

УДК 581.19  
ББК 28.57  
Р59

*Рецензенты:* Верхотуров В. В. — д. б. н., профессор Иркутской ГСХА;  
Попов А. А. — к. х. н., доцент Якутской ГСХА

**Рогожин В. В.**  
Р59 Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции : учеб. пособие для вузов / В. В. Рогожин, Т. В. Рогожина. — СПб. : ГИОРД, 2016. — 480 с.

ISBN 978-5-98879-172-0

Основные цели практикума — ознакомление студентов с практическими методами биохимических исследований растительных и животных тканей, закрепление теоретических знаний в области биохимии сельскохозяйственной продукции, развитие экспериментальных навыков и привитие научного мировоззрения. В книге рассматриваются биохимические методы, используемые при подготовке образцов растительных и животных тканей к исследованию, а также способы определения и расчета содержания биологически активных веществ в исследуемых образцах сельскохозяйственной продукции.

Учебное пособие предназначено для студентов сельскохозяйственных вузов, обучающихся по специальности 110900 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», по направлению подготовки бакалавров, а также может быть использовано студентами биологических, технических и пищевых вузов и научными работниками.

УДК 581.19  
ББК 28.57

ISBN 978-5-98879-172-0

© ООО «Издательство „ГИОРД“», 2016

# Оглавление

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>ГЛАВА 1. ПРАВИЛА И МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....   | <b>16</b> |
| 1.1. Правила техники безопасности при проведении исследований в биохимической лаборатории .....                           | 17        |
| 1.2. Физико-химические методы анализа .....   | 20        |
| 1.3. Подготовка сельскохозяйственной продукции для биохимических исследований .....                                       | 28        |
| 1.4. Приготовление тканей к исследованию .....  | 35        |
| 1.5. Методы разделения биогенных молекул .....  | 42        |
| 1.6. Методы выделения субклеточных фракций .....  | 50        |
| 1.7. Методы концентрирования .....  | 57        |
| 1.8. Методы приготовления, определения и расчета концентрации вещества в растворе .....                                   | 61        |
| 1.9. Методы расчета экспериментальных данных .....  | 68        |
| 1.10. Порядок записи лабораторной работы .....  | 71        |
| Контрольные вопросы и задания .....   | 72        |
| <b>ГЛАВА 2. УГЛЕВОДЫ</b> .....  | <b>73</b> |
| 2.1. Определение глюкозы в биологических жидкостях о-толуидиновым методом .....   | 76        |
| 2.2. Определение глюкозы с помощью антрона .....  | 78        |
| 2.3. Определение содержания сиаловых кислот по реакции с резорцином. ..   | 80        |
| 2.4. Определение сиаловых кислот в биологических жидкостях по методу Гесса .....  | 82        |
| 2.5. Определение целлюлозы (по Кюршнеру и Ганеку). .....  | 83        |
| 2.6. Определение крахмала в тканях растений .....   | 85        |
| 2.7. Выделение и очистка сахарозы из сахарной свеклы .....  | 87        |
| 2.8. Выделение крахмала из зерновок злаковых культур .....  | 89        |
| 2.9. Выделение крахмала из клубней картофеля .....  | 90        |
| 2.10. Выделение гликогена из животных тканей .....  | 91        |
| 2.11. Гидролиз гликогена .....  | 92        |
| 2.12. Ферментативный гидролиз целлюлозы .....   | 93        |
| Контрольные вопросы и задания .....   | 95        |
| <b>ГЛАВА 3. ЛИПИДЫ И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ</b> .....   | <b>96</b> |
| 3.1. Растворимость липидов .....  | 99        |
| 3.2. Количественные показатели растворения липидов растительного масла в хлороформе и этанольно-хлороформных смесях ..... | 100       |
| 3.3. Экстракция липидов из субклеточных частиц .....  | 102       |

