

КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ
РОСЛИННИЦТВА, ЕКОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЙ

І.П. Григорюк, О.А. Бойко, С.В. Прилуцька

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН З ОСНОВАМИ БІОХІМІЇ
ПРАКТИКУМ

ТОВ «Аграр Медіа Груп»

Київ 2014

УДК 581.1:577.1(076)
ББК 28.573:28.072я73
Г82

Рецензенти:

М.М. Мусієнко, доктор біологічних наук, професор, академік НААН України
С.Д. Мельничук, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НААН України

Автори-упорядники:

І.П.Григорюк, О.А.Бойко, С.В.Прилуцька

Рекомендовано до друку рішенням вченої ради Навчально-наукового інституту рослинництва, екології і біотехнологій (протокол № від 2014 року)

І.П. Григорюк, О.А. Бойко, С.В. Прилуцька

Фізіологія рослин з основами біохімії. Практикум. – К.: ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2014. – 144 с.

У навчальному посібнику викладено методику лабораторних робіт по основних розділах навчальної програми з курсу фізіології рослин і біохімії. Розглянуто особливості водного режиму, фотосинтезу, дихання, кореневого живлення, стійкості, росту та розвитку рослин, а також білки та амінокислоти, ферменти, вуглеводи, ліпіди, нуклеїнові кислоти, вітаміни.

УДК 581.1:577.1(076)
ББК 28.573:28.072я73
Г82

©Навчально-науковий інститут рослинництва, екології і біотехнологій

ЗМІСТ

Передмова	
Вступ. Правила поведінки та техніки безпеки в навчальній лабораторії	
ЧАСТИНА 1. Фізіологія рослин	
РОЗДІЛ 1. Фізіологія рослинної клітини	
Робота 1. Визначення явища плазмолізу і деплазмолізу в клітинах епідерми синьо забарвленої цибулі	
Робота 2. Ковпачковий плазмоліз	
Робота 3. Визначення осмотичного потенціалу клітинного соку плазмолітичним методом	
Робота 4. Діагностика пошкодження температурою мембран клітин столового буряка за збільшення їх проникності	
Робота 5. Вплив йонів K^+ на в'язкість цитоплазми	
Контрольні запитання до розділу «Фізіологія рослинної клітини»	
РОЗДІЛ 2. Водний режим рослин	
Робота 6. Визначення стану продихів методом інфільтрації (метод Г. Моліша)	
Робота 7. Визначення поглинання води кореневою системою за допомогою потометра	
Робота 8. Визначення сисної сили тканин за зміною концентрації розчину (за методом Шардакова)	
Робота 9. Визначення кількості води та сухої речовини у рослинах екологічних груп	
Робота 10. Визначення інтенсивності транспірації та відносної транспірації ваговим методом	
Робота 11. Визначення інтенсивності транспірації у різних екологічних груп рослин (за Івановим)	
Робота 12. Спостереження за динамікою транспірації на гілках деревних рослин впродовж дня	
Робота 13. Визначення водного дефіциту рослин	
Контрольні запитання до розділу «Водний режим рослин»	
РОЗДІЛ 3. Фотосинтез	
Робота 14. Екстракція пластидних пігментів	
Робота 15. Виявлення фізико-хімічних властивостей хлорофілу	
Робота 16. Розділення пігментів хлоропластів хроматографічним методом	
Робота 17. Спостереження за явищем флуоресценції хлорофілу	
Робота 18. Кількісне визначення хлорофілу за допомогою фотоелектроколориметра	
Робота 19. Визначення інтенсивності фотосинтезу газометричним методом в течії повітря	
Контрольні запитання до розділу «Фотосинтез»	

РОЗДІЛ 4. Дихання рослин	
Робота 20. Визначення активності каталази в листках рослин	
Робота 21. Визначення інтенсивності дихання за кількістю виділеного вуглекислого газу (за методом П. Бойсен-Йенсена)	
Контрольні запитання до розділу «Дихання рослин»	
РОЗДІЛ 5. Кореневе живлення рослин	
Робота 22. Визначення вмісту золи в різних органах рослин та мікрохімічний аналіз золи	
Робота 23. Визначення в золі макро- і мікроелементів	
Робота 24. Кількісне визначення нітратів у рослинах	
Контрольні запитання до розділу «Кореневе живлення рослин»	
РОЗДІЛ 6. Ріст і розвиток рослин	
Робота 25. Вирощування рослин на повній поживній суміші з виключенням окремих поживних елементів	
Робота 26. Виявлення ритмічності росту рослин	
Контрольні запитання до розділу «Ріст і розвиток рослин»	
ЧАСТИНА 2. Біохімія	
РОЗДІЛ 7. Білки та амінокислоти	
Робота 27. Кольорові реакції на білки та амінокислоти	
Робота 28. Реакція осадження білків. Фізико-хімічні властивості білків	
Робота 29. Виділення білків з рослинного матеріалу	
Робота 30. Кількісне визначення білка	
Контрольні запитання до розділу «Білки та амінокислоти».	
РОЗДІЛ 8. Ферменти	
Робота 31. Ферменти. Вивчення дії ферментів	
Робота 32. Властивості ферментів	
Контрольні запитання до розділу «Ферменти»	
РОЗДІЛ 9. Вуглеводи	
Робота 33. Вуглеводи. Якісні реакції. Моносахариди	
Робота 34. Вуглеводи. Якісні реакції. Полісахариди	
Робота 35. Вуглеводи. Кількісне визначення глюкози у рослинному матеріалі	
Контрольні запитання до розділу «Вуглеводи»	
РОЗДІЛ 10. Ліпіди	
Робота 36. Ліпіди. Фізико-хімічні властивості	
Робота 37. Ліпіди. Фізико-хімічні властивості	
Контрольні запитання до розділу «Ліпіди»	
РОЗДІЛ 11. Нуклеїнові кислоти	
Робота 38. Нуклеїнові кислоти	
Контрольні запитання до розділу «Нуклеїнові кислоти»	
РОЗДІЛ 12. Вітаміни	
Робота 39. Водорозчинні вітаміни. Фолієва кислота	

Робота 40. Водорозчинні вітаміни. Вітамін С	
Робота 41. Жиророзчинні вітаміни. Вітамін А	
Робота 42. Вітаміноподібні речовини. Вітамін Р	
Контрольні запитання до розділу «Вітаміни»	

Словник ключових термінів

ПЕРЕДМОВА

Стрімкий розвиток фізіології рослин, і ті результати, які вона досягла протягом більше як 200 років, багато в чому обумовлена застосуванням інструментальних методів дослідження.

Фізіологія рослин, біологічна наука, що вивчає загальні закономірності життєдіяльності рослинних організмів, яка вивчає процеси поглинання рослинними організмами мінеральних речовин і води, процеси зростання і розвитку, цвітіння і плодоносіння, кореневого (мінерального) і повітряного (фотосинтез) живлення, дихання, біосинтезу і накопичення різних речовин, сукупність яких забезпечує здатність рослини будувати своє тіло і відтворювати себе в потомстві. Розкриваючи залежність життєвих процесів від зовнішніх умов, фізіологія рослин створює теоретичну основу прийомів і методів підвищення загальної продуктивності рослинних організмів, живильної цінності, технологічної якості їх тканин і органів.

Відомо, що здатність рослинного організму пристосовуватися до дії несприятливих факторів залежить від швидкості і направленості адаптивних реакцій в метаболічних циклах, визначальних функціональну активність клітин і тканин. При цьому дія стресів викликає зворотню реакцію у рослин, яка проявляється на різних етапах його організації.

Біологічна хімія, або біохімія – це наука, що вивчає хімічний склад, структуру, механізми перетворення речовини та енергії, що відбуваються в організмі. Тобто, наука про життя.

Біохімія займає проміжне місце між хімією та біологією і тісно пов'язана з іншими науками, які вивчають будову організму – анатомією, структуру тканин і клітин – гістологією та цитологією, а також фізіологією, молекулярною біологією, біофізикою, генетикою тощо.

Запропонований увазі читачів практикум розрахований на поглиблення вивчення лекційного курсу з «Фізіології рослин», «Біохімії» та набуття навичок експериментальних досліджень. В ньому представлені завдання, які сприятимуть формуванню у студентів уявлень щодо фізіолого-біохімічних процесів, що відбуваються у рослинах, а також можливості їх регуляції зовнішніми факторами та вмотивованими діями.

Лабораторні (практичні) роботи є складовою частиною навчальної програми з дисципліни «Фізіологія рослин» та «Біохімія» для студентів ОКР «Бакалавр» за напрямком підготовки Біотехнологія. Навчально-методичне видання складається із дванадцяти основних розділів. Основною метою навчального-методичного видання є закріплення фундаментальних

теоретичних знань та формування практичних навичок у студентів при вивченні загальних курсів «Фізіологія рослин» та «Біохімія».

Вступ. Правила поведінки та техніки безпеки в навчальній лабораторії

1. Перед тим як приступити до виконання лабораторної роботи уважно ознайомтесь із завданням та правилами техніки безпеки, обладнанням, матеріалами.
2. Нагрівати рідину в пробірці треба поступово, спрямовуючи отвір пробірки в напрямку від себе та свого товариша тому, що внаслідок перегріву може відбутися викид рідини.
3. Не нахилитися над пробіркою, в якій кипить рідина.
4. Нюхаючи речовини у лабораторії, треба спрямовувати до себе пари рухом руки.
5. Ніяких речовин у лабораторії не пробувати на смак, а також пити з хімічного посуду.
6. Досліди з отруйними речовинами проводити під витяжною шафою.
7. Розчиняти кислоту у воді треба шляхом додавання кислоти до води по краплинах, весь час перемішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сірчаної кислоти відбувається розігрів розчину.
8. Виливаючи у раковину кислотні та лужні розчини потрібно спочатку їх нейтралізувати лугом чи кислотою відповідно.
9. Розлиті кислоти та лужні розчини треба засипати піском або віднейтралізувати і тільки після цього проводити прибирання.
10. Досліди з бензолом, ефіром та спиртом треба проводити на відстані від полум'я під витяжною шафою.
11. При використанні речовин для досліду звертайте увагу на підписи, в разі сумніву, звертайтеся до лаборанта або викладача.
12. Хімічні реакції необхідно виконувати в тих об'ємах, концентраціях і послідовності, а також використовувати такий лабораторний посуд та обладнання, що вказані у методичних вказівках.
13. Відразу ж повідомляйте викладача або лаборанта про помічені недоліки і порушення правил безпеки.
14. Не заходити в лабораторію, коли працює не ваша група.
15. На робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей (мобільних телефонів, нетбуків, сумок тощо).
16. При роботі у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яка вам доручена. Категорично забороняється робити іншу роботу.
17. Під час виконання лабораторної роботи не ходіть без діла по лабораторії, цим Ви відволікаєте увагу товаришів і залишаєте без нагляду своє робоче місце.

18. По закінченні роботи треба прибрати своє робоче місце, вимити посуд. Після приведення робочого місця в належний стан, необхідно попередити лаборанта або викладача про закінчення роботи, занести результати виконаної роботи у зошит, написати висновок, підписати протокол лабораторної роботи у викладача або лаборанта і тільки після цього залишити лабораторію.

СТРОГО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ:

1. Вносити з лабораторії реактиви та обладнання.
2. Вмикати/вимикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу.
3. Проводити досліди з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції.
4. Тримати у лабораторії особистий одяг і інші речі, а також вживати їжу.
5. Залишати без нагляду запалені пальники та нагрівачі.
6. Проводити досліди без наявності спецодягу (халатів).
7. Набирати ротом за допомогою піпетки концентровані кислоти, луги та отруйні речовини.
8. Працювати з незаземленим обладнанням.
9. Залишатися працювати в лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для надання допомоги у разі необхідності.

НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЄ ЗНАННЯ ІНСТРУКЦІЙ РОБОТИ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕЧОВИН, ПРАВИЛ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ!

Правила роботи з хімічними реактивами

Хімічні реактиви — речовини, що мають високу ступінь чистоти і використовуються для проведення хімічних реакцій.

Реактиви в лабораторії повинні мати етикетку з назвою, датою випуску, назвою заводу-виробника, хімічною формулою, концентрацією розчину.

Не можна користуватися хімічними реактивами невідомого складу (в разі втрати етикетки), визначати їх по запаху, пробувати на смак.

Тверді реактиви треба набирати фарфоровою ложкою, шпателем, грудочки розбивати скляною паличкою. Не можна брати їх руками, а також допускати переплутування пробок, кришок від банок з різними реактивами.

Реактиви з сильним запахом та отруйні речовини необхідно переливати тільки під тягою.

Робота з кислотами

Працювати з кислотами необхідно під тягою. При виготовленні розчинів сірчаної кислоти **запам'ятайте:** кислоту треба лити у воду порційно і перемішувати. При цьому розчин розігрівається.

В разі опіку кислотами необхідно це місце добре промити водою, після чого обробити 5% розчином двовуглекислого натрію (NaHCO_3) або 10% розчином вуглекислого амонію і знову водою.

При попаданні в очі необхідно використовувати 3-5%, для рота — 5% розчин двовуглекислого натрію.

Робота з лугами

Під час приготування розчинів брати луги руками не можна.

В разі опіку лугом пошкоджене місце необхідно промити декілька разів водою, а потім обробити 3-6% розчином оцтової або 1-2% розчином соляної кислот, після чого — знову водою.

При зважуванні твердих реактивів на технічних терезах слід використовувати спеціальний папір, на аналітичних — скляний посуд.

При роботі з леткими речовинами (HCl та ін.), а також при нагріванні речовин на водяній бані необхідно користуватися тягою.

При користуванні хімічними розчинами треба відливати стільки розчину, скільки потрібно для роботи. Залишки не можна виливати в склянку з основним розчином.

В лабораторії необхідно працювати в білих халатах.

Речовини, які вимагають обережного поводження

1. АЗОТНА КИСЛОТА (концентрована) викликає опіки шкіри. Пари цієї кислоти здійснюють подразнюючу дію на дихальні шляхи та очі. Азотна кислота може вибухати при взаємодії з скипидаром та спиртом, а також із солями пектинової кислоти, карбідами та порошками металів.
2. АЦЕТОН – це летка речовина, яку краще зберігати у герметично закритому скляному посуді. У разі виникнення пожежі спричиненої реакцією із ацетоном краще використовувати воду у розпиленому вигляді.
3. ЛУГИ при попаданні на шкіру та слизові оболонки викликають сильні опіки. Їх необхідно зберігати у сухому місці, ізольованому від води та нагріву.
4. КАЛІЙ МАРГАНЦЕВОКИСЛИЙ вибухає при обробці концентрованою сірчаною кислотою, спиртом, ефіром та горючими речовинами.
5. КАЛІЙ ТА НАТРІЙ АЗОТНОКИСЛИЙ можуть викликати подразнення шкіри, вони є легкозаймистими речовинами. Зберігати ці речовини необхідно у сухому місці та у скляному посуді.

6. СІРЧАНА КИСЛОТА при попаданні на шкіру викликає важкі опіки. Пари сірчаної кислоти можуть викликати подразнення слизових оболонок. Гасити полум'я треба піском або золою, застосовувати воду не можна. Зберігати сірчану кислоту необхідно у скляному щільно закритому посуді.

7. СОЛЯНА КИСЛОТА викликає опіки шкіри. Пари соляної кислоти викликають сильні опіки слизових оболонок. При пожежі застосовують воду, або нейтралізуючі речовини (бікарбонат натрію).

8. ОЦТОВА КИСЛОТА може також викликати важкі опіки шкіри. Пари цієї кислоти викликають подразнення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. При взаємодії оцтової кислоти з азотною кислотою може виникнути спалах, таке полум'я необхідно гасити водою.

Перша допомога при нещасних випадках

1. При опіках кислотами та лужними розчинами слід промивати ушкоджене місце під сильним струменем води, потім нейтралізувати кислоту – 1% розчином бікарбонату натрію, а луг – 1% розчином оцтової кислоти.

При хімічних опіках очей, їх слід промивати водою, потім 1% розчином бікарбонату натрію (у випадку із кислотою), чи 2% розчином борної кислоти (у випадку із лугом).

2. При отруєннях газами, людину слід негайно вивести на свіже повітря, дати випити велику кількість молока та забезпечити спокій. У разі послабленого дихання потерпілому слід зробити штучне дихання.

РОЗДІЛ 1. ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ

Клітина – елементарна структурно-функціональна одиниця рослинного організму. Вона здатна до самовідтворення і характеризується специфічними особливостями, які відрізняють її від клітин тваринного походження (наявністю добре розвинутої целюлозної оболонки, пластид, вакуолярної системи, специфічним ростом розтягненням).

Різноманітні функції клітин здійснюються спеціалізованими внутрішньоклітинними структурами – органелами. У зв'язку з їх мікроскопічними й субмікроскопічними розмірами, надзвичайною чутливістю до впливів навколишнього середовища, збереженням нативних властивостей лише у цілій життєдіяльній клітині дослідження фізіології органел і функціонального стану самої клітини є надзвичайно складними в методичному й технічному відношеннях і такі роботи в практикумі не розглядатимуться.

Важлива характерна ознака рослинної клітини – наявність вакуолі, яка відмежована від цитоплазми одношаровою мембраною – тонопластом. Це компартмент, у якому міститься водний розчин мінеральних речовин, цукрів, органічних кислот, амінокислот тощо. Саме концентрацією розчинених речовин і відповідно осмотичним потенціалом вакуолярного соку, оточеного напівпроникною мембраною, визначається здатність клітин поглинати воду з навколишнього середовища. Крім того, вакуоля притискає цитоплазму клітини з розташованими в ній пластидами до клітинної стінки, сприяючи тим самим успішнішому перебігу процесу фотосинтезу. Вакуоля сприяє також створенню тургорного стану клітини, за якого її вміст насичений водою тисне на клітинну стінку. В стані повного насичення клітини водою тургорний протитиск повністю зрівноважує осмотичний, і клітина припиняє поглинати воду. Найбільшу сисну силу клітина має якщо повністю відсутній тургор. У цей момент здатність клітини поглинати воду визначається її осмотичним потенціалом. Рушійною силою надходження води в клітину є різниця хімічних потенціалів води в клітині та навколишньому середовищі. Хімічний потенціал чистої води завжди більший за її хімічний потенціал в розчині (клітині). Чим вища концентрація сполук усередині клітини, тим менший хімічний потенціал внутрішньоклітинної води і тим швидше вода надходить в клітину.

Осмотичний рух води в клітину відбувається пасивно, без енергетичних затрат. Мінеральні ж елементи здебільшого надходять крізь клітинні мембрани проти електрохімічного градієнта активно, за допомогою специфічних білків-

переносників і з затратою енергії АТФ. Завдяки добре розвиненій системі внутрішніх мембран і плазмалеми в клітинах підтримується відповідний йонний склад вакуолярного розчину і цитоплазми, що визначає статус клітини як колоїдно-осмотичної системи. Мембранний принцип будови протопласта реалізується в різноманітних проявах осмотичних властивостей нативних клітин. Зокрема, на цьому базуються принципи практичних робіт вивчення явищ плазмолізу й деплазмолізу, визначення осмотичного тиску клітинного соку, проникності живих і ушкоджених мембран тощо. Більшість із цих робіт мають діагностичне й прикладне значення, зокрема для первинної оцінки фізіологічного стану рослин в умовах відкритого та закритого ґрунту.

Частину робіт присвячено вивченню структурно-функціональних властивостей живого вмісту клітини. Так, встановлення порівняльної здатності до проникності плазмалеми й тонопласту, впливу деяких йонів на в'язкість цитоплазми, тестування ступеня ушкодження тканин за зміною проникності мембран використовують для лабораторно-польових методів діагностики стану рослинних організмів за умов дії на них несприятливих факторів середовища. Досить інформативними й показовими є роботи щодо вивчення процесів і явищ, зумовлених властивостями й результатами сумісної діяльності вакуолей і цитоплазматичного вмісту рослинних клітин. Практичні аспекти цих робіт теж не викликають сумніву.

У процесі еволюції у клітинах усіх живих організмів вироблений механізм типового неспецифічного реагування – загальна неспецифічна реакція на ушкоджуючу дію, проявом якої є однотипні зміни: зменшення дисперсності колоїдів цитоплазми, збільшення спорідненості цитоплазми і ядра до низки барвників, зміна клітинної проникності, підвищення кислотності цитоплазми, зміна здатності до гранулоутворення. Згідно денатураційної теорії всі ці прояви неспецифічної реакції зумовлені зворотною денатурацією протеїнів, які є складовою протоплазми клітин.

Сьогодні більшість положень денатураційної теорії уточнені та конкретизовані з позицій сучасних досягнень біології. З'ясовано, що неспецифічна відповідь клітин на пошкоджуючий агент зумовлена загальними для них особливостями структурно-функціональної організації.

По-перше, нерівномірність просторового розподілу низькомолекулярних органічних сполук: цукрів, амінокислот, нуклеотидів, жирних кислот по всій клітині (компарменталізація). По-друге – неспецифічне інгібування біологічної активності макромолекул низькомолекулярними клітинними субстратами. Зсув рівноваги між активним транспортуванням

низькомолекулярних сполук та їхньою дифузією, який спричинює декомпартменталізацію клітинних субстратів та інгібування ними метаболізму – основні фактори, які зумовлюють неспецифічну реакцію клітини.

У відповідь на дію модельного токсиканту в клітині відбувається комплекс змін, які характеризують її загальну неспецифічну реакцію. Деякі з них можна вимірювати і, завдяки цьому, використовувати як маркери на дію токсичних речовин. Це, насамперед, зміни в'язкості цитоплазми та проникності мембран, зсув йонного балансу, бубнявіння хлоропластів, зменшення дисперсності колоїдів цитоплазми, зміна форми клітини, збільшення спорідненості цитоплазми й ядра клітини до низки барвників, зміна процесу грануловідкладання вітальних барвників і дифузного забарвлення протоплазми.

За цими неспецифічними реакціями клітини, що легко реєструються під мікроскопом, можна робити висновок про стан їхньої життєдіяльності та про пошкодження в його початковій оборотній фазі. Вони мають суттєве значення в цитоекологічних дослідженнях.

Встановлення характеру цих змін дає змогу зробити відповідні висновки про резистентність клітин, органів або організмів до несприятливих умов довкілля і вести цілеспрямований пошук умов або прийомів, які б сприяли підвищенню стійкості і продуктивності досліджуваних об'єктів.

Роботи цього розділу створюють теоретичну й практичну основу для ефективного виконання завдань і засвоєння матеріалу наступного розділу – вивчення водного режиму рослин.

РОБОТА 1.

ВИЗНАЧЕННЯ ЯВИЩА ПЛАЗМОЛІЗУ І ДЕПЛАЗМОЛІЗУ В КЛІТИНАХ ЕПІДЕРМИ СИНЬО ЗАБАРВЛЕНОЇ ЦИБУЛІ

Плазмоліз — це відокремлення протопласта від оболонки рослинної клітини. Явище протилежне тургору та деплазмолізу.

Причиною плазмолізу є зменшення об'єму вакуолі через втрату внутрішньоклітинної води, під дією гіпертонічних розчинів або плазмолітиків: сахарози, KNO_3 , $NaCl$, KCl , $Ca(NO_3)_2$, концентрація яких більша, ніж вакуолярного соку клітини. Плазмоліз можливий лише в життєздатній та функціонально-цілісній клітині. Процес повернення клітини до нормального осмотичного стану (тургору) у гіпотонічному розчині називається деплазмолізом.

На початковій стадії плазмолізу можна побачити тоненькі тяжі (тягнуться від поверхні протопласта до пор в оболонці) — плазмодесмові нитки або нитки Хехта, які свідчать про в'язкість та еластичність цитоплазми.

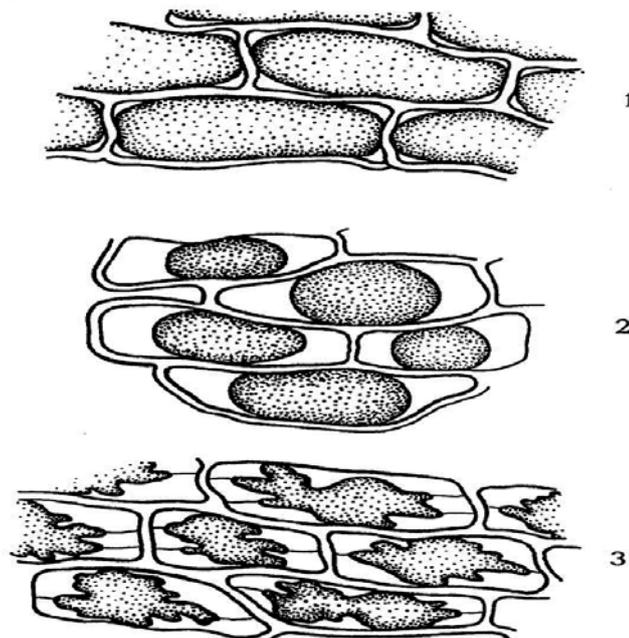
В залежності від ступеня в'язкості протопласта можна спостерігати різні форми плазмолізу (Рис. 1). При менш щільній цитоплазмі буде опукла форма плазмолізу, при більш щільній, в'язкій — угнута, при ще щільнішій — спазматична.

На форму плазмолізу впливають іони плазмолітика. Наприклад, іони кальцію підвищують в'язкість цитоплазми, а іони калію зменшують.

У зів'ялих рослин плазмоліз не відбувається, натомість може спостерігатися явище циторизу коли плазмалема не відокремлюється від оболонки і клітина зморщується.

Явище плазмолізу рекомендується спостерігати в рослин із забарвленим клітинним соком, тому що сама цитоплазма безбарвна.

Для лабораторних занять можна використати епідерму, традесканції, синьо забарвленої цибулі, листки елодеї та валіснерії.



1 – початкова форма плазмолізу

2 - опукла форма плазмолізу

3 – угнута форма плазмолізу

Рис. 1.1. Різні форми плазмолізу в клітинах епідерми цибулі.

Мета роботи:

В результаті особистих спостережень визначити умови проходження плазмолізу та деплазмолізу в рослинних клітинах.

Прилади і матеріали.

Луски синьозабарвленої цибулі або інші об'єкти, скальпелі, препарувальні голки, предметні стекла, накривні скельця, мікроскопи, 1 М розчини плазмолітиків, скляні палички, стаканчики з водою, фільтрувальний папір, пінцети.

Хід роботи.

1. Для спостереження явищ плазмолізу та деплазмолізу необхідно з розрізаної синьо забарвленої цибулі відокремити луски і пінцетом відділити шматочок тонкої зовнішньої плівки (епідерми, розміром 0,5 x 0,5 см). Помістити в краплину води на предметне скло, накривити покривним.

2. Досліджуваний об'єкт на предметному склі розглянути під мікроскопом. Відшукати клітини з найінтенсивнішим забарвленням, не деформовані.

3. Замалювати клітини епідерми цибулі.

4. З одного боку фільтрувальним папером відтягнути воду від препарату.

З протилежного нанести піпеткою краплину 1 М розчину сахарози або NaCl.

Поступово (за 1-4 хвилини) плазмолітик почне надходити в клітину.

5. Спостерігаємо, як цитоплазма починає відставати від оболонки в кутках клітини. Відокремлення збільшується, і протопласт набуває овальної конфігурації посередині клітини.

Замалювати клітини в стані плазмолізу.

6. Піпеткою біля покривного скла нанести декілька крапель води і фільтрувальним папером 3-4 рази обережно протягнути воду через препарат.

Тобто, під покривним склом необхідно створити розчин з меншою концентрацією, ніж має клітинний сік.

7. Коли клітина насичується водою (в результаті заміни розчину плазмолітика) її вакуоля розтягується і протопласт поступово заповнює всю клітину.

8. Записати висновки щодо зробленої роботи.

Контрольні запитання.

1. Чи може проходити плазмоліз в неживих клітинах?

2. Пояснити явище циторизи.

3. Чи залишається рослинна клітина життєздатною після плазмолізу та деплазмолізу?
4. Які існують форми плазмолізу?
5. Що сприяє збереженню в рослинних клітинах плазмодесмових ниток?
6. Які розчини використовують для спостереження явищ плазмолізу та деплазмолізу?
7. Яку роль в рослинних клітинах при плазмолізі відіграють цитоплазматичні мембрани?

РОБОТА 2. КОВПАЧКОВИЙ ПЛАЗМОЛІЗ

Рослинна клітина проявляє властивості осмотичної системи. Функцію напівпроникної оболонки виконують цитоплазматичні мембрани (плазмалема і тонопласт), а осмотично активною розчину – клітинний сік.

Якщо живі рослинні клітини експонувати у розчинах осмотично активних речовин різної концентрації (кожен з яких має певну величину осмотичного тиску), то їх реакція буде неоднаковою. Розчини, осмотичний тиск яких менший за осмотичний тиск клітинного соку, називають гіпотонічними. Якщо осмотичний тиск розчину більший за осмотичний тиск клітинного соку, то він гіпертонічний. Коли осмотичний тиск розчину дорівнюватиме осмотичному тиску клітинного соку, то його називають ізотонічним.

Уразі занурення клітин у гіпертонічний розчин, з клітинного соку в середовище надходитиме вода до вирівнювання осмотичних тисків розчину і клітинного соку. Внаслідок втрати води об'єм протопласта зменшується, він перестає тиснути на клітинну стінку, втрачається тургор, цитоплазма скорочується, ущільнюється – спостерігається явище плазмолізу.

Коли протопласт починає відділятися від клітинної стінки по кутах клітини спостерігається початковий або кутовий плазмоліз, коли в багатьох місцях – увігнутий, коли протопласт повністю відділяється від клітинної стінки – опуклий плазмоліз. Форма плазмолізу залежить також від в'язкості протоплазми та проникності її шарів.

Ковпачковий плазмоліз відбувається під дією катіонів і аніонів солей, які проникають крізь плазмалеми в мезоплазму. Крізь тонопласт ці солі майже не проникають, або проникають дуже повільно. Накопичуючись у мезоплазмі, катіони солей зумовлюють її набухання, в результаті чого утворюються ковпачки на кінцях плазмолізованої цитоплазми (ковпачковий плазмоліз).

Мета роботи. З'ясувати причини виникнення ковпачкового плазмолізу.

Матеріали, реактиви, обладнання. Синя цибуля; 1 н. розчини KNO_3 , $Ca(NO_3)_2$, $CaCl_2$; мікроскопи, предметні стекла та накривні скельця, пінцети, препарувальні голки, скляні бюкси або годинникові стекла, піпетки.

Хід роботи.

1. Шматочки забарвленої епідерми синьої цибулі покласти на 30 - 60 хв. у скляні бюкси з 1 н. розчином KNO_3 .

2. Розглянути препарат під мікроскопом у краплині цього самого розчину.

Примітка. У багатьох клітинах спостерігають ковпачковий плазмоліз. На обох полюсах видно набряклу цитоплазму, що нагадує ковпачки. Ядро також істотно збільшується в об'ємі. Це явище зумовлене проникненням іонів K^+ , NO_3^- крізь плазмалему в мезоплазму. На препараті видно, що плазмалема і тонопласт відрізняються чіткими рівними контурами.

3. Відповідно до п.1 дослід провести і з розчином $Ca(NO_3)_2$.

Примітка. Плазмоліз не відбувається, бо йони кальцію діють на клітину протилежно йонам калію.

4. Клітини з ковпачковим плазмолізом перенести до 1 н. розчину $CaCl_2$.

Примітка. Спостерігають перетворення ковпачкового плазмолізу на звичайний опуклий плазмоліз.

5. Зробити висновки.

Контрольні запитання.

1. Чому в плазмолізованому протопласті утворюються ковпачки?

2. Яка з мембран більш проникна – плазмалема чи тонопласт?

3. Що таке плазмоліз, чому він виникає?

4. Чи здатні до плазмолізу мертві клітини?

5. Які розчини називають гіпер-, гіпо- та ізотонічними?

6. Які типи плазмолізу вам відомі?

РОБОТА 3

ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ КЛІТИННОГО СОКУ ПЛАЗМОЛІТИЧНИМ МЕТОДОМ

Осмотичний тиск — це тиск розчину на напівпроникну перетинку, яка відокремлює його від розчинника (води), або від розчину з меншою концентрацією. Осмотичний тиск тим вищий, чим більш концентрований розчин.

Проявом осмотичних властивостей рослинних клітин є явище плазмолізу. Тобто, внаслідок дії плазмолітиків на клітину більш концентрований розчин відбирає воду від вакуолі, зменшуючи її об'єм і шар цитоплазми, що був притиснутий вакуолею до оболонки, відстає від останньої. При деплазмолізі кількість води в клітині поступово збільшується, об'єм вакуолі зростає, клітинний сік тисне на цитоплазму і притискає її до клітинної оболонки. Клітинна оболонка розтягується під впливом внутрішнього тиску і клітина переходить в стан тургору. Таким чином, за допомогою плазмолітичного методу ми можемо визначити величину осмотичного потенціалу клітини і відповідно концентрацію клітинного соку, який являє собою розчин мінеральних і органічних речовин.

Плазмолітичний метод визначення осмотичного тиску клітинного соку полягає в тому, що підготовлені об'єкти занурюють в розчини різних концентрацій і досліджують їх під мікроскопом для виявлення ізотонічного розчину. Беручи до уваги те, що явище плазмолізу можна спостерігати лише в розчинах плазмолітиків, знаходять таку концентрацію, при якій відбувається початкова стадія плазмолізу не менше, ніж у 50% клітин досліджуваної тканини. Ізотонічний розчин матиме середнє значення між цим розчином і наступні!» (меншої концентрації), в якому плазмоліз ще не відбувся.

Мета роботи: визначити осмотичний тиск клітинного соку рослин з великою кількістю антоціану.

Прилади та матеріали.

Синя цибуля, традесканція, 1 М розчин NaCl або сахарози, дистильована вода, піпетки, пробірки в штативах, леза, препарувальні голки, мікроскопи, предметні стекла, покривні скельця, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

1. Приготувати по 5 мл розчинів NaCl або сахарози з концентрацією від 0,1 до 0,7 моль/л змішуванням відповідних об'ємів вихідного 1 М розчину і води згідно таблиці і помістити в пронумеровані пробірки.

2. Зробити 12 тонких зрізів епідерми цибулі або традесканції і перенести їх на 2-3 хв. у кип'ячену воду з $t = 10-15^{\circ}\text{C}$ для видалення бульбашок повітря. Слідкувати, щоб зрізи повністю були занурені у воду.

Таблиця 1.1.

Схема приготування розчинів NaCl і відповідні значення ізотонічного коефіцієнта

№ пробірки	Концентрація розчину, М	Ізотонічний коефіцієнт	Кількість на 5 мл розчину	
			1 М розчину NaCl	Води

1	0,1	1,87	0,5	4,5
2	0,2	1,83	1,0	4,0
3	0,3	1,78	1,5	3,5
4	0,4	1,75	2,0	3,0
5	0,5	1,70	2,5	2,5
6	0,6	1,68	3,0	2,0

3. Зафіксувати в таблиці час досліді з інтервалом у 5 хв. За допомогою препарувальної голки обсушити на фільтрувальному папері по 2 зрізи (для кожної пробірки) і на 20 хв. занурити їх у розчин від найвищої концентрації до нижчої.

4. Через 20-30 хв. досліджувані препарати розглянути під мікроскопом в краплині з тією концентрацією плазмолітика, в якій знаходився препарат.

5. Необхідно встановити, при якій концентрації плазмолітика починається плазмоліз, а при якій ні. Результати спостережень записати у таблицю (у графі "плазмоліз" + або -).

6. Якщо спостерігається плазмоліз, можна зробити висновок, що зовнішній розчин гіпертонічний, тобто має вищу концентрацію, ніж клітинний сік. Концентрація ізотонічного розчину рівна концентрації клітинного соку, гіпотонічного — нижча.

7. Визначивши ізотонічну концентрацію, вираховують осмотичний тиск клітинного соку за рівнянням Вант-Гоффа:

$$P = RTCi, \text{ де}$$

P — осмотичний тиск в мегапаскалях, МПа;

R — універсальна газова стала, 0,0083 кДж/Дград. моль);

T - абсолютна температура $273^{\circ} + t^{\circ}$;

C — ізотонічна концентрація, моль/л;

i — ізотонічний коефіцієнт (для NaCl значення в таблиці, а для розчинів неелектролітів $i = 1$).

8. Результати досліджень занести в таблицю.

Таблиця 1.2.

Концентрація розчину	Ступінь плазмолізу	Тип розчину (гіпотонічний, ізотонічний, гіпертонічний,	Рисунок
0,6			
0,5			
0,4			
0,3			

0,2			
0,1			

Контрольні запитання.

1. При якій концентрації плазмолітика помітно початкову стадію плазмолізу? Як визначити початок плазмолізу?
2. Склад клітинного соку клітини.
3. Чому розчини електролітів у порівнянні з неелектролітами мають більший осмотичний тиск?
4. Які фактори можуть впливати на проникність мембран?
5. Які розчини плазмолітиків Ви знаєте?
6. Чому під час тривалих дощів плоди абрикосу, сливи, вишні розтріскуються?

РОБОТА 4.

ДІАГНОСТИКА ПОШКОДЖЕННЯ ТЕМПЕРАТУРОЮ МЕМБРАН КЛІТИН СТОЛОВОГО БУРЯКА ЗА ЗБІЛЬШЕННЯМ ЇХ ПРОНИКНОСТІ

Мембрани (від лат. membrana — оболонка) — система динамічних спеціалізованих структур, які забезпечують компартментацію розмежування клітин та окремих органел, створюючи умови для нормального перебігу метаболічних процесів. Мембрани складають 2/3 сухої ваги клітин і побудовані головним чином з ліпідів та білків (Рис. 2).

Мембранна система клітини складається із зовнішньої цитоплазматичної мембрани (плазмалеми), а також складного комплексу внутрішньоклітинних мембран (ендоплазматичної сітки, апарату Гольджі, тонопласта) та мембран клітинних органел — мітохондрій, пластид, ядра, лізосом та ін. При загальному плані будови кожна з цих мембран залежно від функцій, відрізняється за складом і властивостями.

Першу модель мембрани розроблено в 30-х роках англійськими дослідниками Дж. Даніелі і Г. Даусоном. Їх так звана бутербродна модель довгий час вважалась універсальною для всіх живих систем. Сучасна загальноприйнята модель — рідинно-мозаїчна, що запропонована у 1972 р. С. Сінджером і Дж. Ніколсоном. Згідно з їхньою теорією мембрана — динамічна система, що утворена в'язкою ліпідною фазою, в яку занурені молекули білків.

Основні структурні компоненти мембран: фосфоліпіди, білки, вуглеводневі залишки, вода.

