

В последнее десятилетие стало известно, что некоторые углеводы (моносахариды и сахароза) могут выполнять сигнальные функции, участвуя в регуляции донорно-акцепторных связей в растении, модуляции фитохромного сигнала, синтезе запасных продуктов [7; 8; 10; 12].

Хорошо известным примером регуляторной роли углеводов является ингибирование фотосинтеза при накоплении крахмальных зерен в хлоропластах [9]. С использованием различных экспериментальных подходов было показано, что при снижении запроса органов-потребителей сахара способны репрессировать экспрессию фотосинтетических генов [11]. Показано также, что сахара могут регулировать транскрипцию ряда генов, ответственных за расщепление сахарозы, синтез запасных веществ и процессы роста [8].

Поскольку в природных условиях растение подвергается большому набору стрессовых факторов, предполагается, что сахара могут участвовать в процессе адаптации растений к стрессовым условиям [6; 8; 10].

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СВОБОДНЫХ САХАРОВ

2.1. Основные принципы метода

При определении содержания свободных сахаров в растениях используется свойство сахаров легко растворяться в воде. Предлагаемый метод основан на изменении окраски раствора глицерата меди при кипячении его с вытяжками сахаров [1]. Моносахариды (глюкоза, фруктоза, мальтоза) при нагревании в щелочной среде восстанавливают двухвалентную медь до одновалентной, которая выпадает в виде нерастворимого осадка закиси меди. В результате химической реакции исходный раствор становится светлее, что легко регистрируется спектрофотометрически. Исходную водную вытяжку, содержащую кроме сахаров другие восстанавливающие вещества (белки и проч.), очищают при помощи осадителей. В качестве осадителя могут применяться растворы фосфорновольфрамовой кислоты, уксуснокислого свинца и др. Для определения общего количества моно- и дисахаридов водные вытяжки предварительно кипятят с соляной кислотой, что приводит к гидролизу дисахаридов до моносахаридов, способных с высокой эффективностью восстанавливать двухвалентную медь до закиси меди. Таким

образом, после гидролиза можно определить суммарное количество свободных сахаров в растении и, соответственно, эндогенное содержание дисахаридов. Концентрация сахаров определяется с использованием калибровочной кривой, предварительно построенной по растворам глюкозы, затем содержание сахаров рассчитывается в процентах с учетом сырой массы навески.

2.2. Необходимые реактивы и оборудование

Для определения количества свободных сахаров необходимо:

- 1) Раствор N 1 — 0,8 %-ный раствор медного купороса (8 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды).
- 2) Раствор N 2 — 15 %-ный раствор щелочи (150 г NaOH в 1 л дистиллированной воды).

Перед анализом в раствор N 2 добавить чистый глицерин в соотношении 40:1. Обратить внимание на то, что глицерин очень вязкий и набирать его следует медленно. Рекомендуется срезать кончик одноразового пластикового наконечника, если используются автоматические пипетки.

3) Глицерат меди — готовится при смешивании растворов N 1 и N 2 (с глицерином) в соотношении 2:1 непосредственно перед опытом.

4) 1 %-ный раствор HCl .

5) Осадитель:

4 % раствор фосфорновольфрамовой кислоты, или смесь 30 %-го раствора сернокислого цинка (ZnSO_4) и 15 %-го раствора железосинеродистого калия (желтой кровяной соли $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) в пропорции 1:1, или 10 %-ный раствор уксуснокислого свинца, избыток которого удаляют фосфорнокислым натрием.

6) Дистиллированная вода

Ножницы, ступка, пестик, капроновая ткань, мерный цилиндр, пипетки, сухие пробирки (объем — не менее 15 мл) в количестве 6 умноженное на количество вариантов опыта + 2; два стеклянных стакана для приготовления растворов N 1 и N 2, два больших огнеупорных стакана, в каждый из которых должна уместиться половина пробирок; водяная баня или электрическая плитка; секундомер; спектрофотометр.

Следует помнить, что тщательно записанные условия опыта и результаты эксперимента — это залог успешного выполнения работы.

