іононовими й β-іононовими. У фотосинтезуючих організмів група жовтих каротинових пігментів представлена лікопіном, α-каротином, β-каротином і γ-каротином. У вищих рослин переважає β-каротин. Його молекула утворена двома симетрично розташованими іононовими кільцями, сполученими довгим вуглецевим ланцюгом із системою подвійних зв'язків, які регулярно чергуються.

Ксантофіли – кисневмісні похідні каротинів, які в рослинах представлені лютеїном ($C_{40}H_{56}O_2$), зеаксантином ($C_{40}H_{56}O_2$), віолаксантином ($C_{40}H_{56}O_4$) і неоксантином ($C_{40}H_{56}O_4$). Однак, переважає лютеїн, який за хімічною структурою близький до

Національний університет
водного господарства
та природокористування

α-каротину, але, на відміну від останнього, представляє собою двоатомний спирт, тобто в кожному його іононовому кільці один атом водню заміщений на гідроксильну групу. Завдяки присутності гідроксильних та інших кисневмісних груп ксантофіли легко розчиняються в спирті та трохи гірше (на відміну від каротинів) – у неполярних розчинниках.

Каротиноїди також поглинають сонячну енергію й біля 50 % поглинутої енергії передають хлорофілу, тобто вони виконують роль світлозбирачів, виступаючи додатковими пігментами. Одночасно, каротиноїди захищають хлорофіл від його фотодинамічного пошкодження досить активною формою кисню – синглетним киснем, який виникає при взаємодії зі збудженими хлорофілами під впливом сонячного випромінювання.

Фотосинтезуючі пігменти разом із спеціальними білками та іншими речовинами згруповані в дві фотосистеми, що є безпосередніми функціональними одиницями процесів фотосинтезу.

Рослинні пігменти характеризуються відповідними фізико-хімічними властивостями, що дозволяє проводити їх якісне та кількісне визначення.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення вмісту щавлевої кислоти

Принцип методу. Метод кількісного визначення вмісту щавлевої кислоти ґрунтується на вилученні та осадженні її у вигляді оксалату кальцію, майже нерозчинного в холодній воді. Потім використовують об’ємний або ваговий спосіб аналізу.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, мірний циліндр, піпетки градуйовані, колби конічні на 50, 100 та 250 мл, колби мірні на 250, 300 та 500 мл, фарфорова чашка з товкачиком, водяна баня, мікробюретка, центрифуга, лійка, фільтр, годинник, скляний пісок, індикаторні папірці, кристалічний хлорид кальцію, 50 %-ий розчин оцтової кислоти, кристалічний ацетат натрію, борна кислота, 0,1 н розчин перманганату калію, 1 %-ий розчин нітрату срібла, 10 %-ий розчин сірчаної кислоти, аміак, 96 %-ий розчин етанолу, дистильована вода, рослинний матеріал.

Хід роботи. Щоб визначити вміст у рослинному матеріалі вільної та зв’язаної у вигляді кальцієвої солі щавлевої кислоти, використовують його екстракт. Для отримання екстракту взяти на технохімічних вагах наважку сухого рослинного матеріалу масою 5 ±

Національний університет
водного господарства
та природокористування

0,01 г і розтерти до однорідної маси в фарфоровій чашці зі скляним піском масою 2-3 г, додаючи в неї 5 мл сірчаної кислоти та невеликий об'єм етанолу. Отриману масу кількісно (декілька раз сполоскати дистильованою водою фарфорову чашку) перенести в мірну колбу на 250 мл і довести водою до мітки. Вміст колби збовтати та залишити на декілька годин або на ніч.

Після цього провести осадження щавлевої кислоти. Для цього вміст колби відфільтрувати в конічну колбу. З неї відібрати 25 мл фільтрату в конічну колбу на 100 мл. Сюди ж додати аміак до лужної реакції (реакцію середовища контролювати індикаторними папірцями) та 0,5-1 г борної кислоти, щоб запобігти осадженню солей винної кислоти та її оптичних ізомерів. Потім у цю колбу додати 5 мл реактиву для осадження щавлевої кислоти та залишити розчин на 48 год. при температурі не вище 6^0 С.

Реактив для осадження готують таким чином: розчин 1 (до розчину 25 г хлориду кальцію в невеликому об'ємі води, який поміщають у мірну колбу на 500 мл, долити до мітки розчин оцтової кислоти); розчин 2 (330 г кристалічного ацетату натрію розчинити в 300 мл дистильованої води). Розчини 1 і 2 добре перемішати, суміш витримати 48 год. при температурі 3-7^0 С і відфільтрувати.

Вміст колби, де проводилось осадження, перенести в центрифужні пробірки та відділити осад оксалату кальцію шляхом центрифугування впродовж 5 хв. при 4-5 тис. об/хв. Рідину над осадом злити, а осад у пробірках промити до від'ємної реакції на хлор (пробу проводити розчином нітрату срібла). Потім осад у пробірках розчинити розчином сірчаної кислоти, сумарним об'ємом 2,5 мл, і перелити їх вміст у конічну колбу для титрування. Після підігрівання на водяній бані розчин відтитрувати розчином перманганату калію з мікробюретки до слабкого порозовіння. Титр 0,1 н розчину перманганату калію за щавлевою кислотою становить 4,5.

Вміст щавлевої кислоти w(к-ти) (в %) розрахувати за формулою

$$\mathbf{w(к\text{-}ти) = \frac{V \cdot V_1 \cdot k}{V_2 \cdot m} \cdot 100\ \%}\ ,$$

V – загальний об'єм витяжки, мл; V_1 – об'єм 0,1 н розчину перманганату калію, що пішов на титрування, мл; k – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (4,5); V_2 – об'єм витяжки,

Національний університет
водного господарства
та природокористування
взятої для осадження, мл; m – маса наважки рослинного матеріалу, г.

2. Отримання спиртового розчину (витяжки) пігментів

Принцип методу. Як правило, пігменти з рослинних тканин вилучають органічними розчинниками (етиловий спирт, ацетон, бензол), які руйнують зв'язок хлорофілів і ксантофілів із ліпопротеїнами пластид і тим самим забезпечують їх повне екстрагування. Неполярні розчинники (петролейний ефір, гексан, бензин та ін.) не порушують зв'язку цих пігментів із білками й тому не можуть їх вилучати зі свіжих листів. Для одержання витяжки пігментів використовують як сирий, так і сухий рослинний матеріал. В останньому випадку висушені листки попередньо обробляють гарячою водою, щоб полегшити наступне вилучення пігментів.

Обладнання та реактиви: Конічна колба на 200 мл із корком і зворотнім холодильником, колби конічні на 100 мл, мірний циліндр, водяна баня, годинник, 96 %-ий етиловий спирт, дистильована вода, сухі листки кропиви.

Хід роботи. Сухі листки кропиви помістити в конічну колбу та ошпарити окропом, потім воду злити. В колбу долити 100 мл етилового спирту, закрити її корком із зворотнім холодильником і поставити на водяну баню з киплячою водою для екстрагування пігментів. Після п'ятихвилинного кип'ятіння вміст колби охолодити й розчин обережно злити в іншу колбу. Екстракт використати в наступних дослідах.

3. Розподіл пігментів за Краусом

Принцип методу. Метод ґрунтується на різній розчинності пігментів у спирті та бензині. Зазначені розчинники в одній посудині не змішуються, а утворюють дві фази – верхню бензинову та нижню спиртову, завдяки чого розділяються компоненти суміші пігментів.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, корок, піпетки градуйовані, крапельниця, бензин, етиловий спирт, дистильована вода.

Хід роботи. В пробірку внести 2-3 мл спиртового екстракту пігментів і додати 3-4 мл бензину. Вміст пробірки сильно струсити, попередньо закривши її корком або великим пальцем, і залишити відстоятися. В міру розшарування емульсії бензиновий шар буде забарвлюватися в зелений колір через кращу розчинність у ньому хлорофілів. У бензин переходить також каротин, але його забарвлення маскується забарвленням хлорофілу. Ксантофіл залишається в

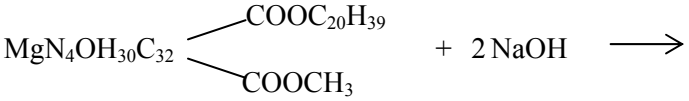
Національний університет
водного господарства
та природокористування

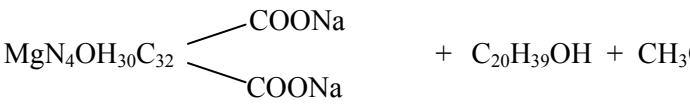
спиртовому шарі та надає йому золотисто-жовтого забарвлення.

Якщо пігменти розділяються недостатньо чітко, то слід додати три-чотири краплі води та знову струсити. При надлишку води можливе помутніння нижнього шару. В цьому випадку варто долити невеликий об'єм етилового спирту та збовтати вміст пробірки.

4. Омилення хлорофілу лугом

Принцип методу. Діючи на хлорофіл лугом, можна викликати омилення ефірних груп, тобто відщеплення залишків метилового спирту та фітолу





Сіль хлорофілінової кислоти, що утвориться при цьому, зберігає зелене забарвлення та оптичні властивості хлорофілу, однак відрізняється від нього більшою гідрофільністю.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, корок, водяна баня, 20 %-ий розчин гідроксиду натрію, бензин, дистильована вода.

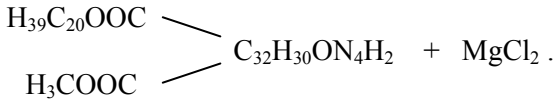
Хід роботи. В пробірку з 2-3 мл спиртового розчину пігментів долити 1 мл розчину гідроксиду натрію та збовтати вміст пробірки. Після змішування екстракту з лугом пробірку поставити на киплячу водяну баню. Як тільки розчин закипить, пробірку вийняти та охолодити. До охолодженого розчину додати 3-4 мл бензину та декілька крапель води для кращого розподілу суміші. Потім вміст пробірки різко струсити та дати відстоятися. При цьому в бензиновий шар переходять каротин і ксантофіл, а в спиртовий – натрієва сіль хлорофілінової кислоти.

5. Одержання феофітину та зворотне заміщення водню атомом металу

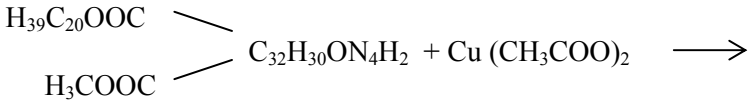
Принцип методу. Атом магнію порівняно слабко утримується в порфіриновому ядрі хлорофілу й при обережній дії сильних кислот

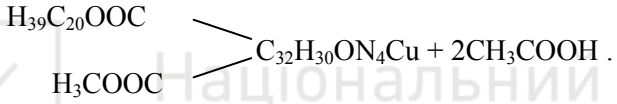
Національний університет
водного господарства
та природокористування

легко заміщується двома протонами з утворенням феофітину бурого кольору



Якщо на феофітин діяти солями міді, цинку або ртуті, то замість двох протонів у ядро входить відповідний метал і продукти реакції забарвлюються в зелений колір. Однак, отримане забарвлення трохи відрізняється від забарвлення хлорофілу





Таким чином, колір хлорофілів обумовлений металоорганічним зв'язком у їхніх молекулах. Зворотне введення магнію в феофітин відбувається досить важко.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, корок, водяна баня, 10 %-ий розчин соляної кислоти, кристали ацетату міді.

Хід роботи. В дві пробірки внести по 2-3 мл спиртової витяжки пігментів і додати по одній-дві краплі розчину соляної кислоти. При збовтуванні зелене забарвлення хлорофілу переходить у буре, що характерне для феофітину. Одну пробірку з феофітином залишити для контролю, а в другу внести кілька кристалів ацетату міді та нагріти розчин на водяній бані до кипіння. В міру нагрівання бурий колір

Національний університет
водного господарства
та природокористування

розчину змінюється на зелений у результаті утворення хлорофілоподібного похідного міді.

6. Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу на процес переносу водню за Гуревичем

Принцип методу. Сутність світлової фази фотосинтезу полягає в окисленні води до молекулярного кисню з використанням променевої енергії, що поглинається хлорофілом. Електрони, що вивільняються при цьому, передаються на $НАДФ^+$, який відновлюється до $НАДФ(Н)Н^+$.

Фотоокислення води та виділення кисню відбувається в ході реакцій, які протікають у фотосистемі II, тоді як $НАДФ^+$ відновлюється в фотосистемі I. Обидві фотосистеми пов'язані одна з одною послідовністю переносників електронів, які утворюють між ними "міст", що спрямований ніби "під гору". В результаті електрони від води проходять Z-подібний шлях. Під впливом індукованого світлом потоку електронів виникає трансмембранний протонний градієнт, унаслідок чого з внутрішньої сторони тилакоїдної мембрани середовище стає більш кислим, ніж із зовнішньої. Послідуюче повернення йонів H^+ із тилакоїда в строму через вмонтовану в мембрані АТФ-азу призводить до утворення АТФ із АДФ і неорганічного фосфату, тобто відбувається фотофосфорилювання.

Фотосенсибілізуюча роль хлорофілу може бути продемонстрована на модельних реакціях із виділеним із рослин пігментом. Для цього як джерело водню беруть аскорбінову кислоту, а як акцептор водню – метиленовий червоний, який, приєднуючи водень, відновлюється до незабарвленої лейкосполуки. Аскорбінова кислота окислюється при цьому в дегідроаскорбінову кислоту.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, штатив із пробірками, піпетки градуйовані, піпетки мірні на 5 мл, крапельниця, шпатель, електрична лампочка потужністю 300 Вт, годинник, чорний папір, насичений спиртовий розчин метиленового червоного, 96 %-ий розчин етилового спирту, спиртова витяжка хлорофілу, кристалічна аскорбінова кислота.

Хід роботи. Взяти чотири пробірки: в три з них налити по 5 мл спиртової витяжки хлорофілу, в четверту – 5 мл етилового спирту. В першу, другу та четверту пробірки внести по 50 мг кристалічної аскорбінової кислоти й декілька раз їх струсити. В усі пробірки з хлорофілом додати краплинами відфільтрований спиртовий розчин

Національний університет
водного господарства
та природокористування

метиленового червоного до тих пір, поки зелене забарвлення не перейде в червоно-буре. В четвертій пробірці забарвлення розчину за допомогою цього індикатора довести до яскраво-червоного. Другу пробірку закрити чохлом із чорного паперу. Потім усі пробірки поставити в штатив і освітлювати електричною лампочкою (на 300 Вт), розмістивши її на відстані приблизно 15 см від штативу.

Після десяти-п'ятнадцятихвилинного освітлення в першій пробірці в результаті відновлення метиленовий червоний знебарвиться й розчин знову набуде зеленого кольору. В інших пробірках забарвлення розчину не зміниться, оскільки без світла, аскорбінової кислоти або хлорофілу метиленовий червоний не відновлюється. Результати досліду занести в таблицю 3.1.

Табл. 3.1. ***Визначення фотосенсибілізуючої дії хлорофілу***

варіант	склад суміші в пробірках				умови	результат
	хлорофіл, мл	етиловий спирт, мл	крист. аскорбінова кислота, мг	спирт. розчин метиленового червоного		
1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***	***7***
1	5	-	50	додають до появи червоно-бурого кольору	світло	
2	5	-	50	те саме	темнота	
3	5	-	-	те саме	світло	
4	-	5	50	додають до появи яскраво-червоного кольору	світло	

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Біологічна роль, форми знаходження та окремі представники органічних кислот.
2. Поширення, вміст і форми знаходження щавлевої кислоти.
3. Принцип кількісного визначення вмісту щавлевої кислоти в рослинному матеріалі.
4. Поняття про рослинні пігменти, їх склад, функціональна роль і локалізація в клітині.
5. Загальне поняття про хлорофіли рослин, їх загальна структура.
6. Хімічна будова хлорофілів *a* і *b*.
7. Загальне поняття про фікобіліни.
8. Каротиноїди, їх склад, функціональна роль, окремі представники.
9. Основні фізико-хімічні та хімічні властивості рослинних пігментів і їх визначення в лабораторних умовах.
10. У чому проявляється фотосенсибілізуюча роль хлорофілу та її демонстрація в лабораторних умовах.

Лабораторне заняття № 4

Тема: Визначення вмісту вітамінів у рослинному матеріалі

Мета заняття: Засвоїти методику якісного та кількісного визначення вмісту окремих груп вітамінів у рослинному матеріалі

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вітаміни розглядають як низькомолекулярні, фізіологічно активні органічні сполуки, що є невід'ємними компонентами організму та забезпечують нормальне протікання біохімічних і фізіологічних процесів шляхом участі в регуляції метаболізму.

Багато вітамінів представляють собою вихідний матеріал для біосинтезу коферментів і простетичних груп ферментів. У цьому полягає одна з головних причин необхідності вітамінів для нормального протікання обмінних процесів.

Структура кожного коферментного вітаміну унікальна та, як правило, характеризується наявністю спряжених зв'язків, чітко вираженими електронодонорними або електроноакцепторними властивостями. Ці властивості значно підсилюються, коли вітамін стає коферментом, сполучаючись із металом або апоферментом при

Національний університет
водного господарства
та природокористування

входженні в активний центр ферменту. Ряд вітамінів самостійно володіє регуляторними функціями, зокрема, бере участь у регуляції проникності мембран, транспорту через них катіонів.

Згідно положень Міжнародної біохімічної номенклатури (1956 р.) вітаміни поділяють на три групи: 1) розчинні у воді; 2) розчинні в жирах; 3) вітаміноподібні сполуки.

В організмі вищих рослин присутні вітаміни в готовій формі або в формі, що легко перетворюється у відповідний вітамін, тобто в формі провітаміну. Нижчі рослини потребують надходження деяких вітамінів із середовища існування.

Із жиророзчинних вітамінів у рослинах знаходяться: провітаміни А, що представляють собою різні каротиноїди (їх особливо багато в коренеплодах моркви, в плодах помідорів і перцю, в листках шпинату); провітаміни D, які представляють собою ергостерин і 7-дегідрохолестерин; вітаміни групи Е або токофероли (найбільше їх міститься в рослинних оліях, особливо в кукурудзяній, бавовниковій, соняшниковій, в олії з пшеничних зародків); вітаміни групи К або хінони (найбільше їх міститься в хлоропластах рослин, особливо в шпинаті, капусті, гарбузі).

Із водорозчинних вітамінів у рослинах знаходяться: вітамін B_1 або тіамін (особливо багато його в бобових рослинах – квасолі, горосі, сочевиці, сої); коферментні форми вітаміну B_2 або рибофлавіну у вигляді ФМН і ФАД (переважають у зернах злаків, в овочах і фруктах); вітамін B_3 або пантотенова кислота (досить багаті на цей вітамін кольорова капуста, картопля, помідори); вітамін B_5 (РР, нікотинова кислота, нікотинамід, ніацин) (цей вітамін досить часто зустрічається в рослинах, особливо багато його в зернових культурах); вітамін B_6 (піридоксин, піридоксаль, піридоксамін) (досить багаті на цей вітамін плодові оболонки зерен злаків); вітамін B_c або фолацин (основним джерелом цього вітаміну є латук посівний, шпинат, капуста, морква, помідори, зелена цибуля); вітамін Н або біотин (найбільше міститься в кінських бобах, оболонці рисових зерен, пшеничному борошні, кольоровій капусті); вітамін С або аскорбінова кислота (є одним із найбільш поширених вітамінів у рослинному світі, особливо багато його в листках і плодах); вітамін Р, що представляє собою різні біофлавоноїди – катехіни, лейкоантоціани, флавонони, флавоноли, флавони, антоціани (він широко представлений у рослинах, особливо багато його в чорноплідній горобині, чорній смородині, щавлі, аґрусі, темній черешні, персиках); інозитол

Національний університет
водного господарства
та природокористування

(представляє собою циклічний шестиатомний спирт циклогексану, що утворюється при циклізації молекули глюкози, часто зустрічається в рослинах, особливо багато його в кукурудзі, картоплі, зеленому горосі, яблуках, динях, а також у грибах). Із вітаміноподібних речовин у рослинах зустрічаються: вітамін B_{15} або пангамова кислота, параамінобензойна кислота, вітамін N або ліпоєва кислота, вітамін U або метилметіонін, вітамін F, який представляє собою ессенціальні поліненасичені жирні кислоти.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Якісні реакції на вітамін А

Принцип методу. Хлороформний розчин вітаміну А утворює з хлоридом сурми (ІІІ) продукт реакції, що забарвлений у синій колір. Із концентрованою сірчаною кислотою цей розчин дає продукт реакції червоно-бурого кольору.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниці, скляні палички, олійний розчин вітаміну А, хлороформ, 33 %-ий хлороформний розчин хлориду сурми (ІІІ) ($SbCl_3$), концентрована сірчана кислота.

