

UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN MOLDOVA

BIOCHIMIE

Ghid metodic la lucrările de laborator



CHIȘINĂU
2011

În ghidul metodic sunt prezentate informații cu privire la structura și rolul biologic al principalilor compuși organici în procesele vitale. Sunt prezentate metodicile de determinare și studiere a acizilor nucleici, aminoacizilor, proteinelor, enzimelor, glucidelor, vitaminelor, lipidelor, precum și întrebări de control, inclusiv teste de evaluare a cunoștințelor studenților.

Indicațiile metodice în cauză reprezintă un îndrumar pentru efectuarea lucrărilor de laborator la biochimie de către studenții de la secțiile de zi și cu frecvență redusă ale facultății de Tehnologie și Management în Industria Alimentară, la următoarele specialități: 541.1. «Tehnologia și Managementul Alimentației Publice»; 541.2. «Tehnologia Produselor Alimentare»; 541.3. «Tehnologia Vinului și a Produselor obținute prin Fermentare»; 552.2. «Biotehnologii Industriale».

Elaborare: lect. sup., dr., Dan Zgardan
conf., dr., Liudmila Palamarcu
conf., dr., Aliona Scifos
lect. asist., Larisa Necula
inginer, Iulia Sandu

Redactor responsabil: prof.univ., dr. Anatol Bălănuță

Recenzent: conf., dr. în biol., Aliona Glijin (UnASM)

Redactor: Elvira Gheorghisțeanu

Tirajul 100 ex.

© UTM, 2011

Tehnica de securitate și regulile de folosire a reactivelor chimice în laboratorul de biochimie

1. Pe parcursul efectuării experiențelor trebuie de folosit cu atenție vasele chimice, aparatele și reactivele.

2. Se interzice de lucrat cu vase chimice nespălate sau stricate.

3. Se interzice de lăsat fără supraveghere aparatele în funcțiune.

4. Toate lucrările cu substanțele toxice sau cu miros iritabil trebuie să fie efectuate în nișa de ventilare.

5. În timpul lucrărilor practice legate de substanțe inflamabile (eter, alcool, benzină, benzol, acetonă și altele) sau explozive trebuie de respectat următoarele reguli:

- substanțele date se țin cât mai departe de foc și de aparatele de încălzire;

- nu se admite păstrarea lor în vase de sticlă subțire și închise ermetic cu dop;

- nu se admite păstrarea reactivelor în cantități mari pe masa de laborator;

- se interzice de turnat reactivele date în chiuvetă;

- dacă au fost vărsate cantități mari de substanțe inflamabile trebuie imediat de închis toate robinetele de gaz, de deconectat aparatele electrice, aparatele de încălzit, de deschis toate ferestrele și de strâns soluția vărsată cu cârpa.

6. Vasele cu reactive trebuie de astupat cu dopuri de cauciuc.

7. Se interzice de lăsat soluțiile în vase fără inscripții.

8. Pentru a cântări probe de produs de natură vegetală trebuie de folosit cântarul tehnic și nu cel analitic.

9. Se interzice categoric de inspirat în pipete soluții care pot provoca arsuri chimice (acizi și baze alcaline concentrate, reactivele Fehling, amestecul formolic și altele).

10. În laborator se interzice mâncatul, băutul din vesela chimică, fumatul și consumul de alcool.

Primul ajutor în caz de arsuri și intoxicații

1. Dacă arsura provine de la un obiect incandescent sau de la foc, leziunea trebuie tratată cu o soluție de alcool etilic, apoi de uns cu glicerină sau vaselină. Arsurile grave se tratează cu soluție de permanganat de potasiu sau cu vaselină și se adresează la medic.

2. Dacă pe suprafața pielii au nimerit stropi de lichid agresiv ea trebuie spălată imediat cu apă din robinet, apoi neutralizată: acidul – cu soluție de sodă calcinată de 3% sau amoniac, iar baza alcalină – cu soluție de acid acetic de 2%.

3. Dacă în ochi au nimerit stropi de acid concentrat, spălați imediat cu apă din robinet, apoi cu soluție de sodă calcinată de 3% și adresați-vă urgent la medic. Dacă au nimerit stropi de bază alcalină se spală cu apă, apoi cu cantități mari de soluție de 0,5 % de acid boric și adresați-vă urgent la medic.

4. Dacă în organism au nimerit întâmplător reactive se recomandă: în caz de bază alcalină – de băut o cantitate mare de apă, apoi un pahar cu soluție de 2% de acid acetic sau citric; în caz de acid – un pahar cu soluție de 2% de bicarbonat de sodiu.

5. Dacă s-a produs o lezare cu sticlă trebuie în primul rând de înlăturat cioburile din rană, apoi de dezinfectat cu soluție de iod 3% și de legat cu pansament steril. Dacă sângerarea e mare, mai sus de rană se aplică un garou, apoi se adresează la medic.

6. Dacă în laborator izbucnește un incendiu, trebuie închise imediat robinetele de gaz și de lichidat focarul incendiului cu nisip sau stingător de bioxid de carbon. Dacă s-a aprins haina – stingerea se face cu o plapumă de lână.

I. Acizi nucleici

Lucrarea de laborator №1

Hidroliza nucleoproteidelor

Obiectivele lucrării de laborator

1. De efectuat hidroliza ribonucleoproteidelor (RNP) la drojdii.
2. De evidențiat componentele (RNP) cu ajutorul reacțiilor calitative.
3. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre componentele (RNP).

Complexele alcătuite din acizi nucleici și proteine se numesc *nucleoproteide*. Drojdiile de panificație pot fi folosite în scopuri didactice pentru studierea componentelor nucleoproteidelor. În urma hidrolizei acide, nucleoproteidele se descompun în următoarele componente: baze azotate purinice și pirimidinice; monoglucide (dezoxiriboză sau riboză); acid fosforic; peptide.

Acizii nucleici sunt biopolimeri macromoleculari, alcătuiți din unități structurale mai simple (*monomeri*) denumite *nucleotide*. Un nucleotid este format din trei componente: un radical fosforic, un monoglucid și o bază azotată pirimidinică sau purinică. În macromoleculele de ADN este stocată informația ereditară a organismului care se realizează în procesul de biosinteză a proteinelor. Compoziția chimică a acizilor nucleici este prezentată în fig. 1-3 și tab.1.

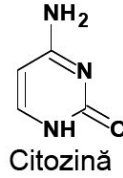
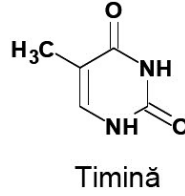
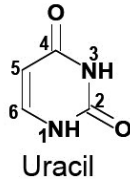


Fig. 1. Bazele azotate pirimidinice

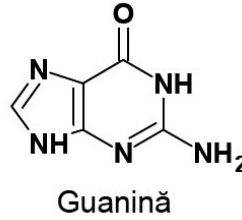
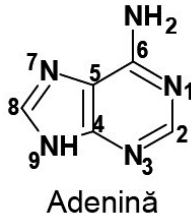


Fig. 2. Bazele azotate purinice

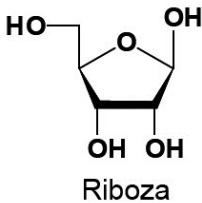


Fig. 3. Monoglucide

Bazele azotate formează împreună cu monoglucidele dezoxiriboza și riboza *nucleozide*. Bazele pirimidinice se

asociază de monoglucid cu atomul N₁, iar bazele purinice – cu atomul N₉. Monoglucidul se atașează de bazele azotate cu grupa -OH a atomului C₁ (fig. 4).

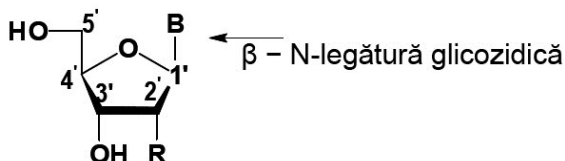


Fig. 4. Structura generală a nucleozidelor: R = OH – ribonucleozidă; R = H – dezoxiribonucleozidă;
B – bază heterociclică

Nucleozidele sunt rezistente la hidroliză în soluții bazice, însă în mediu acid, nucleozidele sunt supuse descompunerii la nivelul legăturii β-N-glicozidice. Nucleozidele purinice se hidrolizează mai ușor decât nucleozidele pirimidinice.

Atașarea restului fosforic la nucleozide condiționează formarea nucleotidelor. Radicalul fosforic realizează legătura între carbonul din poziția 5' (C₅) a unui nucleotid cu carbonul din poziția 3' (C₃) a unui alt nucleotid (fig. 5), astfel încât se formează un lanț polinucleotidic prin legături 5'→3' sau 3'→5' (fig. 6).

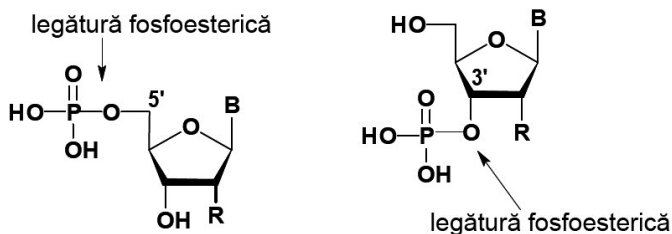


Fig. 5. Structura generală a mononucleotidelor (R = OH – ribonucleotidă; R = H – dezoxiribonucleotidă)

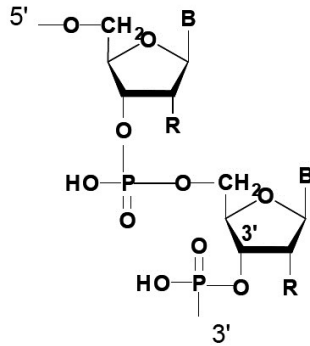


Fig. 6. Lanț polinucleotidic

În anul 1953 J. Watson și F. Crick au propus modelul de structură bicatenară a ADN-lui. Conform acestui model molecula de ADN este alcătuită din două lanțuri sau catene polinucleotidice complementare, răsucite una în jurul celeilalte, formând un helix dublu, aceasta fiind *structura secundară a ADN-lui*. Spre exterior se află scheletul glucidofosforic al moleculei de ADN, iar spre interior – bazele azotate complementare legate prin punți de hidrogen. Realizarea structurii bicatenare este consecința complementarității dintre bazele azotate purinice și bazele azotate pirimidinice (fig. 7).

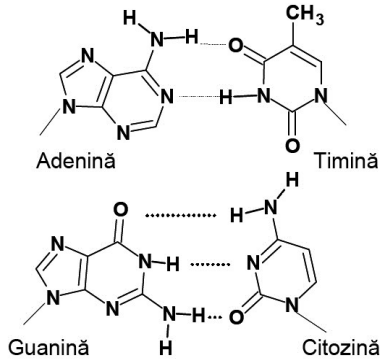


Fig. 7. Legăturile de hidrogen ale moleculei de ADN

Prin urmare, în molecula de ADN ($A = T$) și ($G = C$), iar conținutul purinic este egal cu conținutul pirimidinic ($A+G = T+C$) – regula lui *Chargaff*. Raportul însă dintre $(A+T) / (G+C)$ diferă și este specific la diferite organisme.

Tabelul 1. Asemănări și deosebiri în componența chimică a acizilor nucleici

ADN	ARN
(acid dezoxiribonucleic)	(acid ribonucleic)
Bază azotată	
Adenină	Adenină
Guanină	Guanină
Citozină	Citozină
Timină	Uracil
Monoglucidă	
Dezoxiriboză	Riboză

Transferul de informație genetică din nucleu în citoplasmă necesar pentru biosinteza proteinelor este îndeplinit de acizii ribonucleici (ARN). ARN se deosebește

structural de ADN prin faptul că în loc de monoglucidul dezoxiriboză conține riboză, iar în loc de baza azotată timină – uracil. Pe lângă aceasta, molecula de ARN este monocatenară și are o masă moleculară relativă mai mică. Celula conține 4 tipuri de ARN: ARN mesager (ARNm), ARN de transport (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) și ARN nuclear mic (ARNm), care intră în componența enzimelor ce catalizează metabolismul acizilor nucleici.

Pentru studierea componentei chimice a nucleoproteinelor se efectuează hidroliza acidă a drojdiilor de panificație. Cu ajutorul reacțiilor calitative se identifică produse ale hidrolizei – proteine, baze azotate, acidul fosforic, precum și monoglicidele riboza sau dezoxiriboză.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) NaOH (soluție de 10%).
- 2) CuSO₄ (soluție de 1%).
- 3) Amoniac (soluție concentrată).
- 4) AgNO₃ (soluție de 2%).
- 5) Reactiv difenilamină (soluție de 1%). 1 gr difenilamină se dizolvă în 50 ml acid acetic, se adaugă 2,75 ml H₂SO₄ concentrat, apoi se toarnă acid acetic până la 100 ml.
- 6) Reactiv de molibden (7,5 gr molibdat de amoniu se dizolvă în 50 ml HNO₃ concentrat).
- 7) Apă distilată.
- 8) Hârtie de turnesol.
- 9) Balon cu un tub de sticlă de 20-30 cm.
- 10) Pâlnie cu filtru.
- 11) Cilindru gradat.
- 12) Baie de apă.
- 13) Hidrolizat de drojdii.

Experimentul 1. Obținerea hidrolizatului de drojdii

2,5 gr drojdii se pun într-un balon unit cu un tub de sticlă de 20-30 cm, se adaugă 20 ml soluție 10% H_2SO_4 . Hidroliza drojdiilor se realizează la încălzire timp de o oră din momentul fierberii lichidului. După răcire, hidrolizatul se filtrează și se folosește pentru efectuarea reacțiilor calitative.

În fiolă se pun 1 gr de drojdii proaspete de panificație și se dozează 8 ml soluție 10 % H_2SO_4 . Fiola se închide cu un dop de cauciuc, în care este introdus un tub de sticlă de 20-30 cm și se pune pe baie de apă timp de 35 min. După răcire, hidrolizatul se filtrează și se folosește pentru efectuarea reacțiilor calitative.

Experimentul 2. Reacția biuretică a proteinelor

La 5 picături de hidrolizat se adaugă 10 picături de soluție 10% NaOH până la o reacție bazică, apoi se adaugă 2 picături de soluție $CuSO_4$ de 1%, soluția se colorează în albastru-violet.