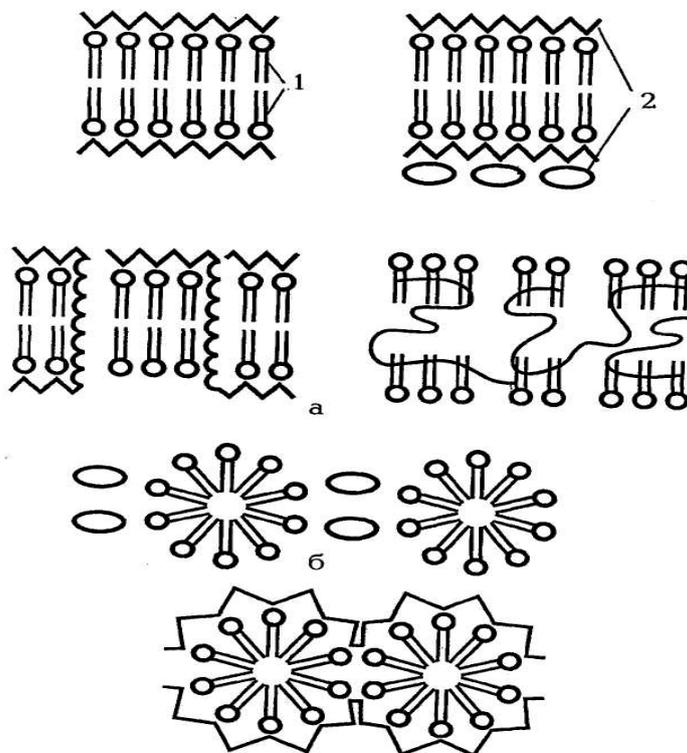
Мембрани відіграють важливу роль у життєдіяльності клітин: беруть участь у формуванні клітин і їх органел, регулюють транспорт речовин та іонів, забезпечують міжклітинні контакти, проходження енергетичних процесів.

Завдяки своїм фізико-хімічним та структурним особливостям мембрани регулюють велику кількість метаболічних процесів як на поверхні клітини, так і в її компартментах. (Метаболізм від грец. *metabole* — перетворення).

Однією з найбільш загальних неспецифічних та швидких реакцій рослинного організму на вплив різних факторів зовнішнього середовища є зміна проникності мембран клітини.

Проникність клітинних мембран змінюється при обробці рослини регуляторами росту, внесенні добрив, проростанні насіння, рості і розвитку рослин, зміні світла, температури.

Цитоплазматичні мембрани (зовнішня — плазмалема і вакуолярна — тонопласт) — напівпроникні, тобто вони добре пропускають воду і вибірково — розчинені речовини. Вибіркова проникність дозволяє живим рослинним клітинам зберігати внутрішньоклітинне середовище. Якщо на рослинну клітину подіяти стресовими чинниками, ці мембрани пошкоджуються і стають проникними для різних речовин.



1. — ліпіди, 2 — білки, а,б — рідинно-мозаїчна модель мембран

Рис. 1.2. Сучасна рідинно-мозаїчна модель мембрани.

Мета роботи.

Прослідкувати вплив температури на проникність мембран клітин столового буряка (*Beta vulgaris*) для речовин клітинного соку.

Прилади і матеріали.

Столовий буряк, стакани, свердла діаметром 5 мм, пробірки, термометри, гаряча вода, фарфорові стакани на 200 мл, фотоелектроколориметр (ФЕК).

Хід роботи.

1. За допомогою свердла відібрати з досліджуваного об'єкту рослинну тканину (6 брусочків довжиною 2 см і діаметром 0,5 см).

2.Промити їх у воді (5 хв.) для вимивання беталанінів із пошкоджених клітин на поверхні брусочків.

3.Брусочки помістити у 6 пробірок і налити по 5 мл води в кожну.

4.Приготувати 6 пробірок з водою, нагрітою до температури від 20 до 70°(t° = 20°C - контроль).

5.В ці посудини занурити на 15-20 хв. пробірки з зразками, періодично збовтуючи їх.

6.Забарвлену воду з пробірок злити в кювети фотоелектроколориметра і виконати вимірювання. Результати досліджень записати у таблицю.

7.Побудувати графік залежності інтенсивності забарвлення розчину в пробірках від температури.

8. Зробити висновки.

Таблиця 1.3.

Варіант	Температура	Інтенсивність забарвлення

Контрольні запитання.

1. Чому в контролі вода залишилась безбарвною?

2. Як пояснити той факт, що із збільшенням температури рідина має інтенсивніше забарвлення?

3. Де і як практично можна використати напівпроникність мембран рослинних клітин?

4. Які фактори крім температури впливають на проникність клітинних мембран?

5. Чому після перших морозів змінюється колір листків та пелюсток квітів жоржин та інших рослин?

6. Яку роль виконують мембрани в життєдіяльності клітини?

РОБОТА 5.

ВПЛИВ ЙОНІВ K^+ НА В'ЯЗКІСТЬ ЦИТОПЛАЗМИ

В'язкість, або внутрішнє тертя – це сила, необхідна для переміщення одного шару рідини відносно іншого. В'язкість зумовлена зчепленням молекул рідини між собою й опором структурних компонентів клітини. Відомо, що зміна функціональної активності клітини корелює зі зміною в'язкості цитоплазми.

Одно- і двовалентні йони металів і різні аніони неоднаково впливають на в'язкість цитоплазми. Одновалентні йони металів підвищують ступінь гідратації колоїдів і тому зменшують в'язкість цитоплазми. Двовалентні катіони зумовлюють коагулюючу дію та дегідратацію білків і підвищення в'язкості цитоплазми.

Про зміну в'язкості цитоплазми свідчить форма і час плазмолізу, що зумовлений гіпертонічними розчинами нітратів калію та кальцію.

Мета роботи.

Визначити залежність між в'язкістю цитоплазми та концентрацією йонів калію в листках елодеї або валіснерії, в лусках цибулі. Встановити характер дії йонів K^+ та Ca^{2+} на в'язкість цитоплазми.

Матеріали, реактиви, обладнання.

Синя цибуля, елодея, валіснерія; 1 М розчин KNO_3 , 0,7 М розчин $Ca(NO_3)_2$, етиловий спирт; центрифуга, центрифужні пробірки, чашки Петрі, скляні пробірки, мікроскопи, предметні та накривні скельця, леза, пінцети, препарувальні голки, піпетки.

Хід роботи:

Дослід 1.

1. Приготувати 0,2; 0,1; 0,05 М розчини KNO_3 .

2. У чотири пробірки (чашки Петрі) налити по 5 мл приготовлених розчинів KNO_3 та 5 мл води (контроль) і експонувати в них по три листка елодеї впродовж 40 хв.

3. По два листки елодеї з кожного розчину верхівкою листка помістити у центрифужні пробірки і центрифугувати за 1000 об./хв. протягом 10 хв. Для фіксації положення хлоропластів листочки перенести в етиловий спирт.

4. Під мікроскопом відмітити ступінь зміщення хлоропластів у клітинах основи і верхівок листків, витриманих у різних розчинах і у воді.

5. Зробити висновки про вплив розчинів KNO_3 на в'язкість цитоплазми.

Дослід 2. Характеристика зміни в'язкості цитоплазми за часом плазмолізу.

Початковою формою плазмолізу є увігнутий плазмоліз. В подальшому ця форма або зберігається, або з відповідною швидкістю переходить в опуклу форму. Проміжок часу, який проходить з часу занурення об'єкта в розчин плазмолітика до досягнення опуклого плазмолізу, значною мірою залежить від в'язкості цитоплазми. Чим менша в'язкість, тим швидше настає опуклий плазмоліз.

Об'єктом досліду є епідерма зовнішньої сторони забарвленої луски цибулі, оброблена плазмолітиками – 1 М розчином KNO_3 та 0,7 М розчином $Ca(NO_3)_2$.

1. На предметному склі провести плазмоліз (Робота 5).

2. Визначити час, за який відбувається плазмоліз у клітинах епідерми цибулі, занурених у KNO_3 та $Ca(NO_3)_2$.

3. Зробити висновки про в'язкість цитоплазми та вплив на неї різних йонів.

Контрольні запитання.

1. Що таке плазмоліз і які форми він має?

2. За яких умов клітина плазмолізує та деплазмолізує?

3. Як можна пояснити різну дію K^+ та Ca^{2+} на в'язкість цитоплазми?

4. Як пояснити той факт, що в'язкість цитоплазми в клітинах цибулі вища, ніж у елодеї?

5. Яка в'язкість цитоплазми у жаростійких рослин?

6. Як змінюватиметься в'язкість цитоплазми у разі посилення гідролітичних процесів?

Контрольні запитання до розділу «Фізіологія рослинної клітини»:

1. Які експериментальні методи застосовують для вивчення структури і функції клітин?

2. Як хімічний склад цитоплазми позначається на фізіологічній діяльності клітини?

3. Як визначити початок плазмолізу?

4. Чи здійснюється міжклітинне транспортування під час плазмолізу?

5. Яка функція клітинної стінки в осмотичних процесах рослинних клітин?
6. Назвіть механізми внутрішньоклітинних рухів.
7. Чи можна використовувати колхіцин для припинення руху цитоплазми?
8. Перерахуйте загальні особливості будови та властивості всіх мембран клітини.
9. Як зумовити плазмоліз клітин, що мають осмотичний потенціал клітинного соку 5 атм.?
10. У яких рослин більший осмотичний тиск клітинного соку: у рослин засолених чи незасолених ґрунтів; гідрофітів чи ксерофітів?
11. Клітина з осмотичним тиском клітинного соку 1МПа занурена в розчин KCl, осмотичний тиск якого 2 МПа. Що відбувається з клітиною?
12. Шматочки однієї і тієї самої рослинної тканини занурені у розчин 1М сахарози і 1М NaCl. У якому з цих розчинів плазмоліз більш виражений?
13. Як пояснити відсутність зворотної дифузії поглинутих клітинами барвників (метиленовий синій, нейтральний червоний).
14. Чому плазмолізовані в розчині сечовини клітини досить швидко деплазмолізуються?
15. Клітина занурена в дистильовану воду. Опишіть можливі варіанти переміщення води в цій системі.
16. Чому під час тривалих дощів соковиті плоди (вишні, черешні, абрикоси) розтріскуються?
17. Молярні розчини KCl і CaCl₂ розділені напівпроникною мембраною. Об'єм якого розчину збільшуватиметься?
18. Що відбуватиметься з клітиною, що має осмотичний потенціал клітинного соку 10 атм, якщо її занурити в ізотонічний розчин, а в гіпотонічний?
19. За допомогою яких цитофізіологічних реакцій можна діагностувати живі та мертві клітини?

РОЗДІЛ 2.

ВОДНИЙ РЕЖИМ РОСЛИН

Серед хімічних сполук, що містяться в живих організмах, вода в кількісному відношенні відіграє домінуючу роль. Вміст її в клітинах з активними процесами життєдіяльності може досягати 70-95 %. Зневоднення насіння, спор, лишайників супроводжується переходом їх від активної

життєдіяльності в анабіотичний стан. Пояснюється це тим, що вода є не лише розчинником, а й активним структурним та функціональним компонентом клітини. Вона є субстратом для фотосинтезу, бере участь у метаболічних перетвореннях, диханні, численних гідролітичних і синтетичних процесах.

Клітина містить завжди мінімальну кількість води, нижче якої рослина вже не в змозі підтримувати нормальний перебіг біохімічних та фізіологічних функцій. Таку воду називають гомеостатичною. Вміст гомеостатичної води неоднаковий у рослин різних екологічних груп: у гідрофітів – 65-70%; мезофітів – 45-60%; ксерофітів – 25-27% сирої маси. Значна кількість води в клітинах потрібна насамперед тому, що вона утворює внутрішнє середовище, в якому можливий перебіг життєвих процесів, адже лише у водному середовищі функціонально важливі біохімічні та структурні компоненти клітини здатні підтримувати свою нативність та функціональність.

Вода відіграє суттєву роль у створенні і підтриманні внутрішнього гідростатичного (тургорного) тиску, від якого залежить характерна форма рослинних клітин, тканин, органів та зовнішній вигляд рослин в цілому. У разі втрати тургору рослини в'януть.

З потоком води від кореневої системи в надземні органи надходять мінеральні речовини і деякі метаболіти, зокрема синтезовані в коренях амінокислоти й цитокініни.

Завдяки високій теплоємності та питомій теплоті пароутворення вода захищає організми від різких коливань температури і є запобіжним фактором від перегрівання.

Слід пам'ятати також і про таку важливу властивість води, як здатність різко збільшувати об'єм (на 11 %) під час замерзання і, так само різко, зменшувати його під час танення льоду, адже з цією властивістю води тісно пов'язана морозостійкість рослин.

Навіть короткотривала нестача води в рослині несприятливо впливає на біохімічні та фізіологічні процеси. Після відновлення оптимальних умов водозабезпечення фотосинтез стабілізується лише через п'ять-шість днів, ріст - через три-чотири тижні, що призводить до значних втрат врожаю. Тому оптимізація водопостачання рослини у змінних умовах навколишнього середовища має бути одним із головних завдань рослинництва.

Вода надходить в рослину в результаті дії законів масового потоку, дифузії та осмосу. Масовий потік, по суті є різницею потенціальної енергії води (водним потенціалом) у системі ґрунт–рослина–повітря. Пересування води по

рослині, крім того, зумовлене дією сил адгезії, когезії, капілярними силами та метаболічними процесами. Саме завдяки перебігу метаболічних процесів формується кореневий тиск (його ще називають нижнім кінцевим двигуном), завдяки якому вода нагнітається догори по судинах ксилеми. Величина кореневого тиску становить 50-150 кПа.

Робота верхнього кінцевого двигуна зумовлена випаровуванням води листками. Чим інтенсивніше транспірують рослини, тим більший створюється гідродинамічний натяг у судинах і капілярах, які зв'язують листок через стебло з кореневою системою.

Основну роль у випаровуванні води відіграють продихи (продихова транспірація). Крім того, вода може випаровуватися крізь кутикулу (кутикулярна транспірація) та крізь перидерму (лентикулярна транспірація).

Водний баланс рослини складається з надходження та витрачання води. У разі перевищення витрат води над надходженням виникає водний дефіцит, який може бути ліквідований у нічний період. Якщо ж протягом ночі дефіцит води повністю не усунений, то говорять про залишковий водний дефіцит.

Показником ефективності використання води рослинами є транспіраційний коефіцієнт – кількість води, що витрачається рослиною на створення одиниці сухої речовини.

Величину, обернену транспіраційному коефіцієнту, називають продуктивністю транспірації. Створюючи оптимальні умови вегетації, можна значно підвищити продуктивність рослин та ефективність використання ними поливної води.

РОБОТА 6.

ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ПРОДИХІВ МЕТОДОМ ІНФІЛЬТРАЦІЇ (МЕТОД Г. МОЛІША)

Продихи — це специфічні отвори в епідермі, крізь які відбувається газообмін. Зовні продих має вигляд щілини між двома клітинами своєрідної будови (Рис. 6). Ці дві серпоподібні клітини, що змикаються між собою протилежними кінцями (замикаючі клітини) значно відрізняються від інших клітин епідерми за формою та наявністю хлоропластів.

Продихи розміщені з нижнього боку листової пластинки, але у деяких рослин — і з верхнього (капуста, злаки).

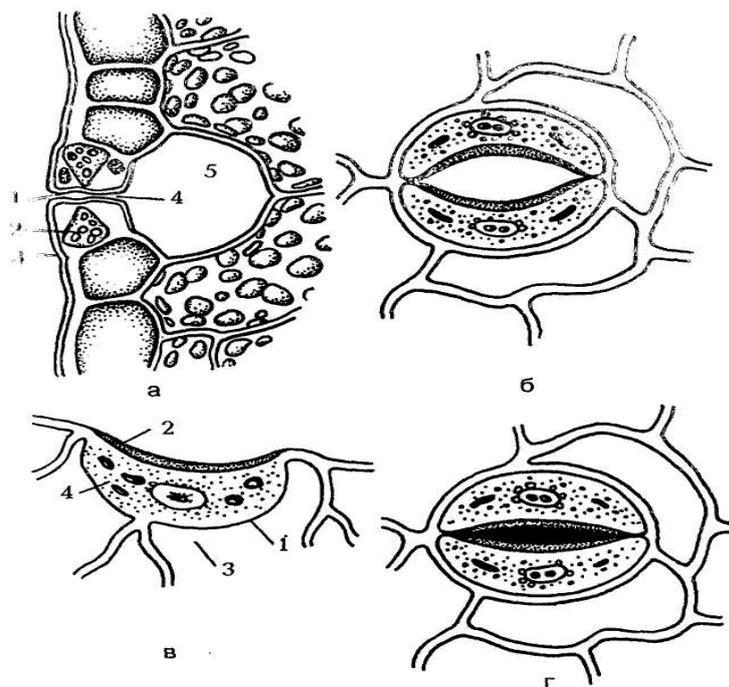
Загальна площа продихів коливається від 1 до 2% всієї листової поверхні. Кількість продихів на листках рослин варіює від 40 до 600 на 1 мм² залежно від виду.

На листках з паралельним жилкуванням (у хвойних) продиhi розташовані паралельними рядами, на листках інших рослин — без певного порядку, рівномірно.

Згідно сучасної іонної теорії головна роль в русі продиhового апарату належить калію, а саме — механізму дії іонних калієвих насосів, що перерозподіляють калій між замикаючими клітинами продиhів і ближніми епідермальними клітинами. Збільшення осмотичного потенціалу в замикаючих клітинах продиhів при відкриванні пов'язане з перерозподілом в них калію. Продиhова щілина закривається при виході калію з замикаючих клітин.

Стан продиhів залежить також від вмісту води в клітинах мезофілу, від температури тощо.

Методом інфільтрації користуються для визначення стану продиhів в польових умовах.



А – поперечний зріз продиhу

1. Передній дворик
2. Хлоропласти
3. Кутикула
4. Задній дворик
5. Міжклітинна повітряна порожнина
6. Продиh відкритий

В – поперечний зріз продиhу

1. Тонка стінка замикаючої клітини
2. Товста стінка
3. Клітина епідермісу
4. Замикаюча клітина

Г – продиh закритий

Рис. 2.1.Будова продиhів.

Він базується на різній ступені проникності (інфільтрації) хімічних речовин крізь відкриті продихи. Тобто, по їх проникності можна зробити висновок про ступінь їх відкритості.

Мета роботи: визначити стан продихів методом інфільтрації рослин різних видів.

Прилади і матеріали.

Листки 10 рослин різних видів, ксилол, бензол, спирт, піпетки, ножиці.

Хід роботи.

1.Відібрати листки 10 рослин (верхній, середній, нижній яруси) з різними умовами існування.

2.Розкласти листки на столі нижнього стороною листової пластинки догори і обережно піпеткою нанести на кожний по краплині бензолу, ксилолу і спирту таким чином, щоб вони не злилися між собою. Результати інфільтрації зафіксувати в таблиці знаками "+" і "-".

3.Ксилол, бензол і спирт мають різні фізичні властивості, тобто різну здатність до інфільтрації (просочування). По проникності на першому місці — ксилол, другому — бензол, третьому — спирт.

При слабо відкритих продихах — ксилол проникає крізь продихи, заповнюючи міжклітинники мезофілу листка і на листку з'являється прозора масна пляма (якщо подивитись на листок проти світла). Щодо бензолу і спирту, то ці краплини висихають.

Якщо продихи середньо відкриті, то плями з'являються на дослідних листках не лише від ксилолу, але й від бензолу. Спирт випаровується.

4.При повному відкритті продихів можна спостерігати появу плям від усіх трьох речовин. Якщо плями взагалі не утворюються, це означає, що продихи закриті.

5.Висновки щодо зробленої роботи та результати дослідження записати у таблицю.

Таблиця 2.1.

Назва, вид рослини	Умови росту, ярусність	Інфільтрація			Висновки про стан продихів
		ксилол	бензол	спирт	

--	--	--	--	--	--

Контрольні запитання.

1. Які фактори впливають на відкриття та закриття продихів?
2. Яка будова продихового апарата?
3. Які види транспірації Ви знаєте? Поясніть різницю механізму дії продихової та кутикулярної транспірації.
4. Яка роль продихів у рослинному організмі?
5. Восени, після опадання з дерев листя, як відбувається транспірація (випаровування води)?

РОБОТА 7

ВИЗНАЧЕННЯ ПОГЛИНАННЯ ВОДИ КОРЕНЕВОЮ СИСТЕМОЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОТОМЕТРА

Поглинання води та пересування її по рослині відбувається в результаті спільної дії таких факторів, як кореневий тиск (нижній кінцевий двигун) та транспірація (верхній кінцевий двигун).

Кореневий тиск — сила, яка спричинює в рослині від кореневої системи односторонній потік води з розчиненими в ній речовинами, незалежно від транспірації.

Транспірація — процес випаровування води рослиною.

Випаровує воду вся поверхня тіла рослини, особливо інтенсивно — продихова поверхня листка.

Транспірація є: кутикулярна (випаровування всією поверхнею рослини) і продихова (випаровування через продихи).

Прослідкувати спрощений механізм дії верхнього кінцевого двигуна водного потоку рослин можна за допомогою приладу, що називається потометр. Складається він із закритого пробкою резервуара, в який занурюється рослина, і горизонтально розташованої градуйованої трубки зі шкалою поділок у міліметрах. Зрізавши надземну частину рослин можна

встановити інтенсивність «плачу», стежачи за зміною швидкості пересування меніска в градуйованій трубці.(рис. 4).

Мета роботи: за допомогою потометра визначити вплив різних факторів (температури і засолення) на поглинання води гілкою рослини.

Прилади та матеріали.

Потометр, дослідні рослини (взимку можна брати гілки хвойних), піпетки, ножі, секатор, пластилін, термометр, H_2SO_4 або ін., метиленова синь.

Хід роботи.

1. Відібрані дослідні гілки рослин вмонтувати у пробки потометрів так, щоб нижній кінець виступав на 4-5 см. Загерметизувати пластиліном.

2. Одночасно резервуар потометра з капілярною трубкою заповнити водою кімнатної температури. У кристалізаторі під водою обережно поновити зріз гілки на 1-2 см з метою видалення повітря з провідних судин і швидко закрити пробкою (з вмонтованою гілкою) резервуар потометра так, щоб під пробкою не залишилось бульбашок повітря. При нахиленні потометра трубкою вниз меніск не повинен пересуватись.

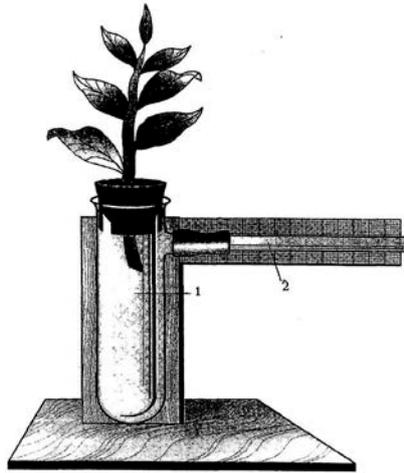
3. Зафіксувати час досліду, відмітити початкове положення меніска води у капілярній трубці та через кожні три хвилини розраховувати швидкість поглинання води гілкою рослини. Дані занести в таблицю 2.2.

4. Дослід повторити, замінюючи воду кімнатної температури на теплу ($40\text{ }^\circ\text{C}$), а потім на 1М розчин NaCl.

5. Заміряти діаметр капілярної трубки та визначити кількість води, яку поглинає гілка за хвилину при різних умовах досліду. Одержані результати записати в таблицю 2.2.

Таблиця 2.2.

Варіант досліду	Положення меніска			Об'єм води, що поглинається
	вихідне	через 3 хв	через 6 хв	
Вода кімнатна				
Вода тепла $40\text{ }^\circ\text{C}$				
NaCl				



1. резервуар
2. горизонтальна та капілярна трубка, що зафіксована на міліметровій лінійці

Рис. 2.1. Потометр для визначення швидкості поглинання води рослиною

Контрольні запитання.

1. Дайте визначення транспірації. Поясніть хід транспірації протягом доби.
2. Що лежить в основі нижнього та верхнього кінцевого двигуна водного потоку рослин?
3. Від дії яких факторів залежить швидкість поглинання води рослиною?
4. Які існують методи вимірювання транспірації?
5. Яка роль і функції транспірації в житті рослин?
6. Що забезпечує безперервний потік? Пояснити явище адгезії і когезії?

РОБОТА 8.

ВИЗНАЧЕННЯ СИСНОЇ СИЛИ ТКАНИН ЗА ЗМІНОЮ КОНЦЕНТРАЦІЇ РОЗЧИНУ (за методом Шардакова)

Сисна сила – це сила з якою вода надходить у клітину. Сисна сила (S) обчислюється як різниця між осмотичним (P) і тургорним (T) тиском ($S = P - T$). Якщо осмотичний тиск більший ніж тургорний, клітина поглинатиме воду. За умов повного насичення клітини водою її тургорний тиск дорівнює осмотичному і тому сисна сила дорівнює нулю. Це спостерігається за високої вологості ґрунту і повітря. Сисна сила за абсолютною величиною дорівнює величині водного потенціалу клітини, але протилежна за знаком.

Якщо рослинну тканину занурити у розчин, осмотичний тиск якого менше сисної сили тканини, то клітини її поглинатимуть воду з розчину. В результаті цього концентрація розчину зростає. Навпаки, коли тканину помістити у гіпертонічний розчин, то він відбиратиме воду з клітин і буде менш концентрованим.

Відомо, що густина і показник заломлення розчинів залежать від їхньої концентрації. Використовуючи цю властивість розчинів, легко визначити найменші зміни їх концентрацій. Отже, можна зробити висновок щодо величини сисної сили тканин порівняно із сисною силою розчинів відомої концентрації, куди були занурені шматочки тканин.

Мета роботи. Ознайомитися зі станом клітин у гіпо- та гіпертонічному розчинах і визначити величину сисної сили досліджуваних рослинних тканин.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки кімнатних рослин, бульби, коренеплоди, вирощені за різних умов; 0,5 М розчин CaCl_2 або 1 М розчин сахарози, метиленовий синій; штативи з пробірками, свердла, препарувальні голки, мікропіпетки або піпетки Пастера.

Хід роботи.

1. З вихідного 0,5 М розчину CaCl_2 приготувати серію розчинів менших концентрацій: 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,11; 0,13; 0,15 М (по 10 мл у кожній пробірці).

Примітка. При використанні розчину сахарози концентрації розчинів мають бути приблизно вдвічі більші.

2. Пробірки з розчинами CaCl_2 поставити у перший ряд штатива. З кожної із них набрати по 0,5 мл розчину і перенести у менші пробірки другого ряду штатива, закрити корками для запобігання випаровування.

3. Свердлом (діаметром 0,8-1,0 см) вирізати диски з досліджуваних об'єктів (листки пеларгонії, примули, бегонії, пластинки коренеплодів тощо). У кожен пробірку другого ряду занурити по два диски тканини на 30 хв.

Примітка. Вміст пробірок впродовж експонування рослинних тканин періодично струшують.

4. Диски вийняти з розчинів (препарувальними голками), розчини підфарбувати метиленовим синім (мокрый кінчик голки занурити в порошок барвника і розбовтати в пробірці).

5. Мікропіпеткою об'ємом 0,5 мл або тонкою скляною трубочкою з відтягнутим кінцем набрати забарвлений розчин із першої пробірки другого ряду і опустити її до середини прозорого розчину відповідної пробірки першого ряду і повільно випустити забарвлену рідину, поступово піднімаючи піпетку.

Примітка. На білому фоні спостерігають, в якому напрямку у безбарвному розчині рухається струмок забарвленої рідини.

Якщо концентрація i , отже, питома густина розчину після перебування в ньому тканини виявиться більшою, ніж у відповідного безбарвного розчину у вищій пробірці, то струмок буде опускатися вниз у вигляді блакитного згустку.

Якщо ж забарвлений розчин матиме меншу концентрацію і меншу питому густина, то блакитний струмок буде підніматися вгору. Таку маніпуляцію виконують з усіма парами розчинів у відповідних пробірках, позначаючи напрямок руху струмків. У зв'язку з тим, що кожна пара пробірок першого і другого ряду містила спочатку розчини однакової концентрації, тому за зміною концентрації розчинів у пробірках другого ряду можна визначити, з яких розчинів тканина поглинала воду, а в які віддавала її.

6. Визначити концентрацію ізотонічного розчину, тобто розчин концентрація якого не змінилась після перебування в ньому досліджуваного об'єкта.

7. Дані записати у таблицю 2.3 і розрахувати величину осмотичної сили в атмосферах.

Таблиця 2.3.

**Визначення ізотонічної концентрації
за напрямом руху струменя забарвленої рідини**

Концентрація розчину, М	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15
Напрямок руху струменя								

Примітка. Величина осмотичного потенціалу визначеного ізотонічного розчину для досліджуваної тканини у цьому разі збігається з величиною осмотичної сили.

$$S = P$$

Величину P визначають за формулою:

$$P = RTCi,$$

де P – осмотичний тиск, МПа; R – універсальна газова стала, $8,317 \cdot 10^{-3}$ Дж/(кМоль·К); T – абсолютна температура, $273^\circ + t$ °С (К); C – концентрація розчину, моль/л; i – ізотонічний коефіцієнт, який визначають за формулою $i = 1 + a(n-1)$, де a – ступінь дисоціації речовини (табл.6); n – кількість йонів, на які дисоціює молекула (для CaCl_2 – це 3, для неелектролітів $n = 1$).

Таблиця 2.4.

Значення ступеня дисоціації (α) для розчинів CaCl_2 різної концентрації

Концентрація розчину CaCl_2 (М)	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15
Ступінь дисоціації (α)	0,90	0,86	0,82	0,79	0,76	0,73	0,72	0,71

8. Зробити висновки.

Контрольні запитання.

1. Що таке сисна сила клітин? Від яких факторів залежить її величина?
2. За якою формулою і в яких одиницях визначають сисну силу клітин?
3. Чому під час використання розчинів сахарози замість CaCl_2 концентрації їх мають бути вдвічі більші?
4. Для чого розчини зафарбовують у малих пробірках другого ряду?
5. На якому фізичному явищі базується можливість спостереження напрямку руху струмків?
6. Які фактори впливають на точність досліджу?

РОБОТА 9.

**ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ВОДИ ТА СУХОЇ
РЕЧОВИНИ У РОСЛИНАХ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП**

Вміст води у рослинах змінюється в широких межах і залежить від віку, фізіологічного стану, хімічного складу рослин та впливу на них різноманітних факторів середовища. Саме тому, визначення загального вмісту води є, як правило, обов'язковим в різноманітних дослідженнях. Вміст води у рослинних тканинах вираховують в процентах від сирої маси.

Мета роботи. Визначити вміст води та сухої речовини у рослинах різних екологічних груп.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини, сухе і проросле насіння різних видів; аналітичні ваги, бюкси, сушильні шафи, ексікатор, щипці, свердла (діаметр 5-8 мм), шматочки гуми 5x5 см.

Хід роботи.

1. Вимити бюкси і висушити їх до постійної маси. Для цього відкриті бюкси витримати 60-90 хв. в шафі за 100-105°C, потім охолодити їх в

ексикаторі, закрити кришками і зважити на аналітичних терезах. Висушування і зважування бюксів повторюють доти, доки їх маса не стане сталою.

2. Рослинний матеріал відібрати за варіантами. Висічки з листків, зроблені свердлом у трикратній повторності, вмістити в бюкси і зважити на аналітичних терезах. Потім поставити відкритими в нагріту до 105°C сушильну шафу на 5 год., охолодити в ексикаторі і знову зважити. Висушування і зважування матеріалу повторювати до досягнення постійної маси бюксів.

Примітка. Під час роботи слід дотримуватися таких правил. Сирий матеріал повинен лежати в бюксах пухко. Не можна витримувати його в шафі без перерви понад 5 год. Бажано розмістити бюкси на одному рівні з кулькою термометра і не впритул до стінок шафи. Брати бюкси слід щипцями, а не руками, тому що в останньому випадку маса буде змінюватись.

3. Розрахувати масу води в наважці, яка дорівнює різниці мас сирого і висушеного матеріалів. Потім розрахувати вміст води в процентах відносно до сирої та сухої мас рослинного матеріалу.

4. Результати записати у таблицю 2.5.

Таблиця 2.5.

**Визначення вмісту води та сухої речовини
у рослин різних екологічних груп**

Назва рослин, ярус, варіант	Номер бюкса	Маса бюкса, г	Маса бюкса з сирою наважкою, г	Маса сирої наважки, г	Маса бюкса з сухою наважкою, г	Маса сухої наважки, г	Вміст води в пробі, г	Вміст води, %

4. Зробити висновки.

Контрольні запитання.

1. Про що свідчать результати ваших досліджень?
2. Які пристосування виробились у рослин до умов недостатнього водозабезпечення?
3. Які пристосування виробились у рослин до умов надмірного зволоження?
4. Що таке плач рослин й чому він відбувається?
5. Як відрізняються між собою за особливостями водного режиму рослини закритого й відкритого ґрунтів?

РОБОТА 10.

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСПІРАЦІЇ ТА ВІДНОСНОЇ ТРАНСПІРАЦІЇ ВАГОВИМ МЕТОДОМ

Транспірація (випаровування води рослинами) вимірюється кількістю випаруваної води одиницею листової поверхні за одиницю часу. Величина транспірації залежить від багатьох факторів (температури, освітлення, водопостачання тощо), а також змінюється впродовж доби в межах $10-300 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$.

Одним із методів визначення інтенсивності транспірації є ваговий, який базується на обліку кількості випаруваної води. Цим методом можна визначити транспірацію цілої рослини або її частини.

Відносна транспірація – відношення інтенсивності транспірації до інтенсивності випаровування з вільної водної поверхні за тих самих умов. Цей показник характеризує здатність рослин регулювати транспірацію і становить $0,1-0,5$, піднімаючись до 1 , а у добре захищених від втрати води рослин дорівнює $0,01$ і менше.

Мета роботи. Визначити інтенсивність транспірації та відносну транспірацію залежно від впливу деяких факторів (температури, вітру тощо).

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини; олія; технічні ваги з наважками, чашки Петрі, звичайний і міліметровий папір, лінійки, вентилятор, ножиці.

Хід роботи.

1. В пробірку налити воду, в яку занурити черешок листка (гілку). Попередньо зрізи поновити з метою видалення з трахей і трахеїд повітря.

2. На поверхню води в пробірці нанести 1-2 краплини рослинної олії і ретельно зважити її з точністю до третього знаку. За одну годину повторно зважити і визначити кількість випаруваної води.

3. Отримати величину інтенсивності транспірації, поділивши кількість випаруваної води в грамах на площу поверхні листової пластинки (см^2).

4. Визначити площу поверхні листка. Для цього вирізати з паперу квадрат площею 100 см^2 ($10 \times 10 \text{ см}$) і зважити. Папір повинен бути рівномірним за щільністю. На цей квадрат накласти листок, який був у досліді, і гострим олівцем обвести контур його. Вирізати контур листка, встановити масу його і вирахувати площу за пропорцією. Поверхню листка ще простіше визначити після нанесення його контуру на міліметровий папір.

5. Обчислити інтенсивність транспірації T (в $\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{год}^{-1}$) за формулою:

$$T = \frac{10000 \cdot C}{S \cdot t}$$

де С – кількість випаруваної листком води за 1 год, г; t - тривалість дослідів, год; S – площа листка, см².

6. Паралельно, за тих самих умов, визначити інтенсивність випаровування води з вільної водної поверхні (Е). Для цього встановити кількість випаруваної води за 1 год з поверхні чашки Петрі. Площу поверхні чашки Петрі підрахувати за формулою:

$$S = \pi r^2.$$

7. Розрахувати Е за раніше наведеною формулою інтенсивності транспірації і обчислити величину відносної транспірації (ВТ):

$$ВТ = T/E.$$

Примітка. У досліді вивчити, як умови (освітленість, швидкість вітру та ін.) впливають на інтенсивність транспірації.

8. Порівняти різні види рослин і зробити висновки про здатність їх регулювати транспірацію.

9. Результати дослідів записати в таблиці 2.6. та 2.7.

Таблиця 2.6.

**Визначення інтенсивності транспірації
ваговим методом**

Варіант дослідів	Транспірація				Інтенсивність транспірації (Т), г м ³ год
	Маса пробірки з листком, г		Випарувалось води, г	Площа листка, см ³	
	на початку дослідів	в кінці дослідів			

Таблиця 2.7.

Визначення інтенсивності випаровування водиз вільної поверхні

Варіант дослідів	Випаровування				Інтенсивність випаровування (Е), г м ² год.	Т/Е
	Маса чашки Петрі з водою, г		Втрата води, г	Площа поверхні, см ³		
	на початку дослідів	в кінці дослідів				

10. Зробити висновки.

Контрольні запитання.

1. Що таке транспірація рослин?
2. Яке значення транспірації для рослин?
3. Що таке відносна транспірація?
4. Від яких факторів середовища залежить інтенсивність транспірації?
5. Якими методами можна обчислити площу поверхні листка?
6. Для чого в пробірку з листком наливають краплину олії?
7. Поясніть чому інтенсивність освітлення (вологість повітря, концентрація CO₂ тощо) впливають на інтенсивність транспірації.
8. Який вплив транспірації на продуктивність рослин?

РОБОТА 11.

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ТРАНСPIPAЦІЇ У РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП РОСЛИН (за Івановим)

Метод базується на визначенні зміни маси зрізаного листка за короткий (до 5 хв.) проміжок часу, що дає змогу спостерігати транспірацію при тому стані насичення листка водою, в якому він перебував на інтактній рослині. За більш тривалої експозиції вміст води в листку зменшується, що відповідно зумовлює зменшення інтенсивності транспірації.

Мета роботи. Встановити інтенсивність транспірації у представників груп гігро-, мезо- і ксерофітних рослин в кімнатних умовах і за дії вітру.

Матеріали, реактиви, обладнання. Двотижневі проростки пшениці або кукурудзи; листки рослин різних екологічних груп, торсійні ваги, вентилятор, ножиці.

Хід роботи.

1. На торсійних терезах швидко зважити листки одного ярусу з 5 рослин.
2. За 5 хв. після зважування першого листка, вдруге зважити всі листки в тій самій послідовності.
3. Результати записати в таблицю 2.8.

Таблиця 2.8.

Визначення інтенсивності транспірації у листках різних рослин

Варіант досліджу	Маса листка, г	Повторність			Сумарна маса 10 листків, г	Втрата води 10 листами, г	Т, Г м ³ год
		1	2	3			
1.	Початкова						

2.	Через 5 хв.				
----	-------------	--	--	--	--

3. Виконати розрахунки за сумарною масою 5 листків кожного варіанту.

4. Визначити інтенсивність транспірації за кімнатних умов (контроль) і сухого теплого вітру (з вентилятором).

Примітка. Можна дослідити інтенсивність транспірації на представниках гігро-, мезо- та ксерофітів у природних умовах зростання.

Контрольні запитання та завдання.

1. Поясніть, чому вимірювання інтенсивності транспірації обмежують 5-хвилинним інтервалом.

2. Які існують пристосування у рослин для регуляції транспірації?

3. Чому під час транспірації води тіло рослини охолоджується ?

4. Чи відомі вам інші механізми тепловідведення крім транспірації ?

5. Проведіть порівняльний аналіз механізмів регуляції транспірації у гідро-, мезо- та ксерофітних груп рослин.

РОБОТА 12.

СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ДИНАМІКОЮ ТРАНСПІРАЦІЇ НА ГІЛКАХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН ВПРОДОВЖ ДНЯ

Інтенсивність транспірації змінюється під впливом факторів навколишнього середовища (температури, освітлення, спектрального складу, вологості повітря тощо). Переконалися в цьому можна провівши досліди зі зрізаними гілками різних деревних порід.

Мета роботи. Провести спостереження за інтенсивністю транспірації у різних видів рослин під впливом факторів навколишнього середовища.

Матеріали, реактиви, обладнання. Гілки деревних рослин (ялини, дуба, липи, бузку та ін.); бюретки місткістю 50 мл, гумові трубки з затискачами, кристалізатор, гумові пробки, свердла, гострий ніж, ваги з наважками, парафін, міліметровий папір, вентилятори.

Хід роботи.

1. Бюретки місткістю 50 мл з гумовою трубкою та затискачем заповнити водою і закрити гумовою пробкою з отвором. Воду для цього взяти відстояну в кристалізаторі впродовж доби з метою видалення розчинених в ній газів.

2. Підрізати під водою дослідні гілки і щільно вставити в отвори пробок (нижні кінці гілок попередньо очистити від кори на 10-12 мм).

Примітка. Бюретки з гілками перевернути донизу і перевірити герметичність приладу (вода не повинна витікати з бюретки).

3. Відкрити затискач і встановити рівень води в бюретці на верхній поділці.
4. Штативи з приладами виставити в умовах досліду і відмічати рівень води в бюретці з інтервалом 2 год.
5. Результати записати в таблицю 2.9.

Таблиця 2.9.

Визначення інтенсивності транспірації рослин

Вид рослини	Випаровування води, мл								Інтенсивність транспірації, г м ² год ⁻¹
	години	8	10	12	14	16	18	20	

6. У польових умовах одночасно провести метеорологічні спостереження.
7. Після досліду визначити площу листків. Щоб визначити поверхню випаровування у хвойних порід (сосни, модрина) обірвати хвою, зважити її і обчислити площу, враховуючи, що 1 сирої хвої сосни відповідає 33 см², а 1 г сирої хвої модрина відповідає площі 150 см².
8. Розрахувати інтенсивність транспірації для кожного виду рослин і побудувати діаграми.

Контрольні запитання.

1. Яке значення має процес транспірації у життєдіяльності рослин?
2. Чому змінюється інтенсивність транспірації впродовж дня? Який характер цих змін?
3. Як довго можуть функціонувати гілки в такому пристрої?
4. Які пристосування для регуляції транспірації у хвойних порід?
5. Чому градієнт водного потенціалу є рушійною силою надходження та пересування води в рослині?

РОБОТА 13.

ВИЗНАЧЕННЯ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РОСЛИН

Водний дефіцит – це нестача води, виражена у відсотках від загальної кількості її при повному насиченні тканин водою. Він може виникати у разі порушення водопостачання рослин і спричинювати тимчасові або тривалі зміни в інтенсивності біохімічних та фізіологічних процесів, що відбивається на

продуктивності рослин. Тому цей показник використовують для оцінки рівня водозабезпеченості та діагностики поливу рослин.

Мета роботи. Визначити водний дефіцит у рослин за різних умов їх водозабезпечення.

Матеріали, реактиви, обладнання. Дослідні рослини в різних умовах водопостачання; дистильована вода; сушильна шафа, аналітичні ваги, бюкси, ексикатори, свердла 8 мм діаметром, фільтрувальний папір, щипці, фанерні або гумові пластинки, чашки Петрі або пробірки в штативах, піпетки.

Хід роботи.

1. Свердлом з діаметром 8 мм зробити 10 висічок з листка, намагаючись обминути товсті жилки.

2. Висічки зважити і помістити у воду (в чашках Петрі або пробірках) на 2 год для насичення тканин водою.

3. Тургесцентні висічки просушити фільтрувальним папером і зважити.

4. Для контролю диски знову занурити у воду і за 30 хв. зважити повторно.

Примітка. У разі повного насичення тканин водою їхня маса залишається такою самою, як і в попередньому зважуванні.

5. Визначити масу сухої речовини в тканині.

6. На основі одержаних даних обчислити показники водного дефіциту (ВД) у рослин:

$$\text{ВД} = \frac{a - b}{a} \cdot 100\%,$$

де a – кількість води у висічках за їх водонасичення, г; b – початковий вміст води у висічках, г; 100 – коефіцієнт для перерахунку ВД, %.

7. Обчислити відносну тургесцентність (ВТ), яка показує, яку частку у відсотках становить початкова кількість води в листках від вмісту її в стані насичення:

$$\text{ВТ} = \frac{в - г}{д - г} \cdot 100\%,$$

де $в$ – маса сирої тканини до занурення її у воду, г; $г$ – маса сухої тканини до занурення її у воду, г; $д$ – маса тургесцентної тканини після насичення її водою, г.

8. Розрахувати дефіцит відносної тургесцентності (ДВТ) – кількість води, яка потрібна для досягнення листками рослин тургесцентного стану:

$$\text{ДВТ} = 100\% - \text{ВТ}.$$

9. Результати досліджень записати в таблицю 2.10.

Таблиця 2.10.

Визначення водного дефіциту та тургесцентності рослин

Варіант дослідду	Маса бюкса, г	Сира маса, г	Суха маса, г	Початковий вміст води, г	Кількість води в стані тургесцентності, г	Показники водозабезпечення, %		
						ВД	ВТ	ДВТ

10. Зробити висновки.

Контрольні запитання.

1. Що називають водним дефіцитом?
2. Якими показниками характеризують водний дефіцит рослин?
3. Який вплив водного дефіциту на фотосинтез?
4. Поясніть наступні терміни: польова вологоємність, мертвий запас води в ґрунті, вологість в'янення.
5. Чи є різниця у водовіддачі різних рослин і в чому вона полягає?
6. Як відрізняються за водовіддачею листки рослин з різних місць зростання (затінені й освітлені), з різним шаром кутикули та жилкуванням?
7. Яке значення товщини кутикули листка в його водовіддачі?

Контрольні запитання до розділу „Водний режим рослин”

1. Що зумовлює поглинання води коренями у разі слабкої та сильної транспірації? Як вода рухається від кореневих волосків до ксилеми центрального циліндра?
2. Чому під час посухи не можна підживлювати рослини?
3. Посуха і засолення ґрунтів аналогічно впливають на поглинання води рослинами. Як це можна пояснити?
4. У рослини, корені якої занурені у воду, при додаванні солей настає в'янення. Через деякий час тургор може відновитися. Як це можна пояснити?
5. Поясніть, чому вода у деревних рослин піднімається на висоту, значно більшу ніж 10 м (максимально на таку висоту можна підняти воду механічним насосом).
6. Як можна виміряти швидкість пересування води в стовбурах дерев, не порушуючи їхньої цілісності?
7. Що запобігає розриву водних тяжів у ксилемі?

8. При хлорозі кукурудзи дуже сильно знижуються фотосинтез і поглинання іонів калію. Опишіть, який зв'язок між фотосинтезом і надходженням калію в рослину?
9. Як пояснити в'янення теплолюбних рослин за низьких позитивних температур?
10. По якій тканині стебла йде висхідний потік?
11. Маса листка клена в стані повного насичення 1,53 г, а після в'янення – 1,26 г. Якою буде величина водного дефіциту листка (у відсотках), якщо маса сухої речовини дослідного листка 0,67 г?
12. Як пояснити механізм закривання та відкривання продихів?
13. Які шляхи випаровування води рослиною, крім продихів?
14. Які існують механізми відведення тепла від рослини, крім транспірації?
15. Що таке водний баланс рослини і які його складові частини?
16. Що таке водний дефіцит і які види його ви знаєте?
17. Яка інтенсивність транспірації листків липи площею 780 см², коли відомо, що за 20 хв. їхня маса зменшилася з 21,7 до 12,7 г?
18. Що таке відносна транспірація і про що вона свідчить?
19. Що розуміють під транспіраційним коефіцієнтом? Рослина кукурудзи за вегетаційний період випаровує 600 кг води і нагромаджує 3 кг сухої речовини. Який у неї транспіраційний коефіцієнт?
20. Що таке продуктивність транспірації? Підрахуйте продуктивність транспірації, якщо відомо, що за вегетаційний період рослини пшениці випарували 525 кг води і утворили 2,5 кг органічної маси.
21. Що таке водний потенціал і які його складові?
22. Які анатомо-морфологічні пристосування рослин сприяють посиленню їхньої водоутримної здатності?
23. Які структурні та функціональні показники можна використовувати для діагностики стану водозабезпечення рослин?
24. Чому тріскаються зрілі плоди томатів, черешень, вишень після інтенсивних тривалих дощів?

РОЗДІЛ 3. ФОТОСИНТЕЗ

Фотосинтез – унікальний в фізико-хімічному відношенні процес, який збільшує вільну енергію біосфери за рахунок зовнішнього джерела – Сонця і забезпечує існування як рослин, так і усіх гетеротрофних організмів, у тому числі й людини. Зараз важко, а то і зовсім неможливо знайти будь-які природні

явища, які не поєднані з фотосинтезом. Із накопиченням знань про механізми даного процесу фотосинтез визначають як фототрофну функцію деяких бактерій, водоростей та вищих рослин.

Фототрофна функція – це сукупність процесів поглинання, перетворення та використання в багатьох ендергонічних реакціях світлових квантів, у яких відбувається первинне становлення пластичних та енергетичних ресурсів життя на нашій планеті.

Особливістю рослинної клітини є наявність у ній хлоропластів, у яких утворюється органічна речовина із CO_2 і H_2O за рахунок енергії Сонця.

Фотосинтез – це окисно-відновний процес. За участю хлорофілу й енергії сонячних квантів вода фотоокиснюється, в результаті чого виділяються кисень та водень, останній і відновлює вуглекислий газ до рівня вуглеводів. Ці реакції відбуваються відповідно в світлову та темнову фази фотосинтезу.

У тилакоїдах хлоропласта відбуваються світлові реакції фотосинтезу: уловлювання квантів світла пігментами – хлорофілом, каротиноїдами, фікобілінами, фотоокиснення води, транспортування електронів за участю електронно-транспортного ланцюга з утворенням відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату ($\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$) і макроергічних сполук аденозинтрифосфату (АТФ).

Певна частина синтезованих у світлових реакціях $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ і АТФ у подальшому використовується в процесі синтезу органічних сполук із вуглекислого газу та води. Ці реакції відбуваються у стромі хлоропласта і їх називають темновими реакціями фотосинтезу, бо кванти світла в них безпосередньо не беруть участі. Стромною називають внутрішній вміст хлоропластів, де локалізовані ферменти, які фіксують та відновлюють вуглекислий газ до вуглеводів.

Засвоєння вуглекислого газу в хлоропласті, тобто асиміляція його вуглецю до складу органічних сполук, відбувається в складному циклі реакцій Кальвіна–Бенсона–Бассема. Найголовнішим ферментом темного циклу є рибулозобісфосфат-карбоксилаза (оксигеназа) – РУБІСКО, яка забезпечує приєднання вуглекислоти до п'ятивуглецевої сполуки – вуглеводу рибулозобісфосфату. Утворений унаслідок такої реакції короткоіснуючий шестивуглецевий продукт розпадається з формуванням двох тривуглецевих молекул фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Відновлення молекули ФГК до фосфогліцеринового альдегіду і є власне відновлювальною реакцією на шляху перетворення вуглекислого газу в молекулу вуглеводу.

Наступні складні перетворення сполук у циклі Кальвіна–Бенсона–Бассема забезпечують регенерацію молекул рибулозобісфосфату для приєднання нової молекули CO₂, а також зумовлюють утворення стабільного продукту фотосинтезу – шестивуглецевого вуглеводу – глюкози.

Усі фотосинтезуючі організми містять пігменти, які запускають фотофізичні та фотохімічні реакції фотосинтезу. Найважливіші з них хлорофіли та каротиноїди, тому розділ «Фотосинтез» розпочинається з практичних занять, що розкривають хімічні та фізичні властивості фотосинтезуючих пігментів.

Пігменти локалізовані в тилакоїдах хлоропластів, де пов'язані з мембранними білками і ліпідами. Для екстракції пігментів з рослинного матеріалу використовують полярні розчинники – етиловий спирт або ацетон, які денатурують білки і руйнують пігментліпопротеїновий комплекс.

Для характеристики фотосинтетичного апарату рослинних організмів використовують такі параметри, як кількісний вміст окремих пігментів, їх співвідношення і фракційний склад, міцність зв'язку хлорофілів із білком, фотохімічну активність, залежність вмісту пігментів від умов освітлення, живлення, етапів онтогенезу тощо. Досліджують також хімічне перетворення хлорофілів у хлорофілід і феофітин. Важливою характеристикою фотосинтезуючих пігментів є спектри поглинання світлової енергії та флуоресценції, активність ферменту хлорофілази, яка бере участь у біосинтезі хлорофілів.

Різні види пігментів розпізнають за допомогою їхніх спектральних характеристик. Наприклад, спектри поглинання у різних груп хлорофілів залежать від характеру бічних груп пірольних кілець порфіринового ядра молекули і типу органічного розчинника. Потім виконують роботи, в яких визначають активність функціонування різних ферментів, інтенсивність фотосинтезу за накопиченням органічних сполук у тканинах і зміною концентрації вуглекислого газу або кисню в навколишньому середовищі (газометричні методи) на одиницю фотосинтезуючої поверхні за одиницю часу.

РОБОТА 14

ЕКСТРАКЦІЯ ПЛАСТИДНИХ ПІГМЕНТІВ

Пігменти з фотосинтезуючих тканин рослини екстрагують полярними розчинниками (етиловим спиртом, ацетоном), які руйнують їхній зв'язок із мембранами хлоропластів і тим самим забезпечують повне екстрагування пігментів. Під час розтирання матеріалу з неполярними розчинниками, які не здатні денатурувати білки, в екстракт переходить незначна кількість

пігментів. Розтертий матеріал у спирті залишається зеленим і тоді, коли в ньому спостерігається висока активність ферменту хлорофілази, яка відщеплює спирт *фітол* від хлорофілу. Тоді утворюється *хлорофілід* зеленого кольору з такими самими спектральними характеристиками, що і хлорофіли, але з гідрофільними властивостями. Тому хлорофілід не розчиняється в полярних розчинниках, а осад на фільтрі після екстракції фотосинтетичних пігментів залишається зеленим.

Для отримання витяжки пігментів можна використовувати як сирий, так і сухий матеріал. В останньому випадку висушені листки попередньо обробляють гарячою водою, щоб спростити процедуру вилучення пігментів з них.

Мета роботи. Отримати екстракт пластидних пігментів із рослин різних систематичних груп, проаналізувати повноту екстракції пігментів використовуючи воду, полярні та неполярні розчинники.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки пеларгонії, проростки гороху, кукурудзи, пшениці; ацетон, етиловий спирт, петролейний ефір або гексан, карбонат кальцію; порцелянові ступки, скляні пластинки для подрібнення матеріалу, скляні палички, фільтри Шотта N 3 або N 4, колби Бунзена, центрифужні та мірні пробірки, ножиці, свердла, вакуумні насоси, ваги з різноважками.

Хід роботи.

1. Листки різних рослин подрібнити ножицями або скальпелем.
2. Подрібнену наважку (0,2.0,5 г) розтерти у ступці, додаючи на кінчику скальпеля CaCO_3 для нейтралізації кислот клітинного соку.
3. Зволожити матеріал незначною кількістю розчинника, розтерти до гомогенної маси і кількісно перенести на фільтр Шотта, змиваючи багаторазово ступку невеликими порціями ацетону (варіант перший), спирту (варіант другий), петролейного ефіру (варіант третій) і водою (варіант четвертий).
4. Фільтр Шотта вставити в пробірку, що міститься в колбі Бунзена, яку з'єднати із насосом.
5. Розчини відфільтрувати, змиваючи стінки фільтра невеликими порціями розчинника доти, поки відфільтрована рідина настане безбарвною.
6. Об'єм розчину довести відповідними розчинниками до 10 мл.
7. Вміст у пробірці збовтати. Порівняти забарвлення розчинів візуально.
8. Визначити екстинцію отриманих екстрактів на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 660 нм.

Примітка. У контрольну кювету наливають розчинник, а віншу – досліджуваний розчин.

9. Результати спостережень записати до таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Ефективність використання різних органічних розчинників для екстракції пластидних пігментів

Рослина	Варіант досліду, використаний екстрагент	Оптична густина розчину, ум. од.
	Ацетон	
	Спирт	
	Петролейний ефір	
	Вода	

10. За величиною екстинції розчинів зробити висновок про розчинність пластидних пігментів у різних розчинниках. Пояснити одержані дані, враховуючи стан пігментів у хлоропластах їх хімічну природу.

Контрольні запитання та завдання

1. Чому вода не екстрагує пігменти хлоропластів?
2. Чим можна пояснити наявність каламуті в водно-ацетонових розчинах пластидних пігментів?
3. Чим можна пояснити той факт, що після промивання 80 %-им ацетоном або 96 %-им етиловим спиртом осад із листків персика і борщівника залишається зеленим?
4. Які пігменти залишаються в осаді у разі використання таких розчинників як петролейний ефір або гексан?
5. Що входить до складу екстрактів пігментного комплексурізних рослин?
6. Як змінюється колір пігментних екстрактів за дії світла, що проходить крізь розчин або відбивається від нього?
7. Який колір має розчин пігментів, що флуоресціюють?

РОБОТА 15

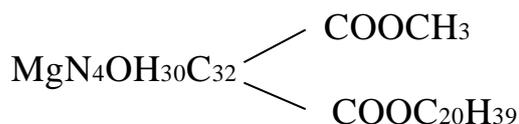
ВИЯВЛЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХЛОРОФІЛУ

Весь пігментний комплекс зосереджений в спеціалізованих органелах клітини — хлоропластах. Пігменти — це сполуки, що вибірково поглинають світло у видимій частині спектра.

Пластидні пігменти поділяють на три класи: хлорофіли, фікобіліни та каротиноїди.

Хлорофіли обумовлюють зелений колір рослин. Основний пігмент, що забезпечує проходження процесу фотосинтезу — хлорофіл а ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$). Поглинаючи сонячну енергію, він здійснює трансформацію, забезпечує утворення органічних сполук і виділення молекулярного кисню (яким ми дихаємо). В фотосинтезуючому рослинному організмі є пігменти допоміжні: хлорофіл b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), каротиноїди.

Хлорофіли — складні ефіри дикарбонової хлорофілінової кислоти з двома спиртами: метилового спирту та фітолу:



Хроматографічно хлорофіли було розділено на: хлорофіл а ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) та хлорофіл b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$).

Гідрофільні властивості хлорофілів пов'язані з їхнім азотовмісним порфі-риновим ядром. Завдяки вуглецевому ланцюгу — "довгому хвосту" фітолу, що приєднується до порфіринової частини молекули, хлорофіли набувають гідрофобних властивостей, добре розчиняються в ацетоні, спирті, бензині та нерозчинні у воді.

Хлорофіли та каротиноїди складають постійний набір пігментів хлоропластів в листках вищих рослин. Оскільки вони є найважливішими компонентами фотосинтетичного апарата, їх досліджують насамперед як пігменти фотосинтезу.

Реакція Крауса основана на різній розчинності пігментів в одному і тому ж розчиннику — спирті (бензині). Завдяки цьому методу можна розділити пластид-ні пігменти, тобто розділити хлорофіли та каротиноїди із загального екстракту.

Мета роботи: дослідити розподіл пігментів за методом Крауса, навчитися робити спиртову витяжку суміші пластидних пігментів з фотосинтезуючих тканин дослідних об'єктів, прослідкувати реакцію омилення хлорофілу.

Прилади та матеріали: 96% етиловий спирт, бензин (ефір, бензол, ацетон), NaOH (KOH), вода, крейда — $CaCO_3$, кварцевий пісок (подрібнене скло), фільтрувальний папір (вата), скляні палички, лійки, мірні циліндри, пробірки, піпетки, зелені листки дослідних об'єктів.

Хід роботи

1. Отримання спиртової екстракції пластидних пігментів з листків

Для цього наважку (1-2 г) листків дослідних рослин розтерти в ступці до однорідної маси. Додати в ступку на кінчику скальпеля крейди (для нейтралізації кислот клітинного соку) і подрібнене скло або кварцевий пісок. Добре розтерти. В ступку до гомогенної маси влити невелику кількість етилового спирту. Перемішати скляною паличкою та профільтрувати. Отриманий розчин (0,5 частини пробірки) суміші пластидних пігментів листків повинен мати концентрований зелений колір.

2. Розподіл пігментів (за методом Крауса). Одержання хлорофілінів.

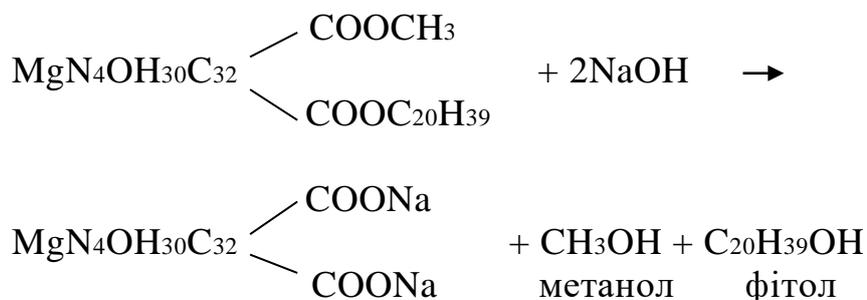
В отриманій спиртовій екстракції пластидних пігментів з листків дослідних рослин містяться пігменти, за участю яких проходить процес фотосинтезу: хлорофіл, що має довгий вуглеводний "хвіст" та каротиноїди. Пігменти розподіляють за Краусом завдяки їхній різній розчинності у спирті (бензині, бензолі, ацетоні).

При додаванні лугу до розчину хлорофілу відбувається реакція омилення хлорофілу: відщеплюються спирти фітол і метанол, а двоосновна кислота хлорофілу утворює сіль: Солі хлорофілів мають зелений колір, але на відміну від хлорофілу не розчинні у бензині.

З отриманої спиртової екстракції пластидних пігментів листків дослідних рослин відібрати в пробірку 3 мл і додати 5 мл бензину та 2-3 краплини води. Пробірку щільно закрити пробкою і збовтати. Протягом 5-10хв. відбудеться розділення пігментів: у верхньому зеленому (бензиновому) шарі міститься розчинений хлорофіл, а нижньому жовтому (спиртовому) – ксантофіл. Зробити висновки. Пробірки замалювати.

3. Реакція омилення хлорофілу.

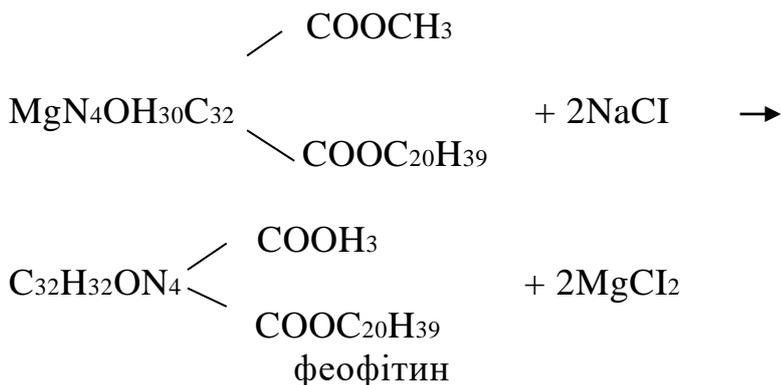
Після розділення, в пробірку додати 10-15 крапель 20% розчину лугу (KOH або NaOH). Добре перемішати. Протягом 5-10 хвилин шари зеленого та жовтого забарвлення поміняються місцями, внаслідок утворення солі хлорофілінової кислоти (реакція омилення хлорофілу).



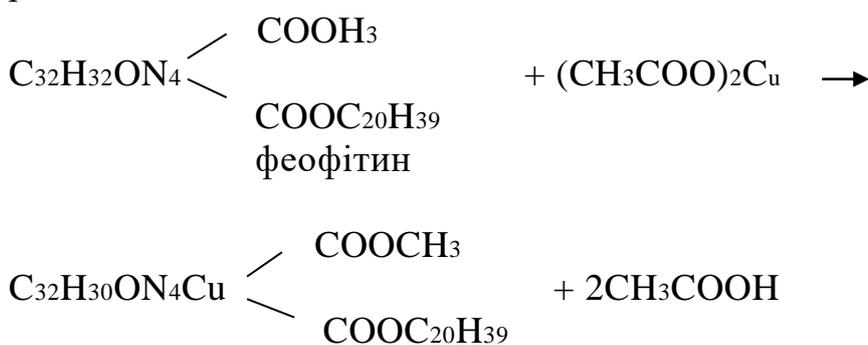
Каротин знаходиться у верхньому (жовтому) шарі, а солі хлорофілінової кислоти, як і хлорофіл, мають зелений колір, але гідрофільні властивості, тому переходять у нижній водно-спиртовий шар. Пробірки зарисувати.

4. Одержання феофітину та зворотне заміщення водню атомом металу

До 2-3 мл спиртового екстракту пластидних пігментів з листків дослідних рослин помістити у дві пробірки (одна з яких — контрольна). В першу пробірку додати 2-3 краплини 20% розчину соляної кислоти. Зелене забарвлення змінюється на буре в результаті утворення феофітину.



В контрольну пробірку додати 2-3 краплини води. Забарвлення залишається без змін. В першу пробірку, де утворився феофітин (буре забарвлення), на кінчику скальпеля внести декілька кристалів ацетату міді (ацетату цинку). Буре забарвлення поступово змінюється на зелене за рахунок відновлення металоорганічного зв'язку, що відбувається за такою реакцією:



Пробірку зарисувати.

Контрольні запитання.

1. Яка роль належить пластидним пігментам у процесі фотосинтезу?
2. Які гідрофільні та гідрофобні властивості має хлорофіл?
3. На чому базується метод Крауса?
4. Чим хлорофілінова кислота відрізняється від її солі?
5. Поясніть реакцію омилення хлорофілу лугом.

6. Як можна виявити каротин і ксантофіл?
7. Під дією яких факторів утворюється феофітин?

РОБОТА 16

РОЗДІЛЕННЯ ПІГМЕНТІВ

ХЛОРОПЛАСТИВХРОМАТОГРАФІЧНИММЕТОДОМ

Уперше швидкий розподіл окремих компонентів із суміші фотосинтетичних пігментів методом адсорбційної хроматографії наколонках здійснив у 1904 р. М. С. Цвет. Пізніше виявилось, що ефективнішою є розподільна паперова та тонкошарова хроматографія. Основи її становить неоднаковий розподіл компонентів суміші між двома рідкими фазами, що не змішуються між собою. Одна з них рухома, інша, наприклад, хроматографічний папір, силікагель, силуфол – нерухома. Твердий носій утримує на своїй поверхні нерухома фазу розчинника (полярний розчинник). Функцію рухомої фази виконує неполярний розчинник. Досліджувану суміш сполук наносять на папір або на тонкошарову хроматографічну пластинку. Потім через хроматограму пропускають роздільну суміш розчинників. Унаслідок різниці в розчинності у певному розчиннику та різної адсорбції пігменти рухаються сорбентом з різною швидкістю й розташовуються на сорбенті окремими зонами. Чим більша розчинність пігменту в розчиннику і чим слабше він сорбується даним сорбентом, тим швидше буде він рухатися і тим далі від старту розташовуватиметься на носії його зона.

Мета роботи. Відокремити каротиноїди від хлорофілів і визначити їхній уміст у зелених листках.

Матеріали, реактиви, обладнання. Листки вищих рослин (пеларгонії, примули, плюща), суспензії водоростей; 100 %-ий ацетон, 96 %-ий розчин етилового спирту, петролейний ефір, етиловий ефір, гексан, бензин, $MgCO_3$ або $CaCO_3$, Na_2SO_4 зневоднений, кварцовий пісок; порцелянові ступки з товчачиками, скальпель, ножиці, пінцет, скляні палички, колба Бунзена, скляний фільтр № 3, мірні пробірки місткістю 10 мл, мірний циліндр місткістю 25 мл, конічні пробірки, центрифужні пробірки, піпетки об'ємом 2 і 5 мл, капіляри, хроматографічна камера з притертою кришкою, силуфольні пластинки, хроматографічний папір, фольга, ваги торсійні та центрифужні, центрифуга, канцелярські скріпки, лінійки, графітні олівці, насос Камовського або компресор, фен для підсушування хроматограм.

Хід роботи.

Отримання екстракту пігментів.

1. Наважку рослинного матеріалу (100.200 мг) подрібнити ножицями, перенести у порцелянову ступку, на кінчику скальпеля додати CaCO_3 , долити 4.5 мл спирту або ацетону та ретельно розтерти.

2. Отриманий екстракт перенести на скляний фільтр, вставлений у колбу Бунзена.

3. За допомогою насоса розчин відфільтрувати.

4. Рослинний матеріал повторно залити розчинником, розтерти та перенести на фільтр. Розчин відфільтрувати.

Примітка. Цю операцію повторюють доти, доки розчин, який стікає з фільтра, не буде абсолютно безбарвним.

5. Спиртовий екстракт пігментів перенести до мірної колбички пробірки, колбу Бунзена промити декілька разів невеликими порціями суміші і довести сумішню об'єм екстракту в мірній колбі до позначки.

Увага! Робота кількісна, не можна втрачати жодної краплі.

Отриманий екстракт містить суміш зелених і жовтих пігментів.

Хроматографічне розділення пігментів.

Розділення виконують на хроматографічному папері або силуфолових пластинках розміром 15 x 15 см.

1. Пігменти нанести капіляром по всій ширині пластинки, відступаючи на 2 см від її нижнього краю та 1 см від бічних країв. Об'єм нанесеного екстракту – 0,5-0,8 мл.

2. Хроматографічний папір або пластинку ретельно підсушити у струмені повітря, помістити у хроматографічну камеру, попередньо насичену сумішню розчинників (наприклад, бензин, ацетон, петролейний ефір, гексан в об'ємних співвідношеннях 10:10:3:10; або бензин, петролейний ефір, ацетон в об'ємних співвідношеннях 8,5:3,5:3,5).

Примітка. Для кожного рослинного об'єкта суміш розчинників та їх об'ємне співвідношення добирається експериментально. Розгонку проводять у затемнених чорним папером хроматографічних камерах зі щільно зачиненою кришкою.

3. Після того, як рівень розчинника підніметься майже до верхнього краю пластинки, хроматограму вийняти та висушити під струменем повітря.

4. Проаналізувати хроматограму: визначити пігментні зони.

Примітка. Порядок розташування окремих зон пігментів подано на **рис.** . На хроматограмі стартова пляма може бути зеленою або рожевою за наявності хлорофілу й антоціанів, хлорофіл *b* – жовто-зеленого кольору,

хлорофіл *a* – синьо-зелений, жовті ксантофіли і червоно-жовтий каротин (рухається разом із фронтом розчинника). Крім того, на хроматограмі часом виявляється бурий феофітин.

5. Для розділення лише каротиноїдів поставити другу хроматограму в іншу систему розчинників – суміш бензолу і петролейного ефіру (3:1).

Примітка. Пігменти розподіляються так: знизу стартова пляма, далі віолаксантин, лютеїн-епоксид, лютеїн, каротин. Між стартовою плямою і жовтими пігментами нерозділеними залишаються хлорофіли.

6. Для виявлення неоксантин поставити ще одну хроматограму в роздільну суміш етиловий спирт – петролейний ефір (1:20).

Примітка. Пігменти на хроматограмі розміщуються в такому порядку: зверху каротин, нижче хлорофіл *a*, суміш ксантофілів, хлорофіл *b*, неоксантин.

7. Хроматограми розшифрувати, в протоколі відмітити розташування та колір розподілених пігментів.

Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть види хроматографічного аналізу. В чому полягає його суть?
2. Назвіть основні правила нанесення екстракту пігментів на хроматограму.
3. Якщо стартова пляма залишається зеленою, які пігменти містяться в ній?
4. Які пігменти забарвлюють стартову пляму в рожевий колір? Чому вони залишаються в ній, а не рухаються разом із розчинником?
5. Які пігментів беруть участь у фотосинтезі?
6. Які промені сонячного спектра поглинають хлорофіли *a*, *b*, каротини та ксантофіли?
7. Яка функція каротиноїдів у рослинах?
8. Чим відрізняються каротиноїди вищих і нижчих рослин?
9. Які розчинники застосовують для екстрагування пігментів?
10. За яких умов у спиртовому або ацетоновому розчині може міститися феофітин?

РОБОТА 17

СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ЯВИЩЕМ ФЛУОРИСЦЕНЦІЇ ХЛОРОФІЛУ

Для розчинів хлорофілу в полярних розчинниках властиве явище **флуоресценції** (від лат. *fluor* – потік та *esentia* – короткочасне світіння) – властивість під впливом падаючого світла у свою чергу випромінювати промені з більшою довжиною хвилі, ніж ті, якими світіння викликається. Це пояснюється тим, що частина енергії випроміненого світла розсіюється у

вигляді теплоти. Флуоресценція – це ознака фотохімічної активності речовини. Спектри флуоресценції, як і спектри поглинання, є важливими фізичними параметрами, що характеризують хімічну природу і стан зелених пігментів. В етиловому ефірі в хлорофілу *a* спостерігається рубіново-червона флуоресценція з максимумом 668 нм, у хлорофілу *b* -646 нм. Агрегований хлорофіл і хлорофіл у нативному стані (в живому листку) має слабку флуоресценцію, що вірогідно можна пояснити поглинанням світла флуоресценції самими пігментами.

Мета роботи: ознайомитись з фізичною властивістю хлорофілу – явищем флуоресценції.

Прилади і матеріали: спиртова витяжка пігментів листка, мікроскопи, елодея, пробірки, джерело світла, чорний папір.

Хід роботи

1. Пробірку із спиртовою витяжкою пігментів розглянути проти світла на рівні очей. Розчин буде смарагдово-зеленого кольору.

2. Розташувати ту ж саму пробірку перед темним папером біля електричної лампи і розглянути її у відбитому світлі (збоку, звідки падає світло). Розчин – темно-червоного кольору.

3. Якщо пробірку із спиртовою витяжкою пігментів освітити електричною лампою знизу, а розчин розглядати зверху, то він матиме знову ж таки темно-червоний колір.

4. Для спостереження флуоресценції в живому листку елодеї, її розташовують на предметному столику мікроскопа, освітлюють синьо-фіолетовим світлом (для цього між освітлювачем і дзеркалом треба поставити синє скло) . Зелені хлоропласти починають світитися червоним світлом.

Контрольні запитання

1. Що таке флуоресценція?
2. Чому розчин хлорофілів зеленого кольору?
3. Інтенсивність флуоресценції хлорофілу в розчині в 10 разів вища, ніж у нативному стані. Чим це обумовлено?
4. Про що свідчить наявність флуоресценції у хлорофілів *a* і *b*?

РОБОТА 18

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРОФІЛУ ЗА ДОПОМОГОЮ ФОТОЕЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРА

Біосинтез та розпад хлорофілу – це складний комплекс біохімічних реакцій, що знаходиться під контролем як генетичних факторів, так і умов оточуючого середовища рослин. Оптимальним для синтезу хлорофілу є освітлення 200 Вт/м². При сильному підвищенні інтенсивності світла біосинтез хлорофілу починає сповільнюватись. Тому світлові листки мають меншу концентрацію хлорофілу, ніж темнові (ефект Шталя). Утворення хлорофілу залежить також від температури. Оптимальною температурою для нагромадження хлорофілу є 20 – 25 С., причому особливе значення має температура для темнових реакцій синтезу попередників хлорофілу. Тому рослини рано на весні часто не зеленіють і залишаються етильованими доти, поки температура не перевищить 10 С. На швидкість утворення хлорофілу, й особливо його попередників, впливає оводненість тканин. При недостатній водозабезпеченості біосинтез хлорофілу загальмовується й спостерігається його розпад. Пожовтінні листків при сильних посухах – звичайний зовнішній прояв водного дефіциту.

Важливе значення для утворення хлорофілу мають умови мінерального харчування. Рослинам насамперед необхідно достатнє забезпечення азотом і магнієм, які входять до складу хлорофілу. При нестачі цих елементів спостерігається хлороз – втрата зеленого кольору листків. Причиною хлорозу може бути й дефіцит заліза. Яке входить до складу ферментів, що каналізують найважливіші ланки біосинтезу хлорофілу – утворення б-амінолевулінової кислоти й протопорфірину. При нестачі міді хлорофіл легко руйнується, тому що порушується комплекси між хлорофілом і відповідними білками.

На загальний хід біосинтезу хлорофілу впливає вік листків і рослини в цілому. В молодих листках біосинтез відбувається в 10 -15 разів швидче, ніж у старих. Молекули хлорофілу не можуть служити необмежено довго. Частина їх поступово руйнується, замінюючись знову синтезованими. «Молоді» молекули хлорофілу в хімічному відношенні тотожні «старим», але мають інший зв'язок із білками і працюють більш активно.

Загальна кількість хлорофілу в фітоценозах досить велика. У посівах сільськогосподарських рослин середня кількість хлорофілу становить 1,5 г/м², або 15 кг/га.

Мета роботи: визначити вміст хлорофілів (мг %).

Прилади і матеріали: зелені листки рослин, крейда, етиловий спирт, фільтрувальний папір, скляна паличка, фарфорова ступка, піпетка, мітна пробірка, ФЕК, кювети.

Хід роботи

1. Наважку зелених листків (без середньої жилки) 0,2 г і приблизно 0,02 г крейди розтерти у ступці з 5 мл етилового спирту до одержання гомогенної маси.

2. Ступку й фільтр кілька разів сполоснути спиртом (піпеткою) і отриману масу відфільтрувати через фільтр у мірну пробірку на 10 мл. В окремій пробірці отриману витяжку розбавити в 5 разів (1мл витяжки + 4 мл спирту).

3. Для визначення концентрації пігментів на спектрофотометрі (ФЕК), екстракт налити в кювету приладу, чистий розчинник – у контрольну кювету. Помістити їх у кюветну камеру спектрофотометра і визначити оптичну густину витяжки при довжині хвилі, яка відповідає максимумам поглинання пігментів. За калібрувальною кривою визначити концентрацію хлорофілів у розчині (мг/літр), яка відповідатиме встановленій оптичній густині витяжки.

Вміст хлорофілів у досліджуваному зразку визначають за формулою:

$$A = \frac{a \cdot v \cdot 100}{1000 \cdot c}$$

де А – вміст хлорофілів у листках, мг%;

а – концентрація хлорофілів у розчині (дані, за калібрувальною кривою) мг/літр;

в – загальний об'єм витяжки з урахуванням розведення;

с – наважка листків, г.