Хід роботи:

А. Реакція з трихлористою сурмою. В суху пробірку внести 3 краплі олійного розчину вітаміну А та додати сюди 3 краплі хлороформного розчину хлориду сурми (ІІІ). Вміст пробірки перемішати. При цьому спостерігається поява синього кольору, що поступово переходить у рожево-фіолетовий.

Б. Реакція з сірчаною кислотою (реакція Друммонда). В суху пробірку внести 3 краплі олійного розчину вітаміну А та додати 1-2 мл хлороформу. Вміст пробірки перемішати та додати 5-6 крапель сірчаної кислоти. Вміст пробірки при цьому забарвлюється в червоно-бурий колір.

2. Якісні реакції на вітамін К

Принцип методу. Спиртовий розчин вітаміну К у лужному середовищі з діетилмалоновим ефіром дає червоно-фіолетове забарвлення, а в присутності діетилдитіокарбомату в цих умовах утворює сполуку, забарвлену в блакитний колір. При наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір внаслідок утворення 1-метил-2-феніламінонафтохінону.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки

Національний університет
водного господарства
та природокористування

градуйовані, крапельниця, скляні палички, спиртовий розчин вітаміну К, 0,05 %-ий спиртовий розчин вікасолу, 1 %-ий розчин діетилмалонового ефіру, 1 %-ий розчин гідроксиду калію, 5 %-ий розчин діетилдитіокарбомату, 4 %-ий спиртовий розчин гідроксиду натрію, розчин аніліну.

Хід роботи:

А. Реакція з діетилмалоновим ефіром. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додати 0,5 мл розчину діетилмалонового ефіру та 0,1 мл розчину гідроксиду калію. При цьому спостерігається поява червоно-фіолетового забарвлення.

Б. Реакція з діетилдитіокарбоматом. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додати 2 мл розчину діетилдитіокарбомату та 0,5 мл розчину гідроксиду натрію в етанолі. При цьому розчин набуває блакитного забарвлення.

В. Реакція з аніліном. У пробірку з 1 мл спиртового розчину вікасолу додати 2 краплі аніліну. Після перемішування вміст пробірки забарвлюється в червоний колір.

3. Якісні реакції на вітамін Е

Принцип методу. Взаємодія α-токоферолу з концентрованою азотною кислотою зумовлює забарвлювання реакційної суміші в червоний колір. Це обумовлено тим, що продукт окислення α-токоферолу має хіноїдну структуру. При взаємодії з хлоридом заліза (III) α-токоферол окислюється до α-токоферилхінону – сполуки, забарвленої в червоний колір.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниця, піпетки градуйовані, скляна паличка, 0,1 %-ий спиртовий розчин α-токоферолу, концентрована азотна кислота, 1 %-ий розчин хлориду заліза (III).

Хід роботи:

А. Реакція з азотною кислотою. В суху пробірку внести 5 крапель спиртового розчину α-токоферолу й додати 1 мл концентрованої азотної кислоти. Пробірку інтенсивно струсити. При цьому спостерігається поява червоного забарвлення.

Б. Реакція з хлоридом заліза (III). У суху пробірку внести 0,5 мл спиртового розчину α-токоферолу та 0,5 мл хлориду заліза (III). Вміст пробірки добре перемішати скляною паличкою. При цьому спостерігається поява червоного забарвлення.

Національний університет водного господарства та природокористування

4. Реакція відновлення вітаміну B_2 (рибофлавіну)

Принцип методу. Водень, який утворюється при додаванні металічного цинку до концентрованої соляної кислоти, відновлює жовтий рибофлавін спочатку до родофлавіну (проміжної сполуки) червоного кольору, а потім до безбарвного лейкофлавіну.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, 0,025 %-ий розчин вітаміну B_2 (завись рибофлавіну), концентрована соляна кислота, металічний цинк.

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину вітаміну B_2, 0,5 мл концентрованої соляної кислоти та опустити в неї шматок металічного цинку. Водень, який виділяється при цьому, реагує з рибофлавіном і відновлює його. При цьому вміст пробірки поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. При збовтуванні знебарвленого розчину лейкофлавін знову окислюється киснем повітря в рибофлавін.

5. Якісні реакції на вітамін С

Принцип методу. Аскорбінова кислота здатна легко вступати в окисно-відновні реакції та відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, гексоціано-(III) феррат калію, нітрат срібла, метиленовий синій. При цьому окислена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синій колір) і метиленовий синій відновлюються в безбарвні лейкосполуки, а $K_3Fe(CN)_6$ відновлюється до $K_4Fe(CN)_6$, який із йонами валентного заліза дає сіль $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ синього або зеленого забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниці, піпетки градуйовані, термостат, 0,4 %-ий розчин аскорбінової кислоти, 0,1 %-ий розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 10 %-ий розчин соляної кислоти, 0,01 %-ий розчин метиленового синього, 10 %-ий розчин карбонату натрію, 1 %-ий розчин гексоціано-(III) феррат калію ($K_3Fe(CN)_6$), 1 %-ий розчин хлориду заліза (III), дистильована вода.

Хід роботи:

А. Реакція з 2,6-дихлорфеноліндофенолом. У пробірку внести 0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 1-2 краплі розчину соляної кислоти та краплями розчин аскорбінової кислоти. При цьому розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу знебарвлюється.

Б. Реакція з метиленовим синім. У дві пробірки внести по одній краплі розчину метиленового синього та по одній краплі розчину карбонату натрію. В першу пробірку прилити 5 крапель розчину

Національний університет
водного господарства
та природокористування

аскорбінової кислоти, в другу – 5 крапель води та обидві пробірки поставити в термостат при температурі 37-40º С. Через деякий час рідина в пробірці з розчином аскорбінової кислоти знебарвиться.

В. Реакція з гексоціано-(III) ферратом калію. До 1 мл розчину аскорбінової кислоти додати 1 мл розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 0,5 мл розчину хлориду заліза (III). При цьому спостерігається утворення синьо-зеленого забарвлення.

6. Якісні реакції на вітамін B_5 або РР

Принцип методу. Вітамін B_5 при нагріванні з розчином ацетату міді утворює погано розчинний синій осад мідної солі. Цей вітамін також відновлює гідросульфіт натрію з утворенням сполуки жовтого кольору. При нагріванні його з 2,4-динітрохлорбензолом у присутності лугу утворюється забарвлена сполука.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, штатив із пробірками, крапельниці, піпетки градуйовані, скляні палички, водяна баня, фарфорова чашка, годинник, порошок вітаміну B_5, 0,1 %-ий спиртовий розчин нікотинової кислоти або нікотинаміду, 10 %-ий розчин оцтової кислоти, 5 %-ий розчин ацетату міді, 10 %-ий розчин карбонату натрію, 5 %-ий розчин гідросульфіту натрію ($NaHSO_3$), 1 %-ий спиртовий розчин 2,4-динітрохлорбензолу, 4 %-ий спиртовий розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи:

А. Реакція з ацетатом міді. В пробірку внести 5-10 мг вітаміну B_5 і розчинити його при нагріванні в 1-2 мл оцтової кислоти. До цього розчину, доведеного до кипіння, додати такий же об'єм розчину ацетату міді. Рідина при цьому стає мутною та забарвлюється в голубий колір. При відстоюванні випадає синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

Б. Реакція з гідросульфітом натрію. В пробірку внести 5-10 мг вітаміну B_5, додати сюди 1,5 мл розчину карбонату натрію, перемішати та додати 1,5 мл свіжоприготовленого розчину гідросульфіту натрію. Рідина при цьому забарвлюється в жовтий колір.

В. Реакція з 2,4-динітрохлорбензолом. У фарфорову чашку для випарювання налити 1 мл спиртового розчину нікотинової кислоти або нікотинаміду. Розчин випарити до сухого на водяній бані. До сухого залишку додати 1 мл спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензолу та добре перемішати скляною паличкою.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Отриманий розчин знову випарити на водяній бані до сухого під витяжною шафою. Після цього ще продовжити нагрівання впродовж 10-15 хв. Чашку охолодити до кімнатної температури та до осаду додати 5 мл спиртового розчину гідроксиду натрію. При цьому з'являється червоне забарвлення, яке при стоянні суміші світлішає та поступово зникає.

7. Кількісне визначення вмісту вітаміну С за Тільмансом

Принцип методу. Метод кількісного визначення аскорбінової кислоти ґрунтується на її здатності окислюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом до дегідроаскорбінової кислоти. За об'ємом 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, визначають вміст аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Як тільки весь вміст вітаміну С окислиться, розчин, який титрується, в кислому середовищі набуває рожевого забарвлення внаслідок утворення недисоційованих молекул 2,6-дихлорфеноліндофенолу. В лужному середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має синє забарвлення, в кислому – червоне, а при відновленні знебарвлюється.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, порцелянова ступка з товкачиком, конічні колби на 50 мл, мікробюретка, піпетки градуйовані, лійка, фільтр, скляні палички, скляний пісок, годинник, 2 %-ий розчин соляної кислоти, 0,0005 моль/л розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу (молекулярна маса – 290, еквівалентна маса – 145), різні види харчових продуктів (капуста, хвоя, картопля, шипшина).

Хід роботи. Зважити 1 г харчового продукту, ретельно розтерти його в порцеляновій ступці зі скляним піском. До розтертої маси додати 9 мл розчину соляної кислоти та відстояти. Через 10 хв. вміст перемішати та відфільтрувати. Для кількісного визначення взяти 3 мл фільтрату, помістити його в конічну колбу та відтитрувати розчином натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 30 с. 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову частку аскорбінової кислоти w(C) (у %) розрахувати за формулою

$$\mathbf{w\,(C) = \frac{E \cdot V \cdot V_0}{V_1 \cdot m} \cdot 100\ \%}\ ,$$

Національний університет
водного господарства
та природокористування

де Е – маса аскорбінової кислоти (0,088 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу; V – об'єм 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлор-феноліндофенолу, витраченого на титрування, мл; V_0 – загальний об'єм екстракту, мл; V_1 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл; m – маса харчового продукту, мг.

8. Кількісне визначення вмісту вітаміну Р у чаї за Левенталем

Принцип методу. До речовин, які володіють Р-вітамінною активністю, належать, насамперед, рутин і гесперидин. Подібну активність проявляють катехіни й таніни чайного листка. В рослинах ці сполуки беруть участь в окисно-відновних процесах.

За своєю природою рутин є глікозидом, який складається з залишків рамнози, β-глюкози та флавонону кверцитину. Крім чайного листка, рутин у незначній кількості міститься в бутонах і квітах софори японської, а також у листках і квітах різних видів гречки.

Метод кількісного визначення рутину ґрунтується на його здатності окислюватися перманганатом калію; як індикатор використовують індигокармін, який вступає в реакцію з $KMnO_4$ після того, як окислиться весь рутин. Експериментально встановлено, що 1 мл 0,02 моль/л розчину перманганату калію окислює 6,4 мкг рутину.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, мікробюретка, крапельниця, піпетки градуйовані, хімічні стаканчики або колбочки, годинник, електрична плитка, 0,01 моль/л розчин перманганату калію ($KMnO_4$), індикатор індигокармін (1 г індигокарміну розтерти в фарфоровій ступці, розчинити в 50 мл концентрованої сірчаної кислоти та залити водою до об'єму 1 л; потім суміш відфільтрувати та зберігати в темній посудині), дистильована вода, чай або готовий екстракт.

Хід роботи. Наважку чаю масою 100 мг помістити в колбочку, залити 50 мл гарячої дистильованої води та кип'ятити впродовж 5 хв. Отриманий екстракт охолодити, відібрати 10 мл і перенести в іншу колбочку або хімічний стаканчик, куди долити ще 10 мл дистильованої води та 5 крапель індигокарміну (при цьому з'являється синє забарвлення). Ретельно перемішуючи рідину в колбочці, вміст її відтитрувати розчином $KMnO_4$ до появи стійкого жовтого забарвлення. Паралельно провести титрування контрольного розчину, де замість екстракту в колбочку внести 10 мл дистильованої

Національний університет водного господарства та природокористування

води. Різниця між дослідним і контрольним титруванням представляє собою число мілілітрів 0,01 моль/л розчину $KMnO_4$, що витратився на окислення рутину.

Вміст вітаміну Р w(Р) (в мкг) розрахувати за формулою

$$w(P) = \frac{q \cdot V \cdot V_0}{V_1 \cdot m},$$

де q – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (3,2); V – об'єм 0,01 моль/л розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування, мл; V_0 – об'єм вихідного розчину, в якому розчинена взята для аналізу наважка, мл; V_1 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл; m – маса сухої речовини, взятої для аналізу, г.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Поняття про вітаміни, їх класифікація.
2. Загальна біохімічна та фізіологічна роль вітамінів. Вітаміни як коферменти.
3. Поширення та форми знаходження вітамінів у рослинах.
4. Загальна характеристика жиророзчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
5. Загальна характеристика водорозчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
6. Найважливіші вітаміноподібні сполуки.
7. Якісні реакції на окремі вітаміни.
8. Принцип кількісного визначення вмісту вітаміну С у рослинному матеріалі.
9. Принцип кількісного визначення вмісту вітаміну Р у рослинному матеріалі.

Національний університет водного господарства та природокористування

Лабораторне заняття № 5

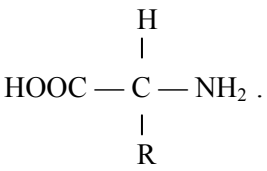
Тема: Якісні реакції на амінокислоти. Визначення вмісту амінного азоту

Мета заняття: Провести якісні реакції на присутність амінокислот; засвоїти методику кількісного визначення вмісту амінного азоту мідним способом у рослинному матеріалі

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Амінокислоти можна розглядати як похідні карбонових кислот, у яких один із атомів водню вуглецевого ланцюга заміщений на групу NH_2. У більшості природних амінокислот аміногрупа знаходиться в α-положенні відносно карбоксильної групи



Значно рідше в рослинних організмах зустрічаються амінокислоти з β- або γ-положенням аміногрупи (наприклад, β-амінопропіонова, γ-аміномасляна).

Залежно від природи бічних ланцюгів (R-радикалу) амінокислоти можна розділити на ациклічні або аліфатичні та циклічні (гомо- та гетероциклічні).

За числом амінних і карбоксильних груп у молекулі амінокислоти поділяють на: 1) моноаміномонокарбонові (наприклад, гліцин, аланін, серин, тирозин); 2) диаміномонокарбонові (наприклад, лізин, цитрулін); 3) моноамінодикарбонові (наприклад, аспарагінова та глутамінова кислоти); 4) диамінодикарбонові (наприклад, цистин).

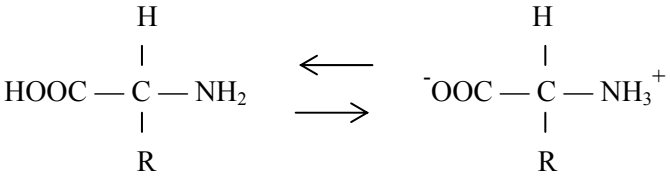
За характером зарядів бічних радикалів і їх полярністю виділяють групи амінокислот: 1) неполярні гідрофобні (наприклад, гліцин, пролін, фенілаланін); 2) полярні, але незаряджені (наприклад, серин, треонін, глутамін); 3) полярні з від'ємним зарядом (наприклад, аспарагінова кислота, тирозин); 4) полярні з додатнім зарядом (наприклад, лізин, гістидин).

Усі амінокислоти, за винятком гліцину, оптично активні та можуть існувати у вигляді пари енантіомерів – D- і L-форм, оскільки вуглецевий атом, у якого водень заміщений на аміногрупу, є хіральним. У живих організмах найчастіше зустрічаються L-форми амінокислот, зокрема, вони входять до складу білків. D-форми зустрічаються зрідка в складі клітинної стінки мікроорганізмів, дуже рідко виявляються в рослинах.

За деяким винятком, амінокислоти добре розчинні у воді. Зі збільшенням вуглеводневого бічного ланцюга їх розчинність у воді зменшується, а в спирті зростає.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Усі α-амінокислоти існують у водних розчинах переважно у вигляді біполярних йонів або цвіттерйонів із дисоційованою карбоксильною групою та протонованою аміногрупою



Біполярність молекул амінокислот обумовлює цілий ряд їх властивостей, зокрема, добру розчинність більшості амінокислот у воді та порівняно погану в органічних розчинниках, великі дипольні моменти їх молекул, високі значення діелектричної сталої та температури плавлення. Залежно від значення pH середовища амінокислоти можуть бути в формі аніонів, катіонів, електронейтральних біполярних йонів або у вигляді суміші цих форм із домінуванням однієї з них. У сильнокислих розчинах амінокислоти представлені позитивними йонами, а в лужних – негативними йонами, тобто амінокислоти представляють собою амфотерні електроліти. Значення pH, при якому сумарний заряд амінокислоти дорівнює нулю, тобто молекула є електронейтральною, називається ізоелектричною точкою.

У відповідності зі своєю амфотерною природою амінокислоти залежно від складу розчину можуть утворювати різні солі, реагуючи як із кислотами, так із основами.

Для амінокислот характерні як загальні, що обумовлені наявністю аміногрупи та карбоксильної групи, так і специфічні, що обумовлені бічними ланцюгами, хімічні властивості. Однією з характерних реакцій α-амінокислот є їх взаємодія з нінгідрином, яка супроводжується виділенням вуглекислого газу. Амінокислоти реагують також із азотистою кислотою та формальдегідом. Радикали бічного ланцюга амінокислот виключно різноманітні, що дає можливість для виявлення більшості амінокислот використовувати кольорові реакції. Окремі з них досить чутливі та специфічні, що дозволяє визначати мізерний вміст тієї або іншої індивідуальної амінокислоти в складі складних сумішей і в біологічних рідинах.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Деякі кольорові реакції знаходять застосування для кількісного визначення амінокислот і білків.

У складі рослинних організмів виявлено біля 250 різних амінокислот, які можна розділити на дві групи: 1) білокутворюючі або протеїногенні, що входять до складу білків (сюди належить 20 основних амінокислот і їх форм); 2) амінокислоти, що зустрічаються у вільному стані (сюди належить понад 200 амінокислот, що представляє собою унікальну особливість амінокислотного обміну в рослинах). Із вільних амінокислот часто зустрічаються такі, як β-аланін, орнітин, цитрулін, γ-аміномасляна кислота та інші.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Нінгідринова реакція

Принцип методу. В результаті взаємодії α-амінокислоти з нінгідрином (трикетогідриндегідратом) при нагріванні утворюється забарвлена комплексна сполука. При температурі 70^0 С α-амінокислоти окислюються нінгідрином і піддаються окислювальному дезамінуванню з утворенням аміаку та декарбоксилюванню з утворенням альдегіду й вуглекислого газу, а нінгідрин при цьому відновлюється. Відновлений нінгідрин, конденсуючись із аміаком і окисленим нінгідрином, утворює сполуку, яка енолізується та переходить у забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір.

У присутності органічних розчинників, на основі яких приготовлюють розчин нінгідрину (ацетон, етанол), можливе протікання побічних реакцій із утворенням сполуки, що містить у своєму складі радикал (R) амінокислоти. Наявність радикалу амінокислоти в складі цієї сполуки обумовлює різне забарвлення (червоне, жовте, голубе) сполук, які виникають при реакції амінокислот із нінгідрином.

Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, які містять α-аміногрупу, та характерна як для ациклічних карбонових, так і для циклічних амінокислот. У реакції гліцину з нінгідрином утворюється комплексна сполука, що має синьо-фіолетове забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, скляна паличка, крапельниця, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1 %-ий водний розчин гліцину, 0,1 %-ий розчин нінгідрину в 95 %-му розчині ацетону.

Національний університет водного господарства та природокористування

Хід роботи. В пробірку внести 5 крапель розчину гліцину та дві краплі розчину нінгідрину. Пробірку поставити на водяну баню й, добре перемішуючи, нагрівати на водяній бані при температурі 70^0 С упродовж 5 хв. При цьому вміст пробірки забарвлюється в синьо-фіолетовий колір.

2. Реакція з азотистою кислотою

Принцип методу. В результаті взаємодії α-амінокислот із азотистою кислотою, що утворюється в реакції нітриту натрію з оцтовою кислотою, відбувається виділення газоподібного азоту. Для гліцину рівняння реакції має вигляд

$$H—\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}—NH_2 + NaNO_2 + CH_3COOH \longrightarrow$$

$$H—\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}—OH + CH_3COONa + H_2O + N_2\uparrow .$$

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниці, скляна паличка, 1 %-ий водний розчин гліцину, 5 %-ий розчин нітриту натрію, концентрована оцтова кислота.