Experimentul 3. Proba de argint la prezența bazelor

La 10 picături de hidrolizat se adaugă o soluție concentrată de amoniac până la o reacție bazică, apoi se adaugă 10 picături soluție 2% $AgNO_3$. În scurt timp se formează un precipitat de săruri ale bazelor purinice de culoare maro-deschisă.

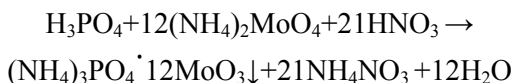
Experimentul 4. Reacția Trommer la prezența componentului glucidic

Difenilamina cu dezoxiriboza produce o culoare albastră, iar cu riboza – culoare verde. La 5 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături difenilamină, soluția se fierbe pe baia de apă timp de 15 minute, se colorează în verde-albastru.

La 0,5 ml de hidrolizat de drojdii se adaugă 1 ml soluție NaOH (30%) și 3 picături soluție de CuSO₄ (7%). Fiola se încălzește până la fierbere. Riboza se oxidează, iar în urma reducerii Cu²⁺ până la Cu⁺ se formează un precipitat Cu(OH)₂ de culoare galbenă sau un precipitat Cu₂O de culoare roșie.

Experimentul 5. Proba de molibden la prezența acidului fosforic

Acidul fosforic formează cu reactivul de molibden (soluție de molibdat de amoniu în acid azotic) un precipitat cristalic galben de amoniu fosforomolibdenic:



La 10 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături reactiv molibdenic, apoi soluția se fierbe câteva minute la baia de aburi. În prezența acidului fosforic soluția se colorează în galben-deschis. La răcire în soluție se formează un precipitat cristalic de culoare galbenă-deschisă.

Perfectarea lucrării. Rezultatele lucrării sunt prezentate în formă de tabel:

№	Etapa lucrării	Condițiile reacțiilor (reactive, t°C, timpul, schema reacției)	Efectele observate	Concluzii
1				

Teste de control

1. Care din următorii compuși intră în componența ADN-lui:
 - a) citozină, guanină, riboză, uracil;
 - b) dezoxiriboză, timină, guanină, uracil;
 - c) adenină, dezoxiriboză, guanină, timină;
 - d) guanină, citozină, riboză, adenină;
 - e) uracil, riboză, timină, adenină?
2. Care din următorii compuși intră în componența ARN-lui:
 - a) riboză, timină, uracil, adenină;
 - b) uracil, adenină, dezoxiriboză, riboză;
 - c) uracil, adenină, timină, riboză;
 - d) dezoxiriboză, timină, riboză, adenină;
 - e) adenină, uracil, timină, riboză?
3. Care din următorii compuși intră în reacție cu reactivul difenilamină:
 - a) timină, riboză, uracil, adenină;
 - b) guanină, dezoxiriboză, uracil, timină;
 - c) adenină, guanină, uracil, riboză?
4. Care din următorii compuși intră în reacție cu soluția bazică de nitrat de argint:
 - a) timină, uracil, adenină, dezoxiriboză;
 - b) guanină, riboză, dezoxiriboză, timină;
 - c) riboză, citozină, guanină, uracil?
5. Două catene polinucleotidice ale moleculei de ADN sunt unite între ele prin legături:
 - a) peptidice; b) glicozidice;
 - c) fosfodiesterice; d) de hidrogen.
6. Un segment bicatenar al moleculei de ADN conține 2400 de nucleotide, dintre care 300 cu adenină. Câte nucleotide cu citozină conține acest segment?
 - a) 300; b) 750; c) 900; d) 1800.
7. Selectați termenul care nu se încadrează în grupul tematic respectiv și explicați de ce l-ați separat:

a) adenină; b) guanină; c) citozină; d) uracil.

8. Un segment bicatenar de ADN conține 720 de nucleotide cu adenină și timidină (48% din numărul total de nucleotide). Determinați numărul total de nucleotide cu guanină în segmentul respectiv.

a) 195; b) 390; c) 720; d) 360.

9. Masa moleculară medie a unei nucleotide este de 300. Determinați masa moleculară a genei care codifică un lanț polipeptidic alcătuit din 470 de aminoacizi.

II. Aminoacizi și proteine

Lucrarea de laborator №2

Determinarea conținutului de amoniac după metoda Conway-Bairn

Obiectivele lucrării de laborator

1. De însușit metodica de determinare cantitativă a azotului amoniacal în vin.
2. De studiat metabolismul amoniacului în plante.
3. De caracterizat succint substanțele azotoase care se conțin în plante.

Azotul joacă un rol important în viața plantelor. Azotul intră în componența proteinelor, acizilor nucleici, clorofilei, enzimelor, majorității vitaminelor și a altor compuși organici. Plantele și microorganismele folosesc azot neorganic pentru biosinteza substanțelor azotoase, iar animalele și omul – doar azot organic.

Plantele, ciupercile, animalele și omul nu pot asimila azot atmosferic. Capacitatea de a fixa azot atmosferic o au unele microorganisme procariote: bacterii anaerobe din genul *Clostridium*, bacterii aerobe din genul *Azotobacter*, cianobacterii (alge albastre-verzi) și bacteriile azotfixatoare

simbiotice din genurile *Rhizobium* și *Bacillus*, care trăiesc pe nodozitățile rădăcinilor plantelor din familia *Fabaceae*. Transformarea azotului atmosferic în azot amoniacal folosit ulterior pentru sinteza substanțelor azotoase reprezintă un proces de reducere fermentativă.

Sărurile acidului azotic (nitrați, nitriți) și amoniacului reprezintă sursa principală de azot a plantelor. În condiții naturale nutriția plantelor cu azot se realizează cu anionii NO_3^- și cationii NH_4^+ .

Azotul amoniacal din sol provine sau din îngrășămintele organice, sau din resturile de substanțe organice în curs de descompunere, proces la care participă bacteriile de putrefacție din genurile *Bacillus* și *Clostridium*. Acest proces se numește *amonificare*.

Nitrații sunt introduși în sol cu îngrășămintele organice, minerale sau se formează la oxidarea amoniacului și a nitriților de bacteriile nitrificatoare *Nitrosomonas* și *Nitrobacter*. Acest proces se numește *nitrificare*. Bacteriile *Nitrosomonas* oxidează amoniacul: $\text{NH}_3 + 1/2 \text{O}_2 = (\text{NO}_2^-) + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$; iar bacteriile *Nitrobacter* oxidează nitriții: $(\text{NO}_2^-) + 1/2 \text{O}_2 = \text{NO}_3^-$. Formele minerale de azot pătrund în plante și sunt supuse unui ciclu complex de transformare și în cele din urmă se includ în componența substanțelor organice azotoase – aminoacizi, amide, proteine. Veriga principală în metabolismul substanțelor organice azotoase este amoniacul. Din amoniac se sintetizează substanțe azotoase, care la rândul său se descompun până la amoniac.

Azotul din nitrați nu poate fi folosit nemijlocit de plante pentru sinteza aminoacizilor. Nitrații sunt supuși unui proces de reducere fermentativă până la amoniac: $\text{HNO}_3 \rightarrow \text{HNO}_2 \rightarrow (\text{HNO})_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{HN}_3$.

Reducerea nitraților în plante se realizează în funcție de utilizarea amoniacului format la sinteza substanțelor organice azotoase.

În plante amoniacul se formează, de asemenea, în urma descompunerii aminoacizilor: în cadrul proceselor de dezaminare, decarboxilare, transaminare.

Amoniacul în stare liberă nu se acumulează în plante deoarece este toxic. Plantele bogate în acizi organici liberi, numite plante acide (măcriș, revent, begonia etc.) au capacitatea de a fixa amoniacul sub formă de săruri de amoniu (oxalat de amoniu, malat de amoniu, citrat de amoniu, fumarat de amoniu etc.). Cea mai importantă cale de depozitare a amoniacului este fixarea acestuia, în special, sub formă de amide ale acidului aspartic și glutamic – asparagina și glutamina. Amidele sunt derivați funcționali ai acizilor carboxilici în care grupa -OH din carboxilul acidului este înlocuită cu gruparea aminică -NH₂. Amoniacul fixat sub formă de amide (asparagină și glutamină) nu este toxic. Formarea asparaginei și glutaminei este un proces care decurge cu consum de ATP (fig. 8):

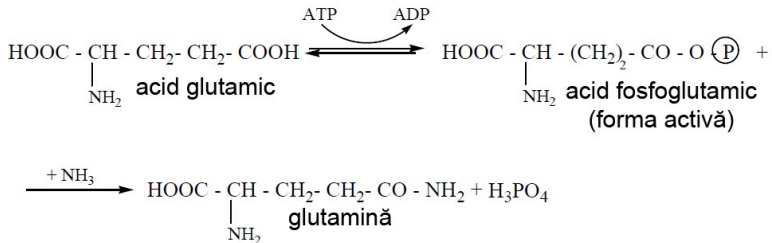


Fig. 8. Formarea glutaminei

Amoniacul fixat sub formă de amide poate fi eliberat prin hidroliză enzimatică pentru a fi utilizat în biosinteza compușilor cu azot sau în menținerea echilibrului acido-bazic din plantă (fig. 9):

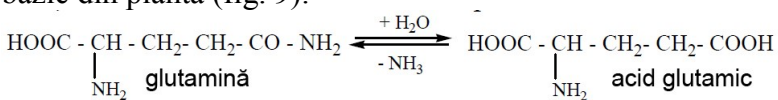


Fig. 9. Hidroliza fermentativă a glutaminei

Fixarea amoniacului molecular sub formă de uree este caracteristică pentru ciuperci, drojdii, plantele superioare, însă se întâlnește mai des în regnul animal și se numește *ciclul ureogenetic* sau *ciclul ornitinic*.

Importanța analizei. În toate plantele și materia primă vegetală se conțin în cantități mari diferite substanțe azotoase. Din această categorie de substanțe fac parte aminoacizi, amide, polipeptide, proteine, alcaloizi, unele vitamine, astfel de produse ale metabolismului azotos precum asparagina, glutamina, ureea, amoniac. Amoniacul, care se găsește sub formă de săruri de amoniu, este un produs toxic și se acumulează în plante în cantități mici. Creșterea conținutului de azot amoniacal reduce calitățile gustative ale vinurilor, sucurilor, compoturilor.

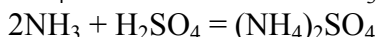
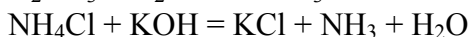
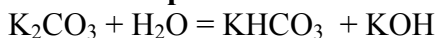
Principiul metodei. Când la soluția care conține săruri de amoniu, se adaugă bază, se elimină amoniac, care se reține cu soluție de 0,02 n H₂SO₄. Titrând cu hidroxid de sodiu excesul de acid, care n-a reacționat cu amoniacul, se poate calcula cantitatea de acid necesară pentru a neutraliza amoniacul.

Bazele puternice, odată cu descompunerea sărurilor de amoniu, parțial hidrolizează și amidole:



Amoniacul format în acest caz poate denatura rezultatele analizei. Iată de ce pentru a evita hidroliza amidelor, în loc de bază la soluția analizată se dozează soluție saturată de K₂CO₃, care în procesul de hidroliză formează un mediu bazic relativ slab.

Chimismul procesului este următorul:





Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Patru cești Conway.
- 2) Două pipete Mor de 5 cm³ și o pipetă gradată de 5 cm³.
- 3) Patru baloane conice de 100 cm³.
- 4) K₂CO₃ (soluție saturată).
- 5) H₂SO₄ (soluție 0.02 n).
- 6) NaOH (soluție 0.02 n).
- 7) Indicator mixt (metilrot-metilen albastru): 0,2 g metilrot și 0,012 g metilen albastru se dizolvă în 60 cm³ alcool și cu apă se aduce pînă la 100 cm³.

Ordinea îndeplinirii lucrării

Se dozează 5 cm³ soluție de 0,02n H₂SO₄ în camera internă (1) a ceștii Conway (fig.10). În camera externă (2) se dozează 5 cm³ soluție analizată (vin, suc etc.). Ceasca Conway se închide în proporție de 9/10 cu o placă de sticlă șlefuită. Prin gaura deschisă cu ajutorul pipetei gradate în camera externă se dozează 3 cm³ soluție saturată K₂CO₃. Ceașca se închide cu placa și se amestecă soluția analizată cu K₂CO₃. Apoi ceașca se pune în termostat și se ține timp de 1 oră la temperatura de 50-55 °C.

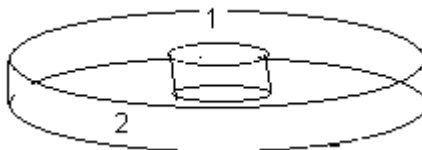


Fig. 10. Ceașca Conway

După ce se scoate din termostat, ceașca Conway se deschide și soluția din camera internă se transferă într-un

balon conic de 100 cm³ cu apă distilată (≈ 10 cm³). Soluția se titrează cu soluție 0,02n NaOH în prezența indicatorului mixt până la schimbarea culorii din violet în verde.

Experiența se repetă în 2 cești Conway. Paralel se efectuează proba de control, unde în loc de soluție analizată se folosește apă distilată.

Cantitatea de azot amoniacal (mg/dm³) în soluția analizată se calculează după formula:

$$X = \frac{(V_{\text{control}} - V_{\text{lucru}}) \times K \times 0,28 \times 1000}{V},$$

unde:

V_{control} – volumul soluției 0,02n NaOH, folosită la titrarea probei de control, cm³;

V_{lucru} – volumul soluției 0,02n NaOH, folosită la titrarea probei de lucru, cm³;

K – coeficientul de corecție a bazei;

0,28 – cantitatea de azot în mg, care corespunde unui cm³ de soluție 0,02n NaOH;

V – volumul probei analizate, cm³.

Întrebări de control

- 1) Numiți substanțele azotoase care intră în componența organismelor vii.
- 2) Care forme de azot sunt utilizate de microorganisme, plante și animale?
- 3) Descrieți transformările azotului nitric în plante.
- 4) Cum se numește procesul de oxidare a amoniacului până la nitrați?
- 5) Explicați deosebirea dintre procesele de nitrificare și amonificare.
- 6) Cum se fixează excesul de amoniac în plante?
- 7) Scrieți reacțiile de sinteză și descompunere a amidelor în plante.

- 8) Descrieți principiul metodei de determinare cantitativă a amoniacului.
- 9) Cum se calculează cantitatea de azot amoniacal în soluția analizată?
- 10) Care reguli ale tehnicii de securitate trebuie de respectat la efectuarea lucrării respective de laborator?