Приклад. У мірній пробірці довжиною 10 мл витяжки пігментів. Витяжку розбавили в 5 разів. Показник ФЕК =0,340, що за калібрувальною кривою відповідає 7,6 мг/л. Наважка-0,2 г.

$$A = \frac{7,6 \cdot 10 \cdot 5 \cdot 100}{100 \cdot 0,2} = 190 \text{ мг\%}$$

Контрольні запитання

1. Як освітлення впливає на біосинтез хлорофілу?
2. Який діапазон температур є оптимальним для нагромадження хлорофілу?
3. Які макро- і мікроелементи необхідні для синтезу хлорофілу і чому?
4. В яких листках синтез хлорофілу відбувається інтенсивніше?
5. Яка середня кількість хлорофілів у сільськогосподарських посівах?

РОБОТА 19

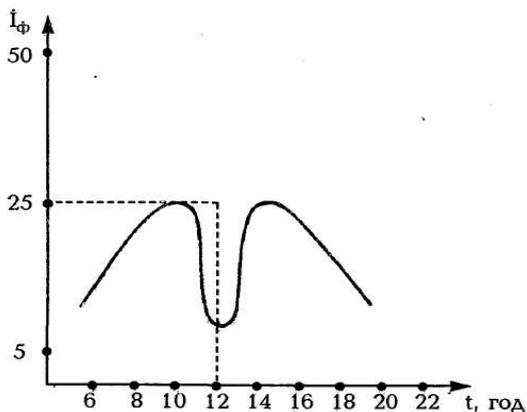
ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФОТОСИНТЕЗУ ГАЗОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ В ТЕЧІЇ ПОВІТРЯ

При фотосинтезі відбувається поглинання енергії сонячного світла хлорофілом та допоміжними пігментами і перетворення її в хімічну енергію; поглинання вуглекислого газу з атмосфери, відновлення його в органічні сполуки та виділення молекулярного кисню в процесі фотолізу води в атмосферу (яким ми дихаємо).

На інтенсивність проходження процесу фотосинтезу впливають: концентрація CO_2 в повітрі, спектральний склад світла, специфіка анатомічного апарату рослин, водний режим. (Об'ємна концентрація CO_2 в повітрі 0,03%).

Максимальний фотосинтез відбувається при відкритих продихах при невеликому водному дефіциті (5-20% від повного насичення).

Під інтенсивністю фотосинтезу розуміють кількість CO_2 , засвоєного одиницею поверхні листка за одиницю часу (можна визначити кількість кисню, що виділяється певною масою за одиницю часу). Інтенсивність фотосинтезу коливається в межах від 5 до 25 $\text{мгCO}_2\text{-дм}^2/\text{год.}$, 5 — вранці, коли інтенсивність низька. Зміну інтенсивності фотосинтезу протягом доби можна прослідкувати за графіком.



Тобто, дія фотосинтетичного апарату тісно пов'язана з освітленням та відкриттям, закриттям продихів. (О 12-00 годині дня продихи закриваються — інтенсивність фотосинтезу спадає, тобто настає полуденна депресія фотосинтезу).

Визначити інтенсивність фотосинтезу можна за допомогою ізотопного, газометричного та ін. методів.

Газометричний метод базується на визначенні кількості CO_2 у двох течіях повітря (1 варіант — листок фотосинтезуючої рослини поміщають у прозору плоску камеру; 2 варіант — без листка). Тобто, протягом приблизно

30 хвилин через установку протягують повітря (за допомогою води). Певна частіша CO_2 з течії повітря поглинається фотосинтезуючим листком, а частіша реагує з баритом $\text{Ba}(\text{OH})_2$, утворюючи BaCO_3 (по різниці CO_2 у двох течіях повітря розраховують інтенсивність фотосинтезу).

Мета роботи: визначити експериментально кількість засвоєного вуглекислого газу (CO_2) фотосинтезуючим листком дослідної рослини за одиницю часу.

Прилади і матеріали: прилад для визначення інтенсивності фотосинтезу газометричним методом в течії повітря має три складові частини:

1. Плоска прозора камера для фотосинтезуючого листка.
2. 10 л ємкість з водою, за допомогою якої протягується повітря через поглинач і камеру.
3. Поглинач (для поглинання CO_2 з повітря), з'єднаний трубкою з колбою, що містить барит $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

Дослідна фотосинтезуюча рослина, $\text{Ba}(\text{OH})_2$, щавлева кислота, вода, ізоаміловий спирт, фенолфталеїн, колби на 100 мл, скляні палички, скляні стакани, піпетки, штативи.

Хід роботи

Варіант 1.

1. Встановити фотосинтезуючий листок в плоску прозору камеру.
2. Налити 100 мл бариту $\text{Ba}(\text{OH})_2$ — (концентрація 9 г/л) в колбу, під'єднану трубкою до поглинача, і додати 5-6 крапель ізоамілового спирту. Резинову трубку під'єднати до циліндра, закріпленого в штативі, другий кінець опустити в колбу. Зафіксувати час, пустити воду з 10-літрової ємкості. Час досліду записати у таблицю (t).
3. Відібрати в колбу 10 мл бариту, через який не проходило повітря, додати 1-2 краплини індикатора фенолфталеїну (добавляти фенолфталеїн обережно, до ледь рожевого забарвлення). Титрування проводити щавлевою кислотою до зникнення забарвлення (1 мл щавлевої кислоти = 0,2 мг CO_2). Для цього довести кислоту в штативі до мітки і прослідкувати, щоб не було повітря. Кількість щавлевої кислоти, що використано на титрування $\text{Ba}(\text{OH})_2$, записати у таблицю і позначити як «В»).
4. У колбу для титрування налити нову порцію (10 мл) бариту, через який не проходило повітря, і додати 1-2 краплі фенолфталеїну і знову відтитрувати щавлевою кислотою до зникнення забарвлення. Кількість щавлевої кислоти,

яку використано на титрування $\text{Ba}(\text{OH})_2$, записати в таблицю і позначити як «А».

5. Провести обрахунки площі фотосинтезуючої листової поверхні (S). Для цього гострим олівцем на міліметровому папері обвести контур листка і визначити площу ваговим методом.

Варіант 2. Повторити хід роботи першого варіанту, але без фотосинтезуючого листка у камері (тобто, пропустити через $\text{Ba}(\text{OH})_2$ — 10 л повітря). Кількість щавлевої кислоти, що використана при титруванні 10 мл бариту у другому варіанті, записати у таблицю і позначити через «С».

Назва рослини	Кількість щавлевої кислоти, що використана на титрування			Площа листка, см ²	Час досліду, год.	Інтенсивність фотосинтезу, мг CO_2 дм ² /год
	$\text{Ba}(\text{OH})_2$ у 1 варіанті «з листком»	$\text{Ba}(\text{OH})_2$ «без листка» у 2 варіанті	$\text{Ba}(\text{OH})_2$			
	В	С	А	S	t	I _ф
1	2	3	4	5	6	7

Розрахунок інтенсивності фотосинтезу за формулою:

$$I_{\text{ф}} = \frac{((A-C)-(A-B)) \cdot 0,2 \cdot 100 \cdot 60}{S \cdot t}, \text{ мг CO}_2 \cdot \frac{\text{дм}^2}{\text{год}}$$

Де I_ф – інтенсивність фотосинтезу, мг $\text{CO}_2 \cdot \frac{\text{дм}^2}{\text{год}}$

A – площа листка, см²

t – час досліду, год.

I_ф=

Контрольні запитання.

1. Які фактори впливають на інтенсивність фотосинтезу? Дати визначення інтенсивності фотосинтезу.

2. В чому суть газометричного методу визначення інтенсивності фотосинтезу?

3. Якщо дослідну рослину освітити спочатку зеленим, а потім синім світлом (однакової інтенсивності), при якому освітленні буде відмічено найшвидше поглинання CO_2 ?

4. Чому максимальна інтенсивність фотосинтезу спостерігається при незначному (5-20%) водному дефіциті, а не повній насиченості листків водою?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Фотосинтез»

1. У чому проявляється суть фотосинтезу як окисно-відновного процесу?
2. Що таке фотосинтетично активна радіація (ФАР) та яку частку вона займає щодо повного спектра сонячного випромінювання?
3. Назвіть експериментальні докази походження кисню в процесі фотосинтезу.
4. Чим можна пояснити підвищення ефективності фотосинтезу у разі використання імпульсного освітлення?
5. Поясніть, що таке квант та яким чином частота випромінювання пов'язана з енергією кванта?
6. В яких інтервалах сприймають сонячне випромінювання око людини та рослинний організм?
7. Чому квант ультрафіолетового випромінювання має більшу енергію, ніж квант синього світла?
8. Поясніть природу поглинання світла речовиною. Що таке фотозбудження молекули, основні закони поглинання світла?
9. Яким чином у процесі поглинання квантів сонячного світла формується синглетний та триплетний електронно-збуджений стани молекули? Наскільки довготривалий цей процес?
10. Поясніть взаємозв'язок між ультраструктурною організацією хлоропластів і функцією даної органели.
11. Чим зумовлені гідрофільні та гідрофобні властивості хлорофілу та яка роль їх у формуванні пігмент-ліпопротеїдних комплексів? Чому молекула хлорофілу електрично нейтральна?
12. У чому суть явища хроматичної адаптації?
13. Від чого залежать оптичні властивості пігментів?
14. Опишіть онтогенез розвитку хлоропласта, яка функція світла на різних етапах його?
15. Схарактеризуйте геном хлоропласта. В чому полягає різниця між хлоропластною та ядерною ДНК?
16. У чому полягає суть первинної фотофізичної стадії фотосинтезу?
17. Чому поглинаючим пігментом фотосинтезу вважають хлорофіл а, хоча хлоропласт містить різноманітний набір пігментів?

18. Що лежить в основі певної локалізації відповідного компонента електрон-транспортного ланцюга?

19. Назвіть акцепторні та донорні компоненти реакційних центрів двох фотосистем. Поясніть, як відбувається первинний розподіл заряду в реакційному центрі.

20. Схарактеризуйте світлозбиральні пігмент-білкові комплекси тилакоїдних мембран.

21. Як відбувається фотоокиснення хлорофілу та які його функції у первинних фотохімічних реакціях?

22. Схарактеризуйте АТФ-синтетазний комплекс.

23. Який взаємозв'язок між фізико-хімічними властивостями пластохінону та його функціями? Схарактеризуйте пул пластохінонів хлоропласта.

24. Чим можна пояснити зміну рН внутрішньотилакоїдного простору та зміщення рН між тилакоїдним компартментом і строною?

25. У процесі функціонування ЕТЛ різниця енергетичного рівня між P680 та P700 реакційних центрів обох фотосистем може досягати 50 кДж. Чи вистачить цієї кількості енергії для утворення макроергічного зв'язку АТФ?

26. Чому циклічне фотофосфорилування можна розглядати як найдавнішу форму фіксації енергії?

27. Схарактеризуйте особливості структурної організації реакцій та компонентів, які беруть участь у синтезі АТФ. Яким чином відбуваються фотоіндуковані окисно-відновні перетворення компонентів електрон-транспортного ланцюга?

28. Чому відновлювальний пентозофосфатний цикл називають первинним, автокаталітичним? Хто і яким чином відкрив даний цикл?

29. Як пояснити припинення фотосинтезу у зрізаною та поставленого у воду листка рослини за найсприятливіших зовнішніх умов?

30. Назвіть сполуки, які утворюються в світлових реакціях фотосинтезу, а потім використовуються в наступній темновій фазі. На яких етапах циклу вони потрібні?

31. Які субстрати використовуються в циклі Кальвіна, на якій стадії відбувається включення їх в реакції, що є кінцевим продуктом циклу, звідки надходить енергія та на що вона витрачається?

32. Припустимо, що в суспензії хлорели активно відбувається фотосинтез, раптово виключається світло. Які зміни вмісту 3-фосфогліцеринової кислоти та рибулозобісфосфату можна спостерігати в наступну хвилину?

33. За яких умов рибулозобісфосфаткарбоксилаза функціонує як оксигеназа? Який механізм даної реакції?
34. Що таке фотодихання, чи впливає світло на інтенсивність дихання?
35. За яким принципом визначають різні групи з C₄-типом метаболізму?
36. Чим фотосинтез у сукулентів відрізняється від фотосинтезу мезофітів C₃ та C₄-типів?
37. Які екологічні переваги в умовах посухи та високої температури мають рослини з C₄-типом фотосинтезу?
38. Що таке компенсаційна точка фотосинтезу?
39. Як впливає на фотосинтез впливає підвищення рівня концентрації CO₂ в атмосфері?
40. У чому полягає значення появи ФС II?
41. Яке значення каротиноїдів у фотосинтезі?
42. Які досліди слід поставити, щоб визначити, до якого типу (C₃ або C₄) належать рослини?
43. Чи існує пряма кореляція між кількістю хлорофілу в листках та інтенсивністю фотосинтезу?
44. Яка роль піридинових дегідрогеназ у фотосинтезі?
45. Що таке фоторедукція? Назвіть основні риси бактеріального фотосинтезу.
46. Чому в процесі еволюції рослини набули зеленого забарвлення?
47. Що являє собою хромофорна група хлорофілу і фікобілінів?
48. Інтенсивність фотосинтезу вівса в середньому в два рази вища, ніж у томатів за однакових умов, а врожай томатів з 1 га нерідко буває в 50 разів більше. В чому полягають можливі причини такої невідповідності?
49. За допомогою якої реакції можна довести, що в молекулі хлорофілу міститься атом магнію? Напишіть рівняння цієї реакції.
50. Назвіть пігменти, що не беруть участь в процесі фотосинтезу.

РОЗДІЛ 4.

ДИХАННЯ РОСЛИН

Дихання є одним з основних проявів обміну речовин та енергії між рослинним організмом і навколишнім середовищем. Це – сукупність фізіологічних процесів, що забезпечують надходження кисню в організм та його використання для окиснення органічних речовин (вуглеводів, жирів, білків).

На дихання рослини витрачають 20-25 % органічної речовини, утвореної під час фотосинтезу. Синтезовані рослинним організмом фотоасиміляти належать до неспецифічних запасних речовин. Тому синтез інших сполук на їхній основі для специфічних потреб організму можливий лише після низки складних біохімічних перетворень.

Хімічна енергія фотоасимілятів, як трансформована форма сонячної енергії, міститься в структурі хімічних зв'язків запасних сполук. У процесі розриву хімічних зв'язків органічних запасних речовин під час окиснення енергія вивільняється. Рослинний організм завдяки поступовому окисненню органічних сполук використовує цю енергію невеликими порціями. Вивільнена енергія витрачається на метаболічні процеси та на утворення нових, багатих на енергію хімічних зв'язків, наприклад АТФ.

Внутрішньоклітинне дихання – це окиснювальний розпад органічних сполук за участю кисню, який зумовлює генерацію трансмембранного електрохімічного градієнта йонів водню ($\Delta\mu\text{H}^+$) і синтез хімічно активних метаболітів, що використовуються як джерела енергії (АТФ) або відновники ($\text{НАД}\cdot\text{H}_2$). Також утворюються проміжні продукти для різноманітних біосинтетичних реакцій організму.

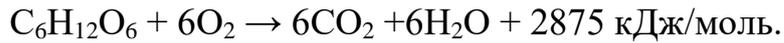
На перших двох етапах дихання (гліколіз, цикл трикарбонових кислот) відбувається відновлення коферментів $\text{НАД}\cdot\text{H}$ та $\text{ФАД}\cdot\text{H}$, які на третьому етапі окиснюються в дихальному електронтранспортному ланцюзі мітохондрій.

АТФ утворюється під час окиснення молекул глюкози, жирних кислот й амінокислот, що використовуються як джерело енергії. У більшості біосинтетичних реакцій продукти перебувають у більш відновленому стані, ніж їхні попередники, тому, крім АТФ, вони потребують відновлювальних еквівалентів. Доноромелектронів у відновлювальних реакціях біосинтезу є $\text{НАДФ}\cdot\text{H}_2$, тоді як $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ і $\text{ФАД}\cdot\text{H}_2$ – переносниками електронів під час окиснення молекул дихального субстрату.

Основним субстратом дихання є вуглеводи. Жири та білки використовуються під час дихання паростків рослин, які розвиваються з багатих на жири чи білки насінин. Розщепленню субстратів у процесі дихання передуює гідроліз: полімерних вуглеводів – до сахаридів, жирів – до гліцерину та жирних кислот, білків – до амінокислот.

Окиснювально-відновлювальні перетворення субстратів дихання каталізують ферменти: дегідрогенази – активують водень; оксидази – активують кисень та ферменти, що виконують функцію проміжних переносників електронів (водню).

Загальне рівняння дихання, якщо вихідним субстратом є вуглеводи, таке:



Якщо вихідним субстратом для дихання є білки або жири, то енергетичний ефект буде іншим. Вважається, що під час спалювання 1 г вуглеводів у середньому виділяється 17 кДж енергії, 1 г білків – 17 кДж, а жирів – 39 кДж.

З наведеного сумарного рівняння слідує, що об'єми газів у разі окиснення вуглеводів однакові. Відношення об'ємів виділеного вуглекислого газу до поглинутого кисню називають дихальним коефіцієнтом (ДК). У разі окиснення вуглеводів ДК рівний одиниці.

Коефіцієнт дихання може значно відхилитися від одиниці, якщо субстратом дихання є білки або жири. Зокрема, якщо субстрат багатий на йони водню, тоді частина кисню повітря використовується на окиснення не лише вуглецю, а й надлишкового водню, що є в субстраті. Саме тому коефіцієнт дихання для жирів менший за одиницю. Чим нижча величина дихального коефіцієнта, тим більший тепловий ефект окиснення, і навпаки.

Загальним показником швидкості окиснення субстратів дихання є інтенсивність дихання. Різні тканини рослин різко відрізняються між собою за інтенсивністю дихання. Інтенсивність дихання є показником життєдіяльності рослин.

Функції дихання не обмежуються запасанням енергії у вигляді АТФ. Дихання має важливе значення у процесах терморегуляції органів рослини, утворенні сполук вторинного метаболізму, знешкодженні шкідливих речовин.

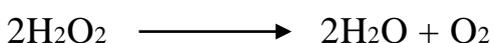
Різноманітність типів обміну речовин у рослин різних систематичних груп, віку, фізіологічного стану та за різних умов довкілля зумовлена специфічними особливостями реакцій процесу дихання.

РОБОТА 20

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ В ЛИСТКАХ РОСЛИН

Каталаза – це фермент класу оксидоредуктаз, простетичною групою якого є залізопорфірин. При багатьох окислювально-відновних реакціях утворюється пероксид водню, надлишок якого є токсичним для клітини. Каталаза каталізує його розщеплення на воду і молекулярний кисень за реакцією

Каталаза



Каталаза широко розповсюджена в рослинних тканинах і є одним з найактивніших ферментів. Роль її полягає в забезпеченні киснем тих ділянок

рослинних тканин, куди доступ кисню ускладнений. Цей фермент було виявлено в мікротільцях (пероксисомах), що беруть участь у процесі фотодихання.

Об'ємний метод визначення активності каталази базується на відновленні об'єму молекулярного кисню, що виділяється при розпаді пероксиду водню в дослідній тканині під впливом каталази.

Для визначення активності каталази використовують прилад, який складається з конічної колби на 150 мл, скляної груші та бюретки. Усі частини приладу з'єднані гумовими трубками і скляним трійником, бюретка і скляна груша, зафіксовані в штативі. Грушу та бюретку заповнюють дистильованою водою.

Мета роботи: визначити активність каталази в дослідній рослинній тканині

Прилади і матеріали: фарфорова ступка, колба на 250 мл, 3%-ий розчин пероксиду водню, скляний стакан, трійник, бюретка, штатив.

Хід роботи

1. Наважку рослинного матеріалу (1 г) добре розтерти у фарфоровій ступці з 0,5 г крейди для створення слабо лужного середовища, оптимального для дії каталази (рН 7,0 – 7,7).

2. Розтерту масу перенести в колбу, ступку промити водою, яку також злити в колбу.

3. На дно колби пінцетом поставити невеликий стаканчик, в який налити 2 мл 3%-го розчину пероксиду водню. Колбу закрити пробкою, з'єднаною через трійник із бюреткою.

4. Рівні в груші та бюретці виміряти, колбу стряхнути так, щоб стаканчик перекинувся і його вміст змішався з рослинним матеріалом. Кисень, який виділяється в результаті реакції, знижує рівень води у бюретці. Кожну хвилину робити заміри. Дослід закінчити через 5 хвилин.

5. Об'єм витісненої води дорівнює об'єму кисню, який виділяється під час розпаду пероксиду водню під дією каталази дослідної рослинної тканини. За об'ємом кисню можемо судити про ферментативну активність каталази.

6. Активність каталази розрахувати за формулою

$$A = \frac{V \cdot 60}{n \cdot t}$$

де V – об'єм витісненої води, мл;

n – наважка, г;

t – час досліду, хв;

60 – коефіцієнт перерахунку, хв.

Контрольні запитання

1. До якої групи ферментів належить каталаза?
2. Що входить до складу простетичної групи каталази?
3. За яким рівнянням відбувається розщеплення пероксиду водню?
4. У чому полягає фізіологічна роль каталази в рослинах?
5. Який принцип методу визначення активності каталази?

РОБОТА 21

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ДИХАННЯ ЗА КІЛЬКІСТЮ ВИДІЛЕНОГО ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ (ЗА МЕТОДОМ П. БОЙСЕН-ЙЕНСЕНА)

Для рослин оптимальною є вологість 40% при якій проходить дихання. При диханні рослина поглинає O_2 та виділяє CO_2 .

Метод П.Бойсен-Йенсена по визначенню інтенсивності дихання за кількістю виділеного вуглекислого газу базується на властивості вуглецю зв'язуватись слабким лугом — баритом $Ba(OH)_2$, так як саме цей луг дуже швидко сорбує кисень.

В дослідженнях необхідно встановити, яке насіння буде дихати інтенсивніше: сухе, вологе чи проросле. В колбу для визначення інтенсивності дихання наливають певну кількість бариту і на гачок підвішують наважку дослідного об'єкту таким чином, щоб він знаходився в 2-3 см від бариту.

При диханні дослідного об'єкту виділений діоксид вуглецю прореагує з лугом. При цьому концентрація розчину значно зменшиться:

$Ba(OH)_2 + CO_2 = BaCO_3 + H_2O$. Через певний час луг, що залишився в колбі, титрують: $Ba(OH)_2 + 2HCl = BaCl_2 + 2H_2O$.

В досліді 3 варіанти, контроль — колба без насіння

1. варіант — сухе насіння
2. варіант — вологе насіння (замочують насіння пшениці за 24 години)
3. варіант — проросле насіння.

За різницею титрування бариту контрольної та дослідної колб прямопропорційній кількості виділеного при диханні CO_2 визначають інтенсивність дихання запропонованого об'єкту. Ставити на експозицію колбу краще не менше, ніж на 1 год., щоб на поглинання CO_2 було використано 30-50% лугу.

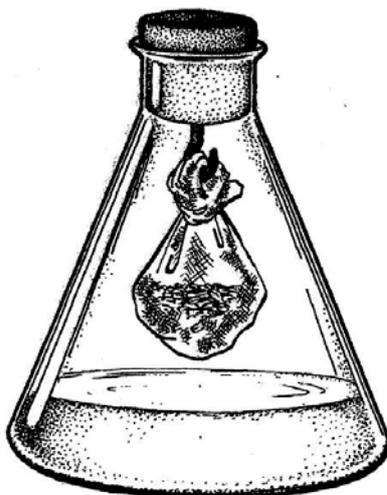
Мета роботи: визначити інтенсивність дихання сухого, вологого та пророслого насіння різних рослинних об'єктів за кількістю виділеного вуглекислого газу.

Прилади та матеріали: сухе, вологе та проросле насіння пшениці, штативи, бюретки, скляні стаканчики, терези, дослідні колби з щільними пробками і гачками, марля, 0,025 н розчин $\text{Ba}(\text{OH})_2$, щавлева кислота, фенолфталеїн.

Хід роботи

1. Підготувати наважки (4-5 г) сухого, вологого та пророслого насіння дослідного об'єкту. Перенести наважку в марлю, зав'язати та зафіксувати на пробці з гачком.

2. В 4 дослідні колби (контроль — без насіння, 1 варіант — сухе, 2 варіант — вологе, 3 варіант — проросле) внести 1-2 краплі фенолфталеїну і 10 мл 0,025 н розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Барит необхідно наливати тільки тоді, коли все підготовлено, так як налитий в дослідні колби барит реагує і з тим вуглецем, що видихає людина при проведенні досліду, що значно збільшує похибку досліду.



3. Швидко і щільно закрити дослідні колби пробками (марлевий мішечок повинен знаходитись на висоті 2-3 см від бариту). Контрольну колбу без насіння закрити просто пробкою. Зафіксувати час початку досліду.

4. Експозиція 1 година, протягом якої дослідні колби необхідно обережно струшувати, для зруйнування на поверхні бариту плівки BaCO_3 , для кращого поглинання вуглекислого газу. Також слідкувати за тим, щоб розчин в колбі мав постійно рожеве забарвлення. Знебарвлення забарвлення свідчить про те, що барит $\text{Ba}(\text{OH})_2$ використано на зв'язування CO_2 , в цьому випадку потрібно прилити в контрольну та "знебарвлену" колбу по 5 мл розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

5. Титрування проводити щавлевою кислотою до повного зникнення рожевого забарвлення. Титрування контрольної колби можна проводити через 25-30 хв експозиції.

6. Інтенсивність дихання обчислюють за формулою:

$$I_d = \frac{(A-B) \cdot 0,55}{p-t}$$

Де I_d — інтенсивність дихання, $\text{мг CO}_2 \cdot \text{г l} \cdot \text{год}^{-1}$;

A — об'єм щавлевої кислоти необхідний для титрування контрольного розчину, мл;

B - об'єм щавлевої кислоти, необхідний для титрування дослідного розчину, мл;

p — наважка, г;

t — експозиція, год.

7. Результати досліду вписати в таблицю

Об'єкт	Наважка, г	Об'єм Ba(OH)_2 , мл	Час експозиції, год	Кількість щавлевої кислоти, що використана на титрування, мл			Інтенсивність дихання
				контроль	1 вар.	2. вар.	

Контрольні запитання

1. На чому базується метод П. Бойсен-Йенсена визначення інтенсивності дихання?
2. Які фактори впливають на інтенсивність дихання рослинного організму?
3. В яких тканинах інтенсивність дихання вища меристематичних або запасуючих?
4. Якими методами можна виміряти інтенсивність дихання рослин?
5. Чому для кращого зберігання овочів у сховищах підтримують низькі позитивні температури і високу концентрацію CO_2 .

Контрольні запитання та завдання до розділу «Дихання рослин»

1. Яке значення мають процеси дихання та бродіння у житті рослин?
2. Назвіть спільні та відмінні риси процесів дихання та бродіння?

3. Що таке окиснення й відновлення? Доведіть, що дихання – це окисно-відновний процес.
4. Схарактеризуйте каталітичні системи дихання.
5. Назвіть основні шляхи дисиміляції вуглеводів.
6. В чому полягає функція гліколізу в обміні клітини?
7. На яких етапах гліколізу та за рахунок яких реакцій синтезується АТФ?
8. Що є кінцевим продуктом гліколізу?
9. Опишіть шляхи руху атомів вуглецю, кисню, водню під час розпаду піровиноградної кислоти в процесі дихання.
10. Назвіть основні стадії циклу Кребса та їх особливості.
11. Схарактеризуйте електрон-транспортний ланцюг мітохондрій, зокрема структурну організацію, основні компоненти, їх окисно-відновні потенціали.
12. Поясніть зв'язок між ультраструктурою клітини та функцією мітохондрій.
13. Що є джерелом енергії для функціонування дихального ланцюга?
14. Чому для функціонування електрон-транспортного ланцюга необхідний кисень?
15. Що таке окиснювальне фосфорилування?
16. Назвіть спільні та відмінні риси фотосинтетичного та окиснювального фосфорилування.
17. Яка кількість АТФ утворюється у разі розпаду однієї молекули глюкози в анаеробну й аеробну фази дихання?
18. Назвіть основні риси пентозофосфатного циклу.
19. Охарактеризуйте гліоксилатний цикл.
20. У чому полягає фізіологічне значення альтернативних шляхів дихання?
21. Які фактори впливають на інтенсивність процесу дихання?
22. Які реакції необхідні для одержання з молекули глюкозифруктози, етилового спирту, однієї з жирних кислот, аспарагінової кислоти?
23. Який зв'язок дихання з фотосинтезом і азотним обміном клітини?
24. Яка залежність між субстратами дихання та дихальним коефіцієнтом?
25. Назвіть шляхи окиснення дихального субстрату.

РОЗДІЛ 5.

КОРЕНЕВЕ ЖИВЛЕННЯ РОСЛИН

Кореневе живлення – розділ фізіології рослин, який присвячений вивченню метаболізму поживних елементів. Основні питання, які досліджуються в даному розділі є: надходження елементів живлення в

рослинний організм, їх перетворення, фізіолого-біохімічне значення, механізм дії тощо.

Рослина засвоює поживні елементи з ґрунту, повітря і води. Основну частину елементів рослина засвоює з ґрунту у вигляді мінеральних сполук; CO₂ та кисень – з повітря; джерелом водню є вода. Обидва способи живлення рослин – повітряний і кореневий – взаємопов'язані. Наразі у рослин чітко проявляється вибіркова здатність поглинати відповідні хімічні елементи.

Усі елементи живлення рослин за їхнім умістом у клітинах поділяють на елементи-органогени, макро-, мікро- та ультрамікроелементи. У більшості рослин близько 95 % сухої речовини складають елементи-органогени (С, Н, О, N), приблизно 4% – макроелементи (Р, К, Са, Mg, S, Cl, Na, Si, Al, Fe) і лише 1 % – мікроелементи (Mn, В, Cu, Zn, Ва, Ni, Мо, Со) та ультрамікроелементи (Cs, Cd, Ag, Ra, Au, Hg, As та ін.). Для нормального перебігу всіх фізіолого-біохімічних процесів рослина має бути забезпечена

всіма поживними елементами, кожен із яких має певне значення у метаболізмі. Зокрема, встановлена необхідність елементів живлення для нормального функціонування протоплазми, для структурної організації й активності живих клітин, передусім завдяки їх участі у генерації і регенерації енергії, для регуляції процесів обміну. Дослідження функції елементів живлення у життєдіяльності рослин дає змогу науковцям і практикаам досягати високої продуктивності сільськогосподарських культур.

Вирішення багатьох практичних завдань живлення рослин потребує глибоких теоретичних досліджень, вивчення фізіолого-біохімічного значення поживних елементів, механізму їхнього поглинання, транспортування і використання рослиною. Відповідь на всі ці питання можна одержати експериментальним шляхом, застосовуючи фізіологічні, хімічні і фізико-хімічні методи.

У даному розділі описано основні методичні прийоми вирощування рослин методом водної культури (встановлення рН живильного розчину, забезпечення киснем, водою тощо), схарактеризовано склад живильних сумішей, розглянуто методи дослідження фізіології кореневої системи, якісного та кількісного визначення макро- та мікроелементів, їх антагонізму, а також фізіологічного значення у життєдіяльності рослин.

РОБОТА 22

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЗОЛИ В РІЗНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН ТА МІКРОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗОЛИ

В різних частинах рослини міститься неоднакова кількість живих клітин, тому кількість золи в них теж різна.

Зола — це залишок, який отримують після спалювання органічних речовин. При спалюванні азот, фосфор, вуглець, водень та частково кисень видаляються, а в золі залишаються окисли ряду елементів — натрій, калій, кальцій, залізо. Ґрунтово-кліматичні, агротехнічні умови вирощування рослин, а також вид, сорт, особливості досліджуваних тканин впливають на вміст та склад зольних елементів. Наприклад, в листках міститься золи більше, ніж в коренях, стовбурі та корі. Окремі види рослин мають здатність нагромаджувати окремі елементи. Так, концентрація бору в листках бобових культур та капусти значно вища, ніж у злакових, а вміст кальцію в листках бобових сягає кількох відсотків на суху вагу, в той час у злакових культур їх не більше 0,5%. Зольні елементи відіграють важливу роль в обміні речовин рослин, входять до складу біологічно-активних сполук.

Для виявлення макро- та мікроелементів у рослинній золі, користуються реакціями, в результаті яких утворюються кристали або розчин набуває забарвлення при наявності певного елемента.

Мета роботи: визначити якісний склад золи різних частин рослини в залежності від різних умов мінерального живлення.

Прилади і матеріали: зола різних частин дослідних рослин, 10% розчин соляної кислоти, дистильована вода, аміак, 1%-ні розчини: нітрату стронцію, молібдату амонію в 15% азотній кислоті, жовтої кров'яної солі, сульфату талію, сірчаної кислоти, фосфату натрію; скляні палички, пробірки, паперові фільтри або вата, скляні лійки, предметні стекла, мікроскопи, електроплитка.

Хід роботи

1. Частина мінеральних речовин, що входять до складу золи розчинна в кислоті, частина у воді. Тому, із дослідного зразка золи необхідно приготувати два розчини: кислотний і водний. У дві пробірки (для визначення якісного складу золи певної частини рослини) насипати 0,30 см³ золи та додати в першу 2 мл розчину 10% соляної кислоти (НС1), другу - 2 мл води (Н₂О). Добре розмішати скляною паличкою та відставити на 15 хв. Потім профільтрувати досліджувані розчини крізь тонкий шар вати або невеличкий паперовий фільтр у чисті пробірки.

2. Реакції проводять на предметних стеклах. На відстані 1-1,5 см нанести краплину витяжки золи і реактиву. Повільно та обережно з'єднати ці дві краплини скляною паличкою. Відбувається реакція при взаємодії

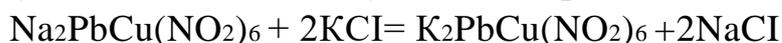
розчину з реактивом і утворюються кристали характерні для того, чи іншого елемента (Рис. 8). Слід зазначити, що великі, чіткі кристали утворюються при повільному обережному з'єднанні крапель препарувальною голкою або скляною паличкою, а дрібні, малопомітні при швидкому та повному перемішуванні краплин. Утворені кристали необхідно замалювати.



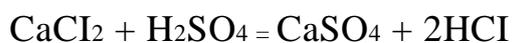
1. кристали хлориду талію
2. кристали свинцево-мідного нітрату калію
3. кристали сульфату кальцію (гіпсу)
4. кристали фосфорноаміачномагнезійальної солі
5. кристали фосфорномолібдату амонію.

Рис. 8. Кристали (під мікроскопом).

3. **Виявлення калію** здійснюють у водному розчині золи за допомогою розчину комплексної солі $\text{Na}_2\text{PbCu}(\text{NO}_2)_6$. Краплю водної витяжки золи на предметному склі підсушити, потім на залишок нанести краплю реактиву. Через 2-3 хв розглянути під мікроскопом. За наявності калію бачимо темно-коричневі кубічної форми кристали свинцево-мідного нітрату калію. Реакція відбувається за рівнянням:



4. **Виявлення кальцію** здійснюється за допомогою 1%-го розчину H_2SO_4 . На предметне скло нанести краплю солянокислої витяжки, додати краплю 1%-го розчину H_2SO_4 і підсушити над плиткою. У ході реакції утворюються голчасті кристали гіпсу.



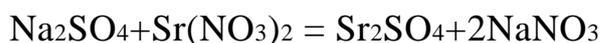
5. **Виявленнямагнію.** Краплину витяжки золи нейтралізувати розчином аміаку, а потім з'єднати з краплиною Na_2HPO_4 . Після нагрівання випадають кристали фосфорно-аміачно-магнезіальної солі у вигляді прямокутників, зірочок, квадратиків



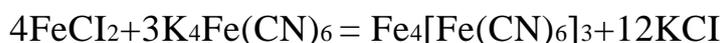
6. Для виявлення фосфору крапля солянокислої витяжки золи на предметному склі з'єднується з 1%-вим розчином молібдату амонію в 1%-ому розчині HNO_3 . Випадають зеленувато-жовті кристали фосфорно-молібденового аміаку за реакцією



7. Для виявлення сірки до краплі солянокислої витяжки золи додати краплю 1%-го розчину нітрату стронцію і трохи нагріти. Утворюються дрібні кристали сірчанокислого стронцію



8. Для виявлення заліза використовують кольорову реакцію з 1%-вим розчином жовтої кров'яної солі $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Утворюється берлінська лазур за формулою:



9. Зробити висновки про кількість і вміст елементів у золі рослини.

Контрольні запитання

1. Які макроелементи містяться в золі рослин і за допомогою яких реакцій їх можна виявити?
2. Яка фізіологічна роль макро- та мікроелементів?
3. Візуально, за якими ознаками можна визначити нестачу того чи іншого елемента в рослині?
4. Які фактори впливають на якісний та кількісний склад золи рослин?
5. Які елементи належать до органогенів?
6. Чому різні органи рослини містять різну кількість золи?

РОБОТА 23

ВИЗНАЧЕННЯ В ЗОЛІ МАКРО- І МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

Поживні елементи, які поглинаються рослинами з ґрунту в різних концентраціях, мають певне біохімічне і фізіологічне значення і відповідають за синтез відповідних речовин у рослинному організмі.

Азот входить до складу амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, гормонів росту, багатьох вітамінів, хлорофілу й інших життєво важливих органічних сполук.

Фосфор – компонент фосфопротеїнів, нуклеїнових кислот (НК), фосфоліпідів, фосфорних ефірів цукрів, нуклеотидів. Особливе значення фосфору в енергетиці клітини, оскільки він входить до складу основних енергетичних депо АТФ і НАДФ. Фосфор посилює накопичення цукрів у фруктах і овочах, крохмалю в бульбах картоплі.

Калій складає основну частину катіонів клітинного соку і є основним йоном нейтралізації від'ємно заряджених аніонів. Цей макроелемент сприяє підтримці стану гідратації колоїдів цитоплазми, регулює її водоутримуючу здатність і забезпечує надходження води в рослину, допомагає рослинам легше переносити посуху і заморозки. Калій потрібен для поглинання і транспортування води по рослині, один із катіонів-активаторів ферментних систем. Під впливом калію посилюється накопичення крохмалю в бульбах картоплі, сахарози в цукровому буряку, моносахаридів у плодах і овочах, підвищується стійкість рослин до грибкових і бактеріальних захворювань.

Кальцій стабілізує функції усіх клітинних структур. Йони кальцію виконують сигнальну функцію і є універсальними регуляторами життєдіяльності клітини. Кальцій регулює активність ферментів, бере участь у структурній організації хромосом, є зв'язуючою ланкою між ДНК і білком, виконує різноманітні функції в обміні речовин організму.

Магній входить до складу хлорофілу, підтримує структуру рибосом, сприяє обміну речовин, підвищує активність ферментів, він необхідний для процесів дихання, фотосинтезу, синтезу НК і білків. Магній підсилює синтез ефірних олій, каучуку, вітамінів А і С.

Сірка входить до складу амінокислот – цистину, цистеїну, метіоніну; вітамінів – ліпоєвої кислоти, біотину, тіаміну; деяких антибіотиків, зокрема пеніциліну та багатьох ферментів. Одна з основних функцій сірки – участь SH-групи в утворенні ковалентних, водневих, меркаптидних зв'язків. Інша важлива функція сірки – підтримка певного рівня окисно-відновного потенціалу клітини. Залізо міститься в окисно-відновних ферментах (цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза) і має важливе значення у диханні рослин, фотосинтезі, синтезі хлорофілу тощо.