Хід роботи. В пробірку внести 5 крапель розчину гліцину, 5 крапель розчину нітриту натрію, 2 краплі концентрованої оцтової кислоти та обережно перемішати суміш. При цьому спостерігається виділення газу.

3. Утворення комплексної солі міді

Принцип методу. При нагріванні амінокислот із карбонатом міді (II) утворюється сполука міді, що має синій колір.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, шпатель, пробіркотримач, спиртівка, 1 %-ий водний розчин гліцину, сухий карбонат міді (II).

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину гліцину, а на кінчику шпателя – сухий карбонат міді (II). Суміш нагріти в полум'ї спиртівки до кипіння. При цьому розчин забарвлюється в синій колір.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

4. Реакція Фоля на “слабкозв’язану” сірку цистеїну та цистину

Принцип методу. При кипінні цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, котрий у лужному середовищі утворює сульфід натрію. Для цистеїну рівняння реакції має вигляд

Утворений сульфід натрію можна виявити за допомогою йонів важких металів, наприклад, йонів свинцю, що утворюють із йонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для виявлення сульфіду сірки можна використати ацетат свинцю, котрий при взаємодії з гідроксидом натрію утворює плюмбіт натрію. В свою чергу плюмбіт натрію, реагуючи з сульфідом натрію, зумовлює утворення сульфіду свинцю.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляна паличка, водяна баня, годинник, 1 %-ий водний розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10 %-го розчину ацетату свинцю додати 10 %-ий розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, що утворився), 30 %-ий розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину цистеїну, 2 мл концентрованого розчину гідроксиду натрію та 1 мл реактиву Фоля. Суміш добре перемішати та кип’ятити на водяній бані впродовж 2 хв. Через 3-5 хв. випадає бурий або чорний осад сульфіду свинцю.

5. Біуретова реакція на пептидні зв’язки

Принцип методу. Амінокислоти, що здатні утворювати не менше двох пептидних зв’язків (—CO—NH—), у лужному розчині в присутності сульфату міді (II) утворюють комплекси з атомами міді, котрі забарвлені в фіолетовий колір. Уперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена для біурету, тому вона й названа біуретовою.

Національний університет водного господарства та природокористування

Біурет, який може бути отриманий при нагріванні сечовини до температури 180^0 С, не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки

$$2H_2N—CO—NH_2 \xrightarrow{\text{нагрівання}} H_2N—CO—NH—CO—NH_2 +$$

$$+ NH_3.$$

У лужному середовищі біурет зазнає енолізації за схемою

$$H_2N—CO—NH—CO—NH_2 \rightleftarrows HN{=}C(OH)—NH—C(OH){=}NH .$$

Дві молекули енольної форми біурету взаємодіють із гідроксидом міді (II) та утворюють комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

Подібний комплекс із міддю можуть утворювати деякі амінокислоти, в яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної та амінної груп. Прикладом такої амінокислоти може бути аспарагін.

Гідроксид міді (II) для проведення біуретової реакції отримують, як правило, в результаті реакції взаємодії сульфату міді (II) з гідроксидом натрію (або калію)

$$CuSO_4 + 2NaOH \longrightarrow Cu(OH)_2 + Na_2SO_4 .$$

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, скляна паличка, 1 %-ий водний розчин аспарагіну, 10 %-ий розчин гідроксиду натрію (або калію), 10 %-ий розчин сульфату міді (II).

Хід роботи. В пробірку з 3 мл розчину аспарагіну додати 1 мл розчину гідроксиду натрію (або калію), 1-2 краплі розчину сульфату міді (II) та вміст перемішати. Вміст пробірки при цьому забарвлюється в синьо-фіолетовий колір.

6. Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. В ароматичних амінокислотах, які містять

Національний університет
водного господарства
та природокористування

бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін), під дією азотної кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

У реакції гідроксиду натрію з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, що має оранжевий колір.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, спиртівка, пробіркотримач, 1 %-ий водний розчин тирозину, концентрована азотна кислота, 10 %-ий розчин гідроксиду натрію.

Хід роботи. В пробірку внести 3 мл розчину тирозину та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Суміш обережно нагріти в полум'ї спиртівки до появи жовтого забарвлення. Після охолодження в пробірку додати розчину гідроксиду натрію до появи оранжевого забарвлення.

7. Мікрометод визначення амінного азоту мідним способом

Принцип методу. Цей мікрометод визначення амінного азоту мідним способом був розроблений Войвудом і модифікований Т.А. Глаголєвою. Принцип методу полягає в тому, що амінокислоти реагують із солями міді з утворенням розчинного мідного комплексу. Надлишок міді видаляють із розчину та визначають вміст міді в розчині або йодометричним методом, або за допомогою діетилдитіокарбомату натрію, що кількісно розкладає мідні сполуки амінокислот, даючи при цьому жовте забарвлення. Оптичну густину забарвленого розчину визначають колориметрично. Лінійна залежність між вмістом більшості амінокислот спостерігається в межах від 1 до 30 мікрограмів амінного азоту.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, фарфорова ступка з товкачиком, штатив із пробірками, лійка, фільтр, хімічний стакан, мірні циліндри, колби мірні на 1 л, 500 і 100 мл, піпетки градуйовані, пробірки градуйовані, скляні палички, водяна баня, центрифуга, ФЕК, 2,73 %-ий розчин хлориду міді (II), 2,56 %-ий розчин гідроортофосфату натрію (25,6 г Na_2HPO_4 розчинити у воді та довести об'єм до 1 л), 1 н розчин гідроксиду натрію, 2 %-ий розчин диетилдитіокарбомату натрію, аміловий або бутиловий спирт, 50 %-ий і 2 %-ий розчини трихлороцтової кислоти, дистильована вода, рослинний матеріал.

Хід роботи. Наважку свіжих листків або інших вегетативних органів рослин масою 5-10 г зафіксувати киплячим аміловим або

Національний університет
водного господарства
та природокористування

бутиловим спиртом і ретельно розтерти в ступці. Потім наважку перенести в хімічний стакан на 100 мл. Ступку змити невеликими порціями води (загальний об'єм суспензії в стакані не повинен перевищувати 40 мл). Стакан із суспензією нагрівати на киплячій водяній бані впродовж 1 год.

При аналізі борошна взяти наважку близько 5 г, перенести її в хімічний стакан, залити 40 мл води, ретельно перемішати та витримати на водяній бані при 40-50^0 С упродовж 1 год., періодично помішуючи скляною паличкою.

Потім провести осадження білків додаванням у хімічний стакан 5 мл 50 %-ого розчину трихлороцтової кислоти. Вміст стакана відфільтрувати в мірну колбу на 100 мл, осад на фільтрі промити 20 мл 2 %-ого розчину трихлороцтової кислоти, вміст колби довести водою до мітки та перемішати.

У пробірку внести 1 мл досліджуваного розчину, що містить 10-60 мкг амінного азоту, додати 2,5 мл розчину гідроортофосфату натрію та 2,5 мл суспензії фосфорнокислої міді. Паралельно приготувати контрольну пробу, в якій у пробірку замість досліджуваного розчину додати 1 мл води. Суспензію фосфорнокислої міді отримати наступним чином. Спочатку готують розчин ортофосфату натрію (Na_3PO_4), для чого розчинити 25,6 г Na_2HPO_4 в 500 мл дистильованої води, додати 180 мл 1 н розчину NaOH і довести об'єм водою до 1 л. До одного об'єму одержаного розчину Na_3PO_4 додати один об'єм розчину хлориду міді (II) (27,3 г $CuCl_2$ розчинити в 1 л) і суміш добре перемішати. Після цього долити чотири об'єми 2,56 %-ого розчину Na_2HPO_4 і нагрівати зі зворотнім холодильником упродовж години. Суспензію фосфорнокислої міді необхідно готувати не менш як за 24 год. до її використання; строк зберігання 1-2 місяці.

Після додавання суспензії фосфорнокислої міді суміш у пробірках добре збовтати та залишити на 30 хв. (за цей час проходить реакція між міддю та амінокислотами). Потім видалити залишок міді. Для цього рідину відфільтрувати через щільний фільтр у чисту суху пробірку або відцентрифугувати при 10 тис. об./хв. упродовж 15 хв., що забезпечує повне видалення з розчину слідів осаду фосфорнокислої міді, котра може вплинути на результати.

Після видалення міді половину фільтрату або 3 мл надосадової рідини перенести в градуйовану пробірку. Рідину в пробірці долити водою до 8 мл, додати 0,1 мл 2 %-го розчину діетилдитіокарбомату

Національний університет
водного господарства
та природокористування

натрію, довести водою до 10 мл і добре перемішати. При цьому з'являється жовте забарвлення.

Після 10-хвилинного витримування сполуку, що дає жовте забарвлення, екстрагувати 10 мл амілового або бутилового спирту. Суміш відцентрифугувати при 10 тис. об./хв. упродовж 15 хв. і оптичну густину одержаного жовтого розчину визначити на ФЕКу з синім світлофільтром. Паралельно визначити оптичну густину контрольної проби, в якій замість розчину, що досліджується, була прилита вода.

Вміст амінного азоту визначити за знайденою величиною оптичної густини, використовуючи калібрувальну криву.

При розрахунках величину оптичної густини контрольного розчину віднімають від величини оптичної густини досліджуваного розчину.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Поняття про амінокислоти, їх різноманітність у рослинних організмах.
2. Класифікація амінокислот.
3. Хімічна будова основних протеїногенних амінокислот.
4. Фізико-хімічні властивості амінокислот.
5. Загальні хімічні властивості амінокислот.
6. Якісні реакції на амінокислоти.
7. Принцип мікрометоду визначення вмісту амінного азоту мідним способом у рослинному матеріалі.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Лабораторне заняття № 6

Тема: Розподіл амінокислот методом хроматографії на папері. Якісні реакції на білки та їх фізико-хімічні властивості

Мета заняття: Засвоїти методику якісного визначення амінокислот методом хроматографії на папері; проробити якісні реакції на білки та з'ясувати їх характерні фізико-хімічні властивості

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Білки разом із нуклеїновими кислотами є обов'язковими компонентами організмів. Вони входять до складу всіх без винятку живих тіл – починаючи від найпростіших вірусів і закінчуючи

Національний університет
водного господарства
та природокористування

людиною. В організмі рослин білки складають 20-25 % у перерахунку на суху масу.

У тілі рослин білки виконують ряд важливих функцій: 1) будівельну або структурну (входять до складу клітинної мембрани, становлять основу гіалоплазми протопласта, беруть участь у побудові всіх його органел); 2) каталітичну (всі ферменти є простими або складними білками); 3) рухову (забезпечують рух джгутиків у статевих клітинах та зооспорах, рух цитоплазми в клітині, переміщення хромосом під час поділу клітини); 4) транспортну (здійснюють перенесення речовин через клітинну оболонку та мембрани, транспортують фітогормони); 5) захисну (отруйні та токсичні речовини, що забезпечують захист рослин від інших організмів, можуть мати білкову природу); 6) запасаючу (можуть відкладатися в рослинних клітинах як запасні речовини); 7) рецепторну (окремі групи білків, насамперед глікопротеїни, вибірково впізнають і зв'язують інші речовини); 8) регуляторну (спеціальні білки впливають на активність генів, можуть бути активаторами або інгібіторами ферментів).

Білки представляють собою високомолекулярні гетерополімерні сполуки, що побудовані з залишків α-амінокислот, які сполучені між собою пептидними (амідними) зв'язками. До складу білків входить, як правило, 20 протеїногенних амінокислот або їх форм. Порядок сполучення конкретних амінокислот у поліпептидному ланцюгу білка визначає його первинну будову. В свою чергу вона задає його вторинну та третинну, а для окремих білків – і четвертинну будови. Прості білки складаються лише з амінокислот, а складні білки містять ще й інші компоненти – вуглеводи, ліпіди, ортофосфорну кислоту, йони металів і ін.

Фізико-хімічні та хімічні властивості конкретного білка визначаються як наявністю багатьох пептидних зв'язків, так і природою амінокислот, які входять до його складу.

Білки представляють собою поліелектроліти й тому здатні рухатись в електричному полі. Сумарний заряд білкової макромолекули залежить, насамперед, від її амінокислотного складу та значення pH середовища. Значення pH, при якому сумарний заряд макромолекули дорівнює нулю й вона не здатна до руху в електричному полі, називається ізоелектричною точкою.

Кислотно-основні властивості білків визначаються, головним чином, бічними радикалами амінокислот, здатними до йонізації.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Внесок кінцевих NH_2- і COOH-груп досить невеликий. Білки, маючи амфотерні властивості, виконують роль буферів.

Переважна більшість білків є гідрофільними речовинами та розчинними у водних розчинах. Розчинність їх, як і інших високомолекулярних речовин, визначається природою тих груп, які опиняються на поверхні молекули при її просторовій укладці. Більша частина білкової макромолекули утворена групами, здатними до гідратації. Розчинність білків у воді зростає при додаванні невеликих кількостей нейтральних солей (Na_2SO_4, $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ та ін.); цей ефект називають сольовим розчиненням. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висалюють) білки з водних розчинів і найбільш активно це відбувається в ізоелектричній точці білка. Розчинність білків залежить також від величини pH розчинника, його складу, температури.

У розчинах білки проявляють колоїдні властивості: вони повільно дифундують, не проходять через напівпроникний бар'єр, розсіюють світло, характеризуються високою в'язкістю. Завдяки гідрофільним і гідрофобним групам, білки можуть впливати на розчинність інших речовин, виступаючи в ролі емульгаторів.

Білки піддаються денатурації. Під денатурацією розуміють порушення нативної просторової структури білкової молекули, що зумовлює зменшення або повну втрату її розчинності, зміну інших фізико-хімічних властивостей білка, втрату специфічної біологічної активності. В результаті денатурації порушуються нативна третинна та, в значній мірі, й вторинна структури. Денатурацію білкових молекул викликають як деякі хімічні речовини (формамід, органічні речовини, йони важких металів, йонні детергенти та ін.), так і фізичні (нагрівання, високий тиск, різні види випромінювань) фактори.

Усі білки, як правило, поглинають ультрафіолетове світло. Вони є оптично активними речовинами та повертають при пропусканні через них плоскополяризоване світло.

При нагріванні з концентрованими кислотами білки піддаються гідролізу, внаслідок чого розриваються пептидні зв'язки та утворюється суміш амінокислот. Подібно до вільних амінокислот білки дають специфічні кольорові реакції, що обумовлені присутністю в їх складі відповідних амінокислот.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення окремих амінокислот методом розподільної хроматографії на папері

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

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

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

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

Обладнання та реактиви: Ексикатор або чашки Петрі, пульверизатор, мікропіпетки на 5-10 мкл, сушильна шафа, олівець, лінійка, годинник, хроматографічний папір, розчинник – суміш *н*-бутанолу, оцтової кислоти та води в співвідношенні 4:1:1, суміш амінокислот і їхні стандартні розчини (0,1 %-ві розчини аланіну, лейцину та глутамінової кислоти), свіжоприготовлений нінгідриновий реактив (змішати 95 мл 0,5 %-го розчину нінгідрину в 95 %-му ацетоні, 1 мл льодяної оцтової кислоти та 4 мл дистильованої води).

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

Олівцем в основі ґнота на хроматографічному папері в кожному сегменті намітити точку нанесення амінокислот. На один із сегментів за допомогою мікропіпетки нанести суміш амінокислот (5-10 мкл

Національний університет
водного господарства
та природокористування

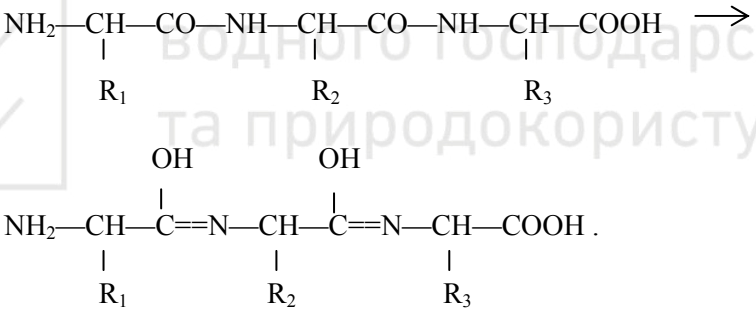
суміш аланіну, лейцину та глутамінової кислоти), на інші сегменти – такий же об'єм стандартного розчину чистих амінокислот. Після цього хроматографічний папір висушити на повітрі впродовж 10 хв. В ексикатор або чашку Петрі налити розчинник – суміш *н*-бутанолу, оцтової кислоти та води, таким об'ємом, щоб ґніт був занурений у розчинник. Кругову хроматограму далі помістити в ексикатор або між двома половинками чашки Петрі. Хроматограма з діаметром 12 см утвориться приблизно через 1 год., із діаметром 20 см – через 2 год. Після завершення розподілу (коли фронт розчинника дійде до встановленої відмітки) хроматограму висушити та проявити, обприскавши її нінгідриновим реактивом із пульверизатора та прогрівши в сушильній шафі впродовж 10 хв. при температурі 110^0 С.

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

2. Біуретова реакція на виявлення пептидних зв'язків у білках

Принцип методу. Білки (поліпептиди) в лужному розчині в присутності сульфату міді (II) утворюють комплексні сполуки міді, що забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від числа пептидних зв'язків у молекулі білка.

Спочатку пептидні групи білка зазнають у лужному середовищі енолізації



Енольна форма поліпептиду взаємодіє з гідроксидом міді (II) й утворює забарвлений у синьо-фіолетовий колір комплекс. Продукти

Національний університет
водного господарства
та природокористування

неповного гідролізу білка (пептиди) дають у біуретовій реакції червоне або рожеве забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляна паличка, крапельниця, 1 %-ий розчин яєчного білка, 10 %-ий розчин гідроксиду натрію (або калію), 1 %-ий розчин сульфату міді (II).

Хід роботи. В пробірку внести 3 мл розчину яєчного білка, додати 1 мл розчину гідроксиду натрію, 1-2 краплі розчину сульфату міді (II) та перемішати. Вміст пробірки при цьому забарвлюється в червоно-фіолетовий колір.

3. Кольорові реакції з білками на виявлення карбонових амінокислот

Принцип методу. Для якісного виявлення залишків карбонових амінокислот, які входять до складу білків, використовують характерні для цих амінокислот кольорові реакції. Так, для виявлення α-амінокислот використовують нінгідринову реакцію, для виявлення залишків цистину та цистеїну – реакцію Фоля.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляні палички, крапельниця, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1 %-ий розчин яєчного білка, 1 %-ий розчин нінгідрину в 95 %-му розчині ацетону, реактив Фоля (див. лабор. заняття № 5).

Хід роботи:

А. Нінгідриновая реакція. В пробірку внести 1 мл розчину яєчного білка, додати сюди 3 краплі розчину нінгідрину. Суміш перемішати та поставити на водяну баню при температурі 70^0 С на 5 хв. При цьому спостерігається утворення синьо-фіолетового забарвлення, що свідчить про присутність у молекулі білка залишків α-амінокислот.

Б. Реакція Фоля. В пробірку внести 3 мл розчину яєчного білка, додати сюди 3 мл реактиву Фоля й після перемішування кип'ятити на водяній бані впродовж 2 хв. Після охолодження пробірки спостерігається утворення бурого або чорного осаду, що свідчить про наявність у молекулі білка залишків цистеїну та цистину.

4. Кольорові реакції з білками на виявлення циклічних амінокислот

Принцип методу. Для якісного виявлення залишків циклічних амінокислот у складі молекули білка використовують характерні для

Національний університет
водного господарства
та природокористування

цих амінокислот реакції. Так, для виявлення залишків ароматичних амінокислот використовують ксантопротеїнову реакцію, залишків тирозину – реакцію Мілона, залишків триптофану – реакції Адамкевича та Вуазене, залишків гістидину та тирозину – реакцію Паулі.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, бюретка, скляні палички, крапельниці, термометр лабораторний, годинник, ванночка з льодом, 1 %-ий розчин яєчного білка, концентрована сірчана кислота, 10 %-ий розчин карбонату натрію, 2,5 %-ий розчин формальдегіду, 1 %-ий розчин сульфанілової кислоти в 5 %-ому розчині соляної кислоти, 0,5 %-ий розчин нітриту натрію.

Хід роботи:

А. Реакція Вуазене. В пробірку внести 2 мл розчину яєчного білка та 1 краплю розчину формальдегіду. До отриманої суміші, ретельно перемішуючи та охолоджуючи пробірку в ванночці з льодом, обережно краплями за допомогою бюретки додати 6 мл концентрованої сірчаної кислоти. Через 10 хв. у пробірку влити, перемішуючи, 10 крапель розчину нітриту натрію. При цьому спостерігається утворення синьо-фіолетового забарвлення.