Lucrarea de laborator №3

Determinarea potențiometrică a derivaților formolici ai α -aminoacizilor

Obiectivele lucrării de laborator

1. De însușit metodica de determinare a conținutului de azot aminic în vin.
2. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre structura și funcțiile aminoacizilor.
3. De studiat proprietățile chimice ale aminoacizilor.

Aminoacizii sunt compuși organici care conțin în molecula lor cel puțin o grupare aminică $-NH_2$ și o grupare carboxilică $-COOH$. În funcție de poziția grupării aminice în scheletul carbonic față de gruparea carboxilică se deosebesc α -, β -, γ - aminoacizi. La α -aminoacizi gruparea aminică și carboxilică sunt legate de același atom de carbon, la β -aminoacizi gruparea aminică este separată de gruparea carboxilică printr-un atom de carbon, la γ -aminoacizi gruparea aminică este separată de gruparea carboxilică prin doi atomi de carbon. În prezent sunt cunoscuți cca. 220 de aminoacizi, însă doar 20 de α -aminoacizi sunt proteinojeni, intră în componența proteinelor (anexa 1). Formula generală a α -aminoacizilor este următoarea (fig. 11):

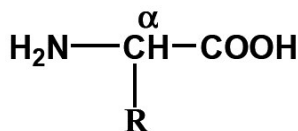


Fig. 11. Formula generală a α -aminoacizilor

Pe lângă aminoacizi standard, în componența unor proteine intră și aminoacizi specifici nestandard – *selenocisteina* (Sec) și *pirolizina* (Pyl).

Prezența concomitentă în moleculele de α -aminoacizi a grupării aminice și carboxilice conferă aminoacizilor capacitatea de a intra în reacții de policondensare și formare a legăturilor peptidice dintre aminoacizi. În rezultatul unei astfel de reacții se formează biopolimeri – proteine. Numărul și succesiunea aminoacizilor în lanțurile polipeptidice sunt strict specifice și determină proprietățile fizico-chimice ale proteinelor.

Proprietățile chimice ale aminoacizilor. α -Aminoacizii având proprietăți amfotere (fig. 12), pot să reacționeze ca amine (fig. 13-15) și ca acizi carbonici (fig. 16-17).

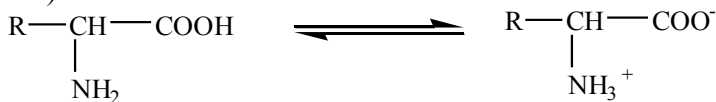


Fig. 12. Proprietățile amfotere ale α -aminoacizilor

Datorită grupării aminice α -aminoacizii intră în reacție cu acizii minerali, cu acidul azotos (fig. 13), HCl (fig. 14), cu aldehydele și glucidele reducătoare.

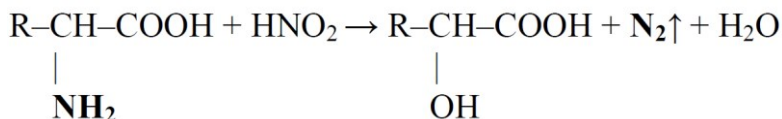


Fig. 13. Reacția α -aminoacidului cu HNO_2

În rezultatul interacțiunii cu HNO_2 se elimină azot și se formează hidroxiacid. Această reacție stă la baza determinării cantitative a aminoacizilor după metoda Van Slyke (se i-a în considerare cantitatea de azot eliminat).

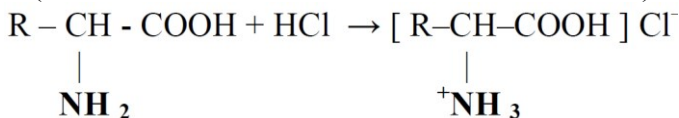


Fig. 14. Reacția α -aminoacidului cu HCl

În rezultatul interacțiunii aminoacizilor cu aldehide (fig. 15) se formează baze Schiff, din care se pot forma *melanoidine*.

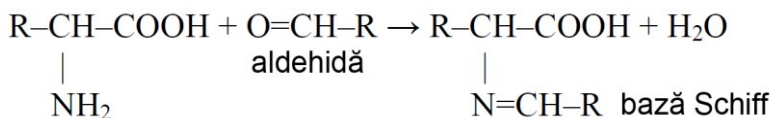


Fig. 15. Reacția α -aminoacidului cu aldehydă

Grupa carboxilică a aminoacizilor reacționează cu baze (fig. 16) și alcooli (fig. 17), formând respectiv săruri și esteri.

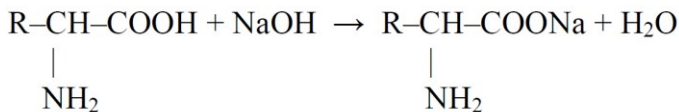


Fig. 16. Reacția α -aminoacidului cu bază

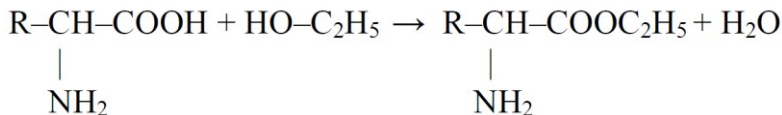


Fig. 17. Reacția α -aminoacidului cu alcool

Importanța analizei. În materia primă de origine vegetală și animală, în produsele alimentare se conține o cantitate de aminoacizi în stare liberă. În must, sucuri, vinuri conținutul de aminoacizi liberi poate să depășească mai mult de jumătate din conținutul total de substanțe azotoase. În procesul de prelucrare a materiei prime, din aminoacizi se formează un șir de compuși care determină gustul, culoarea și mirosul produselor finite.

Principiul metodei. α -Aminoacizii reacționează ușor cu formaldehidă formând derivați formolici (fig. 20):

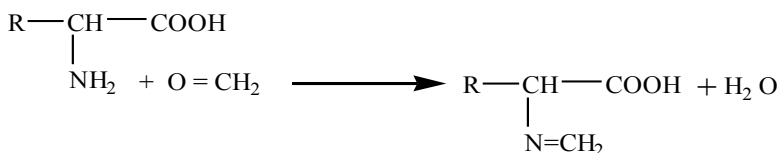


Fig. 20. Reacția α -aminoacidului cu formaldehida

Aminogrupurile își pierd proprietățile bazice, iar grupele carboxilice libere se titrează cu bază (NaOH), formând săruri (fig. 21):

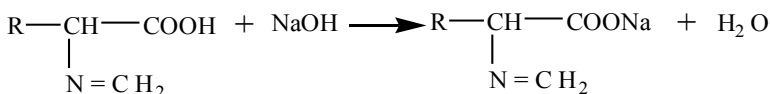


Fig. 21. Titarea grupei carboxil a α -aminoacidului

Se consideră convențional, că numărul grupelor carboxilice titrate, la acizii monocarboxilici, sunt echivalente cu numărul grupelor aminice legate de formaldehidă.

Pentru a introduce corecția la aminoacizii dicarboxilici (acidul glutamic, aspartic etc.), soluția se neutralizează în prealabil cu bază până la pH = 6,8.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Potențiomtru.
- 2) Agitator magnetic.
- 3) Pahar de 100 cm³.
- 4) Biuretă de 25 cm³.
- 5) Cilindru de 25 cm³.
- 6) Pipetă Mor de 10 cm³.
- 7) NaOH (soluție 0,1n).
- 8) Amestec formolic (20 cm³ formalină 40% + 1 cm³ fenolftaleină, se titrează cu soluție 0,2 n NaOH până la pH = 6,8).
- 9) Probe de materie primă (vin sau suc).

Ordinea îndeplinirii lucrării

Pentru titrare se folosește potențiomtrul cu doi electrozi de sticlă și calomel. Înainte de a începe lucrarea pH-metrul se încălzește timp de 30 minute. Electrozii se spală bine cu apă distilată și se usucă cu hârtie de filtru.

Biureta se umple cu soluție 0,1n NaOH. În pahar se dozează 10 cm³ soluție de vin sau suc și se adaugă apă distilată 10 cm³. Se introduc electrozii și se titrează până la pH 6,8. Titrarea se efectuează în felul următor:

- Se determină pH-ul soluției analizate.
- Se cuplează agitatorul magnetic.
- Proba analizată se titrează cu soluție 0,1n NaOH cu viteza de 5-7 picături pe secundă concomitent urmărind indicația de pe ecranul pH-metrului.
- Când gradația pH-metrului ajunge la 6,8 titrarea se stopează. În același pahar se adaugă 10 cm³ amestec formolic cu ajutorul cilindrului gradat.

- Biureta se aduce la gradatia „zero” cu baza (volumul de NaOH care s-a consumat la titrarea solutiei analizate pana la pH-ul 6,8 nu se i-a in calcul).
- Conținutul paharului se titrează cu baza până la pH 9,1.

Titrarea se repetă de 3-4 ori. Diferența volumelor la titrare nu trebuie să depășească 0,1 cm³.

Pentru determinarea cantității de azot aminic se i-a în considerare numai volumul (în cm³) de bază, care s-a consumat la titrarea solutiei de lucru după ce a fost adăugat amestecul formolic. Un cm³ de soluție 0,1n NaOH corespunde cu 1,4 mg de azot aminic.

Conținutul de azot aminic se calculează în mg/dm³ de soluție analizată după formula:

$$X = \frac{V \times 1,4 \times K \times 1000}{V_P}$$

unde:

V – volumul 0,1 n NaOH în cm³;

K – coeficientul de corecție a bazei;

V_p – volumul probei în cm³.

Întrebări și teste de control

- 1) Ce grupări funcționale intră în componența aminoacizilor?
- 2) După care criterii se clasifică aminoacizii?
- 3) Care aminoacizi sunt esențiali? De ce ei se numesc astfel?
- 4) Ce proprietăți chimice au aminoacizii?
- 5) Descrieți metoda de determinare a conținutului de azot aminic în vin.
- 6) Care reguli ale tehnicii securității trebuie respectate la îndeplinirea lucrării respective de laborator?

- 7) Care este monomerul proteinei?
A. Glucoza. B. Acid fosforic. C. Aminoacid.
D. Nucleotid. E. Glicerina.
- 8) Câte tipuri de aminoacizi intră în componența proteinelor?
a) 4; b) 20; c) 64; d) 100; e) 220.
- 9) Selectați termenul care nu se încadrează în grupul tematic respectiv și explicați de ce l-ați separat:
prolină, treonină, metionină, lizină, guanină.

Lucrarea de laborator №4

Analiza calitativă a aminoacizilor și proteinelor

Obiectivele lucrării de laborator

1. De demonstrat existența legăturii peptidice în soluțiile de proteină.
2. De efectuat reacții de culoare ale aminoacizilor.
3. De determinat prezența unor aminoacizi în componența proteinelor.

La interacțiunea proteinelor cu unele reactive se produc diferite reacții de culoare. Cu ajutorul acestor reacții poate fi identificată prezența în moleculele proteice a unor aminoacizi (tirozină, triptofan, cisteină etc.) sau a unor grupări chimice specifice. Sunt două tipuri de reacții de culoare:

- *universale* – biuretică (pentru toate proteinele) și ninhidrică (pentru toate tipurile de α -aminoacizi și proteine);
- *specifice* – pentru aminoacizi specifici din molecula proteică sau soluții de aminoacizi, de exemplu, reacția sulfhidrică, reacția Millon, reacția xantoproteinică etc.

Reacțiile incolore se produc în cadrul hidrolizei proteinelor cu acizi, baze sau enzime. În rezultatul hidrolizei proteinelor se formează produse proteice mai simple și produse finale – aminoacizi.

Hidroliza acidă este cea mai utilizată. Soluția proteică se fierbe în fiole ermetic închise 10-12 ore cu soluție de 10% HCl sau soluție de 20% H₂SO₄. Proteinele se descompun până la aminoacizi, cu excepția triptofanului.

Hidroliza alcalină se realizează cu hidroxizi alcalini timp de 10-12 ore cu soluție 10% NaOH sau Ba(OH)₂. În cadrul hidrolizei alcaline se descompun aminoacizii arginina, citrulina, histidina.

Hidroliza enzimatică se realizează prin intermediul enzimelor la temperatura 20-40°C și la un pH ≈ 7. În acest caz nu se distruge nici un aminoacid. Hidroliza enzimatică are loc în tubul digestiv al organismului animal, uman, în celulele fructelor, legumelor, strugurilor și în vinuri. La prelucrarea strugurilor hidroliza enzimatică are lor după următoarea schemă:

Proteine → albumoze → peptone → polipeptide →
oligopeptide → aminoacizi.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Lapte degresat sau soluție 0,5 g cazeină în 100 cm³ bază de 1 %.
- 2) Soluție de albuș de ou (albușul unui ou se separă de gălbenuș, se amestecă cu 0,5 dm³ apă distilată și se agită minuțios).
- 3) Gelatină (soluție de 1 %) .
- 4) CuSO₄ (soluții de 1% și 6%).
- 5) NaOH (soluții de 10% și 20%).
- 6) Acid azotic concentrat – HNO₃.
- 7) Acid sulfuric concentrat – H₂SO₄.

- 8) Acid acetic glacial – CH_3COOH .
- 9) Uree (soluții de 20% și 40%) .
- 10) Reactivul Millon.
- 11) Ninhidrină (soluție apoasă de 0,5%).
- 12) Reactivul Fohl (la o soluție 5% de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ se adaugă o soluție 30% echivalentă de NaOH până la dizolvarea precipitatului format).
- 12) a-Naftol (soluție alcoolică de 0,2%).
- 13) Hipobromid de natriu – NaBrO.
- 14) Acid sulfanilic (soluție de 1% într-o soluție 5% HCl).
- 15) NaNO_3 (soluție de 0,5%).
- 16) Na_2CO_3 (soluție de 10%).
- 17) Acid glioxilic.
- 18) Dialdehidă ftalică (soluție apoasă).
- 19) Fiole, baie de apă, pipete de 1 și 2 ml.
- 20) Soluții de aminoacizi.

Reacții de culoare universale

Experimentul 1. Reacția biuretică

Principiul metodei. Reacția biuretică (fig. 22) este determinată de prezența în proteine a legăturilor peptidice (-CO-NH-), care în mediu bazic, formează cu sulfatul de cupru (CuSO_4) complexe de culoare violetă.