В аналітичній хімії існує низка методів, за допомогою яких можна якісно й кількісно визначати наявність у золі певних елементів. Це потрібно для встановлення потреби рослин в елементах живлення.

Мета роботи. Визначити хімічний склад золи деревини кількох видів рослин: яблуні, сосни, берези; оцінити значення золи як мінерального добрива.

Матеріали, реактиви, обладнання. Зола деревини досліджуваних рослин; вода дистильована, HNO_3 (конц.), CH_3COOH (конц.), 1 н. розчин NaOH , 5 %-і розчини HCl , NH_4CNS , гексанітрокобальтату натрію, щавлевої кислоти, 10 %-і розчини $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, BaCl_2 , HNO_3 , етиловий спирт, кристалічний NH_4NO_3 , пероксид свинцю, персульфат амонію; порцелянові тиглі, електрична плитка, фільтри, пробірки, лакмусовий папір, піпетки, чашки Петрі.

Хід роботи.

1. У порцеляновий тигель помістити 1 г золи, додати 1 мл концентрованої HNO_3 , перемішати скляною паличкою і додати 10-20 мл дистильованої води.

2. Тигель з кислотною витяжкою золи поставити на електричну плитку, розчин довести до кипіння, відфільтрувати.

3. Одну частину фільтрату розлити у три пробірки по 2 мл для визначення калію, фосфору, сірки.

- Визначення калію. До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл кобальтнітриту натрію і 2 мл етилового спирту. Витримати 15-30 хв. За наявності йонів калію випадає жовтий осад.

- Визначення фосфору. До 2 мл фільтрату внести кристали нітрату амонію NH_4NO_3 , довести до кипіння, додати 1 мл 10 %-го водного розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. За наявності йонів фосфору випадає золотаво-жовтий осад.

- Визначення сірки. До 2 мл фільтрату додати 1 мл 10 %-го розчину BaCl_2 . За наявності SO_4^{2-} утворюється біла каламуть.

4. Другу частину фільтрату довести розчином NaOH до слабкої лужної реакції (за лакмусом) і відфільтрувати драглистий осад, в якому міститься $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Mn}(\text{OH})_2$.

Увага! Осад зберігають для визначення заліза та марганцю (див. п. 6.).

5. Лужний розчин після фільтрування нейтралізувати HCl і підкислити кількома краплями оцтової кислоти для визначення кальцію.

- Визначення кальцію. До 2 мл фільтрату додати 1 мл 5 %-го розчину щавлевої кислоти. За наявності йонів кальцію розвивається біла каламуть.

6. Драглистий осад на фільтрі облити 10 мл азотної кислоти, відфільтрувати, фільтрат розлити у дві пробірки по 2 мл для визначення заліза і марганцю.

Примітка. Використовують фільтрат, що залишився після відокремлення драглистого осаду, нейтралізований та підкислений оцтовою кислотою (п. 4).

• Визначення заліза. До фільтрату в пробірку додати 2-3 краплини 5 %-го NH_4CNS . За наявності заліза розвивається червоне забарвлення.

• Визначення марганцю. До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл концентрованої азотної кислоти і 0,5 мл пероксиду свинцю (або 0,1 г персульфату амонію), нагріти 5 хв. на киплячій водяній бані. Якщо є марганець, розчин забарвлюється у фіолетовий колір.

7. Результати дослідів записати у таблицю 13.

Таблиця 13.

Хімічний склад золи

Елемент	Реактив	Результат реакції

Контрольні запитання та завдання

1. Що таке вибіркова поглинальна здатність?
2. Чому концентрація поживних елементів у рослин і в ґрунті суттєво відрізняється?
3. Наведіть приклади життєво необхідних елементів живлення рослин.
4. Яке фізіологічне значення життєво необхідних елементів у метаболізмі рослин

РОБОТА 24.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ

Мінеральні речовини рослини засвоюють з ґрунту у формі різних сполук. Азот в процесі живлення рослини використовують в різних формах, це:

- 1) молекулярний азот повітря;
- 2) нітратна та амонійна форми;
- 3) органічний азот

Нітратна форма азоту є найоптималькішою для живлення рослинного організму. Нітрати (солі азотної кислоти) рослини поглинають кореневою

системою, відновлюючи їх до аміаку. Аміак з кетокислотами утворює амінокислоти. Також, під дією різних чинників нітрат може проходити паренхіму кореня рослини в незмінному вигляді і по ксилемі з висхідним током потрапляти до листків, де відбувається фотохімічне відновлення нітрату до аміаку

При необґрунтованому використанні, передозуванні азотних добрив, недостатньому освітленні нітрата накопичуються в рослинах, плодах, овочах. Допустимий вміст нітратів складає 2-3 мг на 1 кг сирової маси. Найбільша локалізація нітратів моркви, буряку та ін. у верхній частині коренеплоду (ближче до листків).

Отже, мати уяву про вміст нітратів необхідно для оцінки якості продукції вживаної в їжу.

Мета роботи: визначити вміст нітратів в різних рослинах порівнянням забарвлення з контрольними концентраціями нітратів.

Прилади і матеріали: рослинні об'єкти контрольний розчин нітратів (1,631 г хімічно чистого сухого KNO_3 розчинити у дистильованій воді і довести до 1 л), 0,5% розчин дифеніламіну в концентрованій сірчаній кислоті, ручний прес для видавлювання соку з дослідних об'єктів, піпетки, скальпелі, фарфорові ячейки для соку та контрольних розчинів.

Хід роботи

1. Приготувати контрольні стандартні розчини з концентрацією NO_3 на 1 л дистильату: 10 мг, 125, 250, 500, 1000.

2. Стандартні розчини NO_3 помістити у фарфорові ячейки від нижчої довищої концентрації.

3. В інші ячейки помістити по 2 краплини соку досліджуваних об'єктів(або гомогенної маси, отриманої з рослини).

4. До стандартних розчинів і соку дослідних об'єктів додати по 1 краплині реактиву дифеніламіну. Реактив взаємодіє з азотом і синіє через 1-2 хвилини. Надалі забарвлення буде змінюватися, тому провести порівняння забарвлення з стандартними контрольними розчинами різних концентрацій потрібно швидко.

Об'єкт	Забарвлення	Кількість нітратів

У висновку вказати, в яких органах дослідних рослин відбувається відновлення нітратів і як зовнішні умови впливають на їх вміст у рослинах.

Контрольні запитання

1. Яким чином нітратна форма перетворюється на амонійну в рослині?
2. Якими методами можна визначити вміст нітратів в рослині?
3. При нестачі азоту та інших елементів мінерального живлення в рослині, які зовнішні ознаки ми спостерігаємо?
4. В процесі живлення якими шляхами рослина може отримувати азот?
5. Допустима норма нітратів і нітритів в рослині.
6. Яка фізіологічна роль макро-, мікро- та ультрамікроелементів?
7. В яких органах рослини нітрати піддаються перетворенням?

Контрольні запитання та завдання до розділу «Кореневе живлення рослин»

1. Назвіть основні функції поживних елементів. Як їх класифікують?
2. Що таке методи штучних культур (водних, піщаних, ґрунтових)?
3. Які діагностичні прийоми застосовують для визначення потреб рослин в елементах мінерального живлення?
4. Охарактеризуйте фізіологічне значення елементів-органогенів, макро- та мікроелементів для рослин.
5. Яка будова та функції кореня рослини?
6. Як відбувається поглинання поживних речовин кореневою системою?
7. Що таке вибіркова проникність?
8. Назвіть механізми транспортування йонів по рослині?
9. Порівняйте симпластний та апопластний транспорт речовин.
10. Що таке антагонізм, синергізм і адитивність йонів?
11. Яке екологічне значення корневих виділень рослин?
12. Як властивості ґрунту впливають на процес кореневого живлення рослин?
13. Як відбувається надходження поживних речовин до поверхні коренів?
14. Як реагує рослина на концентрацію йонів водню?
15. Що таке «фізіологічно кислі» та «фізіологічно лужні» солі?
16. Назвіть етапи кругообігу азоту в природі.
17. Дайте характеристику основним джерелам азотного живлення вищих рослин?
18. Схарактеризуйте шляхи асиміляції азоту в рослинах.

19. Які ферментні системи беруть участь у відновленні нітратів?
20. Яке значення мають процеси амоніфікації та нітрифікації для живлення рослин?
21. Яким чином можна визначити потреби рослин в елементах живлення?
22. Назвіть фізіологічні основи застосування мінеральних добрив.
23. Що таке гідропоніка й аеропоніка?
24. Які ознаки рослин свідчать про нестачу елементів живлення?
25. Чому мінеральні добрива можуть бути джерелом забруднення довкілля? Яким чином цього можна уникнути?

Розділ 6.

РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН

Ріст – це незворотне збільшення розмірів і маси клітин, тканин і органів рослин, пов'язане з новоутворенням елементів їхньої структури. Розвиток – це якісні зміни в структурі та життєдіяльності рослин в онтогенезі. З наведених означень зрозуміло, що ріст і розвиток належать до інтегральних процесів, вивчення яких потребує багатогранного підходу, їх слід досліджувати на різних рівнях організації – субклітинному (молекулярному, надмолекулярних комплексів, окремих органел), тканинному, органному та рівні організму. Це можливо у разі застосування сучасних методів молекулярної біології, біохімії, цитології, гістології, імунології, біофізики, фізіології та ін. Лише всебічний аналіз процесів дає можливість проникнути в глибинні механізми росту та розвитку і відкриває можливості регуляції життєдіяльності рослин.

Ріст і розвиток детермінуються генетично та реалізуються під впливом багатоваріантних умов довкілля, фактори якого моделюють експресію геному. Серед них велике значення мають метеорологічні фактори, трофічна, електрофізіологічна і фітогормональна регуляції.

Ріст пов'язаний з локально розташованими твірними тканинами, тому частина лабораторних робіт розділу знайомить студентів із зонами росту рослин і цитологічними особливостями їхніх клітин. Звернуто увагу на початковий етап онтогенезу рослин – проростання насіння і методи визначення його життєздатності, явище апікального домінування, гео- і фототропічні реакції. Низка завдань присвячена вивченню ролі фітогормонів і вегетативному розмноженню рослин. Ці дослідження потребують значного інтервалу часу, їх доцільно проводити під час літньої виробничої практики.

РОБОТА 25

ВИРОЩУВАННЯ РОСЛИН НА ПОВНІЙ ПОЖИВНІЙ СУМІШІ З ВИКЛЮЧЕННЯМ ОКРЕМИХ ПОЖИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

За даними В. І. Вернадського, до складу живої матерії речовини рослин входять 37 хімічних елементів; тепер встановлено, що кількість їх ще більша – у організмі рослин знаходяться майже всі елементи, які зустрічаються в земній корі. Відомо, що присутність хімічних елементів у золі та визначення їх відсоткового вмісту не є доказом того чи іншого елемента для життєдіяльності рослини. Для того щоб з'ясувати, які елементи живлення необхідні рослинам, проводять експерименти з водними культурами. Було встановлено, що рослини нормально розвиваються при наявності в поживному розчині шести мікроелементів (азоту, калію, кальцію, фосфору, магнію і сірки) та семи мікроелементів (бору, марганцю, цинку, міді, молібдену, заліза і кобальту).

Особливістю методу водних культур є те, що всі необхідні елементи мінерального живлення вносять у вигляді солей, які добре розчиняються у воді. Склад живильного середовища може змінюватися будь-який час експерименту згідно зі схемою досліду.

Реакція рослин (зміна обміну речовин, затримка росту, розклад структур) при вилученні різних елементів із поживного середовища неоднакова. Найшвидше проявляється нестача азоту і кальцію. Обмін азоту безпосередньо пов'язаний з ростом завдяки тому, що він входить до складу ростових речовин, білків і нуклеїнових кислот. Кальцій не є таким необхідним, як азот, але він не придатний для повторного використання (реутилізації). Високий ступінь реутилізації властивий фосфору, сірці, калію, натрію, меншій – магнію. Тому, навіть при повному вилученні цих елементів помітити зміни в рослині можна не раніше, як через два тижні. Важко реутилізуються залізо, молібден, кобальт, мідь, цинк і марганець.

Для визначення ролі добрив використовують крім водних, ще піщані і ґрунтові культури, тобто культивують рослини у вегетаційних посудинах, заповнених піском або ґрунтом. Доцільність використання тієї чи іншої модифікації витікає із завдань експерименту.

Мета роботи: освоїти техніку водних культур та виявити необхідність окремих елементів для росту рослин.

Прилади і матеріали: 7-денні проростки кукурудзи, сухі солі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Fe_2Cl_6 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl , 3%-й розчин H_2O_2 , аналітичні терези, банки з пропарафінованими

кришками з двома отворами (4 шт), негігроскопічна вата, лінійка, чорний і білий папір.

Хід роботи

1. Чотири літрові скляні банки обгорнути спочатку чорним папером (запобігаючи розвитку водоростей), а потім – білим (щоб не допустити перегріву коренів під дією сонячних променів). На кожному банку прикріплюють етикетки і наливають по 700 мл водопровідної води.

2. Приготувати повну поживну суміш Кнопа (варіант №1):

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1 на 1 літр води;

KCl – 0,125 г

MgSO_4 – 0,25 г

KH_2PO_4 – 0,25 г

Fe_2Cl_6 – 0,0125 г (додати приблизно 6 крапель 1 %-ого розчину).

3. У варіанті №2 використовують суміш без азоту. Замість солі, що містить у своєму складі азот - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, у суміш додають сіль $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Сіль-замінник необхідно додати в еквівалентній кількості. Вміст кальцію в суміші має залишатися без змін.

Приклад розрахунку кількості солі-замінника:

Спочатку розраховують кількість кальцію (молекулярна маса 40) в 1 г солі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (молекулярна маса 164):

164 – 40

$$1 - x \qquad x = \frac{40 \cdot 1}{164} = 0,24 \text{ (г)}$$

Потім установлюють кількість солі $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (молекулярна маса 172), яка містить 0,24 г кальцію:

172 – 40

$$x - 0,24 \qquad x = \frac{172 \cdot 0,24}{40} = 1,03 \text{ (г)}$$

Отже, для вивчення впливу азоту у варіанті №2 замість солі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ беруть 1,03 г солі $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

4. У варіанті №3 зі суміші вилучають *фосфор*. Замість солі KH_2PO_4 беруть сіль KCl в еквівалентній кількості за вмістом калію.

5. У варіанті №4 із суміші вилучають *калій*. Для цього замість солей KCl і KH_2PO_4 використовують NaCl і $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в еквівалентній кількості за вмістом хлору і фосфору.

6. Склад поживних середовищ представлено в таблиці

Реактив г/л	№1 повний розчин	№2 без N	№3 без P	№4 без K

Ca(NO ₃) ₂	1,0	-	1,0	1,0
KH ₂ PO ₄	0,25	0,25	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
KCl	0,125	0,125	0,255	-
CaSO ₄ ·2H ₂ O	-	1,03	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	0,25
NaCl	-	-	-	0,09
Fe ₂ Cl ₆	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125

7. Наважки солей розчинити у невеликій кількості води і налити у відповідні банки. Розчини перемішати, банки заповнити водою, не доливаючи до мітки 2-3 см.

8. Відібрати 8 однакових проростків кукурудзи. Від дослідних рослин треба обережно відрізати ендосперм. Виміряти довжину проростків, визначити їх масу, а також кількість, загальну довжину і колір листків. Після вимірів рослини обгорнути біля кореня негігроскопічною ватою і закріпити в отворах кришок (на кожній кришці по дві рослини). Корені мають бути занурені в розчин, ватна пробка залишається сухою.

9. Протягом досліду двічі на тиждень необхідно доливати воду до певного об'єму і 5 хв. продувати за допомогою гумової груші для насичення киснем (цю операцію можна замінити додаванням 3-4 крапель 3%-го розчину перекису водню, який при розщепленні виділяє молекулярний кисень)

10. У кінці досліду (через тиждень) описати рослини, підрахувати масу надземної частини і кореня.

11. Результати досліду представити в таблицю.

№ варіанта	Довжина стебла, см		Кількість листків		Загальна довжина листків, см		Колір листків	Сира маса рослини, г
	початк ова	кінцев а	початк ова	кінцев а	початк ова	кінцев а		

Контрольні запитання

1. Які хімічні елементи належать до мікроелементів, а які до мікроелементів?
2. Нестача яких мікроелементів виявляється швидше за інші та чому?
3. Для яких елементів властива швидка реутилізація в рослині?
4. На листках якого ярусу найшвидше спостерігаються симптоми нестачі фосфору і калію?
5. Які функціональні зміни спостерігаються при незбалансованому живленні рослин?

РОБОТА 26

ВИЯВЛЕННЯ РИТМІЧНОСТІ РОСТУ РОСЛИН

Одним з найвидатніших узагальнень кінця позаминулого століття, яке мало загально біологічне значення, було встановлення Ю. Саксом універсальності кривих росту окремих клітин, тканин і органів, організмів та популяцій. Виявилось, що ріст усіх форм живого можна виразити сигмоїдною кривою, або кривою «великого періоду росту». Спочатку ріст клітин дуже сповільнений, в цей період відбуваються інтенсивні біохімічні процеси, пов'язані з нагромадженням енергії. У логарифмічній фазі ріст, урахований за будь-яким показником (лінійний розмір, поверхня, об'єм, маса, новоутворення структур цитоплазми), виражається прямою лінією щодо часу. Кількість хімічної енергії, яка локалізована у вигляді АТФ, на одиницю маси в цей період різко зменшується. У фазах сповільненого росту і стаціонарного стану зміни в перерахованих параметрах, що характеризують ріст, украй незначні, через нестачу енергії орган втрачає здатність боротися за фактори середовища та чинити опір вірусам і зазнає деструктивних процесів під впливом нових органів, які почали рости чи відкладати речовини про запас.

Чергування сповільненого та інтенсивного росту клітини, органа, організму і популяції називають **ритмічністю росту**. Однією з причин сповільненого і повного припинення росту рослин у природних умовах є дія несприятливих навколишніх факторів. Однак ендогенні причини (рівень нуклеїнових кислот, фосфорилування, гормональна регуляція) також викликають ритмічність росту. Зокрема, припинення росту деревних порід у наших умовах відбувається ще в липні – порі року, яка за своїми умовами сприятлива для росту. У тропіках також майже всім рослинам властиве періодичне призупинення ростових процесів. У деревних порід його легко можна спостерігати за довжиною міжвузлів, що утворюються в процесі росту пагона.

Мета роботи: дослідити динаміку росту пагона деревної рослини.

Прилади і матеріали: однорічний пагін деревної рослини, лінійка, папір у клітинку.

Хід роботи

1. Взяти однорічний пагін деревної породи і виміряти довжину кожного міжвузля, починаючи з основи пагона – місця, де була торішня верхівкова брунька. Потім до верху всі листові рубці пронумерувати. При цьому важливо не випустити з уваги зближені рубці в основі та на верхівці пагона.

2. Одночасно зробити два виміри: довжини міжвузлів (відстані між двома сусідніми листовими рубцями) і пагона (відстані між першим рубцем і кожним наступним). Зрозуміло, що довжина пагона на певний період росту кількісно має бути сумою довжин міжвузлів, що з'явилися на цей час, а довжина всього пагона дорівнює сумі довжин усіх міжвузлів.

3. Одержані дані записати в таблицю.

Довжина, мм	Порядковий номер міжвузля									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Міжвузля										
Пагона										

4. За одержаними даними побудувати два графіки: **криву ритмічності росту** (за довжиною міжвузлів) і **велику криву росту** (за довжиною пагона від основи до кожного наступного листового рубця). Для цього на осі абсцис відкласти порядкові номери міжвузлів, а на осі ординат – довжину міжвузлів (перший графік) чи наростаючу довжину пагона (другий графік). В останньому випадку підібрати необхідний масштаб.

Контрольні запитання

1. Що таке крива «великого періоду росту»?
2. Що таке ритмічність росту?
3. Які причини явища сповільненого росту рослин?
4. Які процеси відбуваються у фазах сповільненого росту і стаціонарного стану?
5. Чим пояснюється логарифмічна фаза росту рослин?

Контрольні запитання та завдання до розділу “Ріст і розвиток рослин”

1. Назвіть етапи онтогенезу рослинної клітини.
2. Назвіть етапи життєвого циклу вищих рослин.
3. Назвіть типи росту рослин. Що зумовлює різноманітність типів росту?
4. Що таке адвентивний ріст? Які структури називають адвентивними?

5. Що таке корелятивний ріст? Наведіть приклади практичного використання корелятивного росту.
6. Як змінюється швидкість росту з часом? Схарактеризуйте велику криву росту.
7. Поясніть, що таке періодичність росту, циркадна ритміка, біологічний годинник.
8. Поясніть явище полярності у рослин.
9. Назвіть системи регуляції морфогенезу рослин на рівні клітини і цілого організму.
10. Яке значення гормональної системи регуляції для багатоклітинних рослинних організмів?
11. Що таке фітогормони? Назвіть класи фітогормонів.
12. Які речовини є попередниками фітогормонів?
13. Назвіть основні прояви фізіологічної дії ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, а також абсцизової кислоти та етилену.
14. Що таке фотоперіодизм? Яка функція фотоперіоду в регуляції росту і розвитку рослин?
15. Наведіть приклади рослин довгого і короткого дня та нейтральної групи.
16. Які ймовірні механізми дії фітохрому?
17. Як впливає температура на перехід рослин до цвітіння? Що таке яровизація?
18. Назвіть основні положення гормональної теорії цвітіння.
19. Поясніть участь фітохрому та біологічного годинника в індукції цвітіння.
20. Які процеси лежать в основі рухів рослин?
21. Сформулюйте основні положення гормональної теорії тропізмів.
22. Що таке настичні рухи?
23. Назвіть ймовірні механізми настій.
24. Що таке таксиси?
25. Назвіть основні форми розмноження рослин.
26. Назвіть основні стимулятори росту рослин природного та синтетичного походження. Як вони застосовуються на практиці?
27. Чому в рослинництві частіше використовують синтетичні, а не природні регулятори росту?

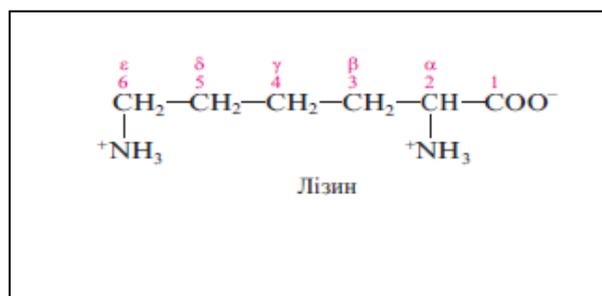
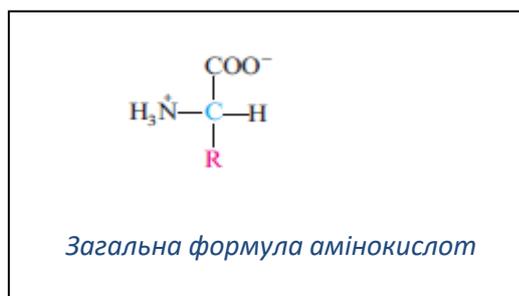
РОЗДІЛ 7

БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Білки – це органічні сполуки, які містять карбон (51-55%), гідроген (6,6-7,3%), кисень (21-23%), нітроген (15-18%), сірку (0,3-2,4%), а деякі білки - фосфор (0,2-2%), залізо та ін. Характерною особливістю елементарного складу білків у всіх організмів є наявність нітрогену.

Білки виконують такі **функції**: ферментативну, структурну, рецепторну, транспортну, захисну, рухову, гормональну, енергетичну тощо.

Білки – це високомолекулярні органічні сполуки (полімери), мономерними одиницями яких є амінокислоти. *Амінокислотами* називають органічні кислоти, у молекулах яких один або кілька атомів водню заміщені аміногрупами. Усі амінокислоти, що входять до складу білків, є α -амінокислотами, тобто їхня аміногрупа (NH_2) перебуває в α -положенні (поряд) з карбоксильною групою (COOH).



Пептидний зв'язок ($-\text{CO}-\text{NH}$) утворюється при взаємодії карбоксильної групи однієї амінокислоти із аміногрупою іншої амінокислоти.

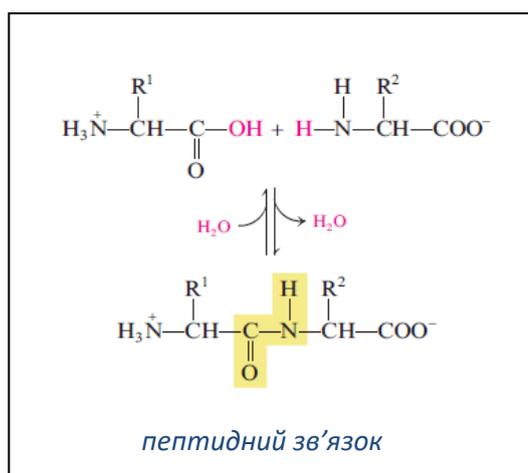
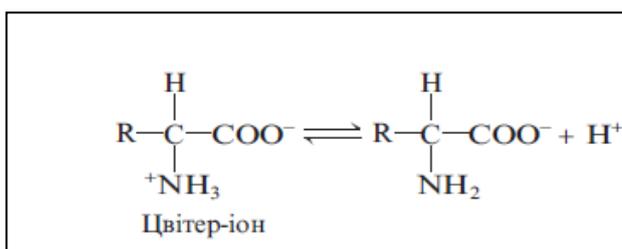
У природі існує понад 150 різноманітних амінокислот, однак лише 20 амінокислот входять до складу білків, які зустрічаються у рослин та тварин. Вищі рослини синтезують усі 20 амінокислот.

Класифікація амінокислот. 1) Розрізняють *замінні* амінокислоти, які синтезуються в організмі (гліцин, аланін, серин, аспарагін, глутамін, пролін, тирозин, цистеїн, аспарагінова та глутамінова кислоти); *незамінні* амінокислоти, які не синтезуються в організмі і потрапляють з їжею (валін, треонін, лізин, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан) та частково замінні амінокислоти (аргінін, гістидин). 2) В залежності від полярності R(радикальних)-груп амінокислоти поділяються на 4 класи: *неполярні (гідрофобні)* – аланін, лейцин, ізолейцин, валін і метіонін; *полярні, але незаряджені* – серин, треонін, цистеїн, аспарагін, глутамін; *позитивно*

заряджені – лізин, аргінін, гістидин; негативно заряджені – аспарагінова і глутамінова кислоти. 3) Амінокислоти можуть бути похідними жирних і ароматичних кислот, тому їх поділяють на ациклічні (аліфатичні) та циклічні (гомоциклічні – фенілаланін, тирозин та гетероциклічні – триптофан, гістидин, пролін). 4) Ациклічні амінокислоти в залежності від кількості карбоксильних і амінних груп розрізняють моноаміномонокарбонові (гліцин, аланін, серин, цистеїн, треонін, валін, лейцин, ізолейцин), моноамінодикарбонові (аспарагінова та глутамінова кислоти), діаміномонокарбонові (лізин, аргінін), діамінодикарбонові (цистин) кислоти.

Класифікація білків.1) В залежності від форми або конформації білки поділяють на – глобулярні (ферменти, гормони) і фібрилярні (кератин, фіброїн). 2) За фізико-хімічними властивостями білки класифікуються на прості (протеїни) та складні (протеїди). При гідролізі простих білків отримують лише амінокислоти, тоді як при гідролізі складних білків - амінокислоти та речовини небілкової природи (вуглеводи, ліпіди, фосфорна кислота, нуклеїнові кислоти тощо). Небілковий компонент складних білків називається простетичною групою. До протеїнів належать гістони та протаміни; альбуміни і глобуліни; глютеліни і проламіни. Розрізняють хромопротеїди (гемоглобін, хлорофіл), фосфопротеїди (казеїноген, вітелін, іхтулін), ліпопротеїди, глікопротеїди (гормони) і нуклеопротеїди.

Властивості білків та амінокислот. У водних розчинах при нейтральному значенні рН амінокислоти існують у вигляді біполярних іонів (цвітер-іонів) (коли R не дисоціюється).



Тому в залежності від зміни рН середовища амінокислоти поведуть себе як кислоти або як основи (амфотерні властивості). У кислому середовищі карбоксильна група нейтралізується і амінокислота реагує як катіон. У

лужному середовищі цвітер-іон амінокислоти втрачає протон і амінокислота реагує як аніон. Значення рН, при якому молекула білка існує в електронно-нейтральній формі, називається *ізоелектричною точкою*.

Під дією різних фізико-хімічних факторів (іони важких металів, концентровані кислоти, луги, високі температури, механічний вплив) змінюється структура і нативні властивості білків. Це явище називається *денатурація*. У денатурованих білків змінюється вторинна, третинна і четвертинна структура, а пептидний зв'язок зберігається.

Більшість білків розчиняються у воді і утворюють колоїдні розчини. Колоїдний стан і великі розміри білкових молекул не дозволяє проходити їм через напівпроникні мембрани. Цю властивість використовують для очищення розчинів білків від низькомолекулярних сполук, а метод очистки білків називається діалізом.

РОБОТА 27.

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Мета роботи. Ідентифікувати наявність амінокислот (циклічних, сірковмісних тощо), пептидних зв'язків у складі білків з використанням кольорових (якісних) реакцій.

1. Біуретова реакція на пептидні зв'язки.

Принцип реакції. Білки в лужному розчині за наявності двохвалентного сульфату міді утворюють комплексні сполуки міді, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка.

Матеріали та реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), 10% розчин NaOH чи KOH, 1% розчин CuSO₄.

Обладнання. Скляні палички, штатив, пробірки, піпетки, крапельниця.

Хід роботи.

Спочатку необхідно приготувати розчин яєчного білка. Для цього білок одного яйця відділяють від жовтка, розчиняють його у 15-20 кратному об'ємі дистильованою водою. Отриманий розчин білка фільтрують через 3-4 шару марлі.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка, 1 мл розчину NaOH і додають 1-2 краплі розчину CuSO₄ та обережно перемішують. Після чого розчин у пробірці має забарвитися у синьо-фіолетовий колір.

2. Реакції на амінокислоти.

А. Реакція з азотистою кислотою.

Принцип реакції.Продуктом взаємодії α -амінокислот з азотистою кислотою, яка утворюється в реакції нітриту натрію та оцтової кислоти, є газоподібний азот.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), 5% розчин нітриту натрію (NaNO_2), концентрована оцтова кислота (CH_3COOH).

Обладнання. Штатив, пробірки, крапельниця.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 5 крапель розчину білка, додають 5 крапель розчину NaNO_2 і 2 краплі розчину CH_3COOH . Суміш у пробірці обережно перемішують, після чого має спостерігатися виділення газу.

Б. Реакція утворення комплексної солі міді.

Принцип реакції. Під час нагрівання амінокислоти з карбонатом міді (CuCO_3) утворюється комплексна сполука міді, яка має синє забарвлення.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), сухий карбонат міді.

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають на кінчику лопатки сухий карбонат міді, далі вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння. Розчин у пробірці має забарвитися у синій колір.

В. Ксантинпротейнова реакція на циклічні амінокислоти.

Принцип реакції. В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця, під дією азотистої кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (тирозин-вмісний), концентрована азотна кислота (HNO_3), 10% розчин NaOH .

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до появи жовтого забарвлення та охолоджують до кімнатної температури і додають 1-2 краплі 10% розчину NaOH . Після чого суміш у пробірці має забарвитися у помаранчевий колір.

Г. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти.

Принцип реакції. При нагріванні розчинів цистину або цистеїну у лужному середовищі відбувається гідроліз сульфгідрильної групи з подальшим утворенням відповідних сульфідів натрію або калію. Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів (іонів свинцю), які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (ячний), реактив Фоля (до 10% розчину ацетату свинцю $Pb(CH_3COO)_2$ додають 10% розчин NaOH до розчинення осаду), 20% розчин NaOH.

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, скляні палички, водяна баня.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають 2 мл 20% розчину NaOH і 1 мл реактиву Фоля. Вміст пробірки ретельно перемішують і поступово нагрівають на водяній бані до появи бурого чи чорного осаду сульфиду свинцю.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Основні правила поведінки та техніка безпеки в навчальній біохімічній лабораторії. Перша допомога при нещасних випадках.
2. Основні принципи класифікації амінокислот. Навести представників.
3. Написати структурну формулу дипептида (на ваш вибір), позначити пептидний зв'язок.

РОБОТА 28.

РЕАКЦІЯ ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БІЛКІВ.

Мета роботи. Досліджити вплив фізико-хімічних чинників на структурний стан білку.

Для осадження білків використовують методи висолювання, що обумовлені нейтралізацією заряду білка з одночасною дегідратацією його колоїдних частинок. При висолюванні білок майже не втрачає свої фізико-хімічні властивості і у разі зміни концентрації солі може переходити назад у розчин. При висолюванні біологічні властивості білків мають зворотній характер.

Матеріали та реактиви. 1% водний розчин ячного білка, 1% розчин оцтової кислоти, насичений розчин хлориду натрію, 10% розчин гідроксиду натрію, концентрована азотна кислота, 20% розчин сульфосаліцилової кислоти,

10% розчин трихлороцтової кислоти (ТОК), 10% розчин пікринової кислоти, насичений розчин таніну, 1% розчин гексаціано (II)-ферату калію, 0,1% розчин сульфату міді, 1% розчин ацетату міді, 96% розчин етилового спирту, 95% розчин ацетону, насичений розчин сульфату амонію, кристалічний сульфат амонію.

Обладнання. Фільтрувальний папір, скляні палички, пробірки зі штативом, крапельниці, піпетки градуйовані, пробірки центрифужні, лійки скляні, пальник, водяна баня, центрифуга.

А. Осадження білків при нагріванні.

Принцип реакції. Більшість білків при нагріванні втрачають свої нативні властивості за рахунок руйнування нековалентних зв'язків. Найкращим методом осадження білків є кип'ятіння його розчину при значеннях рН середовища наближених до ізоелектричної точки білків.

Хід роботи.

У п'ять пробірок за допомогою піпетки вносять по 2,5 мл розчину яєчного білка. Розчин білка в пробірці №1 нагрівають до кипіння, він мутнішає, спостерігається опалесценція розчину, що зумовлено руйнуванням гідратної оболонки навколо молекули білка, але міцели білка заряджені й тому залишаються в розчині, не випадаючи в осад. У пробірку №2 додають 1-2 краплі оцтової кислоти (для слабокислої реакції) та нагрівають до кипіння. Після відстоювання білок випадає в осад. За цих умов молекули білка втрачають заряд, тому що рН середовища близький до ізоелектричного стану. У пробірку №3 додають 1,5 мл розчину оцтової кислоти (для кислої реакції) і нагрівають до кипіння. Під час кипіння розчину осад не утворюється, оскільки молекули білка набувають позитивного заряду, що підвищує їх стійкість. У пробірку №4 додають 2,5 мл насиченого розчину хлориду натрію та нагрівають до кипіння. У пробірці спостерігається випадіння білого осаду. Його утворення викликане тим, що білок внаслідок взаємодії з іонами хлориду натрію втрачає свій заряд. У пробірку №5 додають 2 мл розчину гідроксиду натрію для створення лужного середовища і нагрівають до кипіння. Під час кип'ятіння рідини осад у пробірці не утворюється, оскільки в лужному середовищі збільшується від'ємний заряд білка.

Б. Осадження білків кислотами.

Принцип реакції. Неорганічні та органічні кислоти осаджують білки в результаті денатурації та дегідратації білкових молекул, а також внаслідок утворення комплексних солей білків із кислотами. При надлишку всіх

неорганічних кислот, крім азотної кислоти, осад розчиняється внаслідок утворення позитивного заряду на молекулі білка.

Хід роботи.

У три пробірки вносять по 1 мл кислоти: у пробірку №1 – концентровану азотну кислоту, у пробірку №2 – 10% розчин ТОК, у пробірку №3 – 20% розчин сульфосаліцилової кислоти. До кожної пробірки по стінці обережно додають по 1 мл розчину білка. У пробірці №1 на межі розділення двох рідин утворюється осад у вигляді білкового кільця (проба Гелера). Вміст перемішують, доливають надлишок азотної кислоти й пересвідчуються, що осад не зникає. У пробірках №2 та №3 спостерігається випадіння білка в осад.

Осадження білків органічними розчинниками.

Хід роботи.

У дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. Потім у пробірку №1 додають 1 мл розчин етилового спирту, в пробірку №2 — ацетону. Розчини в обох пробірках мутнішають. Якщо до них додати по 1 мл насиченого розчину хлориду натрію, через деякий час білок випадає в осад.

В. Осадження білків алкалоїдними еактивами.

Принцип реакції. Механізм осадження білків алкалоїдними реактивами (таніном, пікриною, гексаціановою, фосфорно-вольфрамовою, фосфорно-молібденовою, феритовою кислотами та їх солями) зумовлений утворенням нерозчинних сполук цих реактивів із азотистими групами білка. В таких сполуках алкалоїдні реактиви є аніонами, а білки — катіонами. Для надання молекулі білка позитивного заряду розчин білка підкислюють оцтовою кислотою. В результаті позитивно заряджені частки білка легко взаємодіють із від'ємно зарядженими молекулами осаджувача. Білки, що мають позитивний заряд (протаміни, гістони), добре осаджуються алкалоїдними реактивами в середовищі без попереднього підкислення середовища інкубації.

Хід роботи.

У три пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка, по 0,5 мл розчину оцтової кислоти й по дві-три краплі таких речовин: у пробірку №1 — розчину пікринової кислоти, у пробірку №2 — насичений розчин таніну, у пробірку №3 — розчину гексаціано-(II)-ферату калію. У пробірках спостерігається випадіння осаду. Після додавання надлишку розчину гексаціано-(II)- ферату калію та розчину таніну осад розчиняється.

Г. Осадження білків іонами важких металів.

Принцип реакції. Солі важких металів (міді, ртуті, цинку, срібла, свинцю) здатні осаджувати білки, що обумовлено утворенням комплексних сполук. Іони

важких металів з'єднуються із сульфгідрильними (SH)групами радикалів залишків амінокислот, що призводить до зміни конформації молекул білків.

Хід роботи.

У дві пробірки вносять по 1 мл розчину яєчного білка. В пробірку №1 додають про краплям 5% розчин сульфату міді, в пробірку №2 — 5% розчину ацетату свинцю та спостерігають утворення осаду (з сіллю міді — блакитного кольору, свинцю — білого). Внаслідок додавання надлишку розчинів сульфату міді та ацетату свинцю осад, що утворився у пробірках, розчиняється.

Д. Осадження білків хлористим натрієм.

Принцип реакції. У водному розчині більшість білків та їх часток (міцел) заряджені й гідратовані, що зумовлює осадження білків у розчинах. Але за високої концентрації середніх солей (сульфату амонію, хлориду натрію), молекули яких у водних розчинах гідратовані, руйнуються водні оболонки білкових молекул. У результаті цього знижується електричний заряд білкової молекули за рахунок іонів солі, які адсорбуються на ній, міцели білка злипаються одна з одною, збільшуються та випадають в осад.