|   |            |
|---|------------|
| 3.4. Определение содержания общих липидов<br>в растительных тканях .....                              | 102        |
| 3.5. Определение холестерина (метод Ильяка) .....   | 104        |
| 3.6. Выделение общих липидов из мышечной ткани. ....  | 105        |
| 3.7. Фракционирование липидов методом тонкослойной хроматографии ...                                  | 106        |
| 3.8. Исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ) .....   | 108        |
| 3.9. Определение общей антиокислительной активности (АОА) .....                                       | 109        |
| 3.10. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов .....                                     | 111        |
| 3.11. Определение общего содержания антиоксидантов. ....  | 113        |
| 3.12. Определение содержания антиоксидантов в гомогенатах тканей<br>по Глевинду .....                 | 115        |
| Контрольные вопросы и задания .....   | 117        |
| <b>ГЛАВА 4. АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ .....</b>  | <b>118</b> |
| 4.1. Определение аминокислот с помощью нингидрина .....   | 121        |
| 4.2. Определение содержания глутаминовой кислоты .....  | 123        |
| 4.3. Определение содержания белка спектрофотометрическим методом ...                                  | 125        |
| 4.4. Определение общего белка по биуретовой реакции. ....   | 127        |
| 4.5. Метод определения белка по Лоури .....   | 129        |
| 4.6. Метод определения белка по Брэдфорду .....   | 132        |
| 4.7. Определение содержания гемоглобина крови<br>гемоглобинцианидным методом .....                    | 133        |
| 4.8. Определение концентрации гемоглобина (по Д. Драбкину) .....                                      | 135        |
| 4.9. Определение церулоплазмينا (феррооксидазы) в плазме крови .....                                  | 136        |
| 4.10. Метод выделения пептидов из тимуса теленка .....  | 138        |
| 4.11. Выделение и очистка гемоглобина .....   | 141        |
| 4.12. Выделение фибриногена из плазмы крови. ....   | 142        |
| 4.13. Выделение яичного альбумина. ....   | 142        |
| 4.14. Получение кристаллического яичного альбумина .....  | 143        |
| 4.15. Использование метода гель-хроматографии<br>для определения молекулярной массы гемоглобина ..... | 144        |
| 4.16. Изучение кислотной денатурации белков .....   | 146        |
| 4.17. Изучение температурной денатурации белков .....   | 147        |
| 4.18. Кислотный гидролиз белков. ....   | 148        |
| 4.19. Щелочной гидролиз белков .....  | 150        |
| 4.20. Исследование взаимодействий нативной<br>и денатурированных форм альбумина с кальцием .....      | 151        |
| Контрольные вопросы и задания .....   | 154        |
| <b>ГЛАВА 5. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ .....</b>   | <b>155</b> |
| 5.1. Выделение и качественные реакции<br>на дезоксирибонуклеопротеин селезенки .....                  | 158        |
| 5.2. Выделение ДНК из животных тканей .....   | 159        |
| 5.3. Метод определения содержания ДНК с помощью дифениламина ....                                     | 160        |
| 5.4. Метод выделения ДНК растительных тканей .....  | 161        |
| 5.5. Выделение РНК и ДНК фенольным методом. ....  | 162        |
| 5.6. Выделение РНК из печени (по Шерреру) .....   | 164        |
| 5.7. Определение содержания РНК с орцином (по Мейбаум) .....  | 165        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.8. Выделение РНК из рибосом гепатоцитов печени . . . . .  | 166        |
| 5.9. Гидролиз ДНК . . . . .   | 167        |
| 5.10. Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот<br>(по А. С. Спирину) . . . . .                  | 168        |
| 5.11. Определение содержания пуриновых оснований . . . . .  | 169        |
| Контрольные вопросы и задания . . . . .   | 170        |
| <b>ГЛАВА 6. ЭЛЕМЕНТЫ . . . . .</b>  | <b>171</b> |
| 6.1. Определение общего азота в растительных тканях (по А. Т. Усовичу) . . . . .                            | 174        |
| 6.2. Определение фосфора ванадо-молибдатным методом . . . . .   | 176        |
| 6.3. Определение неорганического фосфора методом Фiske-Суббароу . . . . .                                   | 178        |
| 6.4. Определение марганца в растительных тканях<br>формальдоксимным методом . . . . .                       | 180        |
| 6.5. Определение калия и натрия на пламенном фотометре . . . . .  | 181        |
| 6.6. Определение железа роданидным методом . . . . .  | 182        |
| 6.7. Определение железа с помощью 4,7-дифенил-1,10-<br>фенатролин-3,6-дисульфоновой кислоты . . . . .       | 184        |
| 6.8. Определение меди в гомогенатах тканей . . . . .  | 185        |
| 6.9. Определение меди в тканях методом Шмидта<br>в модификации А. Г. Рахманкулова и И. А. Коптевой. . . . . | 187        |