Поэтому перед началом опыта нарисуйте в рабочей тетради таблицу, пример которой указан далее (табл. 1). Рассчитайте количество глицерата меди, необходимое для опыта, исходя из того, что в каждую пробирку необходимо прилить 7,5 мл глицерата меди. Следовательно, 15 мл глицерата меди понадобится для определения количества моносахаридов и общего количества моно- и дисахаридов в одной повторности каждого варианта. Поскольку рекомендуется трехкратная повторность, то для каждого варианта опыта понадобится 45 мл глицерата меди. Таким образом, для определения необходимого количества реактива умножаем 45 на количество вариантов опыта (контроль, нагревание и обезвоживание), прибавляем 15 мл для контролей, не содержащих сахаров, и прибавляем примерно 30 мл в качестве запаса. Получившуюся цифру делим на 3, т.о. определяя количество раствора N 2, и оставшийся объем — это раствор N 1. Расчеты нужно записать в следующем порядке:

- Количество вариантов опыта — 3.
- Объем глицерата меди = $3 \times 45 + 15 + 30 = 180$ мл.
- Объем раствора N 1 — 120 мл.
- Вес $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O} = 120 : 1000 \times 8 = 0,96$ г.
- Объем раствора N 2 — 60 мл.
- Вес $\text{NaOH} = 60 : 1000 \times 150 = 9$ г.
- Объем глицерина = $60 : 40 = 1,5$ мл.

2.3. Ход работы

2.3.1. Экстракция свободных сахаров

1—10 г растительного материала мелко нарезаем и гомогенизируем с водой, нагретой до 70°C, в пропорции 1:10 (г : мл) в течение 3—5 мин, растирая в фарфоровой ступке или размельчая миксером. Полученную суспензию процеживаем через один слой капроновой ткани, осадок отбрасываем, затем измеряем объем вытяжки. Добавляем к вытяжке фиксированный объем осадителя, перемешивая и стараясь использовать минимальное его количество. Для этого осадитель приливаем малыми порциями (по 0,5 мл), в несколько приемов, с интервалом 1—2 мин, добиваясь разделения раствора на мутный осадок и прозрачную надосадочную жидкость, содержащую свободные сахара. Если разделение фаз не наблюдается в течение 5—10 мин, рекомендуется центрифугирование вытяжки при 8 000 об/мин в течение 5 мин. Отмечаем в таблице конечный объем вытяжки (V).

2.3.2. Определение количества моносахаридов

Аккуратно, не потревожив осадок, отбираем 0,5 мл прозрачной вытяжки в сухую стеклянную пробирку, добавляем 7,5 мл глицерата меди, перемешиваем и кипятим на водяной бане ровно 6 мин (время отсчитывать с момента закипания водяной бани). Затем пробирки с экстрактом охлаждаем, помещая в холодильник на 12—24 часа. После чего производим измерение оптической плотности прозрачной жидкости при длине волны 630 нм. В качестве раствора сравнения используется содержимое пробирки, в которую вместо вытяжки свободных сахаров было добавлено 0,5 мл дистиллированной воды.

2.3.3. Определение общего количества моно- и дисахаридов

Отбираем 0,25 мл прозрачной вытяжки в сухую стеклянную пробирку, добавляем 0,25 мл 1 %-го HCl , перемешиваем и ставим на 15 мин в кипящую водяную баню. Таким образом, проводится гидролиз дисахаридов до восстанавливающих моносахаридов. Затем добавляем 7,5 мл глицерата меди, снова перемешиваем и кипятим смесь на водяной бане ровно 6 мин. После чего пробирки с полученным гидролизатом охлаждаем при комнатной температуре, закрываем пробками и помещаем в холодильник на 12—24 часа для полного осаждения закиси меди, измеряем оптическую плотность прозрачной жидкости при длине волны 630 нм. В качестве раствора сравнения используем содержимое пробирки, в которую вместо вытяжки свободных сахаров было добавлено 0,25 мл дистиллированной воды. При измерении проб должны получаться отрицательные значения экстинкции, поскольку раствор в кювете сравнения должен быть самым интенсивным по окраске из-за отсутствия сахаров, способных осаждать медь.

2.3.4. Расчеты содержания свободных сахаров в пробе

Для расчета содержания моносахаридов используем формулу:

$$M = (X_i \times V \times 100) : N \times V_1, \quad (1.1)$$

где

M — количество моносахаридов, % от сырой массы навески;

X_i — содержание моносахаридов в пробе (0,5 мл), найденное из калибровочной кривой, мг;

100 — коэффициент перевода значения в проценты;

V — объем вытяжки, полученной из навески, мл;

V_1 — объем вытяжки, взятой для анализа, мл (0,5 мл);

H — сырая масса навески, мг

При расчете суммы моно- и дисахаридов (S) используем формулу 1.1, но полученное значение X умножаем на 2, т. к. объем вытяжки, взятой для анализа, был вдвое меньше (0,25 мл).

Для расчета содержания дисахаридов используем формулу

$$D = 0,95 \times (S - M), \quad (1.2)$$

где

D — количество дисахаридов, % от сырой массы навески;

S — суммарное количество моно- и дисахаридов, % в единице массы навески;

M — содержание моносахаридов, % в единице массы навески;

0,95 — коэффициент, используемый для расчета содержания дисахаридов, исходя из количества моносахаридов и суммы моно- и дисахаридов.