Хід роботи.

У пробірку вносять 3 мл розчину яєчного білка та хлорид натрію до повного насичення, через кілька хвилин в осад випадають глобуліни. Суміш фільтрують через фільтрувальний папір. У фільтраті містяться альбуміни, які не осаджуються. Якщо до фільтрату додати 1 мл розчину оцтової кислоти й нагріти суміш до кипіння на водяній бані, то альбуміни випадають в осад.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Властивості білків та амінокислот (колоїдні, амфотерні, електро-хімічні, фізико-хімічні тощо).
2. Що таке ізоелектрична точка білків?

РОБОТА 29.

ВИДІЛЕННЯ БІЛКІВ З РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ.

Мета роботи. Виділити протеїни (прості білки) із пшеничного борошна та ідентифікувати їх за допомогою кольорових реакцій.

Як відомо, білки у живому організмі становлять близько 45% від сухої ваги. Молекули білків відрізняються молекулярною масою, хімічною будовою, фізико-хімічними властивостями тощо, що дозволяє їх розділити та отримати ряд білкових фракцій. Для осадження білків використовують метод висолювання (див. Робота 27). Реакції осадження використовуються для

якісного та кількісного визначення білкових сполук. Реакції оборотного осадження використовують для виділення та розділення білків.

Білки за фізико-хімічними властивостями поділяються на прості та складні. До простих білків, або протеїнів належать: альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, глутеліни та проламіни.

Альбуміни — досить поширеними білками у складі клітин рослин та тварин. Це розчинені білки цитоплазми і складові фізіологічних рідин (крові, гемолімфи, молока тощо). Альбуміни добре розчиняються у воді, вони у своєму складі містять багато залишків лейцину (до 15%) і мало - гліцину, також містять лізин, аспарагінову та глутамінову кислоти. Альбуміни висолюються з розчину сульфатом амонію в межах насичення від 65% до 100%.

Глобуліни — також досить поширеними білками і є подібними за своєю хімічною природою до альбумінів. На відміну від альбумінів, глобуліни містять значну кількість гліцину (3-4%) і менш гідрофільні. Глобуліни гірше розчиняються у воді і висолюються 30-50% розчином сульфату амонію. Велика кількість глобулінів входить до складу сироватки крові.

Глутеліни — білки рослинного походження, що містяться переважно у складі насіння злаків. Вони багаті на глутамінову кислоту та лізин, добре розчиняються у розведених розчинах кислот та лугів. До цієї групи належать: білок пшениці — глутенін, білок кукурудзи — глутелін, білок ячменю — гордеїн, білок рису — оризенін тощо.

Проламіни – білки рослинного походження, що містяться в зернах злаків. Вони містять залишки проліну (10—15 %) та глутамінової кислоти (20—25 %). На відміну від глутелінів проламіни розчинні в 70% етиловому спирті. До проламінів належить білок ендосперму пшеничного зерна - гліадин. Разом з глутелінами проламіни є основними компонентами клейковини — субстанції білкової природи, кількість якої надає високу якість борошна та виробам з нього.

Матеріали та реактиви. Пшеничне борошно, біуретовий реактив, насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% розчин NaCl, 0,2% розчини NaOH, 0,2% розчин оцтової кислоти, 70% розчин етилового спирту.

Обладнання. Паперові фільтри, скляні лійки, порцелянові ступки, штатив із пробірками, водяна баня.

Хід роботи.

До порцелянаної ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл дистильованої води. Суміш, що утворилася, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Потім, через 2-3 хвилини, коли нерозчинні часточки борошна осядуть

на дно ступки, рідину, що залишилася, відфільтровують через паперовий фільтр. Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води. Промивну воду відстоюють 3 хвилини і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення інших фракцій білка.

Екстракція альбумінів.

Принцип реакції. Альбуміни виділяють з борошна шляхом висолювання з використанням розчину сульфату амонію.

Хід роботи.

Фільтрат, який утворився після першої екстракції білків з борошна, перевіряють на вміст білків. Для цього у пробіру 1 наливають 1 мл фільтрату та проводять біуретову реакцію. В пробірку 2 вносять 1 мл фільтрату, а потім порціями по 0,5 мл - насичений розчин сульфату амонію, до утворення осаду. Фіксують кількість витраченого сульфату амонію та розраховують його приблизну концентрацію у розчині, за якої білок випадав у осад.

Екстракція глобулінів.

Принцип реакції. Глобуліни виділяють з борошна шляхом висолювання з використанням розчину сульфату амонію.

Хід роботи.

Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів, обробляють 3 мл 10% розчину хлориду натрію та розтирають протягом 5 хвилин у ступці, відстоюють і відфільтровують. У фільтраті глобулінів визначають наявність білків із біуретовою реакцією та проводять реакцію висолювання білків (аналогічно до того, як це описано для альбумінів).

Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води, промивну воду відстоюють упродовж 3 хвилин і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення наступних фракцій білка.

Екстракція глутелінів.

Принцип реакції. Екстракцію глутелінів проводять із лужної витяжки пшеничного борошна із подальшим додаванням оцтової кислоти.

Хід роботи.

Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів і глобулінів, обробляють 3 мл 0,2% розчину NaOH, розтирають, відстоюють і відфільтровують. Потім до 10 крапель лужної витяжки додають по краплях 0,2 % розчин оцтової кислоти до появи осаду глутелінів (розчин стає каламутним).

Екстракція проламінів.

Принцип реакції. Екстракцію проламінів із пшеничного борошна проводять із використанням 70% розчину етанолу.

Хід роботи.

До порцелянової ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл 70% розчину етанолу. Суміш, що утворилась, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Вміст ступки відфільтровують. З фільтратом, який містить проламіни, проводять біуретову реакцію та реакцію осадження проламінів водою. Для цього до 10 крапель спиртової витяжки додають по краплинам дистильовану воду до появи осаду проламінів.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

Основні принципи класифікації білків. Навести представників.

РОБОТА 30.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА.

Мета роботи. Ознайомитися із основними принципами та методами визначення концентрації білку у досліджуваних розчинах.

Методи концентраційного аналізу, зокрема фотометричні (спектрофотометричні та колориметричні) базуються на законі Бугера-Ламберта-Бера. Завдяки розсіюванню світла в оптично неоднорідному середовищі інтенсивність плоскої світлової хвилі поступово зменшується внаслідок її поширення в середовищі. Ця залежність описується законом Бугера-Ламберта: $I = I_0 e^{-Ed}$, де I_0 та I – інтенсивність падаючого та розсіяного світла, відповідно; d – товщина шару розсіюючого середовища; E – коефіцієнт екстинції (він чисельно дорівнює товщині шару розсіюючого середовища, після проходження якого інтенсивність світла зменшується в $e \approx 2,718$ рази).

Для розбавлених розчинів розсіюючої речовини справедливим є закон Бера: $E = \epsilon \cdot c$ і закон Бугера-Ламберта-Бера приймає вигляд: $I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$, де c – концентрація розсіюючої речовини; ϵ – екстинція (стала, що залежить від довжини хвилі світла та властивостей розсіюючої речовини).

Спектр поглинання речовини – це залежність інтенсивності поглинутого світла речовиною від довжини хвилі (λ , нм). Молекули поглинають світло у широкому діапазоні довжин хвиль, тому їх спектри лежать в різних областях: ультрафіолет (200-400 нм), видиме (400-700 нм), близьке інфрачервоне (700-1200 нм).

Спектрофотометрія базується на вимірюванні поглинання монохроматичних випромінювань досліджуваних речовин у розчинах.

Спектрофотометричні методи дозволяють виявляти у незначних кількостях досліджувані речовини, які в процесі дослідження не руйнуються.

Розчини, які використовуються у спектрофотометричних вимірюваннях мають бути: прозорими, не містити пухирців повітря, які збільшують розсіювання світла; кімнатної температури, оскільки на стінках кювет може утворюватися конденсат води; об'єм рідини у кюветі має бути достатнім для того, щоб потік випромінювання проходив повністю через товщину розчину. Кювети для вимірювань мають бути чистими та сухими. Краплі, подряпини і бруд на стінках кювет розсіюють або поглинають світло. Оптичні стінки кювет не слід торкатися пальцями.

Для визначення концентрації досліджуваної речовини, зокрема кількості білка, у досліджуваному розчині з використанням спектрофотометра спочатку необхідно побудувати *калібрувальну криву (графік)*. Для побудови калібрувальної кривої готують декілька, не менше п'яти, стандартних розчинів досліджуваної речовини із відомою концентрацією та згідно протоколу виконують усі умови даної реакції. Далі вимірюють екстинцію, або оптичну густину поглинання проб при певній довжині хвилі (згідно протоколу). За результатами вимірювання екстинції стандартних розчинів, зокрема білка, будують на міліметровому папері калібрувальний графік, тобто залежність оптичної густини розчину (λ , нм) від вмісту білка (мг/мл). Калібрувальну криву будують, наносячи відносно вісі абсцис (X) відомі значення концентрації стандартних розчинів, а на вісі ординат (Y) – відповідну їх екстинцію при певній довжині хвилі. Калібрувальна крива має мати вигляд прямої, яка виходить із початку координат. При зміні реактивів калібрувальний графік потрібно побудувати заново. Графік, отриманий при роботі на одному спектрофотометрі не підходить для роботи на іншому приладі, оскільки прилади відрізняються чутливістю спектрофотометричних визначень.

Кількісне визначення білка у розчинах за допомогою спектрофотометра полягає у вимірюванні їх інтенсивності поглинання світла із біуретовим реактивом при довжині хвилі 540-650 нм та реактивом Фоліна (метод Лоурі) - при 660-750 нм.

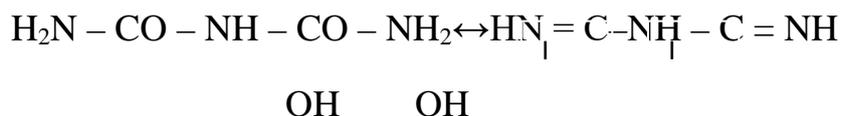
А. Спектрофотометричне визначення концентрації білка з біуретовим реактивом.

Принцип реакції. Амінокислоти, які утворюють не менше двох пептидних зв'язків (-CO-NH-), у лужному середовищі за наявності сульфату міді (II) утворюють комплекси з атомами міді, що забарвлені у фіолетовий колір.

Уперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена з біуретом, тому вона й має назву біуретова. Біурет, який можна одержати під час нагрівання сечовини до температури 180°C, не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки:

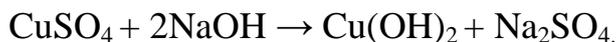


У лужному середовищі біурет зазнає енолізації за такою схемою:

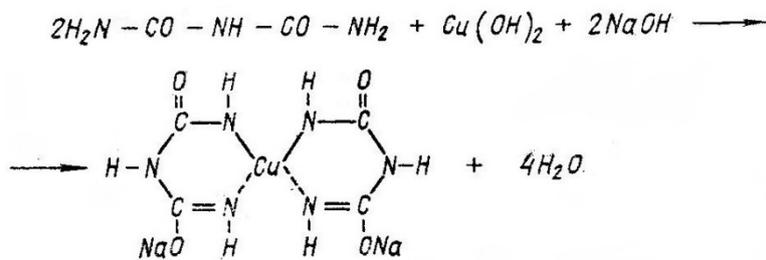


Дві молекули енольної форми біурету взаємодіють із гідроксидом міді (II) й утворюють комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

Гідроксид міді (II) для проведення біуретової реакції одержують, як правило, в результаті реакції взаємодії сульфату міді (II) із гідроксидом натрію (чи калію):



Комплекс біурету з міддю утворюється за такою схемою:



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

Матеріали і реактиви. Розчин телячого сироваткового альбуміну (ТСА) (вихідна концентрація білка 4 мг/мл), біуретовий реактив (0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (виннокислий натрій, калій) розчиняють в 50 мл дистильованої води, добре перемішують, додають 30 мл 10% розчину NaOH вільного від вуглекислого натрію, додають 0,2 г KI (для попередження самовільного відновлення) та розчиняють. Отриманий розчини у колбі

доводять до об'єму 200 мл дистильованою водою та зберігають у темному місці).

Обладнання. Штатив з пробірками, скляні палички, піпетки, спектрофотометр, кювета.

Хід роботи.

1) Спочатку методом серійних розведень готують стандартні концентраційні розчини білка. Для цього у контрольну пробірку (К) та пробірки 2-5 вносять по 1 мл дистильованої води. У пробірку 1 вносять 2 мл вихідного розчину ТСА (концентрація білка 4 мг/мл), звідти відбирають 1 мл розчину білка (4мг/мл) та переносять у пробірку 2 (концентрація білка 2 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 2 переносять 1 мл розчину у пробірку 3 (концентрація білка 1 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 3 переносять 1 мл розчину у пробірку 4 (концентрація білка 0,5 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 4 переносять 1 мл розчину у пробірку 5 (концентрація білка 0,25 мг/мл) і ретельно перемішують. Із пробірки 5 відбирають 1 мл розчину, який далі у дослідах не використовують.

2) Потім до кожної пробірки додають по 4 мл біуретового реактиву, проби витримують упродовж 30 хв за кімнатної температури та вимірюють оптичне поглинання проб на спектрофотометрі при (λ 540 нм).

Для послідовності виконання роботи та внесення реактивів можна скористатися таблицею:

№ п/п	конц. білка, мг/мл	distH ₂ O, мл	Станд. розчини білка	біурет. реактив, мл	t кімн °С, 30 хв	E опт. погл., λ 540, нм
К	-	1	-	4	+	
1	4	-	2 мл вихідного білка	4	+	
2	2	1	1 мл із пробірки 1	4	+	
3	1	1	1 мл із пробірки 2	4	+	
4	0,5	1	1 мл із пробірки 3	4	+	
5	0,25	1	1 мл із пробірки 4	4	+	

-	-	-	1 мл із пробірки 5 вилити	-	-	-
---	---	---	------------------------------	---	---	---

3) Будують калібрувальну криву (за ТСА) для визначення концентрації білка: на вісі абсцис (x) відкладають відомі концентрації стандартних розчинів (мг/мл) білка (ТСА), а на вісі ординат (y) – оптичну густину поглинання при (λ 540 нм). Усі точки з'єднують між собою прямою.

1. Спектрофотометричне визначення концентрації білка за методом Лоурі.

Принцип методу. Метод Лоурі ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину білка під час кольорової реакції Фоліна на білок з тирозиновими та цистеїновими радикалами білкової молекули. Реакція полягає у відновленні суміші фосфорно-вольфрамової та фосфорно-молібденової кислот із утворенням комплексної сполуки синього кольору. Реакція ініціюється комплексними сполуками міді, які виникають під час взаємодії білка з лужним розчином сульфату міді.

Для визначення концентрації білка в розчині, що досліджується за методом Лоурі, необхідно заздалегідь побудувати калібрувальний графік (див. Лаб. роб. №3.1) залежності інтенсивності поглинання від концентрації білка-стандарту. Тому за цим методом можна встановити абсолютний вміст білка в досліджуваному розчині лише в тому разі, якщо калібрувальний графік побудований для того білка, концентрацію якого визначають.

Матеріали та реактиви. Розчин білка, свіжоприготовлений (extempore) лужний розчин міді (50 мл 2% розчину карбонату натрію в 0,1 моль/л розчині гідроксиду натрію змішують із 1 мл 0,5% розчину сульфату міді в 1% розчині татрату натрію-калію), реактив Фоліна, який готують таким чином: фосфорно-вольфрамовий натрій (20 г) і фосфорно-молібденовий натрій (5г) розчиняють у 140 мл дистильованої води, додають 10 мл 80 % розчину ортофосфорної кислоти та 20 мл розчину концентрованої соляної кислоти. Одержану суміш кип'ятять у колбі зі зворотним холодильником Лібіха протягом 10 год. Потім до розчину додають 30 г сульфату літію, 10 мл дистильованої води, дві-три краплі бромиду й без зворотного холодильника кип'ятять у витяжній шафі для видалення бромиду. Розчин охолоджують, його об'єм доводять дистильованою водою до 200 мл і фільтрують. Перед роботою отриманий розчин розводять удвічі дистильованою водою.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, градуйовані піпетки, штатив для пробірок, годинник, спектрофотометр, кювета.

Хід роботи.

До 0,2 мл розчину досліджуваного білка додають 1 мл лужного розчину міді, суміш ретельно перемішують та залишають за кімнатної температури на 10 хв. Потім додають 0,08 мл реактиву Фоліна й знову перемішують. Через 30 хв розчин забарвлюється в синій колір. Інтенсивність забарвлення (оптичну густину) проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм.

Концентрацію білка в досліджуваному розчині визначають за калібрувальною кривою.

2. Визначення концентрації білка за формулою Калькара за оптичним поглинаннями проб при $\lambda 280$ та $\lambda 260$ нм:

$$C_{\text{білка (мг/мл)}} = 1,45 \cdot E_{280} - 0,74 \cdot E_{260} .$$

4. Визначення концентрації білка за формулою Вітекера за оптичним поглинаннями проб при $\lambda 235$ та $\lambda 280$ нм:

$$C_{\text{білка (мг/мл)}} = \frac{E_{235} - E_{280}}{2,51} .$$

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Сучасні біохімічні методи ідентифікації та визначення концентрації білків.
2. Критерії гомогенності білка.
3. Побудувати калібрувальну криву для визначення концентрації білка.
4. Розрахувати похибку концентрації білка за різним методами визначення.

Контрольні запитання до розділу «Білки та амінокислоти».

1. Загальна характеристика білків та амінокислот?
2. Загальна формула амінокислот.
3. Амінокислотний склад деяких рослинних білків.
4. Основні функції білків.
5. Які рівні структурної організації характерні для білків?
6. Ковалентні та нековалентні зв'язки, які приймають участь у стабілізації структури білків.
7. Охарактеризуйте пептидний зв'язок.
8. Що таке пептиди?
9. Чим відрізняється процес висолювання від денатурації білків?

10. Визначення амінокислотної послідовності білка.
11. Якісні реакції на білки та амінокислоти.
12. Гідроліз білків. Протеолітичні ферменти.
13. Кінцеві продукти розпаду амінокислот.
14. Біосинтез білків. Ферменти, рибосоми, РНК, білкові фактори ініціації тощо, які приймають участь у біосинтезі білка. Послідовність етапів. Синтез поліпептидних ланцюгів та посттрансляційні модифікації білків.

РОЗДІЛ 8

ФЕРМЕНТИ

Ферменти, або ензими – це біологічні каталізатори білкової природи, які синтезуються у живих клітинах. Ферменти направлено каталізують біохімічні реакції у клітині та регулюють обмін речовин.

Ферменти, як і білки, поділяються на прості та складні. Прості ферменти, або однокомпонентні, у своєму складі містять лише амінокислоти, тоді як складні ферменти, або двохкомпонентні, містять білкові та небілкові (простетичні) компоненти.

Ферментам притаманні такі властивості білків: висока молекулярна маса, глобулярна форма, чотири рівні структурної організації, гідроліз до амінокислот, утворення колоїдних розчинів, нестійкість до дії високих температур та солей важких металів тощо.

Будова ферментів. Весь активний комплекс ферменту називається холоферментом (холоензимом), термолабільна білкова частина – апоферментом (апоензимом), а термостабільна частина – коферментом (коензимом). Кофермент бере участь у перетворенні субстрату, тоді як апофермент вказує на тип реакції. Коферменти - це низькомолекулярні органічні та неорганічні речовини (метали) - вітаміни та їх похідні, нуклеозиддифосфати, порфірини і т.д., термостабільні сполуки, які легко діалізуються і мають здатність знову зв'язуватись із апоферментом.

Загальні уявлення про механізм дії ферментів. Активний центр ферменту – це та частина молекули ферменту, яка з'єднується із субстратом, а також відповідає за утворення фермент-субстратного комплексу і каталітичне перетворення субстрату. Його умовно поділяють на каталітичну ділянку, де відбувається каталітичне перетворення субстрату, та контактну, або адсорбційну, ділянку, що зв'язує фермент із субстратом.

Розрізняють алостеричні центри ферменту – це ті ділянки ферментів на які впливають різні регуляторні чинники (ефектори), зокрема активатори та інгібітори.

Специфічність дії ферментів. Білкова природа ферментів обумовлює високу їх специфічність. Ця властивість відрізняє їх від інших каталізаторів. Кожен фермент діє на певний субстрат або групу субстратів, які подібні за своєю будовою. Розрізняють абсолютну, абсолютну групову, відносно групову і оптичну, або стереохімічну специфічність.

Швидкість ферментативної реакції залежить також від показників рН та температури середовища. При підвищенні температури середовища збільшується швидкість ферментативних реакцій, однак при високих значеннях $t^{\circ}\text{C}$ (вище 60°C) відбувається денатурація ферменту і, як наслідок, активність ферментативної реакції знижується. Оптимальні значення температури для більшості ферментів коливаються у межах від $20\text{-}40^{\circ}\text{C}$. При низьких значеннях температури (нижче оптимальної) активність ферментів інгібується, але без руйнування структури ферменту.

Максимальна дія ферменту проявляється при певному значенні рН середовища (рН- оптимум) та коливається в межах рН 6-8. Незначні зміни рН знижують активність ферменту або зовсім гальмують, тоді як значні зміни рН призводять до денатурації ферментних білків.

Класифікація та номенклатура ферментів. Згідно сучасної міжнародної наукової класифікації усі ферменти залежно від типу каталізованих реакцій поділено на шість класів:

1. Оксидоредуктази каталізують окисно-відновні реакції.
2. Трансферази каталізують реакції міжмолекулярного перенесення різних хімічних груп і залишків.
3. Гідролази каталізують реакції гідролітичного розщеплення внутрішньомолекулярних зв'язків.
4. Ліази каталізують реакції приєднання груп за місцем подвійних зв'язків, або, навпаки, оборотні реакції відщеплення таких груп.
5. Ізомерази каталізують реакції ізомеризації.
6. Лігази (синтетази) каталізують реакції синтезу двох молекул, що зв'язано з розщепленням пірофосфатного зв'язку в молекулі АТФ або аналогічного нуклеозидтрифосфату.

Кожен клас ферментів поділено на підкласи, у межах кожного підкласу ферменти поділяються на підпідкласи. Ферменти, які недостатньо

охарактеризовані, об'єднуються у спеціальні групи – «інші» під порядковим номером 99.

Міжнародною одиницею *активності ферментів* є катал (кат), який відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 моль субстрату в продукт за 1 с (кат=моль/с). Активність ферментів виражають через питому та молекулярну активність. Питома активність ферментів виражається числом одиниць ферментативної активності, що припадає на 1 мг білка. Молярна активність – це кількість молекул субстрату, що перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хв.

РОБОТА 31 ФЕРМЕНТИ. ВИВЧЕННЯ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи. Дослідити дію амілази та каталази, а також визначити активність каталази.

1. Дія амілази.

Принцип методу. Амілаза є ферментом, який каталізує гідроліз α -глюкозидного зв'язку α -1-4-крохмалю та глікогену до проміжних продуктів – декстринів. Крохмаль утворює з йодом сполуки синього кольору, амілодекстрин – фіолетового, еритродекстрин – червоно-бурого, ахродекстрин – жовтого.

Матеріали та реактиви. 0,2% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, розчин слини(див. нижче).

Обладнання. Штатив із пробірками, колби, піпетки, крапельниці, лійки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

Перед проведенням дослідів необхідно приготувати препарат ферменту амілази слини. Для цього здійснюються певні операції в наступній послідовності:

- а) ополіскують рот дистильованою водою для видалення залишків їжі;
- б) виміряють мірним циліндром 50 мл дистильованої води та набирають її в рот, а потім ополіскують протягом 3-5 хвилин думаючи при цьому про смачну їжу;
- в) переносять у стакан з рота рідину, яка містить амілазу;
- г) зібрану рідину фільтрують через паперовий фільтр у чистий хімічний стакан.

У дві пробірки наливають по 5 мл крохмального клейстеру, в пробірку 1 (дослід) додають 0,5 мл розчину слини, яка містить амілазу, в пробірку 2 (контроль) – 0,5 мл дистильованої води. Вміст обох пробірок ретельно перемішують і залишають відстоюватися за кімнатної температури. Через 15 хв в обидві пробірки додають по 5 краплин розчину йоду. В пробірці 1 з амілазою слини розчин через 1 год знебарвлюється, а в пробірці 2 без амілази колір розчину не змінюється, тобто залишається синьо-фіолетовим.

2. Дія каталази.

Принцип методу. Каталаза (клас оксидоредуктаз) прискорює реакцію розщеплення пероксиду водню на H_2O і O_2 :



У цій реакції одна молекула пероксиду водню окислюється і є донором електронів, а друга відновлюється і є акцептором електронів.

Матеріали та реактиви. Свіжа кров, свіжовиготовлений 3% розчин H_2O_2 .

Обладнання. Штатив, пробірки, крапельниці, піпетки.

Хід роботи.

В дві пробірки наливають по 5 мл розчину пероксиду водню. В пробірку 1 (дослід) додають краплину крові й перемішують. У пробірці 1 (з каталазою) внаслідок утворення молекулярного кисню з'являється велика кількість бульбашок. У пробірці 2 (без каталази) бульбашки газу не утворюються.

3. Визначення активності каталази за методом Баха.

Принцип методу. Кількість пероксиду водню, що залишився після дії на нього каталази, визначають шляхом титруванням розчином KMnO_4 у кислому середовищі:



Матеріали та реактиви. Рослинний матеріал (картопля, морква, капуста цибуля), крейда (карбонат кальцію CaCO_3), 10% розчин H_2SO_4 , 0,1% розчин H_2O_2 на фосфатному буфері (35,0 мл 0,2 моль/л Na_2HPO_4 і 13,6 мл 0,2 моль/л NaH_2PO_4 , pH 7,0), розчин KMnO_4 (0,002 моль/л).

Обладнання. Колби, піпетки, бюретки, порцелянові ступки, кварцевий пісок, лійки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

Спочатку готують препарат каталази, для цього 10 г рослинного матеріалу (картопля, морква, капуста, цибуля тощо) ріжуть на маленькі шматочки та розтирають у порцеляновій ступці з невеликою кількістю кварцевого піску, додають порціями 5 раз по 10 мл дистильованої води і залишають отриману суміш для настоювання на 10 хвилин, після чого розчин фільтрують (для роботи використовують фільтрат). Ступку промивають, промивні води фільтруючи зливають у колбу. Вміст колби доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою. Каталаза інактивується у кислому середовищі, тому для нейтралізації кислот рослинного матеріалу перед початком гомогенізації у ступку на кінчику шпателя додають CaCO_3 (крейда).

В дві колби наливають по 10 мл розчину H_2O_2 . У колбу 1 (контроль) додають 5 мл розчину дистильованої води, а у колбу 2 (дослід) – 5 мл розчину H_2SO_4 . Потім у кожну колбу додають по 20 мл препарату каталази. Вміст обох колб інкубують за кімнатної температури ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) упродовж 30 хв, перемішуючи час від часу. Після завершення інкубації вміст колб титрують розчином KMnO_4 до утворення стійкого рожевого забарвлення від надлишку KMnO_4 .

Активність каталази визначають за кількістю H_2O_2 , що розклався та розраховують за формулою:

$$A = (B - A) \cdot f \cdot Q,$$

де $(B - A)$ – різниця результатів титрування зразків 1 (контроль) та 2 (дослід) $0,002$ моль/л розчином KMnO_4 , мл; f – коефіцієнт поправки на титр $0,002$ моль/л розчину KMnO_4 ; Q – кількість пероксиду водню (1,7 мг), яка відповідає 1 мл $0,002$ моль/л розчину KMnO_4 .

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Сучасна номенклатура та класифікація ферментів.
2. В яких одиницях виражається активність ферментів?
3. Що таке коферменти? Класифікація коферментів.
4. Написати структурні формули таких коферментів:
 - А) Нікотинамідних (НАД та НАДФН).
 - Б) Флавіновінових (ФАД).
 - В) Хінону (убіхінон- CoQ).
 - Г) Нуклеозидфосфатів (АМФ, АДФ, АТФ).
 - Д) Ацилювання (CoA). Написати повну назву кожної сполуки.

РОБОТА 32

ВЛАСТИВОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета роботи. Дослідити вплив фізико-хімічних чинників на активність ферментів.

Термолабільність ферментів.

1. Вплив температури на активність амілази слини.

Принцип методу. Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури і визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

Матеріали та реактиви. 1% розчин крохмалю, розчин слини (див. Лаб. роб. № 5.1), 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, лід.

Обладнання. Штатив з пробірками, піпетки, колби, лійки, фільтрувальний папір, водяна баня, термостат, скляні палички, скляні або фарфорові пластинки.

Хід роботи.

У чотири пронумеровані пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. Пробірку 1 обережно ставлять у кип'ячу водяну баню (100°C), пробірку 2 – у водяну баню за температури 40°C, пробірку 3 залишають за кімнатної температури, а пробірку 4 ставлять у лід. Через 10-15 хвилин в усі пробірки, залишаючи їх з тих же умов, додають по 1 мл розчину слини та перемішують скляною паличкою. За гідролізом крохмалю стежать за реакцією з йодом. Для цього на скляну або фарфорову пластинку наносять кілька краплин розчину йоду й змішують їх із краплинами суміші, яку беруть з кожної пробірки через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 хвилин.

Зміна забарвлення розчину крохмалю з йодом свідчить про гідроліз у кожній пробірці. У пробірці 1, що містилась на водяній бані при 100°C, суміш забарвлюється в синій колір. Фермент у ній інактивований, і гідроліз крохмалю не відбувається. В інших пробірках інтенсивність забарвлення залежить від ступеня гідролізу крохмалю: в пробірці 2 за оптимальної температури (40°C) – жовте, в пробірках 3 і 4 колір розчинів може бути червоним чи фіолетово-червоним.

Вплив рН середовища на активність ферментів.

1. Вплив рН на активність амілази.

Принцип методу. Вплив рН на активність амілази визначається за зміною інтенсивності забарвлення розчину крохмалю з йодом. Оптимум рН для амілази слини становить 6,8, при кислому та лужному показниках рН середовища активність амілази знижується.

Матеріали та реактиви. 1% розчин крохмалю, розчин слини (див. Лаб. роб. № 5.1), дистильована вода, 0,1 М НСІ, 0,1М NaOH, розчин Люголя або 0,1% йоду.

Обладнання. Штатив з пробірками, піпетки, водяна баня або термостат, скляні палички, колби, лійки, фільтрувальний папір.

Хід роботи.

У три пробірки за допомогою піпетки вносять по 5 мл 0,1% розчину крохмалю. Після цього у пробірку 1 додають 1 мл розчину 0,1М НСІ, у пробірку 2 - 1 мл розчину 0,1М NaOH, у пробірку 3 – 1 мл дистильованої води. Потім у кожену пробірку додають по 2 мл препарату амілази слини. Вміст пробірок добре перемішують і ставлять їх у термостат на 20-25 хвилин при температурі 36-38°C. Після завершення інкубації пробірки виймають з термостату та додають у кожену пробірку по 5 крапель розчину Люголя або 0,1% йоду. Спостерігають за змінами забарвлення вмісту пробірок.

3. Вплив активаторів та інгібіторів на активність амілази.

Принцип методу. Активатором амілази є NaCl, а інгібітором - CuSO₄. Вплив цих речовин на активність амілази визначають за ступенем гідролізу крохмалю під впливом ферменту за наявності NaCl і CuSO₄.

Матеріали та реактиви. Розчин слини ((див. Лаб. роб. № 5.1), дистильована вода, 0,5% розчин крохмалю, 0,1% розчин йоду в 0,2% розчині йодиду калію, 1% розчин NaCl, 1% розчин CuSO₄.

Обладнання. Штатив із пробірками, піпетки, крапельниці, колби, лійки, фільтрувальний папір, термостат.

Хід роботи.

В пробірку 1 наливають 2,5 мл дистильованої води, в пробірку 2 – 2 мл дистильованої води та 0,5 мл розчину NaCl, у пробірку 3 – 2 мл дистильованої води та 0,5 мл розчину CuSO₄. В усі пробірки додають по 2,5 мл розчину слини, ретельно перемішують і ставлять в термостат при 38°C. Через 5 хв в усі пробірки додають по 5 краплин розчину йоду. Рідина в пробірці 1 забарвлюється в фіолетовий або червоний колір, у пробірці 2 – у червоний або жовтий, у пробірці 3 – у синій. Одержані результати свідчать, що активатором амілази є NaCl (пробірка 2), а інгібітором – CuSO₄ (пробірка 3).

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Які фізико-хімічні чинники впливають на протікання ферментативної реакції?

2. Як впливають активатори та інгібітори на каталіз ферментативних реакцій?

Контрольні запитання до розділу «Ферменти».

1. Що таке ферменти?
2. Застосування ферментів.
3. Будова ферментів.
4. Коферменти та їх біологічна роль.
5. Фізико-хімічні властивості ферментів.
6. Механізм дії ферментів.
7. Що таке ізоферменти?
8. Які вам відомо мультиферментні системи, де вони локалізовані у клітині та їх функції?
9. Специфічність дії ферментів.
10. Оборотно та необоротно інгібування ферментативних реакцій.
11. Що таке константа Міхаеліса?
12. Яку залежність пояснює рівняння Міхаеліса-Ментена?
13. Як можна визначити величини K_m та V_{max} ?
14. Конкурентне та неконкурентне інгібування ферментативних реакцій ферментативних реакцій та методи його визначення.

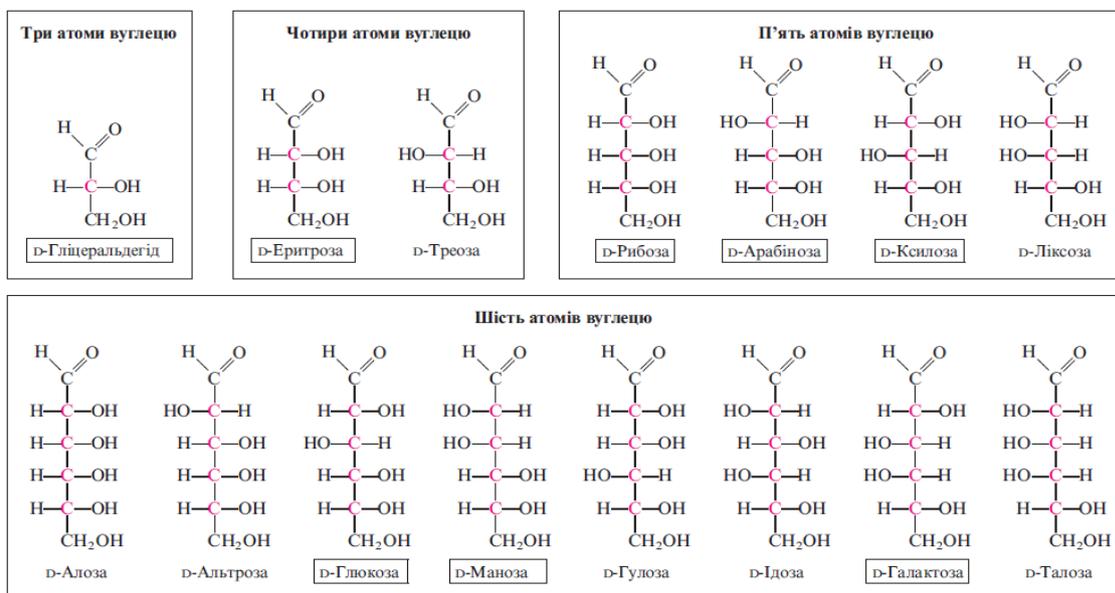
РОЗДІЛ 9 ВУГЛЕВОДИ

Вуглеводи – це органічні сполуки, які у своєму складі містять переважно карбон, гідроген та кисень, а співвідношення атомів гідрогену та кисню таке як у воді. Їх емпірична формула $C_n(H_2O)_n$. Молекули вуглеводів містять альдегідну ($-CH=O$) або кетонну ($>C=O$) групи і кілька спиртових (окси) ($-OH$) груп.

Функції вуглеводів: 1) *енергетична* — основне джерело енергії для організмів, які живляться органічними речовинами; 2) *структурна, або пластична* — приймають участь у побудові різних клітинних стінок рослин і опорних тканин тварин; 3) *захисна* – захищають від дії зовнішнього і внутрішнього середовища; 4) *запасна, або накопичувальна* – накопичують поживні речовини, які використовуються для отримання енергії. Вуглеводи є головними продуктами фотосинтезу і основним субстратом дихання у рослин.

Класифікація вуглеводів. В залежності від складу, структури і властивостей вуглеводи поділяються на три основних класа: моносахариди, олігосахариди та полісахариди. За складністю будови вуглеводи поділяють на прості і складні. Прості вуглеводи (моно-) не гідролізуються, тоді як складні вуглеводи при гідролізі розпадаються на моносахариди.

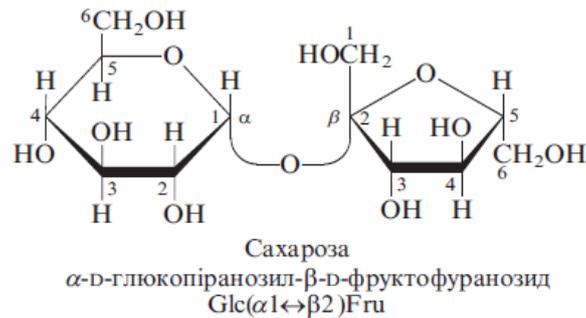
Моносахариди - це білі кристалічні речовини, розчинні у воді, солодкі на смак, оптично активні. За хімічною будовою моносахариди класифікують: 1) заявністю альдегідної або кетонної групи – на альдози (рибоза, дезоксирибоза, глюкоза, маноза, галактоза) і кетози (рибулоза, фруктоза, седогептулоза) і 2) за кількістю атомів карбону: тріози (3 атоми) – гліцериновий альдегід, дигідроксиацетон; тетрози (4 атоми) – еритроза; пентози (5 атомів) – рибоза, дезоксирибоза, арабіноза, ксилоза; гексози (6 атомів) – глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза.



У водних розчинах моносахариди можуть знаходитися у двох формах - ланцюговій (або альдегідній чи кетонній) з відкритим карбоновим ланцюгом і циклічній (піранозна або фуранозна), або кільцевій. Обидві форми перебувають у динамічній рівновазі, взаємний перехід однієї форми моносахаридів у другу має назву кільцево-ланцюгової таутомерії.

Олігосахариди - це полімерні вуглеводи, які містять від 2 до 10 залишків моносахаридів, з'єднаних між собою глікозидним зв'язком і характеризуються невеликою молекулярною масою. Вони добре розчинні в воді, легко кристалізуються, солодкі на смак.

Дисахариди: сахароза, буряковий або тростинний цукор, при нагріванні з розбавленими кислотами розщеплюється на глюкозу і фруктозу; лактоза або молочний цукор, при гідролізі утворюється α -глюкоза та β -галактоза; мальтоза або солодовий цукор складається із двох залишків молекул глюкози; трегалоза або грибний цукор, при гідролізі утворюється дві молекули глюкози; целобіоза містить залишки двох глюкоз.