| 6.10. Определение кальция в сыворотке крови с помощью<br>глиоксаль-бис-2-оксанила . . . . .                 | 188        |
| 6.11. Определение магния в сыворотке крови с помощью<br>титанового желтого. . . . .                         | 190        |
| 6.12. Определение ионов хлора в сыворотке крови<br>меркуриметрическим методом . . . . .                     | 191        |
| Контрольные вопросы и задания . . . . .   | 193        |
| <b>ГЛАВА 7. ВИТАМИНЫ, КОФЕРМЕНТЫ И ПИГМЕНТЫ . . . . .</b>   | <b>194</b> |
| 7.1. Определение содержания аскорбиновой кислоты . . . . .  | 197        |
| 7.2. Выделение и очистка дигидрокверцетина (витамина<br>группы Р) из лиственницы . . . . .                  | 199        |
| 7.3. Изучение физических свойств дигидрокверцетина . . . . .  | 201        |
| 7.4. Энзиматический метод получения кверцетина . . . . .  | 204        |
| 7.5. Выделение убихинона (коэнзима Q) из митохондрий . . . . .  | 206        |
| 7.6. Определение содержания убихинона . . . . .   | 208        |
| 7.7. Определение содержания НАДФ <sup>+</sup> . . . . .   | 209        |
| 7.8. Определение содержания НАД <sup>+</sup> . . . . .  | 210        |
| 7.9. Получение вытяжки пигментов из побегов пшеницы . . . . .   | 212        |
| 7.10. Разделение пигментов по Краусу . . . . .  | 213        |
| 7.11. Количественное определение хлорофиллов и каротиноидов. . . . .  | 214        |
| 7.12. Омыление хлорофиллов щелочью . . . . .  | 215        |
| 7.13. Получение хлорофилла . . . . .  | 216        |
| 7.14. Разделение пигментов методом бумажной хроматографии . . . . .   | 217        |
| 7.15. Получение гемина с помощью органического растворителя . . . . .                                       | 220        |
| 7.16. Получение гемина с помощью пепсина . . . . .  | 221        |
| 7.17. Определение концентрации гемина . . . . .   | 222        |
| Контрольные вопросы и задания . . . . .   | 223        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>ГЛАВА 8. ФЕРМЕНТЫ</b>  | <b>225</b> |
| 8.1. Физико-химические методы исследования ферментов  | 229        |
| 8.2. Методы очистки ферментов   | 254        |
| Контрольные вопросы и задания   | 269        |
| <b>ГЛАВА 9. МОЛЕКУЛЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ</b>   | <b>271</b> |
| 9.1. Определение АТФ и глюкозо-6-фосфата  | 274        |
| 9.2. Определение АТФ с помощью люциферазы<br>(по Угаровой и Бровко)   | 276        |
| 9.3. Определение глутатиона в растительных тканях   | 278        |
| 9.4. Определение содержания глутатиона методом<br>титрования с помощью <i>n</i> -хлормеркурибензоата                    | 279        |
| 9.5. Определение содержания в биогенных тканях<br>креатинфосфата по фосфору   | 281        |
| Контрольные вопросы и задания   | 282        |
| <b>ГЛАВА 10. МЕТАБОЛИТЫ</b>   | <b>283</b> |
| 10.1. Определение нитритов в растительных тканях  | 286        |
| 10.2. Определение нитратов в растительных тканях  | 288        |
| 10.3. Определение содержания мочевины по реакции<br>с диацетилмонооксимом   | 290        |
| 10.4. Определение мочевой кислоты по методу Мюллера-Зейферта  | 291        |
| 10.5. Определение содержания креатинина по цветной реакции Яффе   | 292        |
| 10.6. Определение содержания креатина   | 295        |
| 10.7. Определение содержания пировиноградной кислоты<br>с помощью лактатдегидрогеназы                                   | 295        |
| 10.8. Определение содержания пировиноградной кислоты<br>в животных тканях   | 297        |
| 10.9. Определение пировиноградной кислоты в растительных тканях   | 299        |
| 10.10. Определение содержания молочной кислоты с помощью<br><i>n</i> -оксидифенила                                      | 301        |
| 10.11. Определение содержания молочной кислоты в биогенных<br>тканях энзиматическим методом                             | 303        |
| 10.12. Определение фосфотриоз   | 305        |
| 10.13. Определение этанола в биологическом материале  | 307        |
| Контрольные вопросы и задания   | 309        |
| <b>ГЛАВА 11. МЕТАБОЛИЗМ</b>   | <b>310</b> |
| 11.1. Определение активности пероксидазы в супернатанте<br>зерновок пшеницы   | 314        |
| 11.2. Определение активности пероксидазы по ферроцианиду калия  | 316        |
| 11.3. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции<br>окисления этанола по НАДН                               | 318        |
| 11.4. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции<br>окисления этанола по йоднитротетразолиевому фиолетовому | 319        |
| 11.5. Определение активности алкогольдегидрогеназы<br>в реакции восстановления ацетальдегида                            | 322        |
| 11.6. Определение активности альдегиддегидрогеназы  | 323        |
| 11.7. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы<br>по НАДФН  | 324        |