Б. Реакція Паулі. В пробірку внести 1 мл розчину сульфанілової кислоти в розчині соляної кислоти, 2 мл розчину нітриту натрію та, після ретельного перемішування, 2 мл розчину яєчного білка й 6 мл розчину карбонату натрію. Після перемішування суміш забарвлюється в вишнево-червоний колір.

5. Реакції осадження білків

Принцип методу. Під впливом різноманітних факторів білки втрачають свою нативну структуру, денатурують і внаслідок цього переходять у нерозчинний стан. Осадження білків спостерігається, наприклад, при їх нагріванні, при дії органічних розчинників, алкалоїдних речовин, нейтральних солей високої концентрації, солей важких металів, мінеральних та органічних кислот і інших факторів.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниці, шпатель, 1 %-ий розчин яєчного білка, 5 %-ий розчин ацетату свинцю, 5 %-ий розчин сульфату міді (II), 3 %-ий розчин нітрату срібла, кристалічний хлорид натрію, 96 %-ий етиловий спирт, 95 %-ий ацетон, концентрована соляна кислота, концентрована

Національний університет
водного господарства
та природокористування

сірчана кислота, концентрована азотна кислота, 20 %-ий розчин сульфосаліцилової кислоти, 5 %-ий розчин трихлороцтової кислоти.

Хід роботи:

А. Осадження білків солями важких металів. У три пробірки внести по 3 мл розчину яєчного білка. В першу з них краплями додати розчин ацетату свинцю, в другу – розчин сульфату міді (II), в третю – розчин нітрату срібла. При цьому спостерігається випадання осаду білка. В першу та другу пробірки додати надлишок відповідно розчину ацетату свинцю та розчину сульфату міді (II). При цьому осад зникає.

Б. Осадження білків органічними розчинниками. В пробірку внести 2 мл розчину яєчного білка, додати декілька кристаликів хлориду натрію та 2 мл етилового спирту. Вміст пробірки добре збовтати. При цьому спостерігається випадання осаду білка. Аналогічну реакцію проробити з ацетоном.

В. Осадження білків мінеральними кислотами. В три пробірки обережно налити по 1 мл, відповідно, концентрованих соляної, сірчаної та азотної кислот. Нахиливши пробірки, по їх стінці долити 1 мл розчину яєчного білка. На межі двох рідин спостерігається поява осаду білка у вигляді мутнобілого кільця. Вміст кожної з пробірок обережно струсити. При цьому відбувається розчинення осаду в надлишку кислот.

Г. Осадження білків органічними кислотами. В дві пробірки внести по 1 мл розчину яєчного білка. В одну з них додати 2 мл розчину сульфосаліцилової кислоти, в іншу – 1 мл розчину трихлороцтової кислоти. При цьому спостерігається випадання осаду білка.

6. Визначення ізоелектричної точки білків (желатину)

Принцип методу. Визначення ізоелектричної точки білків ґрунтується на здатності білків під дією осаджувачів, які викликають їх дегідратацію, при значенні pH середовища, що відповідає їх ізоелектричній точці, легко осаджуватися.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляні палички, 1 %-ий розчин желатину, 0,1 і 1 моль/л розчини оцтової кислоти, 0,1 моль/л розчин ацетату натрію, 96 %-ий етиловий спирт або 95 %-ий ацетон, дистильована вода.

Хід роботи. В 6 пробірок помістити відповідні (що приведені в таблиці 6.1) об’єми розчинів оцтової кислоти, ацетату натрію,

Національний університет
водного господарства
та природокористування

дистильованої води та желатину. Вміст кожної пробірки перемішати. Потім у всі пробірки повільно по стінці долити по 4 мл спирту або ацетону. Через 30 хв. визначити ізоелектричну точку. Вона буде відповідати значенню pH пробірки з максимальним ступенем помутніння.

Табл. 6.1. ***Співвідношення компонентів реакційної суміші (в мл) для отримання значення pH при визначенні ізоелектричної точки желатину***

Вода	CH_3COOH (0,1моль/ л)	CH_3COOH (1 моль/ л)	CH_3COONa (0,1моль/ л)	1 %-ий розчин желати-ну	pH се-редо-вища
1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
3,8	0,2	-	2,0	2,0	5,6
3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Принцип методу визначення окремих амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері.
2. Білки, їх вміст у рослинних організмах. Різноманітність білків, їх біологічні функції.
3. Хімічна будова білків. Пептидний зв’язок.
4. Характеристика структурних рівнів організації білкових макромолекул.
5. Загальні фізико-хімічні та хімічні властивості білків.
6. Кольорові реакції на білки.
8. Які речовини можна використати для осадження білків ?
9. Ізоелектрична точка білка та метод її визначення.
10. Денатурація білків і денатуруючі фактори.
11. Класифікація білків. Основні групи простих і складних білків.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Лабораторне заняття № 7-8

Тема: Вивчення властивостей ферментів і визначення їх активності

Мета заняття: З'ясувати загальні фізико-хімічні властивості ферментів; засвоїти методику визначення активності окремих груп ферментів у рослинному матеріалі

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ферменти або ензими є біологічними каталізаторами, що забезпечують протікання біохімічних реакцій у живих організмах. Завдяки ферментам швидкість протікання біохімічних процесів зростає в сотні та десятки тисяч раз. Через ферментативний апарат, регуляцію його активності відбувається й регуляція швидкості обміну речовин у цілому та їх спрямованості.

За хімічною природою всі ферменти є простими або складними білками. Вони володіють вузькою специфічністю, вибірково діючи лише на певні субстрати (речовини, що піддаються каталітичному перетворенню).

У випадку ферментів, які представляють собою складні білки, білкова частина називається апоферментом; небілковий компонент таких ферментів називають коферментом або кофактором, якщо він слабо зв'язаний із білковою частиною та легко дисоціює з такого комплексу, або простетичною групою, якщо небілковий компонент міцно зв'язаний із білком і в циклі біохімічних реакцій не від'єднується від нього.

Як правило, каталітичною активністю володіє не вся молекула ферменту, а лише певна його частина, найчастіше досить невелика, що називається активним центром. Саме в активному центрі відбувається контакт між ферментом і субстратом, зв'язування останнього, утворення проміжного фермент-субстратного комплексу та повне перетворення субстрату. Активний центр створюється певними бічними радикалами амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга, а у випадку складних білків до складу активного центру можуть входити групи небілкової частини. Активні центри ферментів розміщені в заглибинах на поверхні білкової макромолекули. Мікросередовище активного центру відрізняється від решти оточення ферменту більш низькою діелектричною провідністю, що близька до такої для деяких органічних розчинників.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Із коферментів і простетичних груп до складу ферментів найчастіше входять: НАД$^+$ (нікотинамідаденіндинуклеотид), НАДФ$^+$ (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат), ФМН (флавінмононуклеотид), ФАД (флавінаденіндинуклеотид), АТФ та інші нуклеозидтрифосфати (ГТФ, УТФ, ЦТФ), кофермент ацетилування – коензим А (КоА-SH).

Завдяки утворенню фермент-субстратного комплексу значно понижується енергія активації взаємодіючих молекул, що й зумовлює зростання швидкості реакції під впливом ферменту.

Ферментативний каталіз має ознаки як гомогенного, так і гетерогенного каталізу, котрий відбувається на межі розподілу двох фаз. У каталітичній дії ферментів можна виділити 3 основні стадії: 1) приєднання молекул субстрату (S) до ферменту (E); 2) перетворення субстрату; 3) від'єднання кінцевих продуктів реакції (P) від ферменту. В найпростішому випадку схема ферментативної реакції буде мати вигляд:

$$E+S \leftrightarrow \underset{\text{проміжний фермент-субстратний комплекс}}{E'S'} \leftrightarrow E''P' \rightarrow E+P$$

Як правило, найшвидшою є перша стадія реакції, повільною – друга. Утворення проміжного фермент-субстратного комплексу є можливим завдяки певній спорідненості ферменту до свого субстрату. В утворенні цього комплексу беруть участь йонні, водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії. При цьому молекули ферменту та субстрату не тільки зближуються, але й певним чином взаємно зорієнтовуються. Між структурою субстрату та структурою активного центру ферменту крім стеричної відповідності існує й топохімічна, при якій забезпечується взаємодія впізнаваючих груп ферменту та груп субстрату, що розпізнаються. Важливою особливістю ферментативних реакцій є те, що перетворення субстрату протікає як поліфункціональний каталіз, який забезпечується різноманітністю амінокислотних залишків білкової частини ферменту та функціональних груп кофакторів у активному центрі.

Для оцінки ферментативної активності згідно останньої міжнародної угоди використовують одиницю, що називається катал (кат). 1 катал – це така кількість ферменту, яка в певних умовах каталізує перетворення субстрату зі швидкістю 1 моль/с. За стандартну одиницю активності (E) будь-якого ферменту приймається

Національний університет
водного господарства
та природокористування

така його кількість, яка каталізує перетворення 1 мікромоль даного субстрату за 1 хв. при оптимальних умовах (звичайно при температурі 30^0 С, оптимальних для даного ферменту значеннях pH і концентрації субстрату). Якщо реакцію проводять не при температурі 30^0 С, то слід зазначити фактичну температуру реакції. Чистоту ферментного препарату характеризують величиною питомої активності, що виражається числом одиниць ферменту на 1 мг стандартного зразка. Концентрацію ферменту в розчині виражають числом одиниць активності, що припадають на 1 мл розчину. Іноді використовують й інші вираження одиниць активності ферментів.

Активність ферментів у рослинах непостійна й залежить від виду та органу рослини, часу доби, температури й вологості, при яких вирощується рослина, живлення та від ряду інших чинників. Залежно від зміни активності ферментів змінюється інтенсивність і спрямованість біохімічних процесів, що в кінцевому підсумку призводить до зміни величини врожаю та його хімічного складу.

Для впорядкування значного числа ферментів, які виявлені в живих організмах, у 1961 р. Міжнародна комісія з ферментів прийняла їх класифікацію, згідно якої всі ферменти розподілені на 6 класів у відповідності з характером реакції, що каталізується. Ці класи поділенні на підкласи, а вони, в свою чергу, – на підпідкласи або групи, в межах яких ферментам присвоюється порядковий номер. Таким чином, кожен фермент має свій індивідуальний чотиризначний шифр (наприклад, глюкооксидаза – КФ. 1.1.3.4).

Згідно прийнятої класифікації виділено 6 наступних класів ферментів:

1) оксидоредуктази (каталізують окисно-відновні реакції);
2) трансферази (каталізують реакції переносу груп з однієї речовини на іншу);
3) гідролази (каталізують реакції гідролітичного розщеплення речовин);
4) ліази (каталізують реакції негідролітичного розщеплення речовин із утворенням подвійних зв’язків або з приєднанням за місцем подвійних зв’язків);
5) ізомерази (каталізують реакції ізомеризації речовин);
6) лігази або синтетази (каталізують реакції синтезу нових речовин).

Для вивчення дії ферментів і визначення їхньої активності звичайно використовують якісні або кількісні реакції, що

Національний університет
водного господарства
та природокористування

супроводжуються використанням речовин, на які діє фермент (субстратів), або появою продуктів реакції, що утворюються в результаті дії ферменту. Для одержання препаратів ферментів використовують витяжки з рослинних тканин, у яких ферменти знаходяться в розчиненому стані. Для більш детального вивчення дії ферментів їх вилучають із тканин рослин, очищують шляхом фракціонування екстрактів нейтральними солями або органічними розчинниками, йонообмінною хроматографією, гель-фільтрацією або іншими методами. При поєднанні різноманітних методів очищення можна одержати ферменти в кристалічному стані.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення оптимальної температури дії ферментів

Принцип методу. Швидкість ферментативної реакції закономірно зростає приблизно в 2-3 рази при підвищенні температури на кожні 10^0 С. На відміну від неферментативних процесів таке зростання спостерігається лише у вузькому інтервалі температур оптимального значення. Після досягнення температури 40-50^0 С швидкість більшості ферментативних процесів починає зменшуватись, що пояснюється тепловою денатурацією молекули ферменту та втратою її ферментативної активності.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, ванночка з льодом, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1 %-ий розчин крохмалю, розведена слина (1:10), реактив Люголя.

Хід роботи: В чотири пронумеровані пробірки внести 2 мл розчину крохмалю та додати в кожну з них 0,5 мл розведеної слини. Одну з пробірок поставити в ванночку з льодом (температура близько 0^0 С), другу – залишити в штативі при кімнатній температурі, третю – поставити на водяну баню з температурою 37-40^0 С, четверту – на водяну баню з температурою 70-80 ^{0}С. Через 5-7 хв. у пробірки додати по 1-2 краплі реактиву Люголя. Різне забарвлення з йодом і, відповідно, різна глибина гідролізу крохмалю зумовлені різною швидкістю ферментативної реакції при різних температурах. Результати спостережень зпівставити з приведеними нижче даними:

Національний університет
водного господарства
та природокористування

	0^0 С	20^0 С	40^0 С	80^0 С
забарвлення досліджуваного розчину при реакції з йодом	фіолетове	червоно-буре	жовте	оранжеве
назва забарвлених продуктів реакції	амінодекстрини	еритродекстрини	мальтоза	охродекстрини

2. Специфічність дії ферментів

Принцип методу. Ферменти характеризуються строгою специфічністю дії на субстрати. Вони здатні перетворювати лише певну речовину або невелику групу близьких за хімічною природою речовин. Так, наприклад, амілаза каталізує гідролітичне розщеплення глікозидних зв'язків крохмалю та нездатна гідролізувати дисахариди (сахарозу, мальтозу).

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, скляна паличка, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1 %-ий розчин крохмалю, розведена слина (1:10), препарат сахарази, реактив Фелінга.

Хід роботи: В дві пробірки внести по 3 мл розчину крохмалю. В одну з пробірок додати 1 мл розведеної слини, що містить у собі амілазу, а в другу – 1 мл препарату сахарази. Вміст пробірок перемішати й поставити на водяну баню з температурою 37^0 С на 10 хв. для гідролізу. Після проведення гідролізу вміст пробірок перевірити за допомогою реактиву Фелінга (див. лабор. заняття № 1) на наявність у ньому продуктів гідролізу крохмалю. За результатами реакцій зробити відповідні висновки про специфічність дії амілази.

3. Групова специфічність дії сахарази

Принцип методу. Фермент сахараза специфічна по відношенню до фруктозної частини дисариду сахарози та трисахариду рафінози. Тому розщепленню піддається ß-глікозидний зв'язок, який знаходиться ближче до фруктозної частини даних молекул. Продукти ферментативного гідролізу сахарози та рафінози дають позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, піпетки

Національний університет водного господарства та природокористування

градуйовані, скляні палички, термостат, нагрівач, годинник, 1 %-ий розчин рафінози, 1 %-ий розчин сахарози, препарат сахарази, реактив Фелінга.

Хід роботи: В дві пробірки внести по 1 мл препарату сахарази. В одну з пробірок додати 2 мл розчину сахарози, в другу – 2 мл рафінози. Вміст пробірок перемішати й поставити на 5-10 хв. у термостат із температурою 38^0 С. Потім в обидві пробірки додати по 3 мл реактиву Фелінга, добре перемішати й суміш нагріти до кипіння. При цьому в обох пробірках спостерігається утворення червоного осаду оксиду міді (I).

3. Визначення активності каталази методом О.М. Баха та А.І. Опаріна

Принцип методу. Каталаза (К.Ф. 1.11.1.6) – фермент, який каталізує реакцію розкладу пероксиду водню на воду й молекулярний кисень. Незначною мірою вона також сприяє окисленню різних спиртів і інших сполук пероксидами. Цей фермент досить широко розповсюджений у рослинних тканинах і є тут одним із найактивніших.

Активність каталази визначають за кількістю пероксиду водню, що розклався під дією ферменту. В реакційну суміш вносять надлишок пероксиду водню. В контрольному зразку каталазу інактивують сірчаною кислотою. В досліджуваному зразку частина внесеного пероксиду водню розкладається під дією ферменту, а ту частину, що не розклалася, визначають титруванням перманганатом калію в кислому середовищі. При цьому відбувається така реакція

$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 5O_2 + 8H_2O.$$

Об’єм пероксиду водню, що розклався під дією ферменту у відповідності до приведеної реакції, знаходять за різницею між дослідним і контрольним титруваннями.

Обладнання та реактиви. Технохімічні ваги, центрифуга, термостат, годинник, ступки фарфорові з товкачиком, мірні циліндри, пробірки центрифужні, хімічний стакан на 50 мл, конічні колби на 200 мл, бюретки, піпетки градуйовані, шпатель, термометр лабораторний, годинник, 0,1 н розчин пероксиду водню (H_2O_2), 10 %-

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ий розчин сірчаної кислоти, 0,1 н розчин перманганату калію ($KMnO_4$), карбонат кальцію, дистильована вода, індикаторні папірці, кварцовий пісок, рослинний матеріал.

Хід роботи: На технохімічних вагах відважити 2-3 г свіжого рослинного матеріалу та розтерти його в ступці з кварцовим піском. Якщо реакція рослинного матеріалу кисла (визначити за допомогою індикаторних папірців), то в ступку додати на кінчику шпателя невелику кількість карбонату кальцію. В процесі розтирання в ступку невеличкими порціями додати точно 40 мл води. Розтерту масу кількісно (змити ступку 10 мл дистильованої води) перенести в центрифужні пробірки та відцентрифугувати 10-15 хв. при 3-5 тис. об./хв. Потім надосадову рідину з центрифужних пробірок перелити в хімічний стакан.

Для визначення активності ферменту зі стакану взяти дві проби по 20 мл ферментної витяжки та перенести їх у конічні колби на 200 мл. В одну з колб, яка служить контролем, долити 5 мл розчину сірчаної кислоти для інактивації ферменту. Потім в обидві колби додати по 20 мл розчину пероксиду водню. Реакцію розкладання пероксиду водню проводять при 20^0 С впродовж 30 хв. Після додавання кожного з реактивів уміст колб старанно перемішати. Через 30 хв. фермент у досліджуваній колбі інактивувати додаванням у неї 5 мл розчину сірчаної кислоти.

Потім надлишок перекису водню в кожній колбі відтитрувати розчином перманганату калію до утворення стійкого рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 1 хв.

Активність каталази (Е) виразити в мікромолях пероксиду водню, що розклався під дією ферменту за 1 хв. у розрахунку на 1 г свіжого рослинного матеріалу. Розрахунок провести за формулою

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

де V_k – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування контрольного зразка, мл; V_e – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування досліджуваного зразка, мл; Т – поправка на титр 0,1 н розчину $KMnO_4$; 50 – коефіцієнт перерахунку на мікромолі H_2O_2; 50 – загальний об'єм екстракту, мл; 20 – об'єм ферментного розчину, взятого для аналізу, мл; 30 – час

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ферментативної реакції, хв.; m – наважка матеріалу, взятого для аналізу, г.

4. Визначення активності тирозинази

Принцип методу. Тирозиназа або монофенол-монооксигеназа (К.Ф. 1.14.18.1) широко розповсюджена в рослинах. Вона міститься в картоплі, цукровому буряку, багатьох плодових культурах, у зернах злаків та інших рослинах. Активна тирозиназа міститься в зерні жита та в окремих сортах пшеничного борошна. Темний колір житнього хліба частково пояснюється саме дією тирозинази; цією ж причиною пояснюється потемніння макаронів при сушінні.

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

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

Тирозиназу, що міститься в рослинному матеріалі, вилучають водою. У водну витяжку, що містить фермент, вносять певну кількість тирозину та інкубують у термостаті при 40^0 С. Під час інкубації частина тирозину перетворюється в темнозабарвлений пігмент – меланін. Після цього фермент інактивують нагріванням розчину до кипіння, а меланін осаджують хлоридом барію в присутності соди. В фільтраті визначають кількість неокисленого тирозину броматометричним методом. Для визначення кількості тирозину в розчин вносять надлишок 0,03 н розчину бромат-бромідної суміші, підкислюють соляною кислотою й залишають на 10 хв. При цьому відбувається бромування тирозину. Надлишок брому відтитровують

Національний університет
водного господарства
та природокористування

розчином метилоранжу, який руйнується й знебарвлюється під дією брому.

Титрування ведуть до появи червоного забарвлення, що не зникає та обумовлене надлишком метилоранжу. Нормальність розчину метилоранжу встановлюють за титрованим розчином бромат-броміду. Молярна маса бромату калію ($KBrO_3$) дорівнює 167,00, молярна маса тирозину $C_6H_4(OH)CH_2CH(NH_2)COOH$ дорівнює 181,19.