Culoarea soluției poate să varieze de la albastru-violet până la roșu în funcție de lungimea lanțului polipeptidic. Trebuie de menționat că reacția biuretică se produce la substanțele care conțin nu mai puțin de două legături peptidice.

Reacția se numește biuretică deoarece este caracteristică pentru *biuret*, alcătuit din două molecule de uree ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) sau *oxamidă* $\text{NH}_2\text{-CO-CO-NH}_2$.

În trei fiole se dozează soluții proteice diferite: soluție de cazeină sau lapte degresat, soluție albuș de ou, soluție gelatină. În fiecare fiolă la 5 picături de soluție proteică de 1% se adaugă 5 picături NaOH (soluție de 10%), 2 picături CuSO₄ (soluție de 1%) și se agită. Se observă schimbarea culorii soluțiilor.

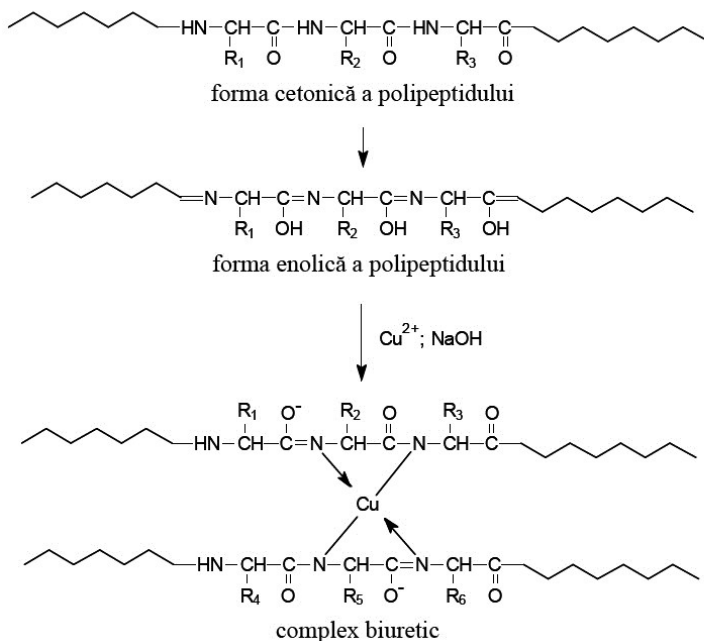


Fig. 22. Reacția biuretică

Experimentul 2. Reacția cu ninhidrină

Principiul metodei. Proteinele și α -aminoacizii liberi interacționează cu ninhidrină și produc o reacție de culoare albastră sau violet (fig. 23). Reacția de culoare este

determinată de prezența grupării aminice în molecula proteică.

La 5 picături de soluție proteică se adaugă 5 picături de soluție apoasă 1% de ninhidrină și se fierbe timp de 1-2 minute. Se observă schimbarea culorii soluției.

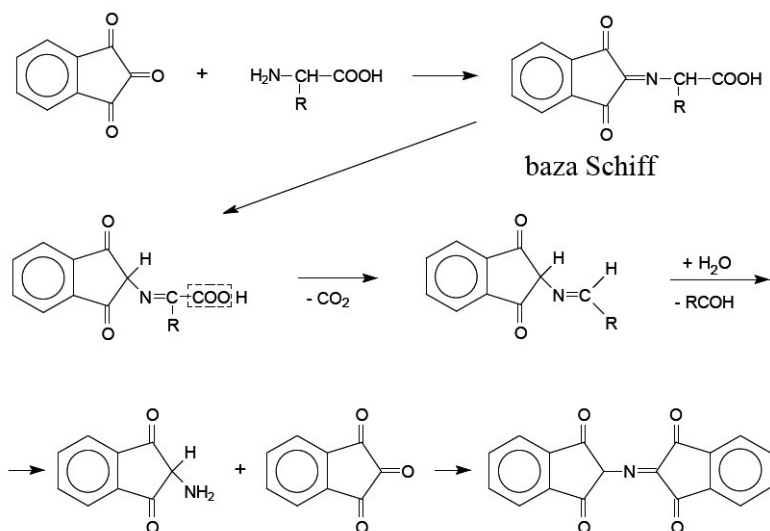


Fig. 23. Reacția cu ninhidrină

Reacții de culoare specifice

Experimentul 3. Reacția xantoproteinică

Principiul metodei. Soluțiile de proteină se încălzesc cu acid azotic concentrat și dau o reacție de culoare galbenă datorită prezenței în moleculele de proteină a aminoacizilor ciclici (fenilalanina, tirozina, triptofan). Acidul azotic nitrează nucleul benzenic al aminoacizilor ciclici formând nitrozocompuși. Astfel, radicalul tirozinei în

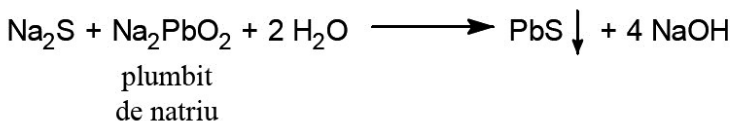
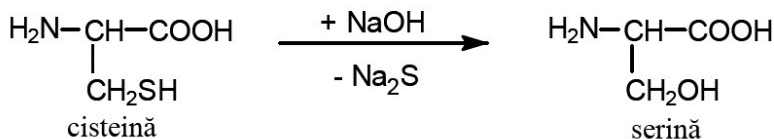


Fig. 25. Reac\u021bia silfidrilic\u0103

Experimentul 5. Reac\u021bia Millon

Principiul metodei. Tirozina interac\u021bioneaz\u0103 cu reactivul Millon \u015i produce o reac\u021bie de culoare ro\u015ie (fig. 26). La \u00e2nc\u0103lzirea solu\u021biei proteice cu o solu\u021bie de azotat de mercur \u00een prezen\u021ba acidului azotic concentrat (reactivul Millon) se formeaz\u0103 un precipitat ro\u015u-c\u0103r\u0103miziu, datorit\u0103 form\u0103rii nitrocompu\u0151ilor tirozinei.

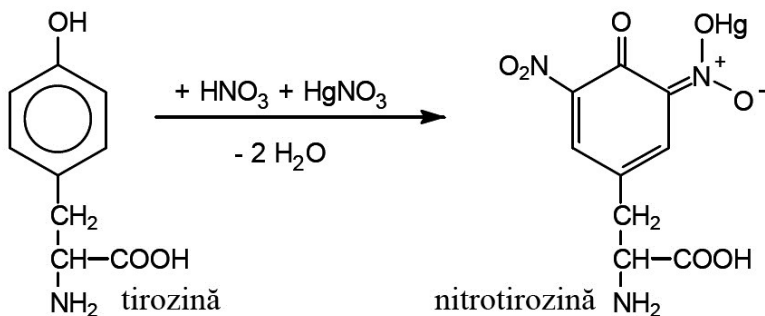


Fig. 26. Reac\u021bia Millon

La 5 picături de soluție proteică se adaugă 3 picături de reactiv Millon, apoi soluția se încălzește și se observă schimbarea culorii soluției.

Experimentul 6. Reacția de identificare a argininei

Principiul metodei. Reacția de culoare este determinată de prezența în molecula aminoacidului arginina a grupării guanidinice (fig. 27). Gruparea guanidinică a argininei se oxidează în prezența hipocloritului de sodiu. Produsul oxidat interacționează cu α -naftol și formează un produs de condensare de culoare roșie-roz.

La 10 picături de soluție proteică se adaugă 10 picături NaOH (soluție de 10%) și 3 picături α -naftol (soluție alcoolică de 0,2%). Conținutul fiolei se agită. Apoi se adaugă 10 picături hipobromid sodiu – NaBrO și soluția din nou se agită. Pentru stabilizarea culorii roșii ale soluției se adaugă 5 picături uree (soluție de 40%).

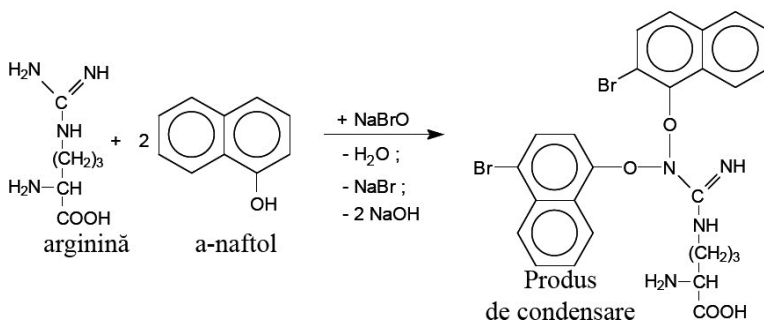


Fig. 27. Reacția de identificare a argininei

Experimentul 7. Reacția de identificare a glicinei

Principiul metodei. Aminoacidul glicina interacționează cu aldehida ftalică într-un mediu bazic și produce o reacție de culoare verde-deschis (fig. 28).

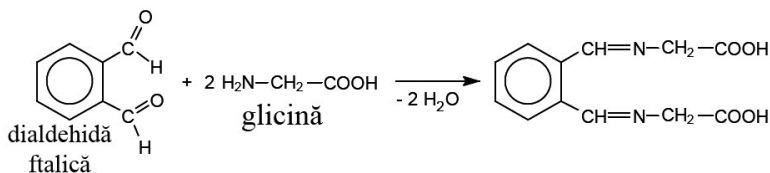


Fig. 28. Reacția de identificare a glicinei

La 10 picături de soluție proteică se adaugă o soluție de 10% NaOH cu pH = 8. Apoi în fiolă se dozează 2-3 picături de soluție apoasă a dialdehidei ftalice.

Perfectarea lucrării. Rezultatele lucrării de laborator sunt prezentate în formă de tabel:

No	Denumirea reacției	Principiul reacției	Condițiile reacției	Efecte observate
1				

Întrebări și teste de control

- 1) Descrieți chimismul reacțiilor de culoare ale proteinelor.
- 2) Cum se realizează hidroliza acidă și bazică a proteinelor?
- 3) Cum se desfășoară hidroliza enzimatică?
- 4) Care din următorii aminoacizi participă la reacția xantoproteinică?
 A. Ile; Val; Met; Phe; Trp. B. Lys; Pro; Phe; Gln; Tyr.
 C. Tyr; Phe; Pro; His; Arg. D. Thr; Ser; His; Phe; Trp.
 E. Trp; Pro; Ala; Val; Phe;
- 5) Care din următorii aminoacizi intră în reacție cu reactivul Fohl?
 A. Cys; Thr; Met; Val; Arg. B. Gly; Ala; Met; Leu; Cys.
 C. Asp; Val; Cys; Thr; Met. D. Glu; Met; Pro; His; Gys;
 E. Gys; Ile; Met; Ala; Gly.
- 6) Care din următorii aminoacizi intră în reacție cu reactivul Millon?

Gly; Val; Ile; Tyr; Pro.

7) Reagentul α -naftol se folosește pentru recunoașterea următorilor aminoacizi:

a) Glu; b) Asp; c) Ala; d) Met; e) Arg.

Lucrarea de laborator №5

Extracția și analiza proteinelor simple

Obiectivele lucrării de laborator

1. De extras fracția albuminică și prolaminică a proteinelor.
2. De studiat proprietățile fizice ale proteinelor.
3. De aprofundat cunoștințele studenților despre funcțiile proteinelor vegetale de rezervă și importanța lor biologică.

Proteinele (gr. *proteinós* – primar) sunt compuși organici macromoleculari care îndeplinesc în celulele vii funcții structurale, catalitice, de transport, de protecție, de semnalizare, reglatoare etc. Proteinele sunt molecule biopolimere prezente în celulele tuturor organismelor vii și sunt alcătuite din α -aminoacizi.

Organizarea structurală a moleculelor de proteine. Sunt patru tipuri de organizare structurală a moleculelor proteice: primară, secundară, terțiară și cuaternară.

Structura primară a proteinelor reprezintă o secvență de aminoacizi într-un lanț polipeptidic.

Structura secundară a proteinelor se formează datorită legăturilor de hidrogen dintre grupările carboxilice și aminice ale diferitor aminoacizi. Legăturile de hidrogen conferă moleculelor de proteină o formă “spiralată” sau “pliată”

Structura terțiară a proteinelor se formează datorită interacțiunii radicalilor de aminoacizi, spre exemplu a

radicalilor aminoacizilor cisteina care conțin sulf. Astfel, între atomii de sulf de la doi aminoacizi de cisteină se formează legături disulfidice (-S-S-). La acest nivel de organizare structurală se deosebesc proteine globulare și fibrilare. Proteinele globulare sunt solubile și au formă sferică, iar proteinele fibrilare au o formă de filamente și de regulă sunt insolubile.

Structura cuaternară reprezintă un mod de asamblare a câteva lanțuri polipeptidice într-o singură moleculă proteică. Această structură se formează datorită legăturilor de hidrogen, disulfidice, hidrofobe, ionice. Acest tip de organizare structurală este caracteristic pentru unele proteine precum *hemoglobina* (două lanțuri α și două lanțuri β), *insulina* (un lanț α și unul β).

Clasificarea proteinelor. Toate proteinele se împart în două grupe mari: proteine simple – *proteine* și proteine conjugate – *proteide*. În componența proteinelor simple intră doar resturi de aminoacizi, iar proteinele conjugate sunt alcătuite dintr-o componentă proteică și o componentă de natură neproteică – *grupare prostetică*. În funcție de natura chimică a grupării prostetice se deosebesc: *lipoproteide*, *glicoproteide*, *nucleoproteide*, *cromoproteide*, *metaloproteide*, *fosfoproteide*.

Proteinele au fost clasificate de către chimistul american Thomas Osborne, în funcție de solubilitatea lor în diferite medii:

- *albumine* – solubile în apă (*ovalbumina* din albușul de ou, *lactalbumina* din lapte);
- *globuline* – solubile în soluțiile apoase ale diferitor săruri (*legumina* din mazăre, *fasolina* din fasole);
- *prolamine* – solubile în alcool etilic (*gliadina* din grâu, *zeina* din porumb);
- *gluteline* – solubile în soluții de baze (*glutelina* din porumb, *glutenina* din grâu).

Proprietățile proteinelor. Proprietățile proteinelor depind, în primul rând, de numărul și succesiunea aminoacizilor în lanțul polipeptidic, de organizarea structurală a moleculelor, precum și de alți factori.