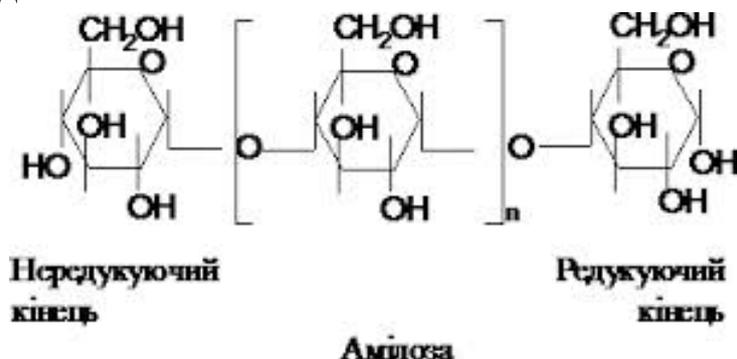
Трисахариди: мелицитоза складається із двох залишків глюкози і одного–фруктози; рафіноза складається із залишків галактози, глюкози і фруктози; генціаноза складається із залишку фруктози і двох залишків глюкози.

Тетрасахарид стахіоза складається із двох залишків галактози, однієї молекули глюкози і фруктози.

Полісахариди - це високомолекулярні сполуки, які побудовані із великої кількості залишків моносахаридів та їх похідних. Залежно від природи моносахаридів, що входять до складу полісахаридів, розрізняють гомополісахариди (залишки моносахаридів одного типу) і гетерополісахариди (залишки моносахаридів декількох типів). До гомополісахаридів відносять: крохмаль, глікоген, клітковину, декстрин, хітин, інулін. До гетерополісахаридів відносять: камеді, геміцелюлози, мукополісахариди (гіалуронову, хондроїтинсірчану кислоти, гепарин) і специфічні полісахариди (групові речовини крові, капсулярні полісахариди, що входять до складу бактерій). Організми можуть накопичувати полісахариди, наприклад, крохмаль, інулін накопичується у рослинах, глікоген – в організмі тварин, хондроїтинсірчана кислота – у клітковині, капсулярні полісахариди, хітин виконують механічні і захисні функції.

Крохмаль – білий порошок, нерозчинний у воді, без смаку і запаху, у гарячій воді утворює колоїдний розчин, який йодом забарвлюється у синій колір. Це продукт фотосинтезу і основна поживна речовина рослин. Крохмаль відкладається в рослинних тканинах (в листі, насінні плодах, бульбах, клубнях) у вигляді зерен шароподібної форми. При кислотному гідролізі крохмаль

розщеплюється до молекул глюкози, яка входить до складу крохмалю у вигляді D-глюкопіранози. Природній крохмаль складається із двох різних фракцій, які відрізняються будовою і властивостями: 25% амілози і 75% амілопектина.



ПОХІДНІ МОНОСАХАРИДІВ. *Аміносахариди (аміноцукри)* – похідні вуглеводнів, які утворюються внаслідок заміщення в молекулі моносахариду однієї ОН-групи, зокрема у 2 положенні атома карбону (С-2), NH₂-групою. Похідні циклічних моносахаридів, які утворюються внаслідок заміщення атома водню глікозидного гідроксила (С-1) будь-яким радикалом, отримали назву глікозиди, а сам радикал – аглікон. Наприклад, при взаємодії метилового спирту з глюкозою утворюється α – або β – метилглікозид.

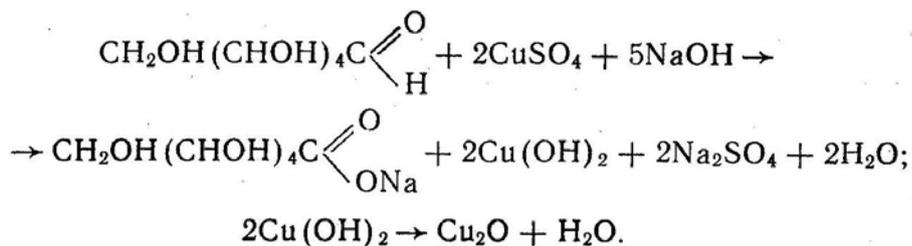
РОБОТА 33

ВУГЛЕВОДИ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ. МОНОСАХАРИДИ

Мета роботи. Ідентифікувати моносахариди за наявністю альдегідної або кетонної груп у їх складі з використанням кольорових (якісних) реакцій.

1. Реакція Троммера.

Принцип реакції. Розчини гексоз (наприклад, глюкози або фруктози) в лужному середовищі під час нагрівання відновлюють гідроксид міді (II) до оксиду міді (I), а самі окислюються до альдонових кислот. Цю реакцію за участю глюкози в загальному вигляді можна представити рівняннями:



Матеріали та реактиви. 5% розчин глюкози, 5% розчин гідроксиду натрію, 5% розчин сульфату міді.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, газовий пальник або спиртівка.

Хід роботи.

В пробірку вносять 3 мл розчину глюкози та 1 мл розчину гідроксиду натрію. До суміші обережно додають 4-5 крапель розчину сульфату міді, при цьому утворюється осад гідроксиду міді (II), який внаслідок перемішування чи струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває блакитного забарвлення. Пробірку обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають за зміною забарвлення її вмісту (випадіння жовтого осаду гідроксиду міді (I) чи червоного осаду геміосиду міді).

2. Реакція Фелінга.

Принцип реакції. В реактиві Фелінга іони міді (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції гексоз (у всіх редуруючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий же, як і в реакції Троммера. Вуглеводи, які містять напівацетальний гідроксил або альдегідну групу, при кип'ятінні з реактивом Фелінга в лужному середовищі утворюють червоний осад Cu_2O . Перевагою реактиву Фелінга є те, що мідь у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді окису міді (II).

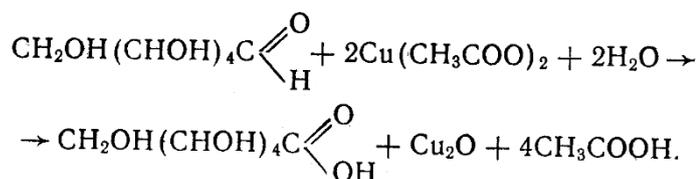
Матеріали та реактиви. 5% розчин глюкози, реактив Фелінга, який готують безпосередньо перед використанням, змішуючи однакові об'єми (1:1) розчинів (розчин 1: 200 г калій-натрію виннокислового $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}_4\text{H}_2\text{O}$ та 150 г гідроксиду натрію розчиняють у дистильованій воді та доводять до об'єму 1 л; розчин 2: 40 г сульфату міді розчиняють у дистильованій воді та доводять до об'єму 1 л).

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, газовий пальник або спиртівка.

Хід роботи. В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози та 2 мл реактиву Фелінга (1мл розчину 1 та 1 мл розчину 2). Вміст пробірки перемішують, обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

3. Реакція Барфедда.

Принцип реакції. Гексози в реакції з ацетатом міді спричинюють утворення геміоксиду міді. Сумарне рівняння реакції для глюкози має такий вигляд:



Ця реакція відбувається в середовищі зі значенням рН, близьким до нейтрального (7,0). За цих умов редуруючі дисахариди не окислюються, що дозволяє відрізнити їх від моносахаридів.

Матеріали та реактиви. 5% розчин глюкози, реактив Барфедда (13,3 г ацетату міді $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ розчиняють у 200 мл гарячої дистильованої води за температури 70°C . Суміш фільтрують і до фільтрату додають 1,9 мл льодяної оцтової кислоти).

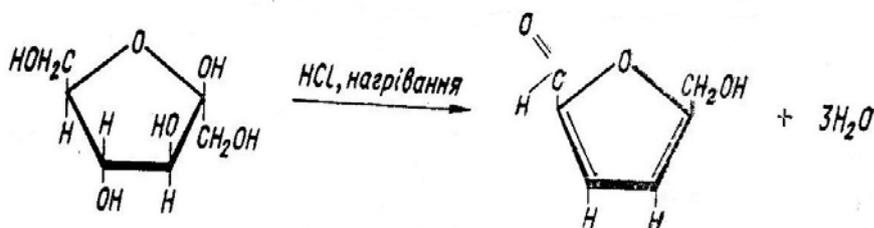
Обладнання. Скляні палички, піпетки градуйовані, штатив із пробірками, газовий пальник або спиртівка.

Хід роботи.

В пробірку вносять 1 мл розчину глюкози і 1 мл реактиву Барфедда. Вміст пробірки перемішують, обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння та спостерігають утворення червоного осаду геміоксиду міді.

4. Реакція Селіванова на кетози.

Принцип реакції. Кетози, на відмінну від альдоз, при нагріванні із концентрованою соляною кислотою зазнають дегідратації. Під час нагрівання фруктози чи інших кетоз із соляною кислотою утворюється оксиметилфурфурол. Рівняння реакції за участю фруктози має такий вигляд:



Оксиметилфурфурол із резорцином утворюють сполуку (продукт конденсації), забарвлену у вишнево-червоний колір.

Матеріали та реактиви. Кристалічний резорцин, 5% розчин фруктози, 5% розчин глюкози, 20% розчин соляної кислоти.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, штатив для пробірок, баня водяна, термометр лабораторний, лопаточка чи шпатель.

Хід роботи.

У пробірку 1 вносять 5 мл розчину фруктози, а в пробірку 2 – 5 мл розчину глюкози. Потім до кожної пробірки вносять по 1 мл розчину соляної кислоти та по декілька кристаликів резорцину, вміст пробірок ретельно перемішують та нагрівають на водяній бані (80°C) протягом 5-10 хв. Після чого у пробірці 1 спостерігають зміну забарвлення розчину у вишнево-червоний колір.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Класифікація моносахаридів. Навести приклади.

2. Написати структурні формули:

А) Моносахаридів: тріоз, тетроз, пентоз, гексоз, представників підписати.

Б) Альдоз та кетоз, представників підписати.

В) Глюкози, манози, рибози дезоксирибози у циклічній та ланцюговій формах. Вказати їх конфігурації та конформації (D- чи L- та , α - чи β -).

Г) β -D-фруктофуранози та β -D-глюкопіранози.

РОБОТА 34

ВУГЛЕВОДИ. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ. ПОЛІСАХАРИДИ

Мета роботи. Провести гідроліз полісахаридів та ідентифікувати їх мономерні одиниці з використанням якісних реакцій.

1. Гідроліз крохмалю.

Принцип реакції. Під час нагрівання розчину крохмалю з мінеральними кислотами відбувається гідроліз крохмалю з утворенням глюкози, яку можна виявити характерними реакціями на моносахариди, зокрема, реакцією Троммера.

Матеріали та реактиви. Концентрована соляна кислота, 1% розчин крохмалю, 15% розчин гідроксиду натрію, 1% розчин сульфату міді.

Обладнання. Скляні палички, пробірки, піпетки градуйовані, крапельниці, штатив для пробірок, водяна баня, годинник.

Хід роботи.

В обидві пробірки наливають по 5 мл розчину крохмалю. В пробірку 1 (дослід) вносять 2-3 краплі концентрованої соляної кислоти, а в пробірку 2 (контроль) 2-3 краплі дистильованої води. Вміст обох пробірок кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв. Після чого у кожен із пробірок вносять по 2 мл розчину гідроксиду натрію та по 5 крапель розчину сульфату міді й нагрівають (проводять реакцію Троммера). В пробірці 1 (дослід), де проводився гідроліз крохмалю соляною кислотою під час нагрівання, утворюється червоний осад геміоксиду міді (позитивна реакція Троммера), а в пробірці 2 (контроль) осад не утворюється (негативна реакція Троммера).

2. Гідроліз клітковини.

Принцип реакції. Гідроліз клітковини мінеральними кислотами відбувається значно повільніше, ніж крохмалю. Якщо ж клітковину заздалегідь обробити 80% розчином сірчаної кислоти, то процес гідролізу клітковини значно прискориться.

Матеріали та реактиви. Вата (джерело клітковини), 3% і 80% розчини сірчаної кислоти, насичений розчин NaOH, реактиви Фелінга та Барфедда.

Обладнання. Скляні палички, крапельниці, штатив із пробірками, водяна баня, лакмусовий папірець.

Хід роботи.

I. Невелику кількість вати (100-200 мг) вносять у пробірку, заливають 0,5 мл 3% розчину сірчаної кислоти та кип'ячать на водяній бані протягом 10 хв. Після нейтралізації вміст пробірки ділять на 2 частини. II. В іншій пробірці таку ж кількість вати заздалегідь обробляють 0,5 мл 80% розчину сірчаної кислоти до повного розчинення, потім розбавляють водою до об'єму 1 мл і кип'ячать на водяній бані протягом 5 хв. Після нейтралізації вміст пробірки також поділяють на 2 частини.

З отриманими гідролізатами, які містять оброблену та необроблену вату, проводять реакцію Фелінга (додають по 1 мл розчину Фелінга, перемішують та нагрівають до кипіння) та реакцію Барфедда (додають по 1 мл реактиву Барфедда, перемішують та нагрівають до кипіння).

У пробірках, де знаходилася необроблена сірчаною кислотою вата, осад червоного кольору не утворюється (негативні реакції Фелінга та Барфедда). У пробірках, які містили заздалегідь оброблену вату, випадає червоний осад геміоксиду міді (позитивні реакції Фелінга та Барфедда), що свідчить про утворення глюкози.

Зробити висновки до роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Класифікація полісахаридів. Навести приклади.
2. Написати структурні формули:
 - А) Олігосахаридів: а) дисахариди (сахароза, лактоза, мальтоза, трегалоза), б) трисахариди (мелицитоза, рафіноза), в) тетрасахарид (стахіоза).
 - Б) Полісахариду (крохмаль), вказати сполука є гомо- чи гетерополісахаридом.

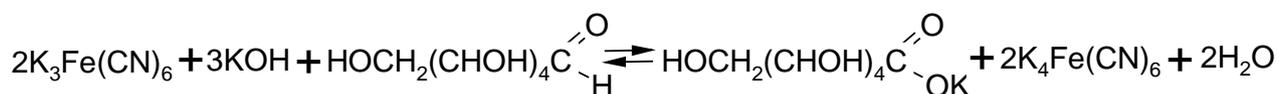
РОБОТА 35

ВУГЛЕВОДИ. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Мета роботи. Визначити кількість глюкози у досліджуваному розчині.

1. Визначення концентрації глюкози за методом Хагендорна-Ієнсена.

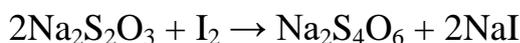
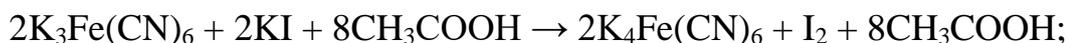
Принцип методу. Метод заснований на здатності глюкози в безбілковому фільтраті в лужному середовищі під час нагрівання відновлювати червону кров'яну сіль (гексаціано-(III)-ферат калію – $K_3Fe(CN)_6$) в жовту кров'яну сіль (гексаціано-(II)-ферат калію – $K_4Fe(CN)_6$). Рівняння реакції має такий вигляд:



Внаслідок зворотності цієї реакції гексаціано-(II)-ферат калію під дією сульфату цинку переводять у нерозчинну сіль – цинк-гексаціано-(II)-ферат калію:



Гексаціано-(III)-ферат калію беруть із надлишком і його невитрачений у реакції залишок визначають йодометрично, в кислому середовищі (наприклад, за наявності оцтової кислоти), а йод, що утворився, титрують тіосульфатом натрію:



Як індикатор молекулярного йоду використовують крохмаль.

Вміст глюкози розраховують по спеціальній таблиці (див. нище), згідно якої певному об'єму тіосульфата натрію, що було витрачено на титрування йоду, а, відповідно, надлишка гексаціаноферата калія (III), відповідає та кількість міліграм глюкози, яка прореагувала в реакції.

Матеріали та реактиви. Вата гігроскопічна для фільтрування розчинів, рослинний матеріал (фрукти), розчин гідроксиду калію (0,1 моль/л), 0,45% розчин сульфату цинку, лужний розчин гексаціано-(III)-ферату калію (1,65 $K_3Fe(CN)_6$ і 10,6 г безводного карбонату натрію розчиняють у дистильованій воді до об'єму 1 л), розчин сульфату цинку в розчині хлориду натрію (10 г сульфату цинку та 50 г хлориду натрію розчиняють у дистильованій воді й доводять об'єм розчину до 200 мл), розчин йодиду калію (5 г йодиду калію розчиняють у 25 мл дистильованої води), розчин тіосульфату натрію (0,05 моль/л), 3% розчин оцтової кислоти, 1% розчин крохмалю.

Обладнання. Скляні палички, пробірки із штативом, колби конічні (об'єм 50 мл), воронки скляні, піпетки, крапельниці, водяна баня, бюретки, чашка, годинник, терка, бинт.

Хід роботи.

Спочатку необхідно приготувати рослинний матеріал. Для цього фрукти (помаранч або яблуко) натерти на мілкій терці, вичавити сік та профільтрувати.

В дві пробірки наливають по 1 мл розчину гідроксиду калію. В пробірку 1 (дослід) додати 0,1 мл рослинного матеріалу (фруктовий сік), а в пробірку 2 (контроль) – 0,1 мл дистильованої води. Потім вносять по 5 мл 0,45% розчину сульфату цинку, перемішують і ставлять на 2-3 хв на кип'ячу водяну баню. Після цього суміші фільтрують у конічні колби через ватний тампон, вкладений у воронку. Воронку та ватний тампон промивають гарячою дистильованою водою три рази по 2 мл, не доливаючи нової порції води до повного відтоку попередньої. До фільтрату в кожній колбі доливають 2 мл лужного розчину гексаціано-(III)-ферату калію та кип'ятять на водяній бані протягом 15 хв.

У кожен колбу додають по 2,6 мл розчину сульфату цинку в розчині хлориду натрію, по 0,4 мл розчину йодиду калію, вміст колб перемішують та додають ще по 2 мл розчину оцтової кислоти та по 3 краплі розчину крохмалю. Суміш титрують 0,05 моль/л розчином тіосульфату натрію до зникнення забарвлення, яке утворилося під час додавання крохмалю.

За витраченими на титрування проби та контролю об'ємами тіосульфату натрію (мл) за таблицею (див. нижче) визначають концентрацію глюкози й розраховують різницю між масою глюкози в контрольній та досліджувальній пробах.

Масову концентрацію глюкози (мг/мл) розраховують за формулою:

$$C = \frac{(B - A)}{V},$$

де А і В – маси глюкози, визначені за табл. в пробі та контролі;
V – об'єм рослинного матеріалу (0,1 мл), взятий для аналізу.

Таблиця.

Залежність вмісту глюкози від об'єму титранта

Об'єм тіосульф. натрія, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358

0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,131	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,098	0,097	0,095	0,093	0,092
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,021	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002

Примітка: - об'єм тіосульфату натрію за вертикаллю – цілі та десяті частки мілілітра, за горизонталлю - соті частки.

Зробити висновок роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Основні методи визначення кількості вуглеводів.
2. За допомогою таблиці розрахувати концентрацію глюкози урослинному матеріалі.

Контрольні запитання до розділу «Вуглеводи».

1. Що таке вуглеводи? Їх емпірична формула. Функції вуглеводів.
2. Класифікація вуглеводів. Навести приклади.
3. Властивості моносахаридів, олігосахаридів та полісахаридів.
4. Що таке сахарні кислоти? Як вони утворюються?

5. Які Вам відомо типи циклічних, або ланцюгових форм вуглеводів?
6. Що таке епімери? Навести приклади.
7. Які кінцеві продукти розпаду вуглеводів утворюються анаеробним шляхом (гліколіз та спиртове бродіння) та скільки молекул АТФ при цьому утворюється?
8. Які кінцеві продукти розпаду вуглеводів утворюються аеробним шляхом та скільки молекул АТФ при цьому утворюється?
9. Шляхи синтезу вуглеводів у рослин.
10. Охарактеризуйте пентозофосфатний шлях утворення вуглеводів?
11. Що таке глюконеогенез? Які сполуки приймають участь у глюконеогенезі?
12. Охарактеризуйте цикл Кальвіна (де він відбувається, рівняння реакцій, функції).
13. Якісні реакції на вуглеводи.

РОЗДІЛ 10.

ЛІПІДИ.

Ліпіди – це природні біоорганічні сполуки (жири і жироподібні речовини), які нерозчинні у воді, але розчинні в органічних розчинниках (ефір, хлороформ, ацетон тощо). Більша частина ліпідів є похідними вищих жирних кислот, спиртів або альдегідів. **Функції** ліпідів: 1) структурна (входять до складу мембран); 2) гормональна; 3) енергетична; 4) запасуюча (запасний і протоплазматичний жир); 5) захисна; 6) метаболічна тощо.

Ліпіди – це низькомолекулярні сполуки, які складаються з однієї або декількох невеликих структурних компонентів. Гідрофобними компонентами є поліметиленові (жирні кислоти насичені і ненасичені) та поліпренові (ізопрен, терпен, сквален, фітол, вітаміни А, Е, К) похідні оцтової кислоти; гідрофільними – спирти та їх похідні (етиленгліколь, пропандіол, гліцерин), азотовмісні похідні етанолу (етанол амід, серин, інозитом, сфінгозин, сіалова кислота, ацетилглюкозамін) та неорганічні фосфат і сульфат.

Властивості ліпідів: 1) амфіфільність ліпідів – люблять гідрофільне і гідрофобне середовища (полярна голова занурена у воду, а неполярний хвіст - у неполярний розчинник, наприклад, міцели, бішар мембран); 2) утворення емульсій - нестійкі емульсії легко розділяються на дві фази: воду і жир. Стійкі емульсії утворюються у присутності емульгаторів – поверхнево активних речовин, які адсорбуються на окремих краплинах жиру, не даючи їм зливатися в більші краплини; 3) гідроліз жирів може відбуватися під дією лугів,

перегрітого пару, кислот і ферментів. Якщо гідроліз відбувається в присутності лугів, то утворюється гліцерин і солі жирних кислот, які називаються милом, а реакція - омилення.

Класифікація ліпідів. Вищі жирні кислоти. Відомо близько 200 жирних кислот, які відрізняються кількістю атомів карбону, ступеню насиченості, характером розміщення подвійних зв'язків та наявністю гідрокси- і оксигрупи. Жирні кислоти – це карбонові кислоти, тобто похідні вуглеводнів. Розрізняють насичені та ненасичені жирні кислоти. Молекули *насичених жирних кислот* – це нерозгалужений вуглеводневий ланцюг, який складається із парної кількості атомів карбону. В рослинах зустрічається пальмітинова жирна кислота (C_{16:0}). Молекули *ненасичених жирних кислот* містять подвійні або потрійні зв'язки. За числом подвійних зв'язків в молекулі жирні кислоти можуть бути моно-, ди-, триєнові (полієнові). У рослин зустрічаються переважно олеїнова (моноєнова (C_{18:1}^{Δ9}), лінолева (дієнова (C_{18:2}^{Δ9,12}), ліноленова (триєнова (C_{18:3}^{Δ9,12,15}) жирні кислоти.

Похідними вищих жирних кислот є вищі жирні спирти (містять спиртову групу) *і альдегіди* (містять альдегідну групу), які можуть бути як насиченими, так і ненасиченими. У природі частіше зустрічаються моноєнові спирти – аналоги моноєнових жирних кислот та поліненасичені первинні спирти (терпеноли). Із спиртової природи у ліпідах зустрічаються також гліцерил, діоли, міоїнозитол, вуглеводи і вищі аміноспирти.

Пальмітинова насичена жирна кислота (C_{16:0}) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$;

Цетиловий (гексадеканол) насичений жирний спирт (C_{16:0}) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Пальмітиновий (гексадеканаль) насичений жирний альдегід (C_{16:0}) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CHO}$.

Олеїнова ненасичена моноєнова жирна кислота (C_{18:1}^{Δ9})

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$;

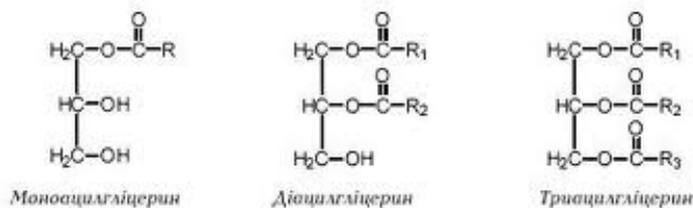
Олеїновий ненасичаний жирний спирт (9-октадецен-1-ол) (C_{18:1}^{Δ9})

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_2-\text{OH}$;

Олеїновий ненасичений жирний альдегід (C_{18:1}^{Δ9})

(9-октадецен-1-аль) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{HC}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CHO}$.

Нейтральні ліпіди, або триацилгліцероли утворюються при етерифікації жирними кислотами всіх трьох гідроксильних груп гліцерола. *Гліцерол* входить до складу нейтральних ліпідів і фосфоліпідів.



Нейтральні гліколіпіди – сполуки, в молекулах яких ковалентно зв’язані ліпідний і вуглеводний компоненти. Гідрофобний компонент в нейтральних гліколіпідах представлений залишками жирних кислот, в основному ненасичених. У склад вуглеводного компонента нейтральних гліколіпідів, крім галактози, входять також залишки глюкози.

Фосфоліпіди – це похідні гліцеролу, які містять залишки жирних кислот, фосфорної кислоти, спирту (холін, етаноламін), амінокислоти тощо. Фосфоліпіди в тканинах тварин і рослин, в клітинах бактерій виконують структурну функцію, приймають участь у формуванні біологічних мембран, приймають участь у метаболічних процесах. Фосфоліпіди класифікуються згідно особливостей гідрофільного замісника: фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін попередник фосфатидилхолінів, фосфатидилсерин.

Сфінголіпіди – це складні ефіри сфінгозинових основ. В молекулах природних сфінголіпідів взаємодія сфінгозинової основи із залишком жирної кислоти відбувається не по гідроксильній групі, а через аміногрупу з утворенням амідного зв’язку. Сфінгозинові основи відрізняються за довжиною вуглецевого ланцюга, її структурі, степені насичення, числу гідроксильних груп. Наприклад, *сфінгомієлін* похідне церамідів (ацильні похідні сфінгозинових основ), замісник по гідроксильній групі у першому положенні є фосфорил холін.

РОБОТА 36

ЛІПІДИ. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ.

Мета роботи. Дослідити здатність ліпідів до утворення емульсій, розділити ліпіди методом ТШХ та розрахувати коефіцієнт розділення.

1. Розчинність ліпідів і утворення емульсії.

Принцип методу. Характерними властивостями жирів є їх добра розчинність у багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, диетиловий ефір тощо) і нерозчинність у воді. Під час змішування жирів із водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, в якому вони утворюються. Наявність у воді речовин — емульгаторів (мила, жовчні кислоти, карбонати тощо) збільшує стійкість емульсій. Утворення емульсій зумовлене тим, що в поверхневий водяний шар, який

оточує жирові краплинки, спрямовуються поверхнево-активні частинки жовчних кислот, мила, карбонату, котрі обволікають краплинки жиру й перешкоджають їх злиттю.

Матеріали та реактиви. Олія (рослинна), 96% етиловий спирт, бензол, хлороформ, 1% розчин карбонату натрія (Na_2CO_3).

Обладнання. Штатив з пробірками, крапельниці, піпетки.

Хід роботи.

1) В чотири пробірки наливають по 0,2—0,3 мл олії, потім у пробірку 1 додають 5 мл води, у пробірку 2— 5 мл спирту, у пробірку 3— 5 мл бензолу, у пробірку 4 — 5 мл хлороформу. Вміст усіх пробірок енергійно струшують. У пробірці 1 олія та вода швидко розділяються на два шари, у пробірці 2 утворюється каламутний розчин внаслідок недостатньої розчинності олії в спирті, в пробірках 3 і 4 розчини прозорі.

2) У дві пробірки вносять по декілька краплин олії. В пробірку 1 додають 2 мл води, в пробірку 2 — 2 мл розчину Na_2CO_3 . Вміст пробірок інтенсивно струшують і спостерігають утворення, емульсії. Відзначають різницю стійкості емульсій у двох пробірках.

2. Розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol.

Принцип методу. Рідка фаза, що рухається по шару адсорбента за рахунок капілярних сил, здатна переміщувати компоненти суміші, яку розділяють, з різними швидкостями. Розташування точок сполук, які розділяють, відповідає коефіцієнту розділення R_f , що визначається співвідношенням відстаней, які проходять сполуки фронтом розчинника від їх старту (значення R_f завжди менше одиниці). Ліпіди на хроматограмі розташовуються за меншим значенням R_f : ефіри холестеролу, триацилгліцероли, жирні кислоти, холестерин, фосфоліпіди.

Матеріали та реактиви. Олія (рослинна), суміш хлороформу та метанолу (1:1), розчинник – суміш n-гексану, ефіру та оцтової кислоти (80:20:1), кристалічний йод, пластинки Silufol, фільтри.

Обладнання. Піпетки, пробірки із штативом, лійки, стакани, водяна баня, газовий пальник, термостат.

Хід роботи.

До 0,1 мл олії додають 10 мл суміші хлороформу та метанолу і інкубують протягом 5 хв при температурі 50°C . Після інкубації суміш фільтрують, а потім випаровують. Сухий залишок розчиняють у 1 мл суміші хлороформу та метанолу.

Пластинку Silufol (15×15 см) промивають розчинником (n-гексан, ефір, оцтова кислота) та сушать у термостаті протягом 30 хв при температурі 100⁰С. На пластинку на відстані 2 см від нижнього краю наносять 10-20 мкл розчину ліпідів і здійснюють розділення висхідним способом у розчиннику на відстанні 10 см. Після чого пластинку висушують під витяжною шафою у парах йоду. Для цього стакан із декількома кристаликами йоду накривають склом та ставлять на водяну баню (50⁰С) на декілька хвилин. У цей же стакан уже за кімнатної температури на 3-5 хв поміщають пластинку. Ліпіди виявляються у вигляді жовтих або жовто-коричневих точок (плям) на білому чи слабо-жовтому фоні пластинки.

За допомогою лінійки та формули: $R_f = a/b$ розраховують коефіцієнти R_f виявлених речовин. Коефіцієнт R_f дорівнює відношенню відстаней, яку пройшла речовина (від місця нанесення на бумазі до середини плями на хроматограмі) (a) до відстані, яку пройшов розчинник (b) (мм).

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Охарактеризуйте основні властивості ліпідів.
2. Охарактеризуйте ліпідні полімери рослин, наприклад, кутин, суберин та воски.
3. Написати структурні формули:

А) жирних кислот, спиртів та альдегідів (насичені та ненасичені). На прикладі пальмітинової, стеаринової, лінолевої та ліноленової кислот.

Б) триацилгліцеролів (гліцерол та його похідні).

В) фосfolіпідів (фосфатидилсерин, фосфатидилхолін, фосфатидил-етаноламін, фосфатидова кислота).

Г) сфінголіпідів (сфінгомієлін, глюкоцереброзид).

РОБОТА 37

ЛІПІДИ. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Мета роботи. Визначити та розрахувати хімічні параметри жирів.

1. Визначення числа омилення.

Принцип методу. Числом омилення називають кількість гідроксиду калію (мг), яка потрібна для нейтралізації всіх жирних кислот (вільних і тих, що входять до складу триацилгліцеролів), що містяться в 1 г жиру.

Матеріали та реактиви. Олія (рослинна), 0,1% розчин фенолфталеїну, розчин HCl (0,5 моль/л), спиртовий розчин КОН (0,5 моль/л). Для виготовлення цього реактиву 40 г КОН розчиняють у 30 мл води, залежно від концентрації

спиртового розчину, беруть відповідну кількість водяного розчину КОН і розводять перегнаним за наявності NaOH (на 100 г спирту 5 г NaOH) спиртом. Спирт із таким вмістом NaOH кип'ятять із зворотним холодильником протягом години, потім переганяють. Розчин відстоюють добу, фільтрують і зберігають у добре закоркованій склянці з темним склом.

Обладнання. Колби об'ємом 50 мл, зворотний холодильник, водяна баня, піпетки, бюретки, крапельниці.

Хід роботи.

В колбу 1 (дослід) додають 0,5 г жиру, в колбу 2 (контроль) — 0,5 мл води. В обидві колби доливають по 15 мл спиртового розчину КОН і кип'ятять із зворотним холодильником на водяній бані протягом 50 хв до повного омилення гліцеридів і нейтралізації вільних жирних кислот. Потім у обидві колби додають по десять краплин розчину фенолфталеїну й титрують теплим розчином HCl до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Кількість КОН, мг (число омилення — ЧО), витрачена на нейтралізацію всіх жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, визначають за формулою:

$$ЧО = (B - A) \cdot f \cdot Q/a,$$

де (B—A) - різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків розчином соляної кислоти (0,5 моль/л), мл; a — наважка досліджуваного жиру, г; f — коефіцієнт поправки на титр розчину HCl (0,5 моль/л); Q — кількість КОН (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл розчину КОН (0,5 моль/л).

2. Визначення кислотного числа жиру.

Принцип методу. Кислотністю жиру, або кислотним числом (КЧ), називають кількість КОН (мг), яка потрібна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру.

Матеріали та реактиви. Олія (рослинна), спирт, нейтралізований за фенолфталеїном, розчин КОН (0,1 моль/л), 0,1% розчин фенолфталеїну.

Обладнання. Колби об'ємом 50 мл, піпетки, бюретки.

Хід роботи.

У колбу внести 1 г жиру, додати 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, добре перемішати для максимального розчинення вільних жирних кислот. Отриману емульсію титрують розчином КОН до появи рожевого забарвлення (забарвлення не повинно зникати протягом 0,5—1 хв).

Кількість КОН (мг), яку було витрачено на титрування вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру, визначають за формулою:

$$КЧ = A \cdot f \cdot Q/a,$$

де А — об'єм розчину КОН (0,1 моль/л), витрачений на титрування досліджуваної проби, мл; а—наважка жиру, г; f — коефіцієнт поправки на титр розчину КОН (0,1 моль/л); Q — кількість КОН (5,61 мг), еквівалентна 1 мл розчину КОН (0,1 моль/л).

3. Визначення ефірного числа жиру.

Принцип методу. Ефірним числом (ЕЧ) називають кількість КОН (мг), яка потрібна для нейтралізації всіх утворених під час омилення триацилгліцеролів жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Це число визначають за різницею між ЧО жиру та його КЧ.

Якщо відоме значення ЕЧ жиру, можна, використовуючи розрахунковий метод, обчислити вміст гліцеролу. Для вивільнення однієї молекули гліцеролу необхідно витратити три молекули КОН.

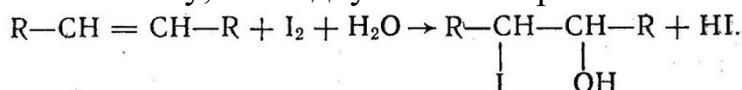
Кількість гліцеролу в жирі, %, розраховують за формулою:

$$C = 96,02 \cdot EЧ \cdot 100 / 56,11 \cdot 3 \cdot 1000,$$

де 96,02 — молекулярна маса гліцеролу; ЕЧ—ефірне число жиру; 56,11 — молекулярна маса КОН.

4. Визначення йодного числа жиру.

Принцип методу. Йодним числом (ЙЧ) називають кількість йоду (г), яка може прореагувати з 100 г жиру. Це число відповідає кількості ненасичених жирних кислот у жирі. Визначення ЙЧ ґрунтується на реакції приєднання йоду за місцем подвійного зв'язку, яка відбувається за рівнянням:



Матеріали та реактиви. Олія (рослинна), спиртовий розчин йоду (0,1 моль/л), 1% розчин крохмалю, розчин Na₂S₂O₃ (0,05 моль/л).

Обладнання. Дві конічні колби об'ємом 50 мл, піпетки, бюретки.

Хід роботи.

В колбу 1 (дослід) вносять наважку жиру 0,1—0,2 г, у колбу 2 (контроль) - 0,1—0,2 мл води, в обидві колби додають по 10 мл спиртового розчину йоду, перемішують і залишають на 15 хв. Через 15 хв вміст колб титрують розчином Na₂S₂O₃ до появи жовтуватого забарвлення. Потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, суміш титрують до зникнення синього забарвлення.

Йодне число визначають за формулою:

$$ЙЧ = (B - A) \cdot f \cdot Q \cdot 100 / a \cdot 1000,$$

де (B - A) – різниця результатів титрування контрольного та досліджуваного зразків розчином гіпосульфїту натрія (0,05 моль/л), мл; а — наважка

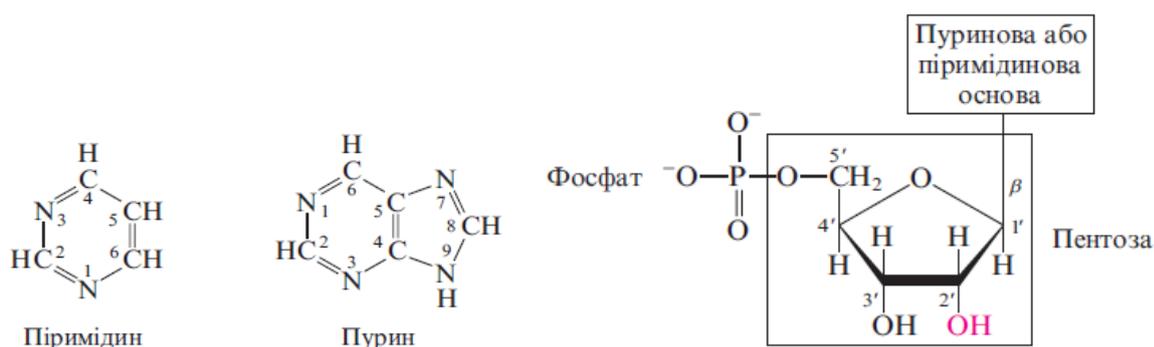
Контрольні запитання до розділу «Ліпіди».

1. Що таке ліпіди?
2. Функції ліпідів.
3. Структурні компоненти ліпідів (гідрофобні та гідрофільні).
4. Класифікація ліпідів. Навести приклади.
5. Чим відрізняються насичені жирні кислоти від ненасичених? Навести приклади.
6. Охарактеризуйте ферменти, які каталізують реакції гідролізу жирів (ліпази). Навести приклади.
7. β -окиснення жирних кислот. Де і за яких умов відбувається цей процес, що є кінцевими продуктами?
8. Основні етапи β -окиснення жирних кислот.
9. Як відрізняється β -окиснення насичених і ненасичених жирних кислот?
10. Біосинтез жирних кислот. Де і за яких умов відбувається цей процес, яка сполука є попередником біосинтезу жирних кислот?
11. Метаболізм триацилгліцеролів, фосфо- та сфінголіпідів.