Обладнання та реактиви: Піпетки градуйовані, ступка з товкачиком, колби мірні на 50 мл, 100 мл, 200 мл і 1 л, колби конічні на 250 мл, хімічний стакан, лійка, фільтр, бюретки, крапельниця, центрифуга, термостат, годинникове скло, годинник, прожарений пісок, толуол, 0,05 %-ий розчин тирозину (0,1 г тирозину перенести в мірну колбу на 200 мл, додати 1,2 мл 5 %-ого розчину Na_2CO_3, долити 150 мл дистильованої води, нагріти до розчинення тирозину, а потім охолодити, довести водою до мітки й перемішати; зберігати в темній посудині в холодильнику), 0,03 н розчин бромат-броміду (зважити на аналітичних вагах 0,8349 г $KBrO_3$, перенести в мірну колбу на 1 л, додати 10 г KBr, розчинити у воді, розбавити водою до 1 л і старанно перемішати), 0,2 %-ий розчин метилоранжу (зважити 2,0 г метилоранжу, перенести в мірну колбу на 1 л, долити дистильованої води, перемішати й довести водою до мітки, розчин відфільтрувати), 10 %-ий розчин хлориду барію (10 г $BaCl_2x2H_2O$ перенести в мірну колбу на 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести водою до мітки й перемішати), 5 %-ий розчин карбонату натрію (50 г безводної солі Na_2CO_3 перенести в мірну колбу на 1 л, розчинити в дистильованій воді й довести водою до 1 л), розчин соляної кислоти (з розведенням 1:1) (50 мл концентрованої соляної кислоти перенести в мірну колбу на 100 мл, довести водою до мітки й перемішати).

Нормальність приготовленого розчину метилоранжу встановлюють за броматом калію. Для цього в колбу для титрування перенести точно 10 мл 0,03 н розчину бромат-броміду, додати 30 мл дистильованої води, 4 мл розчину соляної кислоти (з розведенням 1:1) і відтитрувати розчином приготовленого метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає. Нормальність (N) розчину метилоранжу розрахувати за формулою

$$\mathbf{N = \frac{10 \cdot 0{,}03}{V} = \frac{0{,}3}{V}},$$

Національний університет
водного господарства
та природокористування

де V – об'єм розчину метилоранжу, затраченого на титрування 10 мл 0,03 н розчину бромат-броміду, мл.

Хід роботи. На технохімічних вагах відважити 2-5 г свіжого рослинного матеріалу та перенести його в фарфорову ступку й ретельно розтерти з невеликою кількістю дистильованої води. Якщо матеріал розтирається погано, то в ступку додати невелику кількість прожареного піску. Після розтирання суспензію перенести в мірну колбу на 50 мл, споліскуючи ступку невеликою кількістю води. Вміст колби довести водою до мітки, ретельно перемішати й дати осаду осісти, а потім відфільтрувати. Якщо осад осаджується погано, то його відцентрифугувати впродовж 15 хв. при 5 тис. оберт./хв. Відібрати піпеткою 10 мл прозорої рідини над осадом або 10 мл фільтрату та перенести в конічну колбу на 250 мл. У колбу додати 10 мл розчину тирозину, 2-3 краплі толуолу, поставити колбу в попередньо нагрітий до 40^0 С термостат і витримати при цій температурі 2 год. За час інкубації під дією тирозинази, що міститься в рослинному матеріалі, проходить окислення частини внесеного тирозину в меланіни.

Після закінчення інкубації в колбу додати 1 мл розчину карбонату натрію, 3 мл розчину хлориду барію, нагріти до кипіння й відфільтрувати через паперовий фільтр у колбу для титрування. Колбу, де проводилось осадження, та осад на фільтрі промити 3 рази гарячою водою порціями по 8-10 мл. Фільтрат охолодити, додати 10 мл бромат-бромідного розчину та 4 мл розчину соляної кислоти, накрити колбу годинниковим склом, перемішати та залишити на 10 хв. Надлишок брому відтитрувати розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає. Щоб уникнути втрат брому при титруванні, після додавання наступної порції метилоранжу перемішувати вміст колби коловими рухами без енергійного збовтування.

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

Активність тирозинази розрахувати за формулою

Національний університет водного господарства та природокористування

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

де Е – активність тирозинази, мкмоль окисленого тирозину за 1 год. на 1 г досліджуваного матеріалу; 50 – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл; 10 – об'єм досліджуваного розчину, що взятий для визначення активності ферменту, мл; 2 – час взаємодії ферменту з тирозином, год.; V_e – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування дослідного розчину, мл; V_k – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування контрольного розчину, мл; N – нормальність титрованого розчину метилоранжу; m – наважка досліджуваного матеріалу, г; 166,8 – коефіцієнт перерахунку мг нормального розчину тирозину в мікромолі (30 200 : 181,2 = 166,8).

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Роль ферментів в обміні речовин у рослинних організмах.
2. Поняття про ферменти, їх природа та загальні властивості.
3. Механізм дії ферментів. Фермент-субстратний комплекс.
4. Вплив різних факторів на швидкість ферментативних реакцій.
5. Одиниці активності ферментів.
6. Класифікація ферментів.
7. Принцип методу визначення активності каталази методом О.М. Баха та А.І. Опаріна в рослинному матеріалі.
8. Принцип методу визначення активності тирозинази в рослинному матеріалі.

Національний університет водного господарства та природокористування

Лабораторне заняття № 9

Тема: Якісне та кількісне визначення нуклеїнових кислот

Мета заняття: Засвоїти методики виділення нуклеопротеїнів, їх якісного та кількісного визначення.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Нуклеїнові кислоти, як і білки, є обов'язковими речовинами всіх живих організмів. Не зважаючи на те, що вони були відкриті ще в 1868 р. (швейцарський дослідник Ф. Мішер виділив їх уперше з ядер лейкоцитів людини), їх біологічна роль остаточно була з'ясована лише в 40-50-х роках минулого століття.

Відомо два типи нуклеїнових кислот – дезоксирибонуклеїнова

Національний університет
водного господарства
та природокористування

кислота (ДНК) та рибонуклеїнова кислота (РНК). Функцією ДНК є зберігання та відтворення спадкової інформації. РНК забезпечує безпосередню реалізацію цієї інформації у процесі росту та розвитку організму. При цьому виділяють декілька типів РНК, які відрізняються функціями, розміром, складом і локалізацією: матрична або інформаційна РНК (переносить інформацію від ДНК до білоксинтезуючого комплексу); транспортна РНК (транспортує амінокислоти до білоксинтезуючого комплексу); рибосомальна РНК (входить до складу рибосом).

За хімічною природою нуклеїнові кислоти представляють собою гетерополімери, мономерами яких є нуклеотиди. В свою чергу нуклеотид складається з трьох компонентів – залишків пентози, азотистої основи та ортофосфорної кислоти. Пентоза представлена рибозою (в РНК) або 2'-дезоксирибозою (в ДНК) у β-D-фуранозній формі. Азотисті основи представлені п’ятьма різними сполуками, з яких тимін, цитозин і урацил належать до піримідинів, а гуанін і аденін – до пуринів. Гуанін, аденін, цитозин входять до складу як ДНК, так і РНК. Тимін зустрічається лише в складі ДНК, а урацил – лише в складі РНК. Крім названих азотистих основ у складі нуклеїнових кислот зрідка у невеликих кількостях зустрічаються деякі інші азотисті основи, що називаються мінорними, наприклад, 5-метилцитозин, тіоурацил, гіпоксантин та ін. У складі нуклеїнових кислот усі оксопохідні азотисті основи присутні в формі лактамів.

У молекулі нуклеотиду пуринові азотисті основи через 9-й атом, а піримідинові – через 1-й утворюють N-глікозидний зв’язок із рибозою або 2'-дезоксирибозою.

Для нуклеїнових кислот, як і для білків, виділяють первинну, вторинну й третинну структури. Первинна структура представляє собою послідовність чергування нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюгу. Нуклеотиди сполучаються в макромолекулу нуклеїнової кислоти за рахунок 3',5'-фосфодиефірного зв’язку, що з’єднує С-3' атом D-рибози (або 2'-дезоксирибози) одного нуклеотиду з С-5' атомом іншого. 5'-ОН кінцева група нуклеотиду вважається початком молекули, а 3'-ОН кінцева група – її кінцем.

Вторинна структура ДНК утворює подвійну спіраль із двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів. При цьому ланцюги закручені один навколо іншого, їх вуглецево-фосфатні групи розміщуються зовні, а азотисті основи – всередині. Азотиста основа одного з ланцюгів утворює комплементарну пару з азотистою

Національний університет
водного господарства
та природокористування

основою іншого ланцюга. Така комплементарність забезпечується за рахунок виникнення водневих зв'язків між парою нуклеотидів. При цьому між гуаніном і цитозином виникає три водневих зв'язки, а між аденіном і тиміном – два водневі зв'язки.

Залежно від особливостей вторинної структури відомі декілька форм ДНК – правозакручені (B-, A-, C-форма), лівозакручена (Z-форма), незакручена (SBS-форма). З цих форм найчастіше зустрічається B-форма, в якій на один виток спіралі припадає 10 пар нуклеотидів, крок спіралі становить 3,4 нм, діаметр 2,0 нм.

Вторинна структура РНК виникає внаслідок закручування полінуклеотидного ланцюга на себе та утворення в полінуклеотидних ділянках коротких двоспіральних "шпильок", у яких азотисті основи утворюють комплементарні пари.

Третинна структура ДНК виражається в багаторазовій суперспіралізації молекули, однак в евкаріотичних організмів вона підтримується в комплексі з гістоновими та негістоновими білками. Такі комплекси зумовлюють утворення хромосом. В організації хромосом виділяють декілька рівнів – нуклеосомний, соленоїдний і петлеподібний.

Молекули РНК також мають складну просторову структуру. Так, усі транспортні РНК нагадують "листок конюшини". Рибосомні РНК мають V- або Y-подібну форму.

Полінуклеотидний ланцюг несе багато фосфатних груп, які легко дисоціюють, унаслідок чого він набуває від'ємного заряду. Тому нуклеїнові кислоти в клітині найчастіше сполучені з основними білками й утворюють нуклеопротеїни.

Нуклеїнові кислоти є речовинами білого кольору, погано розчинними у воді. Однак, вони розчинні в розчинах солей. Для нуклеїнових кислот характерна висока оптична активність і їх розчини здатні обертати площину поляризованого світла. Всі нуклеїнові кислоти мають здатність поглинати світло в ультрафіолетовій області з максимум 260 нм. Нуклеїнові кислоти також піддаються денатурації, при якій відбувається розрив водневих зв'язків і порушення вандерваальсових взаємодій. Унаслідок цього деспіралізуються й розходяться полінуклеотидні ланцюги ДНК і двоспіральних ділянок РНК.

У зв'язку з наявністю азотистих основ і пентоз у складі нуклеїнових кислот, які містять різні функціональні групи, вони можуть вступати в різні хімічні реакції. Нуклеїнові кислоти під

Національний університет
водного господарства
та природокористування

впливом кислот піддаються гідролізу.

Якісні реакції на нуклеїнові кислоти та методи кількісного визначення вмісту їх окремих типів ґрунтуються на хімічних властивостях складових компонентів цих сполук.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Виділення нуклеопротеїнів

Принцип методу. Дезоксирибонуклеопротеїни добре розчиняються в лужних та сольових розчинах і осаджуються після нейтралізації розчинів або при розбавленні розчинів солей. Рибонуклеопротеїни також розчиняються в лужних розчинах і можуть бути осаджені в ізоелектричній точці шляхом додавання кислот (наприклад, оцтової кислоти).

Обладнання та реактиви: Технохімічні ваги, центрифужні пробірки, порцелянова ступка з товкачиком, піпетка, мірні циліндри, колба конічна на 100 мл, центрифуга, 0,4 %-ий і 0,02 моль/л розчини гідроксиду натрію, 5 %-ий розчин оцтової кислоти, сухі дріжджі.

Хід роботи. Для одержання рибонуклеопротеїнів наважку 10 г сухих дріжджів ретельно розтерти в порцеляновій ступці впродовж 15 хв. із 50 мл 0,4 %-ого розчину гідроксиду натрію, котрий додавати невеликими порціями. Одержаний гомогенат відцентрифугувати впродовж 10 хв. при 2 тис. оберт./хв. До відібраної надосадової рідини долити при помішуванні 15-20 мл розчину оцтової кислоти й осад, який випав, відокремити центрифугуванням упродовж 15 хв. при 5000 оберт./хв. Осад після центрифугування розчинити в 15-20 мл 0,02 моль/л розчину гідроксиду натрію. Отриманий розчин нуклеопротеїнів надалі використати для якісних реакцій.

2. Виявлення вуглеводів у складі нуклеопротеїнів (реакція з орцином)

Принцип методу. Нуклеопротеїни, на відміну від простих білків, вступають у специфічні кольорові реакції з рядом речовин, що дозволяє виявити вуглеводний компонент у складі їхніх молекул. Так, нуклеопротеїни, що містять у своїй молекулі рибозу, дають із орциновим реактивом синьо-зелене забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив, центрифужні пробірки, піпетки градуйовані, водяна баня, годинник, лужний розчин рибонуклеопротеїнів, який отриманий за допомогою приведеного вище методу, орциновий реактив (50 мл $FeCl_3x6H_2O$ розчинити в

Національний університет
водного господарства
та природокористування

250 мл концентрованої соляної кислоти й зберігати в посудині з темного скла, а перед використанням додати орцин із розрахунку 4,76 мг на 1 мл розчину), концентрована соляна кислота.

Хід роботи. До 1 мл розчину рибонуклеопротеїнів додати однаковий об'єм орцинового реактиву, перемішати й поставити на киплячу водяну баню на 20 хв. Після цього суміш охолодити та розбавити дистильованою водою до об'єму 4 мл. При цьому спостерігається поява синьо-зеленого забарвлення.

3. Виявлення пуринових основ у складі нуклеопротеїнів

Принцип методу. Метод ґрунтується на утворенні комплексів пуринових основ із солями срібла.

Обладнання та реактиви: Технохімічні ваги, штатив із пробірками, круглодонна колба, піпетки градуйовані, мірні циліндри, корок із отвором, скляна трубка довжиною 25-30 см, нагрівач, лакмусові папірці, 10 %-ий розчин сірчаної кислоти, концентрований розчин аміаку, 1 %-ий розчин нітрату срібла, гідролізат нуклеопротеїнів дріжджів (у круглодонну колбу для гідролізу помістити 1 г пекарських дріжджів, долити 20 мл 10 %-ого розчину сірчаної кислоти та 20 мл дистильованої води. Колбу закрити корком, у який вставити скляну трубку довжиною 20-30 см, яка слугує за холодильник. Вміст колби кип'ятити у витяжній шафі впродовж 1 год. на азбестовій сітці при слабкому нагріванні. Після закінчення гідролізу рідину охолодити, довести водою до початкового об'єму й відфільтрувати).

Хід роботи. До 1 мл гідролізату додати концентрованого розчину аміаку для одержання лужного середовища (перевірити лакмусовим папірцем) і 0,5 мл розчину нітрату срібла. Через 3-5 хв. утвориться пухкий осад срібних солей пуринових основ.

4. Виявлення фосфорної кислоти в складі нуклеопротеїнів

Принцип методу. Метод ґрунтується на взаємодії фосфорної кислоти з молібденовим реактивом із утворенням забарвленої сполуки фосфорної солі – фосфорномолібденовокислого амонію

$$12(NH_4)_2MoO_4 + H_3PO_4 + 21HNO_3 \longrightarrow$$

$$21NH_4NO_3 + (NH_4)_3PO_4x12MoO_3x6H_2O + 6H_2O.$$

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, нагрівач, гідролізат нуклеопротеїнів дріжджів (отриманий у попередньому досліді), молібденовий реактив (7,5 г молібдату амонію ($(NH_4)_2MoO_4$) розчинити в 100 мл води та додати 100 мл 32 %-ого розчину азотної кислоти з відносною густиною 1,2 (повне розчинення $(NH_4)_2MoO_4$ відбувається після додавання азотної кислоти)).

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл гідролізату, додати 1 мл молібденового реактиву та кип'ятити. Рідина при цьому забарвлюється в лимонно-жовтий колір, а при охолодженні випадає кристалічний осад жовтого кольору, що обумовлений утворенням фосфорномолібденовокислого амонію.

5. Виявлення білків у складі нуклеопротеїнів

Принцип методу. Для підтвердження наявності білків у складі нуклеопротеїнів проводять біуретову реакцію. Ця реакція характерна для сполук, які містять не менше двох пептидних зв'язків. Такі сполуки з наявними пептидними зв'язками (білки) в лужному середовищі утворюють із сульфатом міді (II) забарвлені комплексні сполуки, колір яких залежить від довжини поліпептидного ланцюга. Розчин нативного білка дає синьо-фіолетове забарвлення, а продукти його гідролізу (пептиди) – червоно-фіолетове.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, крапельниця, гідролізат нуклеопротеїнів дріжджів, 10 %-ий розчин гідроксиду натрію, 1 %-ий розчин сульфату міді (II), розчин лакмусу.

Хід роботи. В пробірку внести 0,5 мл гідролізату, нейтралізувати його розчином гідроксиду натрію (значення pH перевірити лакмусом), потім додати 0,5 мл розчину гідроксиду натрію та 2-3 краплі розчину сульфату міді (II). Суміш перемішати й спостерігати появу забарвлення, що свідчить про присутність у пробі поліпептидів, які утворюються в результаті гідролізу білкової частини нуклеопротеїнів.

6. Якісне визначення ДНК за Діше

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності вуглеводневого компоненту нуклеїнових кислот (рибози або дезоксирибози) давати специфічні кольорові реакції з солянокислим цистеїном.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, колба на 50 мл, мікропіпетки, піпетки градуйовані, водяна баня, термометр

Національний університет
водного господарства
та природокористування

лабораторний, годинник, 0,01-0,1 %-ий водний розчин натрієвої солі ДНК, 5 %-ий розчин солянокислого цистеїну, розчин сірчаної кислоти (змішати 6 мл води та 15 мл концентрованої кислоти).

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину ДНК, додати 0,04 мл розчину солянокислого цистеїну та 5 мл розчину сірчаної кислоти. Суміш нагріти на водяній бані при температурі 40° С упродовж 5 хв. При цьому вміст пробірки забарвлюється в рожевий колір, який не зникає впродовж декількох годин.

7. Визначення вмісту ДНК за Броді

Принцип методу. Інтенсивність забарвлення дезоксирибози молекули ДНК із солянокислим цистеїном залежить від вмісту ДНК у розчині. Цим методом можна визначати вміст ДНК у розчинах, які містять від 1 до 10 мкг ДНК.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, піпетки градуйовані, водяна баня, спектрофотометр, досліджуваний розчин ДНК (із вмістом 1-10 мкг речовини), 1 %-ий розчин солянокислого цистеїну, концентрована сірчана кислота.

Хід роботи. В пробірку внести 0,5 мл досліджуваного розчину ДНК, додати сюди 0,05 мл розчину солянокислого цистеїну й суміш охолодити впродовж 10 хв. у холодній воді. Потім додати 5 мл охолодженої концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки перемішати й поставити на водяну баню при температурі 25° С на 20 хв. Оптичну густину забарвленого розчину визначити на спектрофотометрі при довжині хвилі 474 нм.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Вміст, знаходження та склад нуклеїнових кислот.
2. Будова нуклеотиду.
3. Види та біологічна роль нуклеїнових кислот.
4. Первинна структура нуклеїнових кислот.
5. Вторинна структура ДНК, її форми.
6. Третинна структура ДНК.
7. Характеристика різних типів РНК.
8. Властивості нуклеїнових кислот.
9. Принципи методів визначення складових компонентів нуклеїнових кислот.
10. Принципи методів визначення ДНК за Діше та Броді.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

4. Контрольні тестові завдання

Пропоновані студентам дворівневі тестові завдання призначені для перевірки засвоєння теоретичних знань лекційного курсу та знань методик якісного та кількісного аналізу зі статичної біохімії в обсязі, передбаченому програмою дисципліни. Перший рівень завдань передбачає вибір однієї правильної відповіді з приведеного переліку. Другий рівень завдань передбачає вибір трьох і більше правильних відповідей із запропонованого переліку.

Тема: **ВУГЛЕВОДИ**

I-ий рівень

1. За хімічною природою вуглеводи – це органічні речовини: а) що є похідними гліцеролу; б) що є похідними багатоатомних спиртів; в) що є похідними альдегідів; г) що є похідними кетонів; д) що є альдегідами й кетонами багатоатомних спиртів; е) що є альдегідами й кетонами багатоатомних спиртів і полімерами цих сполук; є) що завжди відповідають загальній формулі $C_n(H_2O)_n$; ж) що є похідними органічних кислот.

2. Існування D- та L-форм моносахаридів пов'язане з присутністю в їх молекулі: а) глікозидних груп ОН; б) альдегідних груп; в) кетонних груп; г) хіральних атомів вуглецю; д) циклічних угруповань; е) кратних зв'язків; є) карбоксильних груп.