Însă toate proteinele au o serie de proprietăți comune. Proteinele posedă proprietăți amfotere. Pentru proteine este caracteristic un punct izoelectric – mărimea pH, la care proteina are un grad minimal de disociere. La umflare proteinele formează geluri.

Factori fizici (t° , presiunea, radiațiile) sau chimici (acizi, baze, solvenți organici) pot modifica structura proteinelor. Fenomenul de distrugere a organizării structurale ale moleculei proteice se numește *denaturare*. Procesul de denaturare este ireversibil dacă se distruge structura primară a proteinelor. Denaturarea proteinelor este însoțită de pierderea activității biologice și modificarea proprietăților fizico-chimice ale proteinelor – micșorarea solubilității, mărirea viscozității, schimbarea formei și mărimii moleculelor etc. În procesele tehnologice din industria alimentară cel mai des se întâlnește denaturarea termică a proteinelor, de exemplu la uscarea pastelor făinoase, laptelui, legumelor, coacerea pâinii, fabricarea conservelor etc.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Boabe de graminee măcinate sau făină.
- 2) NaCl (soluție saturată).
- 3) C_2H_5OH (soluție de 7%).
- 4) Soluții de proteine.

Experimentul 1. Extracția fracției de albumină

Într-un vas de sticlă se pun 2 gr material biologic, se adaugă 2 cm^3 de apă, conținutul vasului se agită și se

introduce în termostat la $t = 30^{\circ}\text{-}35^{\circ}\text{C}$ timp de 3 min. În primele 2 min conținutul vasului se agită periodic. Peste 3 min, soluția cu fracția de albumină se filtrează. O parte din soluția filtrată este folosită pentru reacția biuretică (vezi lucrarea de laborator № 4), iar în cealaltă parte a soluției se adaugă o soluție saturată echivalentă de NaCl. Soluția se tulbură și se formează un precipitat deoarece albuminele în prezența sărurilor își pierd solubilitatea.

Experimentul 2. Extracția fracției de prolamină

În fiolă se pune 1 gr de material biologic și se dozează 1 cm³ soluție alcool etilic. Extracția fracției de proteină se realizează la $t = 30^{\circ}\text{-}35^{\circ}\text{C}$ timp de 2 min, soluția se agită periodic. Peste 2 min soluția se filtrează. O parte din soluția filtrată este folosită pentru reacția biuretică. A doua parte a filtratului se diluează de 2 ori cu apă, concentrația de alcool etilic se micșorează brusc, se micșorează solubilitatea fracției de prolamină, iar soluția devine tulbură și se formează un precipitat.

Experimentul 3. Coagularea proteinelor la temperaturi înalte

Pentru studierea coagulării proteinelor se folosesc soluțiile proteice obținute în experimentul №1. În fiolă se dozează 5 cm³ material biologic și un termometru. Apoi fiola se introduce într-un pahar cu apă, care se încălzește treptat. Se notează temperatura la care soluția începe să se tulbure și apare un precipitat în formă de fulgi. Pentru efectuarea reacțiilor de culoare se pregărește o soluție făinoasă într-un raport de 1:5.

Întrebări și teste de control

- 1) Ce reprezintă proteinele?
- 2) Care sunt funcțiile proteinelor în celulă?
- 3) Care sunt nivelurile de organizare structurală a moleculelor de proteină?
- 4) Câte tipuri de legături sunt prezente în moleculele de proteină?
- 5) Ce proprietăți fizico-chimice au proteinele?
- 6) Care sunt criteriile de clasificare a proteinelor?
- 7) Structura terțiară a proteinei se formează datorită interacțiunii radicalilor aminoacidului:
a) valina; b) leucina; c) izoleucina; d) cisteina.
- 8) Care funcții îndeplinesc proteinele în celulă?
A. Catalitice. B. Stocare a informației genetice.
C. Structurale. D. Energetice. E. Transport. F. Protecție.
- 9) Selectați termenul care nu se încadrează în grupul tematic respectiv și explicați de ce l-ați separat:
albumine; colagen; cheratină; glucoză; globine.

III. Enzime, coenzime și vitamine

Lucrarea de laborator №6

Determinarea activității enzimei invertaza

Obiectivele lucrării de laborator

1. De determinat conținutul de zahăr invertit în vin.
2. De determinat activitatea enzimei invertaza în vin.
3. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre enzime.

Enzimele (din greacă “*zymosis*” – ferment) sunt substanțe care catalizează reacțiile biochimice din celulă. Pentru utilizarea rațională a enzimelor în industria alimentară e necesară cunoașterea structurii și proprietăților lor. După tipul reacției catalizate enzimele se clasifică în 6 clase (tab. 2).

Tab. 2. Clasele enzimelor și tipurile reacțiilor catalizate

Clasa enzimelor	Tipul reacției
1	2
Oxido reductaze	Procese de oxido-reducere care stau la baza oxidării biologice
Transferaze	Transferul unor atomi sau a unor grupări de atomi de pe un substrat donator pe un substrat acceptor
Hidrolaze	Scindarea hidrolitică a legăturilor chimice
Liaze	Scindarea nehidrolitică a legăturilor chimice cu formarea în molecule a legăturilor duble sau scindarea nehidrolitică a legăturilor duble în urma adăugării diferitor grupări chimice la locul de scindare
Izomeraze	Reacții de izomerizare sau rearanjări moleculare a legăturilor duble și a grupelor fosfat pe lanțul carbonic
Ligaze (sintetaze)	Reacții de formare a legăturilor chimice între două molecule pe baza energiei ATP

Enzimele sunt mono- și bicomponente. Enzimele monocomponente sunt alcătuite doar dintr-o parte proteică, iar enzimele bicomponente (*holoenzime*) – dintr-o parte proteică (*apoenzimă*) și neproteică (*cofactor*). Cofactorii au următoarele proprietăți:

- 1) Participă la cataliză.
- 2) Participă la formarea contactului între enzimă și substrat.
- 3) Stabilizează apoenzima.
- 4) Nu sunt responsabili pentru specificitatea și tipul de reacție.

5) Au o masă moleculară relativ mică și sunt termostabili.

După structura chimică cofactorii sunt:

a) derivați ai nucleotidelor (NAD^+ , NADP^+);

b) derivați ai vitaminelor (tiaminpirofosfat, FADH_2 , CoA-SH);

c) metale și compușii lor (Fe , Zn , Cu , Mo);

d) alte structuri chimice (glutation).

Regiunea enzimei în care se realizează cataliza se numește *centrul catalitic* sau *centrul activ*. La enzimele monocomponente centrul activ este format prin asocierea radicalilor anumitor aminoacizi. La enzimele bicomponente (fig. 29) din centrul activ face parte și cofactorul.



Fig. 29. Centrul activ al enzimei bicomponente: R_1 , R_2 , R_3 – radicalii aminoacizilor; Co – cofactor.

Centrul activ se află în partea internă hidrofobă a moleculei proteice și structura acestuia corespunde cu structura substratului (substanța care se transformă în reacția dată) după modelul „cheie-lacăt” (fig. 30).

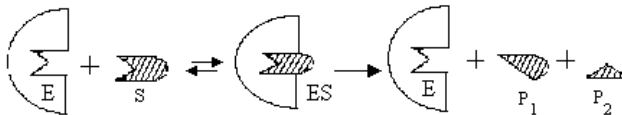


Fig. 30. Interacțiunea enzimei (E) cu substratul (S), formarea complexului enzimă-substrat (ES) și a produselor de reacție P_1 și P_2

Importanța analizei. În natură sunt răspândite pe larg enzimele *carbohidraze* (*glicozidaze*) care catalizează hidroliza legăturilor glicozidice în moleculele glucidelor și descompunerea acestora în molecule cu o masă moleculară mai mică (fig. 31). Din această grupă face parte enzima *β-fructozidaza*, care scindează diglucidul zaharoza în glucoză și fructoză, acționând asupra legăturii β-fructofuranozidice a zaharozei. Această enzimă se mai numește invertaza întrucât catalizează inversia zaharozei. Zaharoza este *dextrogiră*, iar după hidroliza acesteia amestecul echimolar de glucoză și fructoză care se mai numește și *zahăr invertit* este levogir.

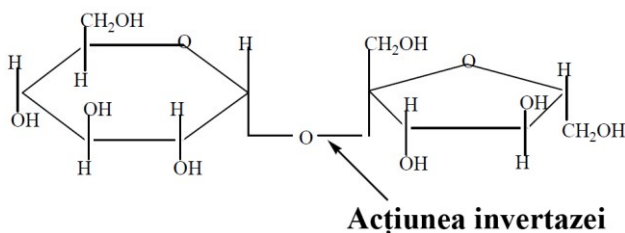


Fig. 31. Locul de acțiune a enzimei invertaza

Invertaza e folosită pe larg în industria panificației și fermentației la hidroliza zaharozei și maltozei, pregătind astfel materia primă pentru fermentație. Drojdiile cu o activitate mică de inversie nu pot fi utilizate în industria panificației și fermentației, prin urmare studierea activității enzimei are o însemnătate practică.

Activitatea enzimatică se exprimă cantitativ folosind următoarele unități:

- *Unitatea enzimatică (U)* reprezintă cantitatea de enzimă care catalizează transformarea substratului cu viteza $1\mu\text{M}/\text{min}$ în condiții optime;

- *Katalul (Kat)* reprezintă cantitatea de enzimă care catalizează transformarea substratului cu viteza 1M/s;
- *Activitatea specifică* reprezintă numărul de Kat care corespund la un μg de proteină a preparatului enzimatic;
- *Activitatea enzimatică molară* reprezintă numărul de molecule de substrat transformate de către o moleculă de enzimă timp de 1 min sau 1 s (Kat/mol).

Principiul metodei. Activitatea invertazei se determină după cantitatea de zahăr invertit care se formează la hidroliza unei cantități de zaharoză la $t = 25^\circ\text{C}$ timp de 24 de ore. Cantitatea de zahăr invertit se determină după *metoda Bertrand*.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Două baloane conice 100 cm^3 .
- 2) Două baloane cotați 200 cm^3 .
- 3) Cilindri cotate 25 cm^3 .
- 4) Pâlnie Shott №3.
- 5) Balon Bunzen 500 cm^3 .
- 6) Pipetă 10 cm^3 .
- 7) Zaharoză (soluție de 10%).
- 8) Soluție-tampon acetică cu $\text{pH} = 4,7$: la 50 cm^3 soluție 1n de NaOH se adaugă $96,8\text{ cm}^3$ soluție 1 n de CH_3COOH și volumul amestecului se aduce cu apă distilată până la cota 500 cm^3 . În soluția tampon acetică se adaugă 1-2 cm^3 toluol pentru reducerea creșterii microorganismelor în probele de materie primă (vin, suc).
- 9) Reactivul Fehling №1: se dizolvă 40 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{ H}_2\text{O}$ într-un dm^3 apă de distilată.
- 10) Reactivul Fehling №2: se dizolvă într-un dm^3 apă de distilată 200g sare de Seignette (tatrat dublu de sodiu și potasiu) și 150 g de NaOH.

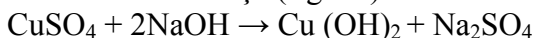
- 11) Soluție ferică amoniacală: 86g sulfat feric amoniacal se dizolvă în 500 cm³ apă, la soluție se adaugă 108 cm³ acid sulfuric concentrat cu densitatea 1,84 și volumul amestecului se aduce cu apă distilată până la un dm³. Înainte de întrebuințare soluția ferică amoniacală se oxidează cu câteva picături de 0,1n KMnO₄ până la culoarea roz.
- 12) KMnO₄ (soluție 0.05 n) care se păstrează la întuneric.
- 13) Probe de materie primă (vin sau suc).

Ordinea îndeplinirii lucrării

Probe de 10 cm³ de vin sau suc se dozează în două baloane conice de 100 cm³. Conținutul primului balon (proba de control) se fierbe timp de 3 min pentru inactivarea enzimei. Apoi în ambele baloane se dozează câte 5 cm³ soluție zaharoză 10% și 10 cm³ soluție-tampon acetică cu toluol. Baloanele se astupă cu dopuri și se lasă pentru 24 ore la temperatura de 25°C în termostat. După expirarea termenului proba de lucru, cu excepția probei de control, se fierbe 3 minute pentru inactivarea enzimei.

Conținutul ambelor baloane se transferă în două baloane conice de 200 cm³ și se adaugă apă distilată până la cotă, apoi se agită. Din fiecare balon se i-au cu pipeta probe de 10 cm³, se transferă în baloane conice de 100 cm³ și se determină zahărul rezidual după metoda Bertrand.

Pentru aceasta la fiecare probă se adaugă câte 10 cm³ soluție Fehling №1 și №2. Probele se fierb 3 minute. Zahărul invertit reacționează cu reactivele Fehling №1, №2 și au loc următoarele reacții (fig. 32).



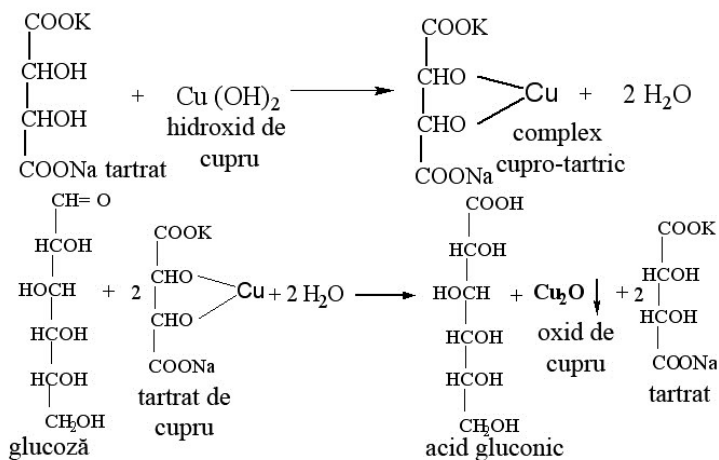


Fig. 32. Reacția glucozei cu tartrat de cupru și formarea oxidului de cupru de culoare roșie-cărmăzie

Dat fiind faptul că reactivul Fehling este bazic, în prezența acestuia fructoza se transformă în aldoză (glucoză sau manoză), care interacționează cu reactivul Fehling (fig. 33).