|  |            |
|--|------------|
| 11.8. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по йоднитротетразолиевому фиолетовому . . . . .   | 326        |
| 11.9. Определение активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы . . . . .  | 327        |
| 11.10. Определение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы . . . . .                                       | 329        |
| 11.11. Определение активности триозофосфатизомеразы . . . . .  | 331        |
| 11.12. Определение активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы . . . . .                                 | 332        |
| 11.13. Определение активности лактатдегидрогеназы . . . . .  | 334        |
| 11.14. Определение активности ферментов пируватдегидрогеназного комплекса . . . . .                          | 336        |
| 11.15. Определение активности ферментов ПДК с помощью йоднитротетразолиевого фиолетового . . . . .           | 338        |
| 11.16. Определение активности ферментов кетоглутаратдегидрогеназного комплекса . . . . .                     | 339        |
| 11.17. Определение активности глутаматдегидрогеназы . . . . .  | 341        |
| 11.18. Определение активности цитохромоксидазы . . . . .   | 343        |
| 11.19. Определение активности сукцинатдегидрогеназы . . . . .  | 345        |
| 11.20. Определение активности НАД <sup>+</sup> -зависимой малатдегидрогеназы . . . . .                       | 346        |
| 11.21. Определение активности НАДФ <sup>+</sup> -зависимой малатдегидрогеназы . . . . .                      | 348        |
| 11.22. Определение активности нитратредуктазы . . . . .  | 350        |
| 11.23. Определение активности аскорбатоксидазы . . . . .   | 352        |
| 11.24. Определение активности полифенолоксидазы . . . . .  | 353        |
| 11.25. Определение активности НАДФ <sup>+</sup> -зависимой изоцитратдегидрогеназы . . . . .                  | 354        |
| 11.26. Определение активности каталазы . . . . .   | 356        |
| 11.27. Определение активности аминотрансфераз . . . . .  | 357        |
| 11.28. Определение активности гексокиназы . . . . .  | 360        |
| 11.29. Определение активности пируваткиназы с помощью лактатдегидрогеназы . . . . .                          | 361        |
| 11.30. Определение активности 3-фосфоглицераткиназы с помощью глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы . . . . . | 363        |
| 11.31. Определение активности креатинкиназы с помощью сложной энзиматической системы . . . . .               | 366        |
| 11.32. Определение активности фосфоглюкомутазы с помощью Г6ФДГ . . . . .                                     | 368        |
| 11.33. Определение активности щелочной фосфатазы . . . . .   | 370        |
| 11.34. Определение активности аргиназы печени . . . . .  | 372        |
| 11.35. Определение активности фруктозо-1,6-дифосфатальдолазы . . . . .                                       | 375        |
| 11.36. Определение активности глюкозофосфатизомеразы с помощью Г6ФДГ . . . . .                               | 377        |
| Контрольные вопросы и задания . . . . .  | 379        |
| <b>ГЛАВА 12. ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ . . . . .</b>  | <b>381</b> |
| 12.1. Определение алкалоидов . . . . .   | 384        |
| 12.2. Определение стероидных гликоалкалоидов . . . . .   | 385        |
| 12.3. Определение стероидных (сердечных) гликозидов . . . . .  | 388        |
| 12.4. Выделение и определение капсаицинов . . . . .  | 391        |