Полученные данные сводим в таблицу (см. табл. 1).

2.3.5. Статистическая обработка полученных данных

Для простейшей статистической обработки полученных данных нам понадобятся следующие характеристики: средняя арифметическая или среднее значение ($CPЗНАЧ$), стандартная ошибка средней арифметической (Sx) и критерии статистической достоверности среднего значения и различий между средними величинами [5].

Среднее значение является средней арифметической из повторностей эксперимента и вычисляется по формуле

$$CPЗНАЧ = x : n, \quad (1.3)$$

где

x — сумма повторностей;

n — число повторностей

Стандартная ошибка средней арифметической (Sx) вычисляется по следующей формуле:

$$Sx = \delta : \sqrt{n}, \quad (1.4)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum (x - CPЗНАЧ)^2}{n - 1}}, \quad (1.5)$$

где

δ — среднее квадратическое или стандартное отклонение;

$\sum (x - CPЗНАЧ)^2$ — сумма квадратов отклонений от средней арифметической;

n — число повторностей.

Для оценки статистической достоверности средней арифметической можно пользоваться «правилом трех сигм», определить относительный показатель точности Cs , использовать критерий t .

«Правило трех сигм» означает, что стандартная ошибка средней арифметической должна превышать среднюю арифметическую как минимум в 3 раза.

Относительный показатель точности выражается как процент отношения стандартной ошибки средней арифметической к средней арифметической

$$Cs = (Sx : CPЗНАЧ) \times 100 \quad (1.6)$$

Очень хорошими считаются результаты, если $Cs \leq 1-2\%$, хорошими — если $Cs \leq 4\%$, вполне удовлетворительными — если $Cs = 4-6\%$, удовлетворительными — если $Cs = 6-8\%$, неудовлетворительными — если $Cs > 8\%$.

Критерий t по Стьюденту-Фишеру используется для оценки статистической достоверности средней арифметической при малом объеме выборки (число степеней свободы $df < 30$) и значительной вариации экспериментальных данных.

$$t = CPЗНАЧ : Sx \quad (1.7)$$

Полученное значение t ($t_{\text{факт.}}$) должно превышать t табличное ($t_{\text{табл.}}$) (табл. 2) для принятого уровня значимости P (обычно $P = 0,05$ или $P = 0,01$) и данного числа степеней свободы df ($df = n - 1$). Уровень

значимости, например, 0,01, означает, что только в 1 случае из 100 (1 %) полученная разница случайна.

При сравнении средних арифметических необходимо установить *статистическую достоверность различий между средними арифметическими*. Достоверность различий между средними арифметическими устанавливается путем применения нулевой гипотезы, т. е. предположения, что разница между средними арифметическими случайна, и проверки ее с помощью нормированного отклонения t , которое определяется по формуле:

$$t_{\text{факт.}} = d : Sd, \quad (1.8)$$

где

$d = x_1 - x_2$ — разница между средними арифметическими двух вариантов эксперимента (например, между опытом и контролем), знак разницы не имеет значения);

Sd — средняя ошибка разницы, определяемая по разным формулам в зависимости от величины объема выборки. При большом числе повторностей ($df > 30$) Sd вычисляется по формуле:

$$Sd = \sqrt{Sx_1^2 + Sx_2^2}, \quad (1.9)$$

где

Sx_1 и Sx_2 — стандартные отклонения от средней арифметической в двух вариантах эксперимента (опыт и контроль).

При малом объеме выборки (число повторностей одного варианта $n < 16$) Sd вычисляется по более сложной формуле

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - CPЗНАЧ_1)^2 + \sum (x_2 - CPЗНАЧ_2)^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 2)} \cdot \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \right)} \quad (1.10)$$

где

$\sum (x_1 - CPЗНАЧ_1)^2$ — сумма квадратов отклонения от средней арифметической величины одного варианта (например, контроля);

$\sum (x_2 - CPЗНАЧ_2)^2$ — сумма квадратов отклонения от средней арифметической величины второго варианта (например, опыта);

n_1 — число повторностей одного варианта;

n_2 — число повторностей второго сравниваемого варианта.

При малом объеме выборки $t_{\text{факт}}$ необходимо сопоставить со значением $t_{\text{табл}}$ (см. табл. 2), исходя из принятого уровня значимости и числа степеней свободы $df = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$. Статистически достоверными считаются различия, если $t_{\text{факт}}$ превышает $t_{\text{табл}}$.