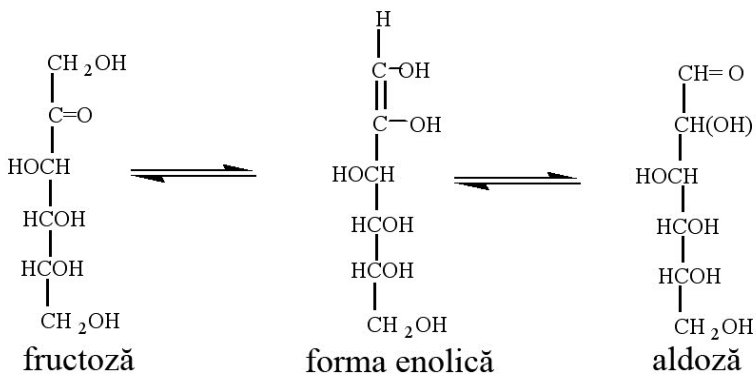


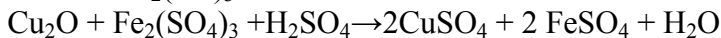
Fig. 33. Transformarea fructozei în aldoză (glucoză sau manoză) în prezența reactivului Fehling

Pentru determinarea cantității de Cu_2O se procedează în modul următor. Conținutul primei probe (de control) după răcire până la $50\text{-}60^\circ\text{C}$ se transferă în pâlnia Şott unită cu balonul Bunzen, care se unește cu pompa de apă. Soluția se filtrează prin pâlnia Şott și se spală de 5-6 ori cu apă fierbinte distilată până când soluția devine incoloră.

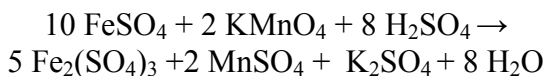
Precipitatul de Cu_2O din pâlnia Şott și din balonul conic cu probă se menține permanent sub un strat de apă pentru a nu permite contactul Cu_2O cu aerul.

Imediat după ultima spălare în vasul conic se adaugă cu cilindrul 10 cm^3 soluție ferică-amoniacală pentru dizolvarea sedimentului de Cu_2O și se agită până când dispare precipitatul roșu-cărămiziu de pe pereții balonului conic. Între timp pâlnia Şott se montează pe un alt balon Bunzen curat și se oprește pompa de apă.

Soluția ferică-amoniacală din balonul conic se toarnă peste precipitatul din pâlnia Şott și se amestecă cu o baghetă de sticlă până la dizolvarea completă a precipitatului de Cu_2O . Apoi balonul Bunzen se unește cu pompa de apă și amestecul obținut se filtrează. Balonul conic cu soluția ferică-amoniacală se spală de 5-6 ori cu apă distilată fierbinte și se filtrează prin pâlnia Şott până când picăturile de filtrat din balonul Bunzen capătă o reacție neutră. pH-ul se determină cu indicatorul universal de hârtie. Are loc reacția de dizolvare a sedimentului de Cu_2O în soluția de sulfat feric $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$:



Sulfatul feros (FeSO_4) format se titrează cu KMnO_4 :



Filtratul limpede cu nuanțe verzui se titrează cu soluție 0,05 n KMnO_4 direct în balonul Bunzen până când soluția se colorează în roz și la o picătură în exces de KMnO_4 colorația persistă un minut. Apoi se fixează volumul soluției 0,05n KMnO_4 consumat la titrare.

Se procedează analogic și cu proba de lucru.

Determinarea zahărului prin metoda Bertran se repetă de 2-3 ori în probele de lucru și probele de control.

1 cm^3 soluție 0,05 n permanganat de potasiu echivalează cu 3,18 mg cupru. Cantitatea de zahăr invertit în mg, se determină după tabelul Bertrand (anexa 2), care indică ce cantitate de zahăr invertit corespunde cu o anumită cantitate de cupru.

Activitatea invertazei (A_C) se exprimă în *unități de activitate enzimatică* într-un dm^3 vin sau suc.

Pentru aceasta cantitatea de zahăr invertit determinată după tabelul Bertrand (**Z**) se recalculează la conținutul lui în volumul balonului cu cotă (200 cm^3) și se înmulțește cu 0,95 (coeficientul de recalculare a zahărului invertit în zaharoză), și se determină cantitatea zaharozei (mg), care s-a supus hidrolizei. Activitatea invertazei se determină după formula:

$$A_C = \frac{P \times 1000 \times 1000}{342 \times t \times v},$$

unde: **P** – masa de zaharoză hidrolizată, mg;

P = $P_{\text{lucru}} - P_{\text{control}} \times 0,95 \times 20$

342 – masa moleculară a zaharozei;

t – durata inversiei;

V – volumul de vin, cm^3 ;

1000 – transformarea mg în micrograme;

1000 – recalcularea la 1 dm^3 .

Întrebări de control

- 1) Care este structura enzimelor?
- 2) Care sunt funcțiile enzimelor?
- 3) Numiți unitățile de măsură ale activității enzimaticе.
- 4) Caracterizați succint enzima invertaza.
- 5) Ce reprezintă zahărul invertit?
- 6) Care sunt deosebirile dintre di- și monoglucide?
- 7) Descrieți metoda de determinare a activității invertazei.
- 8) Explicați formula de calcul pentru determinarea activității invertazei.
- 9) Care reguli de securitate trebuie respectate la efectuarea lucrării?

Lucrarea de laborator №7

Determinarea activității enzimei polifenoloxidaza

Obiectivele lucrării de laborator

1. De însușit metoda de determinare a activității enzimei polifenoloxidaza în materia primă vegetală.
2. De generalizat cunoștințele studenților despre clasa oxidoreductazelor.
3. De aprofundat cunoștințele studenților despre dehidrogenazele anaerobe și rolul lor biologic.

Oxidoreductazele, cea mai importantă clasă de enzime pentru industria alimentară, catalizează reacțiile de oxidoreducere – hidrogenare și dehidrogenare.

Din clasa oxidoreductazelor fac parte dehidrogenaze care catalizează reacții de oxidare biologică după următoarea schemă (fig. 34).

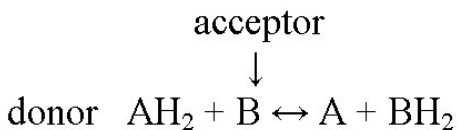


Fig. 34. Cataliza reacțiilor de oxido-reducere

Dehidrogenazele sunt transportatori intermediari ai hidrogenului și se divizează în două grupe:

1. Dehidrogenazele anaerobe ($\text{B} \neq \text{O}_2$), transportă hidrogenul de pe un substrat oxidat pe un substrat altul decât oxigenul. $\text{AH}_2 + \text{B} = \text{A} + \text{BH}_2$

Dehidrogenazele anaerobe sunt enzime bicomponente, cofactorii fiind derivați ai vitaminei B₅: NAD^+ , NADP^+ (nicotinamidadeninucleotidfosfat).

2. Dehidrogenazele aerobe ($\text{B} = \text{O}_2$), transportă hidrogenul de pe un substrat oxidat pe alt substrat sau pe oxigen. $\text{AH}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 = \text{A} + \text{H}_2\text{O}$; $\text{AH}_2 + \text{O}_2 = \text{A} + \text{H}_2\text{O}_2$

Dehidrogenazele aerobe sunt enzime bicomponente, cofactorii fiind derivații ai vitaminei B₂ (FMN, FAD).

Dehidrogenazele aerobe, pentru care acceptor de hidrogen poate fi doar oxigenul se numesc *oxidaze*.

Una din enzimele care face parte din grupul oxidazelor este *polifenoloxidaza*, care se conține în cantități mari în ciuperci, frunze de ceai, boabe de cacao, cafea, tuberculi de cartofi și în diferite fructe: mere, piersici, caise, banane, struguri etc. Masa moleculară a enzimei respective variază (de exemplu, 34500 – în ciuperci, 144 mii – în frunzele de ceai). Polifenoloxidaza conține Cu (0,2-0,3%), catalizează reacția de oxidare a monofenolilor în difenoli (*activitate crezolică*) și a o-difenolilor în o-chinone (*activitate catecholazică*), iar acceptorul de hidrogen este oxigenul molecular (fig. 35).

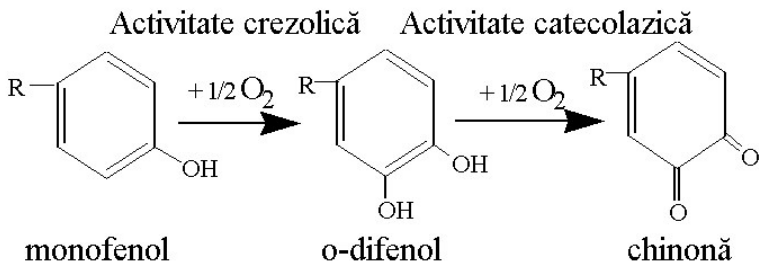


Fig. 35. Oxidarea mono- și polifenolilor

Polifenoloxidaza oxidează substanțele tanante care se conțin în plantele superioare. Prin acțiunea enzimei respective se explică brunificarea legumelor și fructelor la uscare.

Polifenoloxidaza joacă un rol important la respirația plantelor. Potrivit teoriei lui V. Paladin, sistemul polifenol-chinonă reprezintă o verigă intermediară la oxidarea diferitelor substanțe organice în procesul de respirație a plantelor.

La animale și om polifenoloxidaza oxidează aminoacidul tirozina, participând astfel la formarea melaninelor – pigmenți ai pielii, părului, etc. (fig. 36).

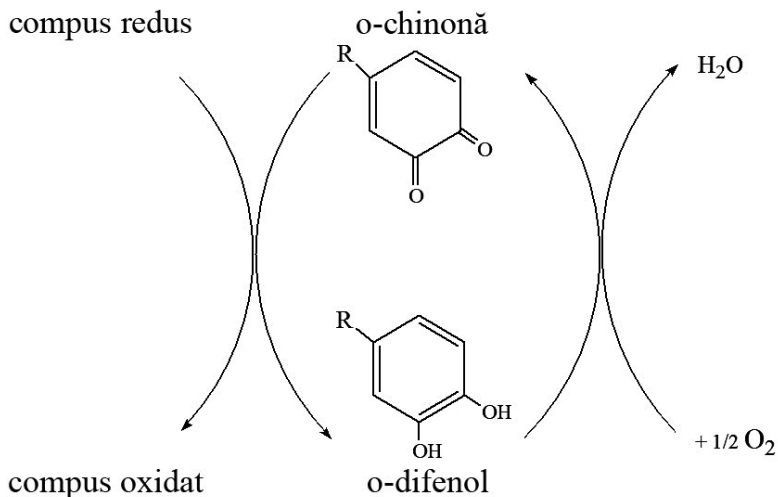


Fig. 36. Participarea polifenoloxidazei în procesul de respirație

Importanța analizei. Sistemul polifenoloxidazei, polifenolilor și a chinonelor respective oxidează acidul ascorbic în materia primă alimentară. Această situație se ia în considerare la prelucrarea fructelor, legumelor și strugurilor, care conțin acid ascorbic.

Materia primă vegetală (fructe proaspete tăiate, legume și struguri) la contactul cu oxigenul din aer se îmbrunează din cauza polimerizării oxidative a chinonelor formate din mono- și difenoli. Pentru inactivarea polifenoloxidazei și prevenirea formării chinonelor se folosește tratamentul termic de exemplu, blanșarea fructelor sau chimic – cu SO₂ sau cu K₂S₂O₅ etc. În industria alimentară dioxidul de sulf se folosește în calitate de conservant și se notează pe ambalaj cu codul E 220.

Principiul metodei. Metoda determinării polifenoloxidazei se bazează pe proprietatea ei de a oxida pirocatehină în orto-chinonă. Orto-chinona oxidează acidul

ascorbic (fig. 37). Acidul ascorbic rămas în mediu de reacție se determină cantitativ prin metoda de titrare cu 0,02n soluție de iod.

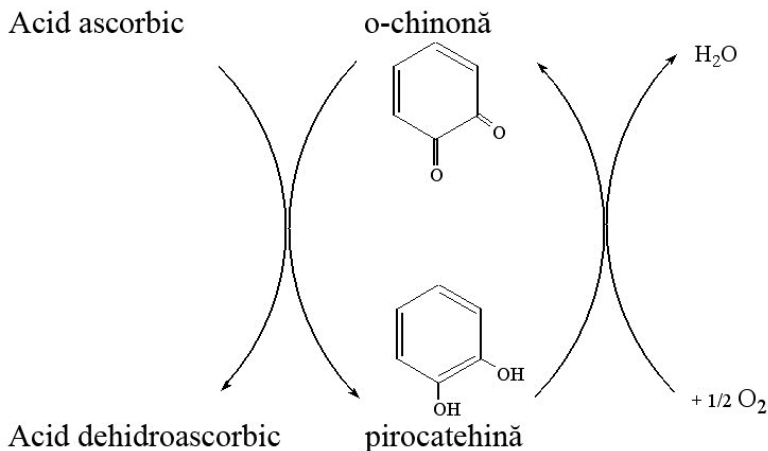


Fig. 37. Oxidarea acidului ascorbic

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Două baloane conice de 100 cm³.
- 2) Mojar cu pistil.
- 3) Pâlnie din sticlă.
- 4) Balon cotat de 50 cm³.
- 5) Pipete Mor de 5 cm³ și 10 cm³.
- 6) Patru pipete gradate de 2 și 5 cm³.
- 7) Acid ascorbic (100 mg acid ascorbic se dizolvă în 100 cm³ apă distilată).
- 8) Pirocatechină (2,2 g în 1 dm³ soluție de 0,02n).
- 9) Acid fosforic (soluție de 10%).
- 10) Iod (soluție de 0.02n).
- 11) Amidon (soluție de 1%).
- 12) Soluție tampon.
- 13) Materie primă vegetală (mere, cartofi, struguri).
- 14) Cântar tehnic.

15) Filtru din material sintetic.

Ordinea îndeplinirii lucrării

Pentru a obține extractul de enzime din materia primă vegetală se cântăresc 5 g de produs la cântarul tehnic. Proba se pune în mojarul de porțelan și se mărunțește cu pistilul. Conținutul mojarului se transferă într-o pâlnie cu filtru din material sintetic pe un balon cotat de 50 cm³. Conținutul balonului se aduce până la cota 50 cm³ cu apă și se agită.