|  |            |
|--|------------|
| 12.5. Выделение и определение сапонинов .....  | 393        |
| 12.6. Определение флавоноидов .....  | 394        |
| 12.7. Определение алкилрезорцинолов .....  | 396        |
| 12.8. Определение госсипола .....  | 398        |
| 12.9. Определение дубильных веществ в семенах. ....  | 401        |
| Контрольные вопросы и задания .....  | 403        |
| <b>ГЛАВА 13. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛОКА .....</b>  | <b>404</b> |
| 13.1. Определение плотности молока и молочных продуктов .....  | 407        |
| 13.2. Определение титруемой кислотности молока<br>и молочных продуктов .....   | 409        |
| 13.3. Определение pH молока .....  | 411        |
| 13.4. Определение массовой доли влаги и сухого вещества в молоке,<br>сметане, мороженом, сырах, твороге и творожных изделиях ..... | 412        |
| 13.5. Методы осаждения белково-липидных комплексов молока .....  | 413        |
| 13.6. Выделение казеина из молока .....  | 418        |
| 13.7. Методы растворения липидов сливочного масла<br>в этиловом спирте и хлороформе. ....  | 419        |
| 13.8. Активность химозина или ферментативного сычужного комплекса. .   | 420        |
| 13.9. Качественные реакции на присутствие посторонних<br>соединений в молоке .....   | 422        |
| 13.10. Выделение лактозы из молочной сыворотки. ....   | 424        |
| 13.11. Метод определения содержания аскорбиновой кислоты в молоке . .  | 426        |
| Контрольные вопросы и задания .....  | 428        |
| <b>ГЛАВА 14 БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЫШЦ .....</b>   | <b>429</b> |
| 14.1. Выделение митохондрий скелетных мышц .....   | 430        |
| 14.2. Выделение митохондрий сердечной мышцы. ....  | 431        |
| 14.3. Выделение белков мышечной ткани .....  | 432        |
| 14.4. Выделение и очистка миоглобина мышц .....  | 433        |
| Контрольные вопросы и задания .....  | 435        |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>  | <b>436</b> |
| <i>Приложение 1. Способы расчета содержания биогенных соединений<br/>в исследуемых жидкостях и тканях .....</i>                    | <i>436</i> |
| <i>Приложение 2. Величины pH буферных растворов и их кислотные<br/>и щелочные компоненты .....</i>                                 | <i>439</i> |
| <i>Приложение 3. Значения молекулярных масс основных соединений. ....</i>  | <i>441</i> |
| <i>Приложение 4. Основные приборы, необходимые для выполнения<br/>биохимических исследований .....</i>                             | <i>448</i> |
| <b>СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....</b>  | <b>453</b> |
| <b>ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА .....</b>   | <b>477</b> |