3. α- та ß-форми вуглеводів характерні: а) лише для лінійних молекул; б) лише для циклічних молекул; в) для лінійних і циклічних молекул; г) лише для L-стереоізомерів; д) лише для D-стереоізомерів; е) лише для фуранозних ізомерів; є) лише для піранозних ізомерів.

4. Внаслідок відновлення моносахаридів утворюються: а) гідроксикислоти; б) кетокислоти; в) амінокислоти; г) вуглекислий газ і вода; д) альдегідоспирти; е) одноатомні спирти; є) багатоатомні спирти.

5. Специфічною якісною реакцією на сахарозу є: а) реакція Фелінга; б) реакція "срібного дзеркала"; в) реакція з йодом; г) реакція Троммера; д) реакція з сульфатом міді (II); е) реакція з оксидом міді (I); є) реакція з нітратом кобальту.

6. В результаті реакцій Троммера та Фелінга молекули гексоз зазнають: а) відновлення; б) окислення; в) дегідратації; г) утворення кратних зв'язків; д) циклізації; е) розкладання; є) декарбоксилування.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

II-ий рівень

1. Із перерахованих органічних речовин рослинного організму вказати ті, що є моносахаридами: а) гліцерол; б) рибоза; в) целюлоза; г) віск; д) глюкоза; е) манноза; є) аланін; ж) сахароза; з) фруктоза; и) цитозин.

2. Із перерахованих органічних речовин рослинного організму вказати ті, що є олігосахаридами: а) фосфатидилхолін; б) рибоза; в) целобіоза; г) галактоза; д) мальтоза; е) гліцин; є) сахароза; ж) лактоза; з) рафіноза; и) целюлоза.

3. Із перерахованих органічних речовин рослинного організму вказати ті, що є гліканами: а) мальтоза; б) крохмаль; в) целюлоза; г) віск; д) тирозин; е) манноза; є) агар-агар; ж) дезоксирибоза; з) геміцелюлоза; и) тимін.

4. Моносахариди характеризуються такими загальними властивостями: а) складаються з залишків декількох простіших речовин; б) складаються з залишків великого числа відносно простих речовин і є полімерами; в) входять до складу полісахаридів; г) при розкладанні втрачають основні вуглеводні властивості; д) при розкладанні своїх вуглеводних властивостей не втрачають; е) солодкі на смак; є) не мають солодкого смаку; ж) добре розчинні в воді; з) у воді не розчинні.

5. Олігосахариди характеризуються такими загальними властивостями: а) складаються з 2-10 залишків моносахаридів; б) складаються з великого числа залишків моносахаридів; в) складаються з 2-10 залишків амінокислот; г) при розкладанні втрачають основні вуглеводні властивості; д) при розкладанні своїх вуглеводних властивостей не втрачають, бо утворюють при цьому моносахариди; е) як правило, солодкі на смак; є) не мають солодкого смаку; ж) переважно добре розчинні в воді; з) у воді не розчинні.

6. Глікани характеризуються такими загальними властивостями: а) складаються з 2-10 залишків нуклеотидів; б) складаються з великого числа залишків моносахаридів; в) складаються з 2-10 залишків моносахаридів; г) при розкладанні втрачають основні вуглеводні властивості; д) при розкладанні своїх вуглеводних властивостей не втрачають, бо утворюють при цьому моносахариди; е) як правило, солодкі на смак; є) не мають солодкого смаку; ж) переважно добре розчинні в воді; з) у воді не розчинні, можуть лише набухати.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Тема: **ЛІПІДИ**

І-ий рівень

1. Ліпіди за хімічною природою переважно є: а) гомополімерами; б) гетерополімерами; в) одноатомними спиртами; г) багатоатомними спиртами; д) вищими спиртами; е) жирними кислотами; є) складними ефірами багатоатомних спиртів і вищих жирних кислот; ж) простими ефірами одноатомних спиртів.

2. З приведеного переліку груп ліпідів вказати ту, представники якої є похідними пергідроциклопентанфенантрену: а) нейтральні жири; б) стероїди; в) гліколіпіди; г) фосфоліпіди; д) воски; е) терпени; є) ацилгліцерини; ж) сфінголіпіди.

3. Для отримання нерозчинного мила до його розчину слід додати: а) розчин соляної кислоти; б) розчин гідроксиду калію; в) розчин хлориду кальцію; г) розчин хлориду натрію; д) діетиловий ефір; е) бензин; є) розчин карбонату натрію.

4. Число міліграмів їдкого калію, що необхідне для нейтралізації всіх, як вільних, так і тих, які входять до складу триацилгліцеринів, жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, називається: а) числом омилення; б) кислотним числом; в) йодним числом; г) ефірним числом; д) величиною ізоелектричної точки; е) величиною константи дисоціації; є) перекисним числом.

5. Число міліграмів їдкого калію, що необхідне для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в 1 г жиру, називається: а) числом омилення; б) кислотним числом; в) йодним числом; г) ефірним числом; д) величиною ізоелектричної точки; е) величиною константи дисоціації; є) перекисним числом.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ІІ-ий рівень

1. Ліпіди характеризуються такими загальними властивостями: а) нерозчинні у воді; б) розчинні у воді; в) розчинні в неполярних органічних розчинниках; г) за хімічною природою є переважно альдегідами та кетонами багатоатомних спиртів; д) за хімічною природою є переважно складними ефірами багатоатомних спиртів і вищих жирних кислот; е) проявляють гідрофільні властивості; є) проявляють гідрофобні властивості.

2. Із перерахованих органічних речовин рослинного організму вказати ті, що є ліпідами: а) фосфатидилхолін; б) рибоза; в) віск; г) галактоза; д) мальтоза; е) ситостерол; є) фосфатидилсерин; ж) лактоза; з) тристеариногліцерол; и) целюлоза.

Національний університет водного господарства та природокористування

3. До складу нейтральних жирів входять: а) спирт гліцерол; б) спирт сфінгозин; в) етиловий спирт; г) лінолева кислота; д) щавлева кислота; е) вищі жирні кислоти; є) пальмітинова кислота; ж) оцтова кислота; з) амінокислота.

4. Фосфоліпіди характеризуються такими загальними властивостями: а) до їх складу входить гліцерол; б) до їх складу входить метанол; в) до їх складу входить етиленгліколь; г) до їх складу входять вищі жирні кислоти; д) до їх складу входить залишок ортофосфорної кислоти; е) до їх складу входить залишок азотної кислоти; є) переважно містяться в клітинних мембранах; ж) переважно містяться в клітинних рибосомах.

Тема: **ОРГАНІЧНІ КИСЛОТИ. РОСЛИННІ ПІГМЕНТИ**

І-ий рівень

1. Із запропонованих формул речовин вказати формулу щавлевої кислоти: а) Н – СООН; б) Н – СОН; в) CH_3 – СООН; г) НОС – СООН; д) НООС – СООН; е) НООС – CH_2 – СООН; є) $HOCH_2$ – СООН; ж) CH_3 – СО – СООН.

2. За хімічною природою каротиноїди є похідними: а) ізопрену; б) бутадієну; в) хлорофілінової кислоти; г) фітолу; д) пергідроциклопентанфенантрену; е) фенолів; є) ацилгліцеринів; ж) пуринів.

3. Визначення вмісту щавлевої кислоти в рослинному матеріалі ґрунтується на її здатності утворювати нерозчинну сполуку з: а) каротинами; б) діетиловим ефіром; в) солями натрію; г) солями калію; д) солями кальцію; е) гідроксидом натрію; є) соляною кислотою; ж) етанолом.

4. При обережній дії на хлорофіл сильних мінеральних кислот утворюється: а) сіль хлорофілінової кислоти; б) метанол; в) етанол; г) фітол; д) каротин; е) ксантофіл; є) феофітин; ж) пірол.

ІІ-ий рівень

1. Із приведених кислот вибрати ті, що є двоосновними органічними кислотами: а) оцтова; б) мурашина; в) яблучна; г) лимонна; д) щавлева; е) малонова; є) масляна; ж) янтарна; е) фумарова.

2. Із приведених груп органічних речовин вказати основні фотосинтезуючі пігменти рослин: а) антоціани; б) глікозиди; в) хлорофіли; г) ксантофіли; д) стероли; е) фікобіліни; є) феноли;

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ж) органічні кислоти; з) каротини.

3. Із приведених речовин вказати ті, залишки яких є складовими компонентами хлорофілів: а) порфірин; б) метанол; в) бутанол; г) каротин; д) фітол; е) Fe^{3+}; є) Fe^{2+}; ж) Mg^{2+}; з) хлорофілінова кислота.

4. Особливостями структури молекули хлорофілів є: а) відсутність кратних зв'язків; б) наявність декількох подвійних зв'язків; в) наявність багатьох спряжених подвійних зв'язків; г) наявність потрійного зв'язку; д) наявність координаційних зв'язків; е) наявність складного неорганічного йона; є) наявність йона металу; ж) наявність піранозних кілець; з) наявність пірольних кілець.

5. Фотосенсибілізуюча дія хлорофілу на модельних реакціях за участю виділених із рослин пігментів може проявитися при обов'язковому використанні таких компонентів: а) аскорбінова кислота; б) оцтова кислота; в) щавлева кислота; г) етиловий спирт; д) гліцерол; е) метиленовий синій; є) метиленовий червоний; ж) темнота; з) світло.

Тема: **ВІТАМІНИ**

I-ий рівень

1. Провітаміном вітаміну А в рослинах виступають: а) феноли; б) стероли; в) ненасичені жирні кислоти; г) глікозиди; д) азотовмістні сполуки; е) нафтохінони; є) каротиноїди.

2. Провітаміном вітаміну D в рослинах виступають: а) феноли; б) стероли; в) ненасичені жирні кислоти; г) глікозиди; д) азотовмісні сполуки; е) нафтохінони; є) каротиноїди.

3. Для якісного визначення вітаміну К використовують: а) трихлористу сурму; б) метиленовий синій; в) концентровану сірчану кислоту; г) ацетат міді; д) діетилмалоновий ефір; е) гексаціано-(III) феррат калію; є) 2,4-динітрохлорбензол.

4. Для якісного визначення вітаміну B_2 використовують: а) діетилдитіокарбомат; б) металічний цинк і соляну кислоту; в) концентровану сірчану кислоту; г) ацетат міді; д) діетилмалоновий ефір; е) гексаціано-(III) феррат калію; є) анілін.

5. Для якісного визначення вітаміну B_5 використовують: а) металічний цинк і соляну кислоту; б) метиленовий синій; в) концентровану сірчану кислоту; г) ацетат міді; д) діетилмалоновий ефір; е) гексаціано-(III) феррат калію; є) анілін.

6. Для якісного визначення вітаміну С використовують: а) трихлористу сурму; б) метиленовий синій; в) концентровану

Національний університет
водного господарства
та природокористування

сірчану кислоту; г) ацетат міді; д) діетилмалоновий ефір; е) 2,4-динітрохлорбензол; є) діетилдитіокарбомат.

II-ий рівень

1. Біологічна роль вітамінів полягає в тому, що вони: а) є добрими розчинниками; б) є фізіологічно активними речовинами; в) входять до складу клітинних оболонок рослин; г) виступають коферментами або простетичними групами ферментів; д) беруть участь у багатьох окисно-відновних процесах; е) підтримують осмотичний тиск у клітинах; є) є мономерними одиницями білків.

2. Із приведеного переліку вітамінів вказати жиророзчинні вітаміни: а) біотин; б) аскорбінова кислота; в) ергокальциферол; г) токоферол; д) рибофлавін; е) ретинол; є) філлохінон; ж) тіамін.

3. Із приведеного переліку вітамінів вказати водорозчинні вітаміни: а) біотин; б) аскорбінова кислота; в) ергокальциферол; г) токоферол; д) рибофлавін; е) ретинол; є) філлохінон; ж) тіамін.

4. Вітамін С характеризується такими загальними властивостями: а) має назву – нікотинова кислота; б) має назву – аскорбінова кислота; в) жиророзчинний вітамін; г) водорозчинний вітамін; д) за хімічною природою є азотовмісною сполукою; е) за хімічною природою є похідним вуглеводів; є) в рослинах знаходиться в готовому вигляді; ж) в рослинах знаходиться у вигляді провітаміну – каротину.

5. Вітамін B_2 характеризується такими загальними властивостями: а) має назву – тіамін; б) має назву – рибофлавін; в) жиророзчинний вітамін; г) водорозчинний вітамін; д) за хімічною природою є азотовмісною гетероциклічною сполукою; е) за хімічною природою є похідним амінокислот; є) входить до складу коферменту ФАД; ж) входить до складу коферменту $НАД^+$.

6. Вітамін К характеризується такими загальними властивостями: а) має назву – α-токоферол; б) має назву – філлохінон; в) жиророзчинний вітамін; г) водорозчинний вітамін; д) за хімічною природою є азотовмісною сполукою; е) за хімічною природою є похідним хінонів; є) в рослинах знаходиться в готовому вигляді; ж) у рослинах знаходиться у вигляді провітаміну – стеролу; з) приймає участь в окислювальному фосфорилюванні; й) приймає участь в обміні ліпідів.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Тема: **АМІНОКИСЛОТИ**

I-ий рівень

1. Із приведених речовин вказати протеїногенну амінокислоту: а) фосфатидилсерин; б) тіамін; в) лізин; г) нікотинова кислота; д) орнітин; е) каротин; є) біотин; ж) гуанін; з) гліцерин.

2. Значення pH, при якому сумарний заряд молекули амінокислоти дорівнює нулю, називається: а) константою седиментації; б) константою дисоціації; в) константою Міхаеліса; г) константою інгібування; д) ізойонною точкою; е) ізоелектричною точкою; є) коефіцієнтом розподілу.

3. Реакція Фоля дозволяє виявити: а) всі α-амінокислоти; б) аланін; в) цистеїн; г) аскорбінову кислоту; д) аргінін; е) тирозин; є) гліцин.

4. Ксантопротеїнова реакція дозволяє виявити: а) лізин; б) пролін; в) фенілаланін; г) валін; д) аланін; е) метіонін; є) аргінін.

5. Для якісного визначення тирозину слід скористатися: а) нінгідриновою реакцією; б) реакцією з азотистою кислотою; в) реакцією з карбонатом міді (II); г) реакцією Фоля; д) біуретовою реакцією; е) реакцією Паулі.

II-ий рівень

1. Із приведених амінокислот вибрати нециклічні моноаміномонокарбонові протеїногенні амінокислоти: а) пролін; б) серин; в) лізин; г) гліцин; д) орнітин; е) гістидин; є) аргінін; ж) цитрулін; з) лейцин.

2. Із приведених амінокислот вибрати циклічні протеїногенні амінокислоти: а) тирозин; б) серин; в) лізин; г) триптофан; д) орнітин; е) гістидин; є) аргінін; ж) фенілаланін; з) лейцин.

3. Загальними властивостями протеїногенних амінокислот є: а) входять до складу білкових макромолекул; б) присутні в організмі лише у вільному стані; в) у водних розчинах присутні лише в недисоційованому стані; г) у водних розчинах присутні у вигляді йонів; д) у білках сполучені між собою пептидними зв'язками; е) у білках сполучені між собою йонними зв'язками; є) у переважній більшості у воді нерозчинні; ж) у переважній більшості добре розчинні у воді.

4. Нінгідринова реакція є якісною реакцією на: а) α-амінокислоти; б) γ-амінокислоти; в) тирозин; г) гідроксикислоти; д) лізин; е) насичені карбонові кислоти; є) β-аланін; ж) цистеїн.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Тема: **БІЛКИ**

I-ий рівень

1. Мономерними одиницями білкових макромолекул є: а) моносахариди; б) амінокислоти; в) аміни; г) карбонові кислоти; д) нуклеотиди; е) азотисті основи; є) фосфоліпіди.

2. Порядок розміщення амінокислотних залишків, які сполучені пептидними зв'язками, та положення дисульфідних зв'язків у макромолекулі білків називається: а) поліпептидом; б) доменом; в) первинною структурою; г) вторинною структурою; д) третинною структурою; е) четвертинною структурою; є) конформацією.

3. Впорядковане просторове розміщення окремих ділянок макромолекули білка без врахування розміщення бічних радикалів називається: а) поліпептидом; б) доменом; в) первинною структурою; г) вторинною структурою; д) третинною структурою; е) четвертинною структурою; є) денатурацією.

4. Просторове розміщення впорядкованих і аморфних ділянок у молекулі білка в цілому з врахуванням розміщення бічних радикалів називається: а) поліпептидом; б) доменом; в) первинною структурою; г) вторинною структурою; д) третинною структурою; е) четвертинною структурою; є) денатурацією.

5. Структура з декількох окремих, взаємно розміщених і поєднаних макромолекул білка, називається: а) поліпептидом; б) доменом; в) первинною структурою; г) вторинною структурою; д) третинною структурою; е) четвертинною структурою; є) денатурацією.

6. Основним зв'язком первинної структури білка є: а) пептидний зв'язок; б) йонний зв'язок; в) гідрофобний зв'язок; г) дисульфідний зв'язок; д) водневий зв'язок; е) складноефірний зв'язок.

7. Вторинна структура білків підтримується за рахунок виникнення: а) пептидних зв'язків; б) ковалентних зв'язків; в) гідрофобних зв'язків; г) дисульфідних зв'язків; д) водневих зв'язків; е) складноефірних зв'язків.

8. Окремий поліпептидний ланцюг із третинною структурою в складі білків, які мають четвертинну структуру, називається: а) мономером; б) протомером; в) доменом; г) протеїном; д) шарніром; е) фібрилою.

9. Видовжені макромолекули білків, які мають ступінь асиметрії 80 і більше, називаються: а) аморфними; б) протомерними; в) доменними; г) глобулярними; д) фібрилярними; е) простими.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

10. За своїми фізико-хімічними властивостями білки є: а) малодисоційованими сполуками; б) сполуками, нездатними до дисоціації; в) сполуками, що піддаються у водних розчинах гідролізу; г) амфотерними поліелектролітами; д) виключно кислотними електролітами; е) виключно лужними електролітами.

11. Значення pH середовища, при якому білкова макромолекула містить однакове число позитивно та негативно заряджених груп, називається: а) константою седиментації; б) константою дисоціації; в) константою Міхаеліса; г) константою інгібування; д) ізойонною точкою; е) ізоелектричною точкою; є) коефіцієнтом розподілу.

12. Втрата білком своїх нативних властивостей під впливом різних факторів, називається: а) інгібуванням; б) активацією; в) йонізацією; г) висалюванням; д) гідратацією; е) денатурацією.

13. У результаті денатурації білки: а) розпадаються на окремі амінокислоти; б) розпадаються на короткі поліпептиди; в) розпадаються на окремі мономери; г) втрачають первинну структуру; д) втрачають вторинну, третинну та четвертинну структури; е) стають більш розчинними; є) набувають каталітичних властивостей.

II-ий рівень

1. Білки як речовини рослинного організму характеризуються такими загальними особливостями: а) є низькомолекулярними сполуками; б) є гомополімерами; в) є гетерополімерами; г) складаються з залишків амінокислот; д) складаються з залишків нуклеотидів; е) можуть виконувати каталітичні функції; є) є обов'язковими компонентами всіх живих організмів; ж) входять до складу лише окремих груп організмів; з) є виключно нерозчинними сполуками.

2. Пептидний зв'язок у білкових макромолекулах характеризується такими особливостями: а) є проміжним між одинарним і подвійним; б) є одинарним; в) є подвійним; г) є планарним; д) утворюється за рахунок –COOH групи однієї амінокислоти та $–NH_2$ групи іншої амінокислоти; е) утворюється за рахунок –COOH групи однієї амінокислоти та $–SH_2$ групи іншої амінокислоти; є) утворюється за рахунок –COH групи однієї амінокислоти та –OH групи іншої амінокислоти; ж) переважно представлений *цис*-формою; з) переважно представлений *транс*-формою.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

3. Основними типами вторинної структури білків є: а) паралельні ß-складчасті шари; б) антипаралельні ß-складчасті шари; в) поліпептидні ланцюги; г) правозакручені α-спіралі; д) лівозакручені α-спіралі; е) фібрилярні структури; є) глобулярні структури; ж) протомери; з) ß-згин.

4. Денатурацію білка може викликати: а) додавання води; б) високі температури; в) низькі температури; г) розведені розчини йонів Na^+, K^+; д) розчини важких металів; е) помірне освітлення; є) йонізуюче випромінювання; ж) розчин глюкози; з) розчин алкалоїдів.

5. Із приведеного переліку вибрати групи простих білків: а) фосфопротеїни; б) гістони; в) провітаміни; г) глікозиди; д) альбуміни; е) протаміни; є) каротини; ж) хромопротеїни; з) порфірини; й) глобуліни.