În patru baloane conice se dozează câte 5 cm³ de filtrat și câte 10 cm³ H₂O. Două baloane (probele de control) se încălzesc și se fierb 2 minute pentru inactivarea enzimei, apoi se răcesc. Probele (de control și lucru) se aduc la temperatura 25°C. În fiecare balon se adaugă câte 5 cm³ soluție-tampon (pH = 6,8), câte 2 cm³ soluție de pirocatehină, câte 5 cm³ soluție acid ascorbic și baloanele se omogenizează timp de 2 minute. În fiecare balon se adaugă câte 1 cm³ soluție 10% de acid fosforic și se titrează cu 0,02 n soluție de iod în prezența a 1 cm³ soluție de 1% amidon. Se notează volumul de iod consumat la titrare.

Deoarece 1 cm³ soluție de 0,02n iod este echivalent cu 1,76 mg sau 10 μmol de acid ascorbic, activitatea polifenoloxidazei ce corespunde unui g de produs, exprimată în unități de *activitate enzimatică* se calculează după formula:

$$A_{PFO} = \frac{(V_c - V_1) \times 10 \times 10}{5 \times 2} = (V_c - V_1) \times 10,$$

unde:

V_C – volumul soluției 0,02 n iod, care s-a consumat la titrarea a 5 cm³ soluție de control;

V_1 – volumul soluției 0,02 n iod, care s-a consumat la titrarea a 5 cm^3 soluție de lucru;

10 – numărul de μmol de acid ascorbic;

10 – gradul de diluare a probei;

5 – volumul filtratului, cm^3 ;

2 – durata acțiunii enzimei, min.

Întrebări și teste de control

- 1) Caracterizați succint oxidoreductazele.
- 2) Caracterizați enzima polifenoloxidaza.
- 3) Poate polifenoloxidaza să oxideze acidul ascorbic în absența polifenolilor?
- 4) Descrieți metoda de determinare a activității polifenoloxidazei.
- 5) Argumentați formula de calcul a determinării activității polifenoloxidazei.
- 6) Care reguli de securitate trebuie respectate la efectuarea lucrării?
- 7) Oxidoreductazele catalizează:
 - a) descompunerea hidrolitică a legăturilor chimice;
 - b) descompunerea nehidrolitică a legăturilor chimice;
 - c) formarea unor legături chimice noi;
 - d) reacții de izomerizare;
 - e) reacții de oxido-reducere.

Lucrarea de laborator №8

Determinarea conținutului de glutatión redus

Obiectivele lucrării de laborator

1. De însușit metoda de determinare a conținutului de glutatión în materia primă vegetală.

2. De apreciat calitatea drojdiilor analizate.
3. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre modificările care au loc în complexul proteic și glucidic al boabelor de graminee în curs de germinare.

Caracteristica generală a glutatationului.

Glutationul este o tripeptidă formată din trei resturi de aminoacizi: acidul glutamic, cisteină, glicina (fig. 38):

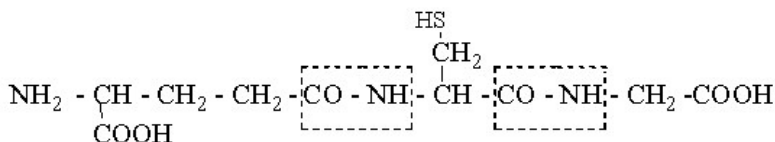
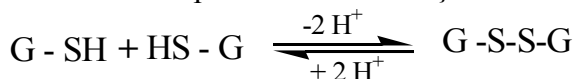


Fig. 38. Formula glutatationului redus

Glutationul este foarte răspândit în natură și se conține în cantități mici în aproape toate celulele vii. În cantități mari, glutatationul se găsește boabele de grâu germinat (până la 0,45 % din masa uscată), în levurile vechi, struguri. Glutationul este o substanță solidă, albă, solubilă în apă și alcool, are 2 grupe carboxilice libere, respectiv are un caracter pronunțat acid (pH = 2,83).

Datorită prezenței grupării sulfhidrilice (-SH) glutatationul are proprietăți reducătoare puternice și poate exista în două forme: redusă (G-SH) și oxidată (G-S-S-G). Forma oxidată este alcătuită din două molecule de glutatation redus, legate printr-o legătură (-S-S-) disulfidică. Reducerea glutatationului oxidat are loc pe baza surselor de hidrogen, formate în procesul schimbului de substanțe. Aceste forme trec ușor una în alta după următoarea reacție:



Transformările reciproce ale formelor reduse și oxidate ale glutatationului au loc în prezența acidului dehidroascorbic (acceptor de hidrogen) și sunt catalizate de enzima *glutathionreductaza*.

Glutathionul fiind un reducător intracelular puternic protejează grupele -SH ale proteinelor de oxidare, îndeplinește un rol specific de reducere a peroxidului de hidrogen și acidului ascorbic, are funcție de coenzimă în diferite reacții de oxido-reducere, joacă un rol în transportul aminoacizilor prin membrana celulară.

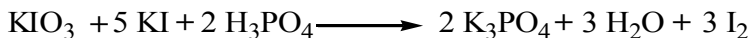
Multe enzime proteolitice de origine vegetală, care au în centrul activ gruparea -SH (enzime *tiolice*) sunt activate de glutathionul redus.

Importanța analizei. Glutathionul are funcții de coenzimă în astfel de enzime proteolitice precum catepsinele, papainele etc. În grăunțele germinate se activează enzimele proteolitice care hidrolizează proteinele, formând astfel polipeptide și aminoacizi. Astfel, la a patra zi de germinare a orzului, cantitatea de glutathion în boabe crește de 2,5 ori.

Modificarea particularităților tehnologice și de panificație ale grăunțelor se explică prin faptul că crește solubilitatea proteinelor în apă, se reduce conținutul de proteine și se mărește conținutul de compuși azotați neproteici și aminoacizi liberi. Glutenul grâului își pierde elasticitatea, devine lipicios, fragil, fapt care duce la schimbarea proprietăților aluatului.

În panificație pentru a preveni distrugerea glutenului, glutathionul redus se oxidează cu acidul dehidroascorbic (vitamina C oxidată).

Principiul metodei. Metoda se bazează pe oxidarea grupării -SH a glutathionului redus cu iod. Pentru a obține soluții stabile de iod se folosește KIO_3 , titrarea se realizează în prezență de KI în mediul acid:



Iodul oxidează glutationul redus conform reacției:



Titarea se încheie când apare culoarea albastră a amidonului, fapt care indică prezența iodului și dispariția glutationului în forma redusă.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Materie primă vegetală: levuri de panificație sau de vin, cereale germinate.
- 2) Acid meta-fosforic (soluție de 5 %).
- 3) KI (soluție de 1,5%).
- 4) Amidon cu adaos de NaCl (soluție de 1%).
- 5) KIO_3 (soluție de 0,001n).
- 6) Mojar cu pistil.
- 7) Microbiuretă sau biureta de 10 cm^3 .
- 8) Baloane conice de 100 cm^3 .
- 9) Balon cotate de 50 cm^3 .
- 10) Pipete: 1, 5, 10 cm^3 .
- 11) Hârtie de filtru pliată.

Ordinea îndeplinirii lucrării

Proba produsului vegetal (2 g) se transferă în mojar și se mărunțește cu pistilul în prezența a 5 cm^3 soluție de 5% acid meta-fosforic. Apoi, masa mărunțită se transferă în balonul cotate de 50 cm^3 , se aduce până la cotă cu apă distilată. După 5 min de macerare conținutul balonului se agită 2-3 min și se filtrează prin hârtie de filtru pliată.

Pentru determinarea conținutului de glutation, 5 cm^3 de filtrat se dozează în balonul conic de 100 cm^3 , se adaugă 1 cm^3 soluție 1,5 % KI și 5 picături de soluție 1% amidon

după care se titrează din microbiuretă cu soluție de 0,001 n KIO_3 până la apariția culorii albastre.

Conținutul glutatationului se exprimă în mg sau % la masa uscată a materialului vegetal după formula:

$$X = \frac{A \times 0.307 \times C \times 100 \times 1000}{P \times b \times 1000}$$

unde:

X – conținutul de glutatation, mg;

0,307 – coeficientul de recalculare a glutatationului, care arată că 1 cm^3 soluția de 0,001n KIO_3 este echivalent cu 0,307 mg de glutatation redus;

P – masa levurilor, g;

C – volumul finit al suspensiei de levuri, cm^3 ;

A – cantitatea de soluție de 0,001 n KIO_3 , care a fost folosită la titrare, cm^3 ;

b – volumul filtratului titrat, cm^3 ;

100 – recalcularea la 100 g de produs;

1000 – recalcularea g în mg.

Întrebări și teste de control

- 1) Descrieți structura, proprietățile și funcțiile glutatationului în metabolismul celular.
- 2) Explicați principiul metodei de determinare a conținutului de glutatation.
- 3) Care este importanța practică a metodei?
- 4) Care enzime sunt activate de glutatationul redus?
Descrieți mecanismul acestui proces.
- 5) Enzime:

a) catalizatori biologici; b) se sintetizează pe ribosomi; c) alcătuite din proteine; d) alcătuite din proteine și vitamine; e) alcătuite din proteine și fier.

6) Enzime:

a) simple; b) compuse; c) se modifică în reacții chimice; d) specifice; e) universale.

7) NADPH⁺:

a) coenzimă; b) fenol; c) proteină structurală; d) hexoză.

8) Partea enzimei în care are loc nemijlocit cataliza:

a) centrul alosteric; b) centrul activ; c) coenzima.

9) Coenzime:

a) nucleotide; b) vitamine; c) glucide;

d) metale; e) acizi grași.

Lucrarea de laborator №9

Analiza calitativă a vitaminelor

Obiectivele lucrării de laborator

1. De efectuat reacții de culoare ale vitaminelor hidrosolubile.
2. De efectuat reacții de culoare ale vitaminelor liposolubile.
3. De aprofundat cunoștințele studenților despre structura, funcțiile și importanța vitaminelor pentru organismele vii.

Caracteristica generală a vitaminelor. *Vitaminele* sunt substanțe organice micromoleculare cu rol funcțional care se găsesc în cantități mici în alimente și sunt indispensabile pentru creșterea și dezvoltarea normală a organismelor. Majoritatea vitaminelor, în special cele hidrosolubile, îndeplinesc rolul de coenzime (anexa 3), iar altele îndeplinesc rolul de activatori enzimatici. Termenul de vitamină (amină vitală) a fost folosit pentru prima dată de biochimistul polonez Casimir Funk în 1912, care a izolat din

tărâțele de orez o substanță ce vindeca boala beri-beri. Ulterior s-a stabilit că nu toate vitaminele (ex. vitamina C) conțin azot în molecula lor. Lipsa totală a unei vitamine din organism se numește *avitaminoză*, boală care provoacă tulburări grave ale metabolismului celular sau chiar moartea organismelor. Lipsa parțială a vitaminelor este cunoscută sub numele de *hipovitaminoză*, iar tulburările metabolice în acest caz sunt mai puțin grave. Excesul de vitamine din alimentație, în special a vitaminelor liposolubile, poate determina apariția *hipervitaminozei*, care de asemenea provoacă dezechilibre în desfășurarea normală a metabolismului.

Clasificarea vitaminelor. Vitaminele se denumesc cu ajutorul literelor mari din alfabetul latin (A, B, C, D, E, K). După rolul fiziologic ce-l îndeplinesc în organism, vitaminele se denumesc astfel: vitamină antihemoragică (vitamina K), creșterii (vitamina A), antirahitică (vitamina D), antisterilității (vitamina E), antiscorbutică (vitamina C), antiberiberi (vitamina B₁). După solubilitatea vitaminelor în apă sau solvenți organici, acestea se clasifică în vitamine *hidrosolubile* și vitamine *liposolubile*.

Vitamine hidrosolubile

Vitamina B₁ (tiamină); Vitamina B₂ (riboflavină)
Vitamina B₃ (acid pantotenic)
Vitamina B₅ (nicotinamidă, acid nicotinic)
Vitamina B₆ (piridoxină, piridoxamină, piridoxal)
Vitamina B₁₂ (cianocobalamină)
Vitamina B₁₅ (acid pangamic)
Vitamina B₉ sau Bc (acid folic)
Vitamina C (acid ascorbic); Vitamina H sau B₈ (biotină)

Vitamine liposolubile

Vitamina A (retinol)
Vitamina D (ergocalciferol, colecalciferol)

Vitamina E (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol)

Vitamina K (filochinonă, menachinonă)

Funcția de coenzimă a vitaminelor. La începutul sec. XX, în cadrul studierii proceselor de descompunere oxidativă a glucidelor, s-a reușit pentru prima dată separarea coenzimei *glucozo-6-fosfatdehidrogenaza* în a cărei componentă intră nicotinamidă. Ulterior s-a stabilit că amida acidului nicotinic, precum și alte vitamine formează în celule importante sisteme de oxido-reducere, care iau parte la numeroase procese metabolice ale glucidelor, lipidelor, proteinelor și a altor compuși, reglează potențialul de oxido-reducere celular, contribuie la transportul hidrogenului pe cale neenzimatică (vitaminele C, E, K etc.). Coenzimele conțin două regiuni funcționale, una dintre care realizează legătura cu apofermentul, iar alta participă nemijlocit la cataliză. De regulă, forma activă a vitaminelor participă la cataliză.

Caracteristica succintă a unor vitamine. *Vitamina B₁ (tiamină)* a fost descoperită de către C. Funk în 1912. Se conține în cantități mai mari în drojdia de bere, semințele cerealelor și leguminoaselor. Vitamina B₁ este formată dintr-un nucleu pirimidinic și unul tiazolic uniți printr-o grupare metilenică (fig. 39). Vitamina B₁ are un rol însemnat în metabolismul glucidelor, lipidelor și al protidelor. Sub formă de coenzima *tiaminpirofosfat* (TPP), vitamina B₁ face parte din structura carboxilazei, care produce decarboxilarea și respectiv carboxilarea acidului piruvic. Lipsa acestei vitamine din hrană produce la om tulburări ale sistemului nervos, oboseală, tulburări gastrointestinale și cardiace. În cazul de avitaminoză prelungită apare boala *beri-beri*.