При отсутствии таблиц для установления статистической достоверности различий между средними арифметическими можно пользоваться «правилом трех сигм» (см. выше).

Таблица 1

Содержание свободных сахаров в проростках ячменя, выращенных при нормальной (контроль) и повышенной (опыт) температуре

Варианты, повторности	Сырой вес навески, Н, мг	Объем вытяжки, V, мл	Поглощение при 630 нм		Хi, мг	
			- HCl	+ HCl	- HCl	+ HCl
Контроль	1					
	2					
	3					
CPЗНАЧ Sx Cs, %						
Опыт	1					
	2					
	3					
CPЗНАЧ Sx Cs, %						
Содержание свободных сахаров, % от сырой массы навески						
	M	Cs, %	S	Cs, %	D	Cs, %
Контроль						
Опыт						

Таблица 2

Значения t при различных уровнях значимости (P)

Число степеней свободы	Уровень значимости (P)				
	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
1	6,31	12,7	31,82	63,66	—
2	2,92	4,30	6,97	9,93	31,60
3	2,35	3,18	4,54	5,84	12,94
4	2,13	2,78	3,75	4,60	8,61
5	2,02	2,57	3,37	4,03	6,86
6	1,94	2,45	3,14	3,71	5,96
7	1,90	2,37	3,00	3,50	5,41
8	1,86	2,31	2,90	3,36	5,04
9	1,83	2,26	2,82	3,25	4,78
10	1,81	2,23	2,76	3,17	4,59
11	1,80	2,20	2,72	3,11	4,44
12	1,78	2,18	2,68	3,06	4,32
13	1,77	2,16	2,65	3,01	4,22
14	1,76	2,15	2,62	2,98	4,14
15	1,75	2,13	2,60	2,95	4,07
16	1,75	2,12	2,58	2,92	4,02
17	1,74	2,11	2,57	2,90	3,97
18	1,73	2,10	2,55	2,88	3,92
19	1,73	2,09	2,54	2,86	3,88
20	1,73	2,09	2,53	2,85	3,85
21	1,72	2,08	2,52	2,83	3,82
22	1,72	2,07	2,51	2,82	3,79
23	1,71	2,07	2,50	2,81	3,77
24	1,71	2,06	2,49	2,80	3,75
25	1,71	2,06	2,49	2,79	3,73
26	1,71	2,06	2,48	2,78	3,71
27	1,70	2,05	2,47	2,77	3,69
28	1,70	2,05	2,47	2,76	3,67

2.4. Построение калибровочной кривой

Для расчета значения X_i необходимо построить калибровочную кривую, используя растворы D -глюкозы в концентрациях от 10 до 0,23 мг/мл. Для приготовления исходного раствора растворяем 20 мг глюкозы в 2 мл дистиллированной воды. Последующие разведения готовим согласно таблице 3., которые анализируем на содержание моносахаридов согласно пункту 2.3.2 с единственным отличием в объеме приливаемого глицерата меди. Поскольку при построении калибровочной кривой объем растворов сокращен вдвое (0,25 мл вместо 0,5), то количество глицерата также сокращается до 3,75 мл для соблюдения исходной пропорции 1:15. Экспериментальные данные откладываем на графике как зависимость оптической плотности растворов (ось Y) от концентрации глюкозы в исходной пробе (мг/мл, ось X). По экспери-

ментальным данным проводим прямую (т. е. осуществляем линейную аппроксимацию), оценивая величину достоверности аппроксимации (R^2). Если величина R^2 приближается к единице (0,95—0,99), то считаем аппроксимацию удовлетворительной и выводим уравнение прямой, используя возможности графических компьютерных программ, например, Excel), которое в общем виде будет выглядеть как

$$Y = A \times X_i - B.$$

Следовательно, искомая величина X_i вычисляется по формуле:

$$X_i = (Y+B) : (-A), \quad (1.11)$$

где

X_i — концентрация моносахаридов в опытной пробе (объем пробы : объем глицерата = 1:15);

Y — оптическая плотность опытной пробы (кювета сравнения заполнена раствором глицерата без сахаров, поэтому « Y » обычно со знаком минус);

A и B — численные значения из уравнения прямой.