6. Біуретова реакція дозволяє виявити в білках: а) вільні аміногрупи; б) SH-групи; в) вільні OH-групи; г) вільні карбоксильні групи; д) пептидні зв'язки; е) водневі зв'язки; є) основні зв'язки первинної структури; ж) зв'язки типу **O H** .

— C — N —

7. Реакція Паулі дозволяє виявити в білках: а) всі α-амінокислоти; б) циклічні амінокислоти; в) сірковмісні амінокислоти; г) тирозин; д) аспарагінову кислоту; е) гістидин.

Тема: **ФЕРМЕНТИ**

І-ий рівень

1. Ферменти за хімічною природою є: а) похідними полісахаридів; б) фосфоліпідами; в) пігментами; г) лише простими білками; д) лише складними білками; е) простими та складними білками; є) похідними нуклеотидів.

2. Механізм прискорення ферментами біохімічних реакцій ґрунтується на: а) збільшенні розчинності субстратів; б) зменшенні розчинності субстратів; в) підвищенні температури реакційного середовища; г) зниженні температури реакційного середовища; д) зміні значення pH реакційного середовища; е) підвищенні енергії активації молекул субстрату; є) зниженні енергії активації молекул субстрату.

3. Білкова частина ферменту називається: а) коферментом; б) апоферментом; в) інгібітором; г) активним центром; д) простетичною групою; е) мономером; є) каталізатором;

Національний університет
водного господарства
та природокористування
ж) активатором.

4. Субстрат – це речовина, яка: а) збільшує швидкість ферментативної реакції; б) зменшує швидкість ферментативної реакції; в) стабілізує структуру ферменту; г) входить до складу активного центру ферменту; д) зазнає перетворення під дією ферменту; е) знижує енергію активації ферментативної реакції.

5. Активним центром ферменту є: а) його білкова частина; б) його небілкова частина; г) протомер; д) лише кофермент; е) лише простетична група; є) частина молекули ферменту, де відбувається безпосереднє зв'язування й перетворення субстрату.

6. Із поступовим збільшенням концентрації субстрату швидкість ферментативної реакції: а) залишається незмінною; б) поступово збільшується; в) поступово зменшується; г) реакція припиняється; д) спочатку поступово збільшується, а потім залишається незмінною; е) спочатку поступово збільшується, а потім різко зменшується.

II-ий рівень

1. Ферменти характеризуються такими особливостями: а) за своєю природою є простими або складними білками; б) за своєю природою є гомо- та гетерополісахаридами; в) володіють широкою специфічністю до субстратів; г) володіють вузькою специфічністю до субстратів; д) при перетворенні речовин часто утворюють побічні продукти; е) при перетворенні речовин не утворюють побічних продуктів; є) володіють такою властивістю як регульованість; ж) важко піддаються регулюванню в організмі.

2. Субстрат під час ферментативної реакції: а) стабілізує структуру ферменту; б) входить до складу активного центру ферменту; в) приймає участь у формуванні перехідного комплексу ферментативної реакції; г) піддається перетворенню за участю ферменту; д) зменшує швидкість ферментативної реакції; е) збільшує швидкість ферментативної реакції; є) є одним із факторів, який впливає на кінетику ферментативної реакції.

3. Із приведеного переліку компонентів вибрати ті, що можуть виступати коферментами в молекулах ферментів: а) білкова частина; б) небілкова частина, що міцно зв'язана з білковою; в) небілкова частина, що легко від'єднується від білкової; г) $НАД^+$; д) похідні вітамінів; е) протомери; є) йони металів.

4. В утворенні фермент-субстратного комплексу беруть участь: а) міцні ковалентні зв'язки; б) водневі зв'язки; в) йонні зв'язки;

Національний університет
водного господарства
та природокористування

г) дисульфідні зв’язки; д) пептидні зв’язки; е) металічні зв’язки; є) координаційні зв’язки.

5. Константа Міхаеліса є величиною, яка: а) дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції складає 1/3 від максимальної; б) дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції складає 1/2 від максимальної; в) дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції є максимальною; г) залежить від температури; д) є одиницею ферментативної активності; е) виражає спорідненість ферменту до субстрату; є) є специфічною для конкретної ферментативної реакції.

6. При класифікації ферментів згідно діючої нині номенклатури враховують такі ознаки: а) швидкість каталізованої ферментом реакції; б) тип і характер каталізованої реакції; в) природу субстрату; г) відносну молекулярну масу ферменту; д) джерело виділення ферменту; е) практичне використання ферменту; є) природу продуктів ферментативної реакції.

7. Із приведеного переліку вибрати класи ферментів: а) альдози; б) оксидоредуктази; в) гідролази; г) амілази; д) кетози; е) фосфорилази; є) нуклеази; ж) ізомерази; з) трансферази.

Тема: **НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ**

І-ий рівень

1. Мономерними одиницями нуклеїнових кислот є: а) моносахариди; б) амінокислоти; в) аміни; г) карбонові кислоти; д) нуклеотиди; е) азотисті основи; є) фосфоліпіди.

2. Із приведених речовин вибрати пуринову азотисту основу: а) урацил; б) аланін; в) тимін; г) глюкованілін; д) лейцин; е) гуанін; є) глутамін.

3. Із приведених речовин вибрати піримідинову азотисту основу: а) аденін; б) аланін; в) глутамін; г) глюкованілін; д) лейцин; е) гуанін; є) цитозин.

4. Із приведених речовин вибрати мінорну азотисту основу: а) аденін; б) метилцитозин; в) глутамін; г) аланін; д) лейцин; е) гуанін; є) етаноламін.

5. Сполуки азотистих основ із рибозою або дезоксирибозою називаються: а) нуклеозидами; б) нуклеотидами; в) нуклеопротеїнами; г) полінуклеотидами; д) глікозидами; е) нуклеосомами; є) нуклеїнами.

6. Порядок розміщення залишків нуклеотидів у макромолекулах

Національний університет
водного господарства
та природокористування

нуклеїнових кислот, які сполучені фосфодиефірними зв'язками, називається: а) поліпептидом; б) доменом; в) первинною структурою; г) вторинною структурою; д) третинною структурою; е) четвертинною структурою; є) конформацією.

7. Вторинна структура ДНК представляє собою: а) одинарний полінуклеотидний ланцюг; б) одинарний поліпептидний ланцюг; в) два паралельні полінуклеотидні ланцюги; г) два антипаралельні полінуклеотидні ланцюги; д) два антипаралельні поліпептидні ланцюги; е) нуклеосому; є) соленоїд.

8. Комплементарні азотисті основи в дволанцюговій молекулі ДНК сполучені між собою: а) пептидним зв'язком; б) дисульфідним зв'язком; в) ковалентним зв'язком; г) йонним зв'язком; д) координаційним зв'язком; е) водневим зв'язком.

9. Прикладом третинної структури ДНК у рослин є: а) одинарний полінуклеотидний ланцюг; б) одинарний поліпептидний ланцюг; в) два паралельні полінуклеотидні ланцюги; г) два антипаралельні полінуклеотидні ланцюги; д) два антипаралельні поліпептидні ланцюги; е) нуклеосома; є) нуклеотид.

10. Біологічна роль молекули ДНК полягає в тому, що вона: а) забезпечує захист рослинного організму від мікроорганізмів; б) входить до складу рибосом; в) виконує каталітичні функції; г) забезпечує зберігання та відтворення спадкової інформації організму; д) передає спадкову інформацію від ядра до рибосом; е) переносить амінокислоти; є) входить до складу клітинних оболонок рослин.

11. Біологічна роль молекули транспортної РНК полягає в тому, що вона: а) забезпечує захист рослинного організму від мікроорганізмів; б) входить до складу рибосом; в) виконує каталітичні функції; г) забезпечує зберігання та відтворення спадкової інформації організму; д) передає спадкову інформацію від ядра до рибосом; е) переносить амінокислоти; є) входить до складу клітинних оболонок рослин.

12. Біологічна роль молекули інформаційної РНК полягає в тому, що вона: а) забезпечує захист рослинного організму від мікроорганізмів; б) входить до складу рибосом; в) виконує каталітичні функції; г) забезпечує зберігання та відтворення спадкової інформації організму; д) передає спадкову інформацію від ядра до рибосом; е) переносить амінокислоти; є) входить до складу клітинних оболонок рослин.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

13. Пуринові азотисті основи в складі нуклеопротеїнів можна виявити за допомогою реакції з: а) солями міді; б) солями срібла; в) солями барію; г) фосфорним реактивом; д) орциновим реактивом; е) солянокислим цистеїном.

14. Наявність залишку ортофосфорної кислоти в складі нуклеїнових кислот можна виявити за допомогою реакції з: а) солями міді; б) солями срібла; в) солями барію; г) фосфорним реактивом; д) орциновим реактивом; е) солянокислим цистеїном.

15. Якісне визначення вмісту ДНК за Діше ґрунтується на використанні реакції з: а) солями міді; б) солями срібла; в) солями барію; г) фосфорним реактивом; д) орциновим реактивом; е) солянокислим цистеїном.

II-ий рівень

1. Нуклеїнові кислоти як речовини рослинного організму характеризуються такими загальними особливостями: а) є низькомолекулярними сполуками; б) є гомополімерами; в) є гетерополімерами; г) складаються з залишків амінокислот; д) складаються з залишків нуклеотидів; е) виконують каталітичні функції; є) виконують функції, що пов'язані зі зберіганням, відтворенням і реалізацією спадкової інформації організму; ж) є обов'язковими компонентами всіх живих організмів; ж) входять до складу лише окремих груп організмів; з) можуть піддаватись денатурації.

2. Із приведених речовин вибрати ті, залишки яких можуть входити до складу нуклеотиду: а) рибоза; б) рибулоза; в) дезоксирибоза; г) галактоза; д) ортофосфорна кислота; е) азотна кислота; є) фумарова кислота; ж) урацил; з) тимін; и) аланін; і) аденін.

3. Мінорними азотистими основами є: а) урацил; б) аденін; в) азотисті основи, що часто входять до складу нуклеїнових кислот; г) ксантин; д) гуанін; е) метилцитозин; є) β-D-рибофураноза; ж) азотисті основи, що зрідка входять до складу нуклеїнових кислот; з) тіоурацил.

4. До складу РНК входять: а) урацил; б) аденін; в) β-D-рибофураноза; г) β-D-2'-дезоксирибофураноза; д) гуанін; е) тимін; є) ортофосфорна кислота; ж) цитозин; з) β-D-2'-дезоксигалактопіраноза.

Національний університет водного господарства та природокористування

5. До складу ДНК входять: а) урацил; б) аденін; в) β-D-рибофураноза; г) β-D-2'-дезоксирибофураноза; д) гуанін; е) тимін; є) ортофосфорна кислота; ж) цитозин; з) цистеїн.

6. Подвійна спіраль ДНК характеризується такими особливостями: а) представлена антипаралельними ланцюгами; б) представлена паралельними ланцюгами; в) переважно правозакручена; г) переважно лівозакручена; д) утворена комплементарними азотистими основами, що сполучені складноефірними зв'язками; е) утворена комплементарними азотистими основами, що сполучені водневими зв'язками; ж) при денатурації вона розділяється на окремі ланцюги; з) при денатурації вона розпадається на нуклеотиди.

7. Третинна структура ДНК представляє собою: а) комплекс ДНК із РНК; б) комплекс ДНК із гістоновими білками; в) комплекс ДНК із проламіновими білками; г) фібрилярну витягнуту структуру у вигляді соленоїда; д) суперспіралізовану компактну структуру; е) подвійну спіраль; є) одинарну спіраль; ж) нуклеосому.

Тема: **ОБМІН РЕЧОВИН**

I-ий рівень

1. Субстратне фосфорилювання відбувається за рахунок: а) енергії світла; б) електрохімічного потенціалу; в) окислення багатих на енергію речовин; г) синтезу спеціальних фітогормонів; д) активації ферментів; е) інгібування ферментів.

2. Окислювальне фосфорилювання відбувається за рахунок: а) енергії світла; б) електрохімічного потенціалу; в) окислення багатих на енергію речовин; г) синтезу спеціальних фітогормонів; д) активації ферментів; е) інгібування ферментів.

3. У результаті відновного дезамінування амінокислоти утворюється: а) нова амінокислота; б) амін; в) насичена карбонова кислота; г) ненасичена карбонова кислота; д) кетокислота; е) гідроксикислота; є) складний ефір.

4. У результаті гідролізного дезамінування амінокислоти утворюється: а) нова амінокислота; б) амін; в) насичена карбонова кислота; г) ненасичена карбонова кислота; д) кетокислота; е) гідроксикислота; є) складний ефір.

5. У результаті активації амінокислоти під час ініціації трансляції до неї приєднується: а) інша амінокислота; б) карбонова кислота; в) вітамін; г) АТФ; д) хлорофіл; е) моносахарид.

6. Утворення води як кінцевого продукту при аеробному

Національний університет
водного господарства
та природокористування

перетворенні вуглеводів відбувається: а) під час функціонування дихального ланцюга; б) в процесі здійснення ЦТК; в) під час утворення оксалоацетату; г) під час субстратного фосфорилювання; д) під час циклічного фотофосфорилювання; е) під час нециклічного фотофосфорилювання.

II-ий рівень

1. Особливостями С-3 шляху асиміляції вуглекислого газу в темновій фазі фотосинтезу є: а) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є піруват-3-фосфат; б) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є гліцерат-3-фосфат; в) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є оксалоацетат; г) він характерний для переважної більшості звичайних рослин; д) він характерний переважно для тропічних теплолюбних рослин; є) вихідною речовиною, до якої приєднується CO_2, є фосфоенолпіруват; ж) вихідною речовиною, до якої приєднується CO_2, є рибулозо-1,5-дифосфат; з) цей шлях носить назву цикл Кребса; і) цей шлях носить назву цикл Кальвіна.

2. Біосинтез нуклеїнових кислот: а) відбувається в результаті трансляції; б) відбувається в результаті редуплікації; в) відбувається в результаті транскрипції; г) мономерами для їх біосинтезу є амінокислоти; д) мономерами для їх біосинтезу є нуклеозид-трифосфати; е) вихідною речовиною для біосинтезу пуринових азотистих основ є оротова кислота; є) вихідною речовиною для біосинтезу пуринових азотистих основ є інозинова кислота; ж) вихідною речовиною для біосинтезу піримідинових азотистих сполук є інозинова кислота; з) вихідною речовиною для біосинтезу піримідинових азотистих сполук є оротова кислота.

3. Особливостями окислювального фосфорилювання є: а) відбувається лише на мембранах хлоропластів; б) відбувається лише в гіалоплазмі клітини; в) відбувається лише на мембранах мітохондрій; г) кінцевим результатом його є синтез НАДФ(Н)H^+; д) кінцевим результатом його є синтез АТФ; е) його рушійною силою є електрохімічний потенціал; є) його рушійною силою є фотони світла; ж) головним ферментом при цьому є цитратсинтетаза; з) головним ферментом при цьому є АТФ-синтетаза.

4. Особливостями гліколізу є: а) відбувається лише на мембранах хлоропластів; б) відбувається лише в гіалоплазмі клітини; в) відбувається лише на мембранах мітохондрій; г) кінцевим продуктом його є вода та вуглекислий газ; д) кінцевим продуктом

Національний університет
водного господарства
та природокористування

його є молочна кислота; е) кінцевим продуктом його є гліцеральдегід-3-фосфат; є) відбувається при обов'язковій участі кисню; ж) відбувається без участі кисню; з) синтез АТФ тут відбувається в результаті субстратного фосфорилювання; і) синтез АТФ тут відбувається в результаті окислювального фосфорилювання.

5. Особливостями С-4 шляху асиміляції вуглекислого газу в темновій фазі фотосинтезу є: а) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є піруват-3-фосфат; б) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є гліцерат-3-фосфат; в) першою речовиною після приєднання CO_2 тут є оксалоацетат; г) він характерний для переважної більшості звичайних рослин; д) він характерний переважно для тропічних теплолюбних рослин; е) вихідною речовиною, до якої приєднується CO_2, є фосфоенолпіруват; є) вихідною речовиною, до якої приєднується CO_2, є рибулозо-1,5-дифосфат; ж) цей шлях носить назву цикл Кребса; з) цей шлях носить назву цикл Кальвіна.

6. Особливостями світлової фази фотосинтезу є: а) відбувається всередині хлоропластів; б) відбувається в гіалоплазмі клітини; в) відбувається всередині мітохондрій; г) відбувається лише на світлі; д) відбувається і в темноті й на світлі; е) під час цієї фази відбувається циклічне фотофосфорилювання; є) під час цієї фази відбувається окисне фосфорилювання; ж) на відновлення хлорофілу використовується глюкоза й виділяється CO_2; з) на відновлення хлорофілу використовується вода й виділяється O_2; і) головним результатом її є отримання піровиноградної кислоти та води; ї) головним результатом її є отримання АТФ та відновних еквівалентів.

7. Особливостями біосинтезу білка є: а) цей процес називається транскрипцією; б) цей процес називається трансляцією; в) цей процес називається редуплікацією; г) відбувається на рибосомах; д) відбувається на лізосомах; е) поділяється на три етапи; є) поділяється на два етапи; ж) мономерами для синтезу білка є активовані амінокислоти; з) мономерами для синтезу білка є звичайні амінокислоти; і) матрицею для синтезу білка є і-РНК.

8. Особливостями темнової фази фотосинтезу є: а) відбувається всередині хлоропластів; б) відбувається в гіалоплазмі клітини; в) відбувається всередині мітохондрій; г) відбувається лише на світлі; д) відбувається і в темноті й на світлі; е) під час цієї фази відбувається поглинання та відновлення H_2O; є) під час цієї фази відбувається поглинання та відновлення CO_2; ж) тут використовується синтезована

Національний університет
водного господарства
та природокористування

в світловій фазі АТФ; з) тут використовується синтезована в світловій фазі молочна кислота; і) головним результатом її є отримання глюкози та інших вуглеводів; ї) головним результатом її є отримання АТФ.

9. Особливостями дихального ланцюга є: а) представляє собою початковий етап аеробного перетворення вуглеводів; б) представляє собою проміжний етап аеробного перетворення вуглеводів; в) представляє собою кінцевий етап аеробного перетворення вуглеводів; г) представляє собою послідовний ланцюг перенесення електронів; д) представляє собою послідовний ланцюг перетворення азотистих основ; е) до його складу входять ацетил-SКоА, рибулозо-1,5-дифосфат, піровиноградна кислота; є) до його складу входять білки цитохроми, кофермент Q, флавопротеїни; ж) під час його функціонування відбувається циклічне фотофосфорилювання; з) під час його функціонування відбувається окислювальне фосфорилювання.

10. Особливостями циклу трикарбонових кислот є: а) відбувається всередині хлоропластів; б) відбувається в гіалоплазмі клітини; в) відбувається всередині мітохондрій; г) кінцевим продуктом його за участю дихального ланцюга є вода та вуглекислий газ; д) кінцевим продуктом його є молочна кислота; е) кінцевим продуктом його є гліцеральдегід-3-фосфат; є) відбувається при безпосередній участі кисню; ж) кисень у цьому процесі безпосередньої участі не приймає; з) головним результатом його є отримання відновних еквівалентів – ФАД·H_2 та НАД(Н)H^+; і) головним результатом його є отримання піровиноградної кислоти та води.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

5. Приклади завдань підсумкового контролю

ВАРІАНТ-І

1. Запропоновані речовини організму рослини розподілити за трьома групами: А) моносахариди; Б) діаміномокарбонові амінокислоти; В) піримідинові азотисті основи – лізин; рибоза; аргінін; тимін; манноза; цитозин; урацил; глюкоза; ксилоза. Написати структурну формулу однієї з речовин, віднесених вами до групи А.

2. Вкажіть найбільш важливі ознаки рослинних речовин, які відносяться до ферментів: а) за своєю природою є простими або складними білками; б) за своєю природою є нуклеїновими кислотами; в) володіють широкою специфічністю й діють на різні субстрати; г) володіють вузькою специфічністю й діють лише на свої субстрати; д) при перетворенні речовин часто утворюють побічні продукти; е) при перетворенні речовин не утворюють побічних продуктів; є) основною функціональною частиною ферментів є активний центр; ж) основною функціональною частиною ферментів є нуклеосома.

3. Для вказаних термінів знайти відповідні їм визначення:

А. Метаболізм. **Б.** Цикл трикарбонових кислот. **В.** Редуплікація.	**а)** сукупність реакцій послідовного окислення оксалоацетату з утворенням відновних еквівалентів і CO_2; **б)** сукупність усіх реакцій, які відбуваються в організмі; **в)** сукупність реакцій, які зумовлюють самоподвоєння молекули ДНК.