РОЗДІЛ 11

НУКЛЕЙНОВІ КИСЛОТИ

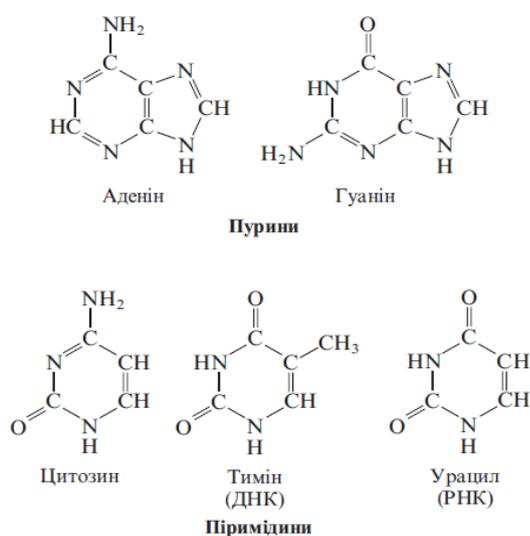
Нуклеїнові кислоти – це біополімери живих організмів, які забезпечують збереження та передачу спадкової інформації. У природі існує два типи нуклеїнових кислот – це ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) та РНК (рибонуклеїнова кислота). Мономерними одиницями нуклеїнових кислот є нуклеотиди, які складаються із трьох компонентів: 1) азотовмісна циклічна сполука – пуринові чи піримідинові основи, 2) вуглевод (пентози - дезоксирибоза або рибоза), 3) залишок фосфорної кислоти.



Будова нуклеотиду

Піримідинові основи - це похідні шестичленної гетероциклічної сполуки – піримідину. Цитозин (2-окси-6-амінопіримідин) входить до складу як ДНК, так і РНК; тимін (5-метил-2,6-діоксипіримідин) – до складу ДНК, а урацил (2,6-

диоксипіримідин) – до складу РНК. Мінорні основ похідних піримідина – це метильовані (5-метилцитозин), сірковмісні (2- або 6-тіоурацил), гідровані (дигідроурацил).



Пуринові основи – це похідні гетероциклічної молекули піримідину, яка складається із піримідинового і імідазольного кілець, що конденсовані по 4-5 зв'язках. *Аденін* (6-амінопурин) та *гуанін* (2-аміно-6-оксипурин) входять до складу як ДНК, так і РНК. Природними похідними пурину є гіпоксантин, ксантин і сечова кислота. *Мінорні основи* пуринових основ – 1-метиладенін, 2-метиладенін, 7-метилгуанін, виявлено у тРНК і нуклеїнових кислотах вірусів.

Вуглеводний компонент - це альдопентози у фуранозній формі. До складу РНК входить β-D-рибоза, а до ДНК –β- D-2 дезоксирибоза, у якої ОН-група у положенні 2 атома карбону заміщена атомом гідрогену. Відсутність у 2 положенні ОН-групи у дезоксирибозі робить ДНК більш стійкою до лужної деградації.

Нуклеозиди складаються із залишка пуринової чи піримідинової основи, який зв'язаний через атом нітрогену із залишком D-рибози або 2-дезоксид-рибози у фуранозній формі. Відповідно нуклеозиди, які містять рибозу називаються аденозин, гуанозин, цитидин, та уридин, а які містять дезоксирибозу - дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин, тимідин.

Нуклеотиди – це фосфорнокислі ефіри нуклеозидів, в яких фосфорна кислота з'єднана складноєфірним зв'язком з вільною ОН-групою пентози. Назви нуклеотидів залежать від назви основ: аденилова, гуанилова, тимідинова, цитидилова і уридилова кислоти. Нуклеотиди з'єднуються між собою за допомогою фосфодієфірних зв'язків, які утворюються між ОН-групою в 5 положенні пентози одного нуклеотиду та ОН-групою в 3 положенні пентози іншого нуклеотиду.

Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот. РНК, як і ДНК, інтенсивно поглинають в УФ-області при 260-280 нм, характеризуються певним гіпохромним ефектом, оптичною активністю. Інтервал денатураційного переходу у РНК вищий, ніж у двох ланцюгових ДНК, криві денатурації схожі

до кривих плавлення одноланцюгових ДНК та залежать від нуклеотидного складу.

РОБОТА 38 **НУКЛЕЙНОВІ КИСЛОТИ**

Мета роботи. Приготувати гідролізат (дезоксирибонуклеопротейідів та ідентифікувати основні складові нуклеотиду за допомогою якісних реакцій.

Виділення нуклеопротейідів.

Принцип методу. Дезоксирибонуклеопротейіди добре розчиняються в лугах і сольових розчинах та осаджуються після нейтралізації розчинів або розведення розчинів солей. Рибонуклеопротейіди також добре розчиняються в лужних розчинах та осаджуються в ізоелектричній точці неорганічними кислотами. Кінцевими продуктами при гідролізі нуклеїнових кислот є: вуглеводи (пентози - дезоксирибоза та рибоза), азотисті основи (пуринові та піримідинові) та залишок фосфорної кислоти.

Матеріали та реактиви. Сухі пекарські дріжджі, 0,4% і 0,02 моль/л розчин їдкого натрію, 5% розчин оцтової кислоти, 10% розчин H_2SO_4 .

Обладнання. Порцелянова ступка з товкачиком, центрифужні та хімічні пробірки, штатив для пробірок, центрифуга, колба із круглим дном, пробка із скляною трубкою, лійки, фільтрувальний папір, водяна баня.

Хід роботи.

Для приготування гідролізату дріжджів №1 - 10 г сухих дріжджів старанно розтирають у порцеляновій ступці протягом 15 хв із 50 мл 0,4% розчину NaOH, який додають невеликими порціями. Отриману суміш центрифугують протягом 10 хв при 2000g. Надосад відбирають та помішуючи доливають до нього 15-20 мл розчину оцтової кислоти. Отриману суміш центрифугують за тих же умов. Осад розчиняють у 15-20 мл розчину NaOH (0,02 моль/л).

Отриманий гідролізат нуклеопротейідів використовують у якісних реакція на вуглеводи, зокрема, пентози.

Для приготування гідролізату нуклеопротейідів дріжджів №2 - у колбу із круглим дном вносять 1 г свіжих пекарських дріжджів, 20 мл розчину сірчаної кислоти та 20 мл дистильованої води, колбу закривають пробкою, в яку вставляють скляну трубку довжиною 20-30 см (як зворотній холодильник) та кип'ятять на водяній бані протягом 35 хвилин. Після чого рідину у колбі охолоджують, об'єм доводять дистильованою водою до початкового та фільтрують.

Отриманий гідролізат використовують для якісних реакцій на білки, пуринові основи та залишок фосфорної кислоти.

1. Виявлення білків у гідролізаті нуклеопротейдів дріжджів (біуретова реакція).

Принцип реакції. Білки в лужному середовищі із сульфатом міді утворюють комплексні сполуки, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка.

Матеріали та реактиви. Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №2, 10% розчин NaOH, 1% розчин CuSO₄.

Обладнання. Скляні палички, пробірки із штативом, піпетки, крапельниця, лакмусовий папірець.

Хід роботи:

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 0,5 мл гідролізату №2, нейтралізують розчином їдкою натрію (за лакмусом), потім додають 0,5 мл розчину NaOH і 2-3 краплі розчину CuSO₄ та обережно перемішують. Виникнення синьо-фіолетового забарвлення розчину у пробірці свідчить про наявність білків у гідролізаті нуклеопротейдів.

2. Виявлення вуглеводів.

А. Якісна реакція з орцином (реакція Біаля) на пентози.

Принцип методу. Рибози у присутності концентрованої соляної кислоти під час нагрівання перетворюються на фурфурол, який із орцином за наявності хлориду заліза (III) утворює забарвлену в синьо-зелений колір, а із флорглюцином – в вишнево-червоний колір.

Матеріали та реактиви. Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №1, концентрована соляна кислота, кристалічний орцин, 0,1% розчин флорглюцину.

Обладнання. Скляні палички, пробірки із штативом, водяна баня.

Хід роботи. В дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату дріжджів №1. У пробірку 1 додають 1 мл HCl та декілька кристаликів орцину, а у пробірку 2 – 1,5 мл розчину флорглюцину. Вміст обох пробірок перемішують. Пробірку 1 кип'ятять на водяній бані протягом 6 хв, а пробірку 2 нагрівають до кипіння. Вміст пробірок охолоджують та спостерігають у пробірці 1 (із орцином) утворення синьо-зеленого забарвлення, а у пробірці 2 (із флорглюцином) – вишнево-червоного.

В. Якісна реакція із дифеніламіном на дезоксипентози.

Принцип методу. При нагріванні дезоксипентоз у кислому середовищі утворюються сполуки (фурфуролів спирт, оксилевулиновий альдегід тощо), які конденсуються із дифеніламіном та утворюють сполуки синього кольору.

Матеріали та реактиви. Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №1, розчин дифеніламіну (1 г дифеніламіну розчиняють у суміші концентрованої сірчаної кислоти (2, 75 мг) і льодяної оцтової кислоти (100 мл)).

Обладнання. Пробірки із штативом, піпетки.

Хід роботи.

У пробірку до 2 мл гідролізату дріжджів №1 додають 2 мл дифеніламінового реактиву. Вміст пробірок перемішують та кип'ячать на водяній бані протягом 15 хв. Якщо у гідролізаті нуклеопротейдів міститься дезоксирибоза то вміст пробірки забарвлюється у синій колір, а якщо рибоза – то у зелений колір.

3. Виявлення пуринових основ.

Принцип методу. Пуринові основи із солями срібла утворюють комплексні сполуки.

Матеріали та реактиви. Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №2, концентрований розчин амоніаку, 1% розчин AgNO_3 .

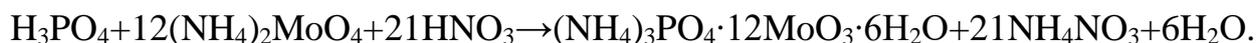
Обладнання. Пробірки із штативом, піпетки, лакмусовий папірець.

Хід роботи.

До 1 мл гідролізату дріжджів №2 додають концентрований розчин амоніаку до утворення рН лужного середовища (за лакмусовим папірцем) і 0,5 мл розчину AgNO_3 . Через 3-5 хв утворюється пухкий осад срібних солей пуринових основ.

4. Виявлення фосфорної кислоти (молібденова реакція).

Принцип реакції. Фосфорна кислота взаємодіє із молібденовим реактивом, при цьому утворюється сполука фосфорна сіль молібдату амонію жовтого кольору:



Матеріали та реактиви. Гідролізат нуклеопротейдів дріжджів №2, молібденовий реактив (7,5 г молібдату амонію розчиняють у 100 мл води і додають 100 мл 32% розчину азотної кислоти з відносною щільністю 1,2, повне розчинення молібдату амонію відбудеться після додавання азотної кислоти).

Обладнання. Пробірки із штативом, піпетки, водяна баня.

Хід роботи.

До 1 мл гідролізату дріжджів додають 1мл молібденового реактиву та кип'ячать. За присутності фосфорної кислоти у гідролізаті нуклеопротейдів дріжджів рідина у пробірці забарвлюється в лимонно-жовтий колір, а при охолодженні випадає кристалічний осад жовтого кольору.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Хімічний склад нуклеїнових кислот.
2. Чим відрізняється нуклеотид від нуклеозида?
3. Написати структурні формули:

А) пуринових (аденін, гуанін) та піримідинових (цитозин, тимін, урацил) основ.

Б) нуклеотидів, які входять до складу ДНК(дАМФ, дГМФ, дЦМФ і дТМФ).

В) нуклеотидів, які входять до складу РНК(АМФ, ГМФ, ЦМФ і УМФ).

Контрольні запитання до розділу «Нуклеїнові кислоти».

1. Що таке нуклеїнові кислоти? Навести приклади.
2. Функції нуклеїнових кислот.
3. Характерні особливості структурного складу та будови ДНК.
4. Характерні особливості структурного складу та будови РНК.
5. Фізико-хімічні властивості нуклеїнових кислот.
6. Рівні структурної організації ДНК.
7. Правило компліментарності (правило Чаргаффа) азотистих основ у складі нуклеїнових кислот.
8. Де міститься генетична інформація у клітині?
9. Будова (структурно-функціональний стан) хромосоми.
10. Поняття геному.
11. Структура і будова РНК. Типи РНК: інформаційна, транспортна, рибосомальна.
12. Ферменти, які приймають участь у гідролізі нуклеїнових кислот.
13. Кінцеві продукти розпаду пуринових і піримідинових основ.
14. Що таке реплікація ДНК? Назвати ферменти, які приймають участь та послідовність етапів цього процесу.
15. Що таке транскрипція РНК? Назвати ферменти, які приймають участь та послідовність етапів цього процесу.

РОЗДІЛ 12 ВІТАМІНИ

Вітаміни - це органічні речовини різноманітної природи, які необхідні для нормальної життєдіяльності людей і тварин у невеликих кількостях. Вітаміни та їх похідні є незамінними учасниками обміну речовин і потрібні для забезпечення нормальних функцій і будови організму. Зараз відомо близько 20 різних вітамінів, які разом із основними харчовими речовинами – білками, вуглеводами та ліпідами повинні забезпечувати нормальний ріст і життєдіяльність організмів. Джерелами вітамінів для людей і тварин є

переважно продукти рослинного походження. Окремі вітаміни містяться лише в організмах тварин (А, Д). Деякі тварини, крім людей, мавп, синтезують вітамін С із глюкози.

За фізико-хімічними властивостями вітаміни поділяють на водорозчинні та жиророзчинні (добре розчинні в неполярних розчинниках і жирах). До водорозчинних вітамінів належать такі, як тіамін (вітамін В1), рибофлавін (вітамін В2), нікотинова кислота (вітамін В5, РР), пантотенова кислота (вітамін В3), піридоксин (вітамін В6), біотин (вітамін Н), фолієва кислота (вітамін Вс), кориноїди (вітаміни групи В12), аскорбінова кислота (вітамін С). Усі ці ферменти беруть участь в утворенні коферментів. До жиророзчинних належать вітаміни груп: А (каротиноїди), Д (кальцифероли), К (філохінони), Е (токофероли).

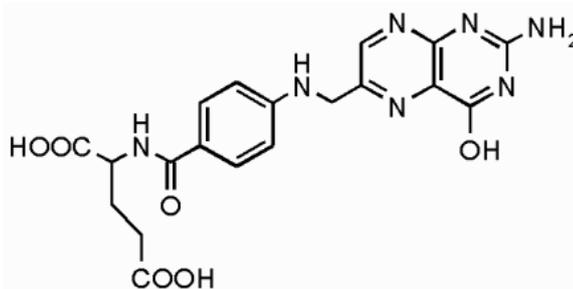
Крім добре відомих цих вітамінів існують інші речовини, які необхідні для нормальної життєдіяльності живих організмів, але вони не вважаються вітамінами - це вітаміноподібні речовини. До них належить карнітин, інозитол, ліпоєва кислота, рутин, катехін, вітамін В₁₃ (оротова кислота), вітамін В₁₅ (пангамова кислота) тощо.

РОБОТА 39

ВОДРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ. ФОЛІЄВА КИСЛОТА

Мета роботи. Виділити фолієву кислоту (вітамін Вс) з дріжджів.

Фолієва кислота (вітамін Вс, В10, В11, птероїлглутамінова кислота) вперше була виділена із листя шпинату. Молекула фолієвої кислоти складається із глютамінової кислоти, п-аміно бензойної кислоти та гетероциклічної сполуки – заміщеного птеридину.



Структурна формула фолієвої кислоти (вітамін Вс).

Фолієва кислота погано розчиняється в холодній воді, етанолі, краще – в гарячій воді. Фолієва кислота не має коферментних властивостей, однак при відновленні перетворюється на тетрагідрофолієву кислоту. Тетрагідрофолієва кислота – переносник одно вуглецевих груп: метильної, метиленої, формільної, формінної. Тетрагідрофолієва кислота бере участь у біосинтезі

азотистих основ нуклеїнових кислот, креатину, метіоніну, в утворені серину з гліцину тощо. Фолієва кислота біохімічно пов'язано із обміном і функціями вітаміну В12.

Відсутність у їжі фолієвої кислоти викликає анемію та лейкопенію (порушення синтезу еритроцитів і лейкоцитів) та інші зміни обміну речовин. Добова потреба людини у фолієвій кислоті становить 0,2-0,5 мг. У значних кількостях фолієва кислота міститься в листі рослин, овочах, фруктах, особливо великий вміст у суниці.

Принцип методу. Фолієва кислота добре розчиняється в лужних розчинах, зокрема NaOH (0,1 моль/л). Екстрагована фолієва кислота із дріжджів за ультрафіолетового опромінення здатна викликати інтенсивну блакитну флюоресценцію.

Матеріали та реактиви. Пекарські дріжджі, кварцевий пісок, концентрована оцтова кислота, 0,4% розчин перманганату калію, 3% розчин пероксиду водню, розчини гідроксиду натрію (0,1 моль/л та 0,005 моль/л), лакмусовий папірець.

Обладнання. Штатив для пробірок, центрифужні пробірки, центрифуга, флюорисцента лампа, порцелянова ступка, піпетки.

Хід роботи.

В порцеляновій ступці розтирають 10 г дріжджів із 10 мл розчину NaOH (0,1 моль/л) та 2 г кварцевого піску протягом 5 хвилин. Отриману рідину центрифугують при 800g протягом 15 хвилин. Надосад обережно переносять в інші пробірку та використовують у подальших реакціях.

До 10 крапель надосадової рідини додають 20 крапель концентрованої оцтової кислоти (рН 3,0) та 10 крапель розчину KMnO_4 так, щоб рожеве забарвлення не зникло протягом 10 хвилин. Якщо рожеве забарвлення розчину є нестійким, то необхідно додати ще декілька крапель KMnO_4 . Через 10 хвилин надлишок перманганату калію видаляють шляхом додавання 4-5 крапель розчину H_2O_2 та додають 4-5 мл розчину гідроксиду натрію (0,005 моль/л) до рН 4,0 — 4,5, використовуючи лакмусовий папірець.

Фолієва кислота в лужному розчині за умови опромінення в ультрафіолетовому діапазоні світла здатна до флюоресценції (виникає блакитне світіння).

Зробити висновок роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Характеристика водорозчинних вітамінів. Навести приклади.

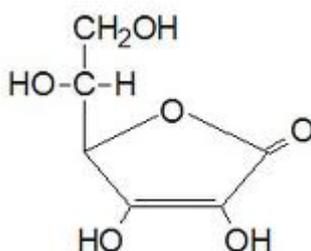
2. Написати структурні формули водорозчинних вітамінів: тіаміну (вітамін В₁), рибофлавіну (вітамін В₂), нікотинової кислоти (вітамін В₃, РР), пантотенової кислоти (вітамін В₅), піридоксину (вітамін В₆), біотину (вітамін Н), фолієвої кислоти (вітамін В₉), кобаламіну (вітамін В₁₂).

РОБОТА 40.

ВОДОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ. ВІТАМІН С

Мета роботи. Визначити кількість вітаміну С (аскорбінової кислоти).

Вітамін С або аскорбінова кислота вперше було виділено із лимонного соку (1933р). Завдяки антискорбутним властивостям (попередження розвитку цинги) цей вітамін назвали аскорбіновою кислотою.



Структурна формула аскорбінової кислоти (вітаміну С).

Молекула вітаміну С за будовою подібна до гексоз і є лактоном дієнол гулонової кислоти. Ця кислота може віддавати два атоми водню, перетворюючись на дегідроаскорбінову кислоту. Аскорбінова кислота добре розчиняється у воді та метанолі, гірше – в етанолі. Вона добре окислюється киснем повітря, особливо у присутності іонів важких металів (міді, заліза) з підвищенням рН і температури середовища. Без кисню аскорбінова кислота може витримати нагрівання до 100 °С.

Біологічна роль аскорбінової кислоти – приймає участь в окисно-відновних процесах, завдяки її властивості віддавати та приєднувати атоми водню. Основна роль цього вітаміну – це підтримання сульфгідрильних груп ферментативних білків у відновному стані, що забезпечує активність ряду ферментів. Коферментну роль аскорбінової кислоти виявлено у реакціях гідроксилування біомолекул.

Більшість тварин та усі рослини можуть синтезувати цей вітамін з глюкози. У організмі людей, мавп, мурчаків і деяких інших хребетних тварин цей вітамін не синтезується. Мікроорганізми не мають і не потребують цього вітаміну.

Середньодобова потреба дорослих у вітаміні С становить 50-70 мг. Найкращим джерелом вітаміну С є шипшина, чорна смородина, томати, цитрусові, білокачанна капуста, зелені овочі, горіх грецький, перець червоний.

Принцип методу. Визначення аскорбінової кислоти ґрунтується на її окисно-відновних властивостях, а саме при окисленні аскорбінова кислота відновлює йодат калію до вільного йоду, кількість якого розраховують за реакцією з крохмалем.

Матеріали та реактиви. Фрукти (яблука, мандарини, апельсини), овочі (морква, цибуля, редис), 2% розчин НСІ, 1% розчин КІ, 0,5% розчин крохмалю, 0,1 н розчин КІО₃ (0,3568 г КІО₃ розчиняють у 1 л води, 100 мл цього розчину переносять у колбу на 1 л і доводять водою до мітки), їдкий натрій, фенолфталеїн.

Обладнання. Порцелянова ступка, колби мірні об'ємом на 100 мл, фільтрувальний папір, мірні циліндри, піпетки, мікробюретки.

Хід роботи.

Наважку 2-10 г (залежно від вмісту вітаміну С) рослинного матеріалу розтирають з невеликою кількістю дистильованої води у порцеляновій ступці. Отриману суміш переносять в мірну колбу об'ємом на 100 мл, вміст колби доливають дистильованою водою до мітки і фільтрують через сухий фільтр в сухий стаканчик або конічну колбу об'ємом на 100 мл. Для титрування використовують 10 мл фільтрату до якого приливають 1 мл 2% розчину НСІ, 0,5 мл 1% розчину КІ, 2 мл 0,5% розчину крохмалю і 6-7 мл дистильованої води. Вміст колби 1 титрують 0,01н розчином йодату калію з мікробюретки до виникнення стійкого синього забарвлення. Паралельно необхідно зробити контрольну пробу. Для цього у колбу 2 замість фільтрату вносять 10 мл дистильованої води, додають всі реактиви згідно протоколу та вміст колби 2 також титрують до виникнення стійкого синього забарвлення.

Кількість вітаміну С (мг %) визначають за формулою:

$$C = \frac{(a - b) \cdot T \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 0,8806}{H \cdot V_2},$$

де С – кількість вітаміну С; (а – b) - кількість 0,01 н йодату калію, витраченого на титрування дослідного та контрольного зразків, мл; Т – поправка до титру 0,01 н йодату калію; V₁ – загальний об'єм витяжки, мл; V₂ – об'єм витяжки взятої для титрування (10 мл); Н – наважка рослинного матеріалу, г.

Примітка. 1 мл 0,01н розчину йодату калію відповідає 0,8806 мг аскорбінової кислоти. Якщо вміст аскорбінової кислоти низький, беруть 0,001 н йодат калію (1 мл відповідає 0,088 мг вітаміну С).

Перевага цього методу в порівнянні з методом Муррі, полягає в тому, що визначення вітаміну С можна проводити в забарвлених екстрактах рослин.

Зробити висновок роботи.

Контрольні запитання та завдання.

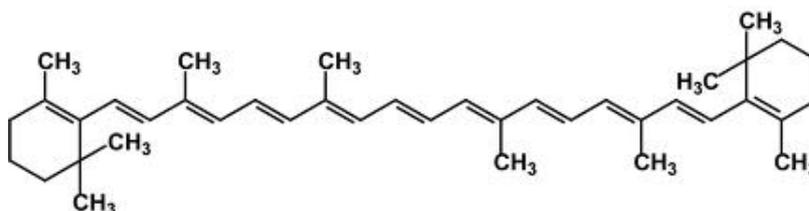
1. Написати структурну формулу аскорбінової кислоти.
2. Біохімічна роль фолієвої та аскорбінової кислот.
3. Чому рослини із високим вмістом вітаміну С не слід піддавати дії високих температур?

РОБОТА 41.

ЖИРОРОЗЧИННІ ВІТАМІНИ. ВІТАМІН А

Мета роботи. Визначити концентрацію вітаміну А.

Вітамін А (каротиноїди, антиксерофтальмічний фактор), під цією назвою об'єднується група похідних рослинних пігментів – каротинів. Біологічне значення для людини мають α -, β - і γ -каротини.



Структурна формула β -каротину

В організмі людини та тварин β -каротин може ферментативно перетворюватися на вітамін А₁, тому каротини називають провітамінами – попередниками вітаміну А. Вітамін А термостабільний, може витримувати нагрівання до 100-120 0С у безкисневому середовищі, стійкий до дії лугів, легко окиснюється киснем повітря, однак у кислому середовищі та під дією сонячного світла швидко руйнується.

Вітамін А бере участь в окисно-відновних процесах, тканинному диханні, процесах біосинтезу білків, нуклеїнових кислот, кортикостероїдів та входить до складу зорового пігменту людини - родопсину. Біологічна роль вітаміну А полягає у зоровій функції у формах ретинолу, ретиналю, ретинолової кислоти.

Середньодобова потреба дорослої людини у вітаміні А становить 0,75-1,5 мг. У разі перевищення рекомендованих доз вітаміну у 20-30 разів спостерігаються токсичні ефекти та загибель людей. Особливо багато вітаміну А міститься в печінці риб і ссавців, які живуть у водах Арктики.

Принцип методу. Вітамін А екстрагують із рослинного матеріалу органічними розчинниками та визначають його кількість

спектрофотометричним методом за інтенсивністю поглинання світла при довжині 700 нм, оскільки інтенсивність забарвлення екстракту пропорційна вмісту у ньому вітаміну.

Матеріали та реактиви. Морква, кварцевий пісок, ацетон, бензин, безводний сульфат натрію, порошок каротину.

Обладнання. Порцелянова ступка, скальпель, фільтрувальний папір, лійка, мірна колба об'ємом на 100 мл, піпетки, розподільна лійка, пробірки, спектрофотометр, кювета.

Хід роботи.

За допомогою скальпеля дрібно нарізають 1 г сирової моркви та розтирають у порцеляновій ступці із кварцевим піском, додавши 5 мл ацетону. Отриману суміш фільтрують через складчастий паперовий фільтр у мірну колбу об'ємом на 100 мл. Осад промивають новими порціями ацетону до тих пір, поки останній не перестане забарвлюватися у жовтий колір.

До ацетонової витяжки каротину за допомогою піпетки додають 10 мл бензину та 3 мл води. Колбу закривають і струшують протягом 2-3 хвилин. Вміст колби переносять у розподільну лійку. Після розшарування рідин у лійці, нижній шар, що містить ацетон і воду, обережно зливають. Верхній бензиновий шар, який містить екстракт каротину, переносять у пробірку для подальших досліджень. Для зневоднення бензинової витяжки в пробірку додають 1 г безводного сульфату натрію.

Вимірюють оптичну густину поглинання проб на спектрофотометрі чи фотоелектроколориметрі при червоному світлофільтрі (625-740 нм). Як контрольну пробу використовують кювету з бензином. Стандартний розчин каротину: 0,203 мг каротину розводять в 100 мл бензину.

Вміст каротину розраховують за формулою:

$$A = \frac{E_2 \cdot V \cdot 0,203}{E_1 \cdot m \cdot 100},$$

де E_2 - екстинція каротинової витяжки дослідної проби, E_1 - екстинція каротинової витяжки стандартного розчину, V -об'єм витяжки, мл (3 мл); m -наважка моркви, г (1 г).

Зробити висновок роботи.

Контрольні запитання та завдання.

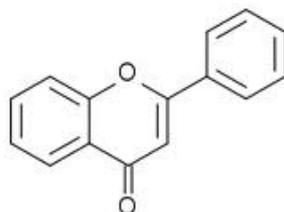
1. Характеристика жиророзчинних вітамінів. Навести приклади.
2. Написати структурні формули жиророзчинних вітамінів: вітаміну A_1 (каротиноїди), вітаміну D_3 (холекальциферол), вітаміну K_1 (філохінон), вітаміну E (токоферол).

РОБОТА 42.

ВІТАМІНОПОДІБНІ РЕЧОВИНИ. ВІТАМІН Р

Мета роботи. Визначити концентрацію вітаміну Р в чаї (за методом Левенталя).

Біофлавоноїди – це сполуки рослинного походження. Більшість біофлавоноїдів добре розчинні у воді, нерозчинні в етиловому ефірі, хлороформі і бензолі. На сьогодні відомо близько 150 біофлавоноїдів, які характеризуються Р-біологічною активністю – це катехіни, халкони, флавіни, флаволи тощо.



Структурна формула вітаміну Р.

Біофлавоноїди характеризуються наявністю у хімічній формулі ароматичних бензольних кілець і ядра, які з'єднані між собою трьох вуглецевим фрагментом. Флавоноїди поділяються на декілька груп в залежності від хімічної структури. Біологічна роль біофлавоноїдів: антиоксидантні та протизапальні властивості, нормалізують ліпідний, вуглеводний та білковий обміни у клітині, стабілізують основну речовину сполучної тканини, інгібуючи гіалуронідазу, при недостатній кількості біофлавоноїдів підвищується проникність кровоносних судин, що супроводжується кровотечами.

До речовин, що мають Р-вітамінну активність, належать широко поширені в рослинному світі глікозиди — рутин і геспередин, а також танін, що міститься в чайному листі і винограді.

Принцип методу. Рутин здатен окислюватись перманганатом калію, як індикатор використовують індигокармін, який взаємодіє із KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин. Встановлено, що 1 мл розчину перманганату калію (0,02 моль/л) окислює 6,4 мкг рутину.

Матеріали та реактиви. Чай, 0,01 моль/л розчин перманганату калію, індикатор індигокармін (1г індигокарміну розтирають і додають 50 мл

концентрованої сірчаної кислоти, об'єм до 1 л доводять дистильованою водою, фільтрують і зберігають в темному скляному посуді).

Обладнання. Водяна баня, фільтрувальний папір, колби, мікробюретки.

Хід роботи.

Наважку чаю 100 мг заливають 50 мл гарячої дистильованої води і доводять до кипіння на водяній бані. Отриманий екстракт охолоджують і фільтрують. У колбу 1 (дослід) наливають 10 мл фільтрату чаю, а у колбу 2 (контроль) 10 мл дистильованої води. В обидві колби додають по 10 мл дистильованої води і 5 крапель індигокарміну. У колбі 1 утворюється синє забарвлення. Вміст обох колб ретельно перемішують та титрують розчином KMnO_4 до появи стійкого жовтого забарвлення. Різниця між дослідним і контрольним титруванням (без екстракту) являє собою кількість мл 0,01 моль/л KMnO_4 , що витрачається на окислення рутину.

Для визначення вмісту (мкг) вітаміну Р використовують формулу:

$$X = A \cdot V_1 \cdot k / V_2 \cdot P,$$

де k - стандартний коефіцієнт титрування (3,2), A - різниця кількості 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , що пішло на титрування дослідної і контрольної проб, V_1 - об'єм (мл), в якому розчинена дослідна наважка чаю, V_2 - об'єм рослинного матеріалу (мл), взятий для аналізу, P - кількість чаю, г, взятого для аналізу.

Зробити висновок до роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Що таке вітаміноподібні речовини? Навести приклади.
2. Написати структурні формули вітаміноподібних речовин: карнітину, інозитулу, ліпоєвої кислоти, рутину, катехіну, вітаміну B_{13} (оротова кислота), вітаміну B_{15} (пангамова кислота).

Контрольні запитання до розділу «Вітаміни».

1. Що таке вітаміни? Що є їх джерелом?
2. Що відбувається в організмі людини при нестачі та надлишку вітамінів?
3. Біологічні функції вітамінів.
4. Класифікація вітамінів.
5. Чому рослини із високим вмістом піридоксину (вітамін B_6) слід зберігати у темному місці?
6. Які вітаміни є стійкими до дії високих температур, а які – ні? Як це впливає на їх біологічні властивості?
7. Який вітамін входить до складу коферментів – ФМН та ФАД?
8. Який вітамін входить до складу коферментів – НАД та НАДФ?

9. Який вітамін входить до складу коферменту-А?

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Біохімія. Підручник / Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М., Виноградова Р.П., Войціцький В.М., Курський М.Д., Рибальченко В.К., Цудзевич Б.О. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2002. – 480 с.
2. D.L. Nelson, M.M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. Publisher: W.H. Freeman (15th Edition), 2009, ISBN-10: 0-7167-7108-X. ISBN-13: 978-0-7167-7108-1. 1100 p.
3. Молекулярна біологія. Підручник / Сиволоб А.В. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2008. – 384 с.
4. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений/ Под ред.Н.Н. Третьякова. – М.: Колос, 2000. – 640 с.
5. Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высшая школа, 1980. –446с.
6. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под ред. С.Е. Северина,Г.А. Соловьевой. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 509 с.
7. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.
- 8 Пустовалова Л.М. Практикум по биохимии. - Ростов-на-Дону: Изд-во “Феникс”, 1999. - 544 с.

СЛОВНИК КЛЮЧОВИХ ТЕРМІНІВ

Адгезія — сила прилипання молекул води до клітинних стінок судин.

Антоціан — водорозчинний червоний або синій пігмент клітинного соку.

Апопласт — єдина транспортна система, поякій здійснюється транспорт води та розчинених речовин по рослині.

Біосфера — зона атмосфери, суші і води, заселена організмами.

Вакуоля — простір у цитоплазмі, що заповнений водянистою рідиною, клітинним соком та оточений мембраною.

Відновлення — приєднання електрона атомом (відбувається одночасно з окисненням: один атом віддає електрон, другий — захоплює).

Відносна транспірація — відношення інтенсивності транспірації з одиниці площі листка до інтенсивності випаровування води з такої самої площі вільної водної поверхні за одиницю часу.

Водневий зв'язок — слабкий зв'язок між атомами водню, ковалентно зв'язаного з атомом кисню або азоту та іншим атомом з останніх двох елементів.

Ієн — одиниця спадковості рослинного організму, за допомогою якої відбувається кодування та передача генетичної інформації в ряді поколінь.

Гіпертонічний розчин — розчин, який має концентрацію вищу, ніж клітинний сік.

Гіпотонічний розчин — розчин, концентрація якого нижча, ніж має клітинний сік.

Гідроліз — розщеплення молекули за рахунок приєднання води.

Гліколіз — ланцюг реакцій, в результаті яких глюкоза перетворюється на піруват (з утворенням АТФ).

Гутація — явище виділення крапель рідини на листках рослин.

Деплазмоліз — процес повернення клітини до нормального осмотичного стану у гіпотонічному розчині

Дихальний коефіцієнт — відношення кількості виділеного при диханні CO₂ до кількості поглинутого O₂, молях.

Дихання — біохімічний процес, в результаті якого в органах рослини окислюються та розкладаються органічні сполуки за участю кисню з виділенням енергії.

Ендодерма — шар клітин, що охоплює провідний циліндр у коренях та деяких стеблах.

Епідерма — зовнішній шар клітин (первинний за походженням) листків, стебел, коренів.

Замикаючі клітини — дві спеціалізовані епідермальні клітини продихового апарата.

Ізотонічний розчин — розчин, концентрація якого рівна концентрації клітинного соку.

Інтенсивність дихання — основний показник окислення субстратів, що визначають по кількості вуглекислого газу, що виділяє рослина або по кількості кисню, що поглинає.

Інтенсивність транспірації — величина, що показує, яку кількість води в грамах випаровує рослина на 1 м² або 1 см² листової поверхні за 1 годину.

Інтенсивність фотосинтезу — кількість CO₂, засвоєного одиницею поверхні листка за одиницю часу.

Інфільтрація — проникність (просочування) хімічних речовин крізь відкриті пори.

Каротиноїди — клас пігментів (жиророзчинних): жовті, оранжеві, червоні каротини та жовті ксантофіли. Це допоміжні пігменти процесу фотосинтезу. Містяться в хромопластах та хлоропластах рослин.

Клітинний сік — рідкий вміст вакуолей.

Когезія — сила взаємного зчеплення молекул води, що забезпечує безперервність водяних ниток в судинах та трахеїдах.

Кореневий тиск — сила, яка спричиняє в рослині від кореневої системи односторонній потік води з розчиненими в ній речовинами, незалежно від транспірації.

Ксилема — тканина, по якій транспортуються мінеральні речовини та вода в рослині. Має трахеальні елементи.

Макроелементи — основні неорганічні хімічні елементи, що необхідні рослині для росту та розвитку (K, N, Ca, P, Mg, S).

Мембрани — система динамічних спеціалізованих структур, які забезпечують компартментацію розмежування клітин та окремих органел, створюючи умови для нормального проходження метаболічних процесів.

Меристема — недиференційована рослинна тканина, з якої розвиваються нові клітини.

Мітохондрії — основна енергетична підстанція клітини, де в процесі дихання розщеплюються органічні молекули, вивільнюється енергія і запасується у формі АТФ, що забезпечує рослинну клітину енергією життєдіяльності в доступній формі.

Органела — спеціалізована частина клітини.

Осмоз — дифузія розчинника або води крізь напівпроникну мембрану.

Осмотичний тиск — це тиск розчину на напівпроникну перетинку, яка відокремлює його від розчинника, або від розчину з меншою концентрацією. Осмотичний тиск тим вищий, чим концентрованіший розчин.

Первинна оболонка — шар оболонки, що формується в період росту клітин.

Пігмент — речовина, що вибірково поглинає світло.

Плазмоліз — відокремлення протопласта від оболонки рослинної клітини, в результаті втрати ним води за рахунок осмосу.

Продихи — специфічні отвори в епідермі, крізь які відбувається газообмін. Розміщені переважно з нижнього боку листової пластинки, але у деяких рослин — з верхнього (капуста, злаки).

Протоплазма — цитоплазма без органел.

Протопласт — у рослин клітина без оболонки.

Рідинно-мозаїчна модель — модель мембрани, згідно якої мембрана складається з подвійного шару ліпідів та занурених в нього білкових глобул.

Рибосома — частинка рослинної клітини, яка складається з білка і РНК (місце синтезу білка).

Симпласт — сукупність протопластів клітин рослинної тканини або органа.

Строма — основна речовина пластид.

Судини — трубчасті елементи ксилеми, що мають провідну функцію.

Тонопласт — цитоплазматична мембрана, що оточує вакуолю клітини.

Транспірація — процес випаровування води рослиною (продихова, кутикулярна).

Трахеїди — продовгувата товстостінна опорна і провідна клітина ксилеми з порами в оболонці.

Флоема — провідна тканина судинних рослинних організмів, по якій транспортуються органічні речовини. Складається з волокон, склереїд, різних паренхімних клітин та ситоподібних елементів.

Фотоліз води — розщеплення молекули води на кисень і водень (залежне від світла). Відбувається в ході світлових реакцій фотосинтезу в фотосистемі II.

Циторіз — явище, при якому плазмалема не відокремлюється від оболонки, в результаті чого клітина зморщується.

Ядро — спеціалізована частина еукаріотичної клітини, що містить хромосоми та відмежована подвійною мембраною. Має колоїдну структуру, передає генетичну інформацію від клітини до клітини.