Таблица 3

Пример построения калибровочной кривой

Номер пробирки	Взять из предыдущей пробирки, мл	Добавить дистиллированной воды, мл	Содержание глюкозы, мг/мл	Поглощение при 630 нм (проба — р-р сравнения)
Исходный раствор	2 мг глюкозы	2	10	
1	0,25	0	10	-0,61353
2	1 (из исходного раствора)	0,25	8	-0,44333
3	1	0,25	6,4	-0,37267
4	1	0,25	5,12	-0,34977
5	1	0,25	4,096	-0,29043
6	1	0,25	3,28	-0,217
7	1	0,25	2,62	-0,19243
8	1	0,25	2,1	-0,17817
9	1	0,25	1,68	-0,12233
10	1	0,25	1,34	-0,09733
11	1	0,25	1,1	-0,0829
12	1	0,25	0,86	-0,06267
13	1	0,25	0,69	-0,0578
14	1	0,25	0,55	-0,045
15	1	0,25	0,44	-0,0353
16	1	0,25	0,35	-0,0167
17	1	0,25	0,28	-0,0133
18	1	0,25*	0,23	0,0061

*Примечание: Из пробирки № 18 нужно вылить 1 мл раствора, чтобы оставшийся объем составлял 0,25 мл.

Хорошо построенную калибровочную кривую можно использовать в дальнейших опытах в виде формулы 1.11, подставляя на место Y значения оптической плотности опытной пробы и таким образом получая количественное значение X_i в миллиграммах.

Если для построения калибровочной кривой нет возможности воспользоваться компьютером, то строим кривую на миллиметровке и определяем значения X_i в месте пересечения прямой, проведенной из экспериментально полученного значения Y параллельно оси X .

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРАХМАЛА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

3.1. Принцип колориметрического метода определения крахмала

Крахмал — полимер глюкозы, состоящий из двух различающихся по структуре и свойствам полисахаридов — линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Молекулярная масса амилозы колеблется от 300 000 до 1 000 000 дальтон, а амилопектина — достигает сотен миллионов дальтон. У разных растений в крахмале содержится 10—30 % амилозы и 70—90 % амилопектина. При нагревании под действием кислот крахмал последовательно распадается до полисахаридов меньшей молекулярной массы (декстрины), затем до дисахарида мальтозы и затем до моносахарида глюкозы.

Предлагаемый метод [4] основан на гидролизе крахмала при нагревании растительной ткани в 80 %-ном растворе азотнокислого кальция и осаждении его из полученного раствора йодом. В присутствии йодистого калия и азотнокислого кальция йод полностью осаждает крахмал в виде темно-синего соединения, содержащего от 14 до 16 % йода. После центрифугирования и промывания осадок йодного крахмала растворяют в гидроокиси натрия, разбавляют дистиллированной водой до определенного объема и проводят реакцию с йодом в кислой среде. Оп-

тическую плотность полученного синего раствора измеряют при 610—660 нм, затем определяют концентрацию крахмала в колориметрируемом растворе по предварительно построенной калибровочной кривой.

3.2. Необходимые реактивы и оборудование

- 1) 80 %-ный раствор азотнокислого кальция (80 г CaNO_3 растворить в дистиллированной воде до конечного объема 100 мл);
- 2) 20 %-ный раствор азотнокислого кальция;
- 3) 0,5 %-ный раствор йода (1 часть 3 %-го раствора йода разбавить 5 частями дистиллированной воды);
- 4) 5 %-ный раствор азотнокислого кальция, содержащий 0,01 % йода (5 г CaNO_3 и 0,33 мл 3 %-го раствора йода растворить в дистиллированной воде до конечного объема 100 мл);
- 5) 0,1 Н раствор NaOH (4 г в 1 л дистиллированной воды);
- 6) 1 Н раствор HCl (82 мл в 1 л дистиллированной воды);
- 7) Дистиллированная вода.

Ножницы, ступка; пестик; мерный цилиндр; пипетки; пробирки; конические колбы на 100 мл; мерные колбы на 50 мл; воронка; электрическая плитка; секундомер; центрифуга; центрифужные пробирки.

3.3. Ход опыта

Берем мелко нарезанную навеску растительного материала, содержащую 5—50 мг крахмала (1—2 г листьев), и растираем ее в 5 мл 80 %-го азотнокислого кальция. Гомогенат переносим в коническую колбу на 100 мл, ступку и пестик промываем 10 мл 80 %-го азотнокислого кальция и выливаем в ту же колбу.

Колбу, закрытую воронкой, ставим на плитку, нагреваем до кипения и кипятим при слабом нагреве 3 мин, растворяя крахмал. Приливаем в колбу 20 мл дистиллированной воды.

Содержимое колбы переносим в центрифужные пробирки в равных объемах и центрифугируем при 2 000—3 000 об/мин в течение 2—3 мин, мутную надосадочную жидкость сливаем в мерную колбу объемом в 50 мл.

Колбу, в которой производилось кипячение, и осадок промываем горячей дистиллированной водой (5—10 мл) тщательно ресуспендируя