4. Дайте загальну характеристику процесові темнової фази фотосинтезу за С-4 шляхом, для прикладу наведіть 2-3 конкретні реакції біохімічних перетворень, які відбуваються в цьому процесі. Покажіть взаємозв'язок темнової фази фотосинтезу з анаеробним перетворенням вуглеводів.

ВАРІАНТ-ІІ

1. Запропоновані речовини організму рослини розподілити за трьома групами: А) ліпіди; Б) моноаміномокарбонові амінокислоти; В) вітаміни – біотин; фосфатидилсерин; валін; триацилгліцерол; лейцин; цистеїн; стероїди; треонін; ергокальциферол. Написати структурну формулу однієї з речовин, віднесених вами до групи Б.

2. Вкажіть найбільш важливі ознаки рослинних речовин, які

Національний університет
водного господарства
та природокористування

відносяться до білків: а) є гомополімерами; б) є гетерополімерами; в) складаються з залишків моносахаридів; г) складаються з залишків амінокислот; д) можуть виконувати функцію регуляції різних процесів; е) можуть виконувати функцію зберігання спадкової інформації; є) основним зв'язком їх первинної будови є пептидний зв'язок; ж) основним зв'язком їх первинної будови є водневий зв'язок.

3. Для вказаних термінів знайти відповідні їм визначення:

А. Анаболізм. **Б.** Хемосинтез. **В.** Трансляція.	**а)** сукупність реакцій, які зумовлюють синтез органічних речовин за рахунок енергії окислення неорганічних речовин; **б)** сукупність усіх реакцій, які забезпечують синтез білків; **в)** сукупність реакцій синтезу з простих речовин більш складних речовин.

4. Дайте загальну характеристику процесові темнової фази фотосинтезу за С-3 шляхом, для прикладу наведіть 2-3 конкретні реакції біохімічних перетворень, які відбуваються в цьому процесі. Покажіть взаємозв'язок темнової фази фотосинтезу з аеробним перетворенням вуглеводів.

ВАРІАНТ-ІІІ

1. Запропоновані речовини організму рослини розподілити за трьома групами: А) фотосинтезуючі пігменти; Б) моноаміно-дикарбонові амінокислоти; В) пуринові азотисті основи – каротини; гуанін; аспарагінова кислота; ксантофіли; фікобіліни; аденін; хлорофіли; глутамінова кислота. Написати структурну формулу однієї з речовин, віднесених вами до групи В.

2. Вкажіть найбільш важливі ознаки рослинних речовин, які відносяться до вуглеводів: а) є альдегідами й кетонами одноатомних ароматичних спиртів; б) є альдегідами й кетонами багатоатомних спиртів і полімерами цих сполук; в) можуть виконувати структурну та енергетичну функції; г) можуть виконувати генетичну та каталітичну функції; д) існують лише в циклічних формах; е) існують і в циклічних і у відкритих формах; є) не містять хіральних атомів вуглецю; ж) містять хіральні атоми вуглецю.

3. Для вказаних термінів знайти відповідні їм визначення:

А. Гліколіз. **Б.** Фотофосфо-	**а)** сукупність реакцій послідовного окислення в анаеробних умовах вуглеводів із утворенням

Національний університет
водного господарства
та природокористування

рилювання. **В.** Транскрипція.	лактату; **б)** сукупність реакцій, які зумовлюють синтез молекули іРНК на матриці ДНК; **в)** сукупність реакцій, які зумовлюють синтез АТФ за рахунок енергії світлового випромінювання.

4. Дайте загальну характеристику процесові циклу трикарбонових кислот, для прикладу наведіть 2-3 конкретні реакції біохімічних перетворень, які відбуваються в цьому процесі. Покажіть взаємозв'язок циклу трикарбонових кислот із гліколізом.

ВАРІАНТ-IV

1. Запропоновані речовини організму рослини розподілити за трьома групами: А) дикарбонові кислоти; Б) циклічні амінокислоти; В) олігосахариди – мальтоза; тирозин; лактоза; янтарна кислота; сахароза; щавлева кислота; глутарова кислота; рафіноза; гістидин. Написати структурну формулу однієї з речовин, віднесених вами до групи Б.

2. Вкажіть найбільш важливі ознаки рослинних речовин, які відносяться до нуклеїнових кислот: а) є гомополімерами; б) є гетерополімерами; в) складаються з залишків нуклеотидів; г) складаються з залишків фосфоліпідів; д) виконують енергетичну функцію; е) виконують функцію, що пов'язана зі зберіганням, відтворенням і реалізацією спадкової інформації організму; є) до їх складу обов'язково входить залишок ортофосфорної кислоти; ж) до їх складу обов'язково входить залишок глюкози.

3. Для вказаних термінів знайти відповідні їм визначення:

А. Катаболізм. **Б.** Окислювальне фосфорилювання. **В.** Елонгація трансляції.	**а)** сукупність процесів послідовного сполучення амінокислот у поліпептидний ланцюг на рибосомі; **б)** сукупність процесів, які зумовлюють синтез АТФ на мембранах мітохондрій за рахунок електрохімічного потенціалу; **в)** сукупність реакцій розщеплення складних речовин на більш прості з виділенням енергії.

4. Дайте загальну характеристику процесові гліколізу, для прикладу наведіть 2-3 конкретні реакції біохімічних перетворень, які

Національний університет
водного господарства
та природокористування

відбуваються в цьому процесі. Покажіть взаємозв'язок гліколізу з аеробним перетворенням вуглеводів.

ВАРІАНТ-V

1. Запропоновані речовини організму рослини розподілити за трьома групами: А) глікани; Б) вітаміни; В) прості білки – целюлоза; альбуміни; амілопектини; гістони; агар-агар; аскорбінова кислота; ретинол; глобуліни; тіамін. Написати структурну формулу однієї з речовин, віднесених вами до групи Б.

2. Вкажіть найбільш важливі ознаки рослинних речовин, які відносяться до ліпідів: а) розчинні у воді; б) розчинні в неполярних органічних розчинниках; в) за хімічною природою є переважно складними ефірами багатоатомних спиртів і вищих жирних кислот; г) за хімічною природою є переважно полімерами моносахаридів; д) виконують переважно енергетичну та структурну функції; е) виконують переважно каталітичну та генетичну функції; є) до їх складу обов'язково входить залишок ортофосфорної кислоти; ж) до їх складу часто входить залишок гліцеролу.

3. Для вказаних термінів знайти відповідні їм визначення:

А. Дихальний ланцюг. **Б.** Цикл Кальвіна **В.** Ініціація трансляції.	**а)** сукупність реакцій поступового відновлення CO_2 з утворенням різних моносахаридів під час темнової фази фотосинтезу; **б)** сукупність процесів послідовного окислення та відновлення спеціальних білків під час переміщення електронів на мембранах мітохондрій; **в)** сукупність процесів активації амінокислот, їх транспортування та формування білоксинтезуючого комплексу.

4. Дайте загальну характеристику процесам перетворення амінокислот, для прикладу наведіть 2-3 конкретні реакції біохімічних перетворень, які відбуваються в цих процесах. Покажіть взаємозв'язок перетворення амінокислот із аеробним або анаеробним перетворенням вуглеводів.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

6. Тематика індивідуальної роботи

1. Найважливіші відкриття в галузі біохімії та молекулярної біології в другій половині XX століття.
2. Роль різних хімічних елементів у процесах обміну та життєдіяльності рослинних організмів.
3. Похідні вуглеводів у складі рослинних організмів.
4. Терпени, їх структура, функції, найважливіші представники та шляхи біосинтезу.
5. Рослинні алкалоїди, їх склад, функції, найважливіші представники, шляхи біосинтезу, практичне застосування.
6. Рослинні глікозиди, їх склад, функції, найважливіші представники, шляхи біосинтезу, практичне застосування.
7. Рослинні ефірні олії, їх склад, функції, найважливіші представники, шляхи біосинтезу, практичне застосування.
8. Дубильні речовини, їх склад, функції, найважливіші представники, шляхи біосинтезу, практичне застосування.
9. Вітаміноподібні речовини рослинного походження.
10. Вільні амінокислоти та їх роль у метаболізмі рослинних організмів.
11. Методи визначення первинної структури білків.
12. Характеристика основних груп простих і складних білків.
13. Молекулярні механізми дії ферментів.
14. Методи визначення первинної структури нуклеїнових кислот.
15. Надвторинні структури молекули ДНК. Нуклеосоми та хромосоми.
16. Характеристика мітохондріальної та пластидної типів ДНК і РНК.
17. Характеристика різних типів бродінь.
18. Молекулярні механізми здійснення окислювального фосфорилювання в мітохондріях клітин.
19. Апотомічний (пентозофосфатний) шлях перетворення вуглеводів.
20. Роль різних груп пігментів у здійсненні процесів світлової фази фотосинтезу.
21. Характеристика біохімічних процесів хемосинтезу в бактеріальних організмах.
22. Шляхи біосинтезу нейтральних жирів і фосфоліпідів у рослинних організмах.
23. Шляхи біосинтезу стероїдів у рослинних організмах.
24. Біохімічні процеси розпаду ліпідів у рослинних клітинах.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

25. Шляхи біосинтезу ациклічних амінокислот у рослинних організмах.
26. Шляхи біосинтезу циклічних амінокислот у рослинних організмах.
27. Біохімічні процеси засвоєння молекулярного азоту азотфіксуючими мікроорганізмами.
28. Біосинтез пуринових азотистих основ.
29. Біосинтез піримідинових азотистих основ.
30. Загальна характеристика процесів подвоєння молекули ДНК (редуплікації ДНК).
31. Загальна характеристика процесів біосинтезу молекули іРНК (транскрипції ДНК).
32. Механізми регуляції процесів метаболізму в рослинному організмі.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

7. Варіанти та завдання для виконання контрольної роботи студентам заочної форми навчання

ВАРІАНТИ ЗАВДАНЬ

Передостання цифра шифру	Остання цифра шифру									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1, 11, 21, 36, 46, 56	2, 12, 22, 35, 45, 55	3, 13, 23, 34, 44, 54	4, 14, 24, 33, 43, 53	5, 15, 25, 32, 42, 52	6, 16, 26, 31, 41, 51	7, 17, 27, 40, 50, 60	8, 18, 28, 39, 49, 59	9, 19, 29, 38, 48, 58	10, 20, 30, 37, 47, 57
1	7, 13, 24, 37, 43, 54	5, 18, 25, 35, 48, 55	8, 20, 24, 38, 50, 54	9, 17, 21, 39, 47, 51	1, 12, 16, 31, 42, 56	3, 14, 21, 33, 44, 51	6, 16, 22, 36, 46, 52	10, 19, 23, 40, 49, 53	2, 11, 26, 32, 41, 56	4, 15, 26, 34, 45, 56
2	5, 12, 27, 35, 42, 57	9, 11, 24, 39, 41, 54	10, 18, 29, 40, 48, 59	7, 20, 28, 37, 50, 58	2, 13, 30, 32, 43, 60	4, 19, 27, 34, 49, 57	3, 14, 29, 33, 44, 59	1, 17, 22, 31, 47, 52	8, 15, 27, 38, 45, 57	6, 16, 21, 36, 46, 51
3	2, 16, 30, 32, 46, 60	6, 15, 29, 36, 45, 59	5, 11, 22, 35, 41, 52	3, 12, 22, 33, 42, 52	10, 17, 24, 40, 47, 54	1, 18, 25, 31, 48, 55	4, 19, 21, 34, 49, 51	9, 14, 24, 39, 44, 54	7, 20, 30, 37, 40, 60	8, 13, 27, 28, 43, 57
4	10, 17, 22, 40, 47, 52	1, 16, 30, 35, 46, 60	7, 15, 30, 37, 45, 60	5, 11, 23, 35, 41, 53	3, 14, 28, 33, 44, 58	8, 17, 22, 38, 47, 52	2, 18, 30, 32, 48, 60	6, 13, 30, 36, 43, 60	4, 12, 28, 34, 42, 58	9, 12, 22, 39, 42, 52
5	4, 20, 25, 34, 50, 55	8, 19, 21, 38, 49, 51	1, 17, 25, 31, 47, 55	10, 18, 27, 40, 48, 57	6, 16, 21, 36, 46, 51	2, 15, 28, 32, 45, 58	9, 13, 23, 39, 43, 53	5, 12, 21, 35, 42, 51	3, 14, 25, 33, 44, 55	7, 11, 25, 37, 41, 35
6	6, 18, 29, 36, 48, 59	3, 17, 26, 33, 47, 56	4, 19, 24, 34, 49, 54	1, 16, 25, 38, 46, 55	8, 11, 22, 31, 41, 52	9, 12, 24, 39, 42, 54	5, 20, 28, 35, 50, 58	7, 15, 29, 37, 45, 59	10, 13, 21, 40, 43, 51	2, 14, 23, 32, 44, 53
7	8, 14, 23, 38, 44, 53	10, 20, 27, 40, 50, 57	9, 16, 28, 39, 46, 58	6, 15, 29, 36, 45, 59	4, 19, 24, 44, 49, 54	7, 13, 30, 37, 43, 60	1, 12, 25, 31, 42, 55	3, 16, 26, 33, 46, 56	6, 18, 23, 36, 48, 53	5, 17, 28, 35, 47, 58
8	3, 19, 26, 33, 49, 56	7, 14, 28, 37, 44, 58	9, 12, 27, 39, 42, 57	2, 13, 26, 32, 43, 56	6, 18, 26, 36, 48, 56	8, 20, 23, 38, 50, 53	10, 15, 26, 40, 45, 56	4, 11, 27, 34, 41, 57	5, 16, 22, 35, 46, 52	1, 18, 24, 31, 48, 54
9	9, 15, 28, 39, 43, 58	4, 13, 23, 34, 43, 53	6, 14, 26, 36, 44, 56	8, 19, 30, 38, 49, 60	7, 20, 23, 37, 50, 53	10, 11, 29, 30, 37, 59	5, 11, 24, 35, 41, 54	2, 20, 25, 32, 50, 35	1, 17, 24, 31, 47, 54	3, 19, 29, 33, 49, 59

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ПЕРЕЛІК ЗАВДАНЬ

1. Предмет вивчення біохімії рослин. Особливості біохімії рослин як науки. Розділи біохімії.
2. Практичне значення та завдання біохімії рослин. Значення біохімії рослин для ґрунтознавства та агрохімії.
3. Історія становлення й розвитку біохімії рослин, роль у цьому вітчизняних вчених.
4. Поширення хімічних елементів у рослинних організмах. Біофільні елементи.
5. Органогенні та зольні елементи. Вміст хімічних елементів в організмі рослин. Коефіцієнт біологічного поглинання.
6. Речовинний склад тіла рослин.
7. Вміст, форми знаходження та біологічна роль води в рослинних організмах.
8. Вміст, форми знаходження та загальна біологічна роль мінеральних солей у рослинних організмах.
9. Загальне поняття про вуглеводи, їх вміст і біологічна роль у рослинному організмі. Класифікація вуглеводів.
10. Моносахариди, їх класифікація. Стереоізомерія моносахаридів. Загальні фізичні та хімічні властивості моносахаридів.
11. Характеристика найважливіших представників рослинних моносахаридів.
12. Характеристика найважливіших представників рослинних олігосахаридів.
13. Характеристика найважливіших представників рослинних полісахаридів I і II порядків.
14. Загальне поняття про ліпіди, їх спільні фізичні властивості. Вміст і біологічна роль ліпідів, їх класифікація.
15. Структурні компоненти ліпідів (вищі жирні кислоти, жирні спирти, інші спирти).
16. Характеристика нейтральних жирів. Жирові числа або константи.
17. Характеристика рослинних фосфоліпідів.
18. Характеристика рослинних стероїдів і восків.
19. Карбонові кислоти, їх знаходження в рослинних організмах.
20. Фенольні сполуки рослинних організмів.
21. Рослинні глікозиди та алкалоїди.
22. Рослинні пігменти.
23. Жиророзчинні вітаміни, їх знаходження в рослинах і хімічна будова.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

24. Водорозчинні вітаміни, їх знаходження в рослинах, хімічна будова й біохімічна роль.
25. Фітогормони та регулятори росту рослин.
26. Поширення та вміст білків у рослинних організмах. Різноманітність білків, їх функції.
27. Білокутворюючі амінокислоти, їх хімічна будова, класифікація, фізико-хімічні властивості.
28. Первинна будова білків. Пептидний зв'язок і його особливості.
29. Вторинна будова білків.
30. Третинна та четвертинна будови білків.
31. Фізико-хімічні властивості білків. Денатурація білків.
32. Характеристика окремих груп простих білків.
33. Характеристика окремих груп складних білків.
34. Поняття про ферменти, їх природа та складові компоненти.
35. Активний центр ферменту. Фермент-субстратний комплекс і його утворення.
36. Залежність активності ферменту від різних факторів. Одиниці активності ферменту.
37. Класифікація ферментів, приклади окремих класів ферментів.
38. Відкриття нуклеїнових кислот і з'ясування їх біологічної ролі. Класифікація нуклеїнових кислот і їх знаходження в клітині.
39. Склад нуклеїнових кислот. Будова нуклеотидів. Азотисті основи.
40. Первинна та вторинна структури ДНК. Форми вторинної структури ДНК.
41. Будова та біологічна роль різних типів РНК.
42. Поняття про метаболізм рослинного організму та його складові частини.
43. Анаеробне дихання. Характеристика різних типів бродінь.
44. Загальна характеристика гліколізу, його біологічне значення та енергетика.
45. Біохімічна характеристика гліколізу.
46. Аеробне перетворення вуглеводів, його біологічне значення. Утворення ацетил-коензиму А.
47. Біохімічна характеристика циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса).
48. Енергетика аеробного перетворення вуглеводів.
49. Окислювальне фосфорилювання. Дихальний ланцюг.
50. Загальне уявлення про фотосинтез, його біологічне значення. Хлоропласти як органели фотосинтезу.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

51. Характеристика світлової фази фотосинтезу.
52. Біохімія темнової фази фотосинтезу в рослин C_3-типу (цикл Кальвіна).
53. Біохімія темнової фази фотосинтезу в рослин C_4-типу.
54. Розклад білків і амінокислот мікроорганізмами ґрунту.
55. Біохімічні процеси дисиміляції амінокислот у клітинах.
56. Шляхи біосинтезу амінокислот у рослинних організмах.
57. Основні етапи біосинтезу білків.
58. Загальна характеристика біосинтезу нуклеотидів.
59. Взаємозв’язок і взаємообумовленість процесів метаболізму.
60. Рівні регуляції метаболізму.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

8. Рекомендована література

Артамонов В. И. Зеленая лаборатория планеты. – М.: Агропромиздат, 1987.
Березин И. В., Савин Ю. В. Основы биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1990.
Биологическая химия. Практикум / Под. ред. Ю. Е. Хмелевского /. – К.: Выща школа, 1985.
Биохимический справочник / Н. Е. Кучеренко и др. /. – К.: Выща школа, 1979.
Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. /. – К.: Выща школа, 1988.
Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. /. – К.: Выща школа, 1988.
Біохімія: еволюційна і порівняльна / М. Є. Кучеренко та ін. /. – Львів: Либідь, 1996.
Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія. – К.: Вища школа, 1995.
Гребинский С. О. Биохимия растений. – Львов: Выща школа, 1975.
Губський Ю. І. Біологічна хімія. – Київ-Тернопіль, 2000.
Гудвин Т. и др. Введение в биохимию растений. – М.: Мир, 1986. – Т. 1, 2.
Злобін Ю. А. Курс фізіології і біохімії рослин. – Суми: Універ. книга, 2004.
Кольман Я. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000.
Кретович В. Л. Биохимия растений. – М.: Высш. школа, 1986.
Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М.: Высш. школа, 1983.
Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – Т. 1-3.
Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков и др. / – Л.: Колос. Ленингр. отд-ние, 1987.
Мецлер Д. Биохимия.– М.: Мир, 1980. – Т. 1-2.
Мусил Я., Новокова О., Кунц Е. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1984.
Николаев Л. А. Химия жизни. – М.: Просвещение, 1977.
Плешков Б. П. Биохимия сельскохозяйственных растений. – М.: Агропромиздат, 1987
Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1985.
Проскурина И. К. Биохимия. – Москва-Владивосток: Пресс, 2001.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. – М.: Высш. школа, 1982.
Шевряков М. В. Практикум з біологічної хімії. – Суми: Універ. книга, 2003.
Явоненко О. Ф. Біохімія. – Суми: Універ. книга, 2002.
Журнал “Биохимический журнал”
Журнал ”Физиология и биохимия растений”

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Навчальне видання

Віталій Олександрович Володимирець

БІОХІМІЯ РОСЛИН. ІНТЕРАКТИВНИЙ КОМПЛЕКС НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

Навчально-методичний посібник

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Друкується в авторській редакції

Редакційно-видавничий центр
Національного університету водного
господарства та природокористування
33028, Рівне, вул. Соборна, 11

127