Vitamina B₂ (riboflavină) a fost separată pentru prima dată din lapte și obținută în formă cristalină în anul 1933. Cantități mari de vitamina B₂ se găsesc în ficat, lapte,

ouă, drojii și în semințele gramineelor. Riboflavina este formată dintr-un nucleu izoaloxazinic și din ribitol (fig. 40). Formele active ale vitaminei B₂ (*FMN-flavinmononucleotidă* și *FAD-flavinadenindinucleotidă*) sub formă de coenzime intră în componența a circa 30 de enzime. La om avitaminoza produce iritații ale pielii, căderea părului, tulburări de creștere, slăbirea văzului și auzului, tulburări digestive.

Vitamina B₃ (PP, nicotinamidă) este amida acidului nicotinic și se mai numește *nicotinamidă*. Acidul nicotinic reprezintă precursorul nicotinamidei în organism (fig. 41). Se conține în cantități mai mari în târâțele cerealelor, ciuperci, lapte, ficat etc. Vitamina B₃ are un rol biochimic foarte important în metabolismul celular, deoarece intră în componența enzimelor anaerobe – *dehidrogenaze* ce conțin NAD⁺ – *nicotinamadenindinucleotid* și NADP⁺ – *nicotinamadenindinucleotidfosfat*. Aceste enzime catalizează peste 100 de reacții biochimice: oxidarea alcoolilor în aldehide și cetone, aldehidelor și cetonelor în acizi carbonici, aminelor în imine etc. Pe lângă aceasta, forme active ale vitaminei B₃ participă la reglarea unor procese biochimice importante precum ciclul Krebs. La om, în cazul avitaminozei de B₃, se dezvoltă boala celor “trei D” – dermatita, diareea, demența. Dacă starea de avitaminoză se menține un timp mai îndelungat, la oameni apare boala numită *pelagră* (lat. “pella agra” – piele aspră). Numele de vitamină PP provine de la proprietatea pe care o are această vitamină de a preveni pelagra.

Vitamina B₆ are trei derivați piridinici importanți – *piridoxină*, *piridoxamină* și *piridoxal* (fig. 42). Aceste trei substanțe se găsesc de obicei împreună și se transformă reciproc una în alta. Prin fosforilarea piridoxalului și piridoxinei se obțin coenzime care iau parte la decarboxilarea și transaminarea aminoacizilor.

Piridoxalfosfatul sub formă de coenzimă intră în componența a peste 50 de enzime care catalizează reacții ale metabolismului acizilor aminici. Vitamina B₆ se găsește în cantități mai mari în drojdii, germeni de grâu, tărâțe de orez, fructe și legume proaspete, ficat, pește etc. La om stările de avitaminoză se manifestă prin artrite, tulburări cardiace, stări de nervozitate și insomnii.

Vitamina A (retinol), descoperită în anul 1916 de către J. Drummond, se mai numește *vitamina creșterii*. Din punct de vedere chimic, vitamina A este un alcool care are în moleculă un inel β-iononic, o catenă laterală ce conține două resturi de izopren și gruparea terminală -CH₂OH (fig. 43). Vitamina A se află sub formă de provitamine (*carotenoide*) în legume și fructe, dar în cantități mai mari în morcov, fructe citrice, măcieș, iar în stare liberă în untura de pește, ficat, lapte, gălbenușul de ou, unt. Vitamina A are un rol important în dezvoltarea embrionară normală, protejarea țesuturilor epiteliale, procesele fotochimice ale vederii, reglează permeabilitatea membranelor celulare. Lipsa vitaminei A în organismul omului determină tulburări oculare specifice, precum pierderea capacității de adaptare a vederii la întuneric.

Vitaminele D (ergocalciferol, colecalciferol) sunt substanțe care derivă de la *steroli (provitamine)*. Toate vitaminele D au o grupare hidroxilică la C-3, un inel deschis (inelul B) cu trei legături duble conjugate și o catenă laterală caracteristică fiecărei vitamine (fig. 44). Se găsesc în astfel de alimente de origine animală precum laptele, ouăle, untul de vacă atât în stare liberă cât și sub formă de steroli. Transformarea sterolilor în vitamine D se face sub acțiunea energiei solare, a radiațiilor ultraviolete, printr-un proces fotochimic cu consum de energie. Rolul fundamental al vitaminei D constă în reglarea metabolismului calciului și al fosforului în procesul de osificare. În avitaminoze D apare

rahitismul la copii și osteoporoza la adulți. Excesul de vitamine D duce la demineralizarea oaselor și la apariția calculilor renali, hepatici, etc.

Vitaminele E (tocoferoli, lat. “tokos” – naștere, “ferro” – a purta) se mai numesc vitamine de reproducere și se găsesc în cantități mai mari în frunze, muguri, semințe germinate, drojdii, tărațe, ou, carne. Vitaminele E sunt derivați ai cromanolului. Ele conțin în molecula lor o grupare hidroxilică la C-6, grupări metilice și o catenă laterală ce derivă din fitol. Se cunosc 7 tocoferoli notați cu litere grecești α , β , γ , δ , ϵ , etc., care se deosebesc după gradul de metilare a inelului cromanic și activitatea biologică. Cel mai răspândit și mai important este α -tocoferolul (fig. 45). Tocoferolii protejează oxidarea vitaminelor A, C, D, H (biotina), lipidelor, mențin integritatea membranelor biologice, favorizează fosforilarea și formarea compușilor macroergici, participă la sinteza hemului. Avitaminaza E determină la animale și uneori la om scăderea capacității de reproducere, sterilitate, dereglări metabolice, decalcifiere, scăderea rezistenței organismului la infecții, stări nervoase etc.

Vitaminele K (filochinonă, menachinonă) se mai numesc și vitamine pentru coagularea sângelui sau antihemoragice. Ele determină coagularea sângelui prin transformarea fibrinogenului în fibrină, formează în celule importante sisteme de oxido-reducere. Se găsesc în cantități mai mari în frunzele de spanac, varză, lucernă, trifoi, microflora intestinului. Vitaminele K sunt formate dintr-un nucleu naftochinonic, care are substituit la C-3 o grupare metilică și la C-2 o catenă laterală (fig. 46). Pe lângă vitaminele naturale K, au fost obținuți un șir de derivați naftochinonici prin sinteză chimică. Astfel, vicasolul (fig. 47) este un analog al fitochinonei sintetizat artificial. Lipsa vitaminei K apare datorită bolilor care împiedică biosinteza

vitaminei în intestin sau prin administrarea îndelungată de sulfamide și antibiotice.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Diazoreactiv (5 picături de soluție de acid sulfanilic 1% într-o soluție de HCl 2% + 5 picături de soluție NaNO₂).
- 2) Na₂CO₃ (soluție de 10%).
- 3) HCl concentrat.
- 4) Praf de zinc.
- 5) CH₃COOH concentrat.
- 6) Cu (CH₃COO)₂ (soluție de 2%).
- 7) FeCl₃ (soluție de 1%).
- 8) Fiole.
- 9) Pipete.
- 10) Baie de apă.
- 11) Soluții de vitamine B₁, B₂, B₅, B₆.
- 12) H₂SO₄ concentrat.
- 13) Reactiv anilinic (anilină în HCl concentrat – 15:1).
- 14) HNO₃ concentrat.
- 15) Cisteină (soluție de 0,025%).
- 16) NaOH (soluție de 10%).
- 17) Vitamina A (soluție uleioasă în cloroform în raport 1:5).
- 18) Vicasol (soluție de 0,05%).

Determinarea calitativă a vitaminelor hidrosolubile

Experimentul 1. Reacția la vitamina B₁

Vitamina B₁ la interacțiunea cu diazoreactiv în mediu bazic colorează soluția în culoarea roșie ca urmare a formării unui compus complex cu acidul diazobenzosulfuric.

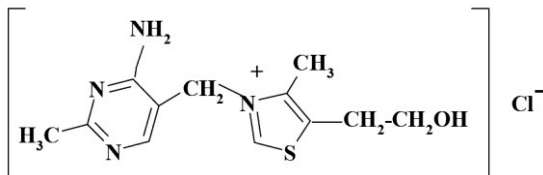


Fig. 39. Vitamina B₁

În 10 picături de diazoreactiv se adaugă 2-4 picături de vitamina B₁ și 5-7 picături de soluție 10% Na₂CO₃. Se observă schimbarea culorii soluției.

Experimentul 2. Reacția la vitamina B₂ (riboflavină)

Reacția la vitamina B₂ se bazează pe capacitatea sa de a se reduce ușor. Reacția de reducere este însoțită de schimbarea culorii soluției din galben în roz sau roșie, ulterior soluția se decolorează.

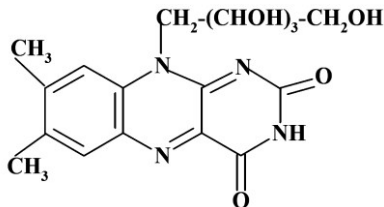


Fig. 40. Vitamina B₂ (riboflavină)

În fiolă se dozează 10 picături de vitamină B₂, se adaugă 5 picături de HCl concentrat și puțin praf de zinc. Se observă schimbarea culorii soluției.

Experimentul 3. Reacția la vitamina B₅

Vitamina B₅ cu CH₃COOH interacționează cu Cu(CH₃COO)₂ și colorează soluția în albastru, formând săruri de cupru ale acidului nicotinic.

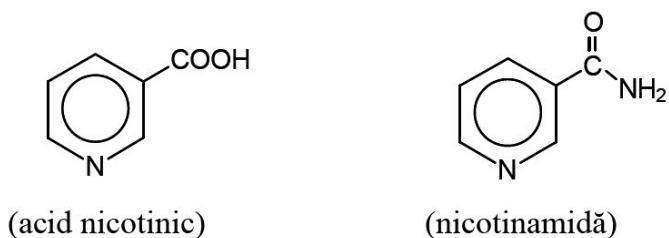


Fig. 41. Vitamina B₅

Într-o fiolă cu o soluție de 1% vitamină B₅ se adaugă o picătură de CH₃COOH și se agită. Apoi din fiolă se iau 20 de picături și se încălzesc până la fierbere, iar soluția se limpezește. În soluția încălzită de vitamină B₅ se adaugă 20 de picături de soluție 2% Cu(CH₃COO)₂, soluția din fiolă iarăși se încălzește până la fierbere și se răcește sub un jet de apă rece. Se observă modificarea culorii soluției.

Experimentul 4. Reacția la vitamina B₆

La interacțiunea vitaminei B₆ cu clorid de fier soluția se colorează în roșu datorită formării unei săruri complexe de tipul fenolatului de fier.

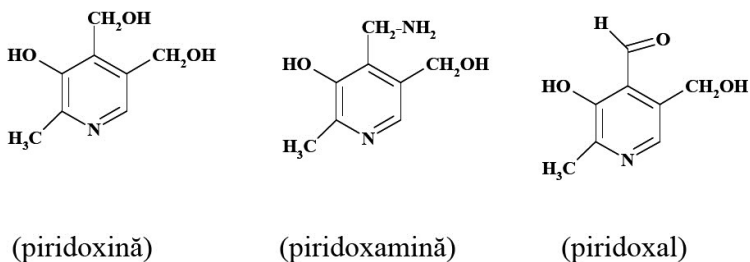


Fig. 42. Vitamine B₆

La 5 picături de soluție de vitamină B₆ se adaugă 5 picături de soluție FeCl₃ și se agită. Se observă schimbarea culorii soluției.

Determinarea calitativă a vitaminelor liposolubile

Experimentul 5. Reacția la vitamina A

La interacțiunea soluției de vitamină A în cloroform cu acid sulfuric concentrat se formează un complex din câteva de molecule de vitamină A, iar soluția se colorează în roșu-brun.

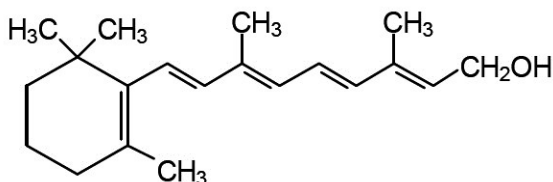


Fig. 43. Vitamina A

Pe sticlă uscată se amestecă 6 picături de soluție de vitamină A în cloroform cu o picătură de H₂SO₄ concentrat. Se observă schimbarea culorii soluției.

Experimentul 6. Reacția la vitamina D

La încălzirea soluției de vitamină D în cloroform cu un amestec de anilină și acid azotic concentrat soluția se colorează în roșu.

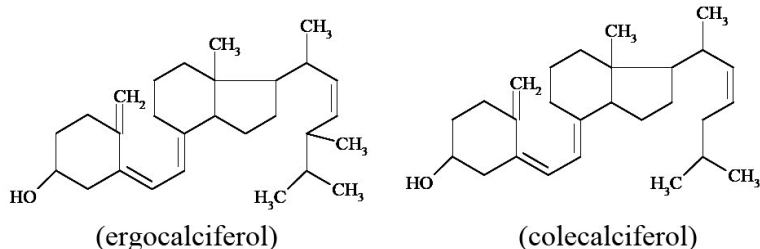


Fig. 44. Vitamine D

Într-o fiolă cu 1-2 picături de vitamină D în cloroform se adaugă 1 picătură de soluție de anilină. După agitare și încălzire se observă schimbarea culorii soluției.

Experimentul 7. Reacția la vitamina E

La interacțiunea vitaminei E cu acid azotic se observă colorarea soluției în galben.

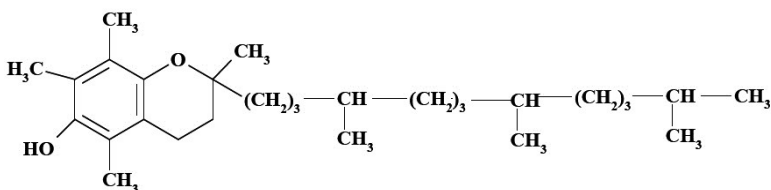
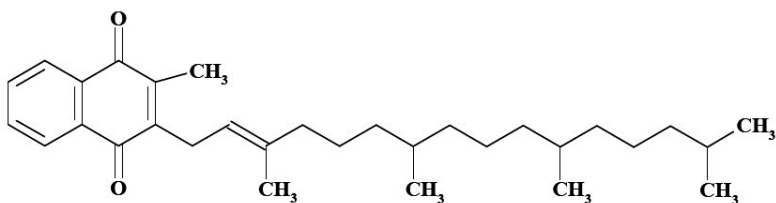


Fig. 45. α -tocoferol

