

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 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 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 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 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 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 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 (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 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- фенатролин-3,6-дисульфоновой кислоты . . . . .	184
6.8. Определение меди в гомогенатах тканей . . . . .	185
6.9. Определение меди в тканях методом Шмидта в модификации А. Г. Рахманкулова и И. А. Коптевой. . . . .	187
6.10. Определение кальция в сыворотке крови с помощью глиоксаль-бис-2-оксанила . . . . .	188
6.11. Определение магния в сыворотке крови с помощью титанового желтого. . . . .	190
6.12. Определение ионов хлора в сыворотке крови 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 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 (по Угаровой и Бровко) .....	276
9.3. Определение глутатиона в растительных тканях .....	278
9.4. Определение содержания глутатиона методом титрования с помощью <i>n</i> -хлормеркурибензоата .....	279
9.5. Определение содержания в биогенных тканях 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 с диацетилмонооксидом .....	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 с помощью лактатдегидрогеназы .....	295
10.8. Определение содержания пировиноградной кислоты в животных тканях .....	297
10.9. Определение пировиноградной кислоты в растительных тканях .....	299
10.10. Определение содержания молочной кислоты с помощью <i>n</i> -оксидифенила .....	301
10.11. Определение содержания молочной кислоты в биогенных 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 зерновок пшеницы .....	314
11.2. Определение активности пероксидазы по ферроцианиду калия .....	316
11.3. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола по НАДН .....	318
11.4. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции окисления этанола по йоднитротетразолиевому фиолетовому .....	319
11.5. Определение активности алкогольдегидрогеназы в реакции восстановления ацетальдегида .....	322
11.6. Определение активности альдегиддегидрогеназы .....	323
11.7. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 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 и молочных продуктов .....	409
13.3. Определение pH молока .....	411
13.4. Определение массовой доли влаги и сухого вещества в молоке, 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 в этиловом спирте и хлороформе. ....	419
13.8. Активность химозина или ферментативного сычужного комплекса. .	420
13.9. Качественные реакции на присутствие посторонних 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 в исследуемых жидкостях и тканях .....</i>	<i>436</i>
<i>Приложение 2. Величины pH буферных растворов и их кислотные 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 биохимических исследований .....</i>	<i>448</i>
<b>СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....</b>	<b>453</b>
<b>ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>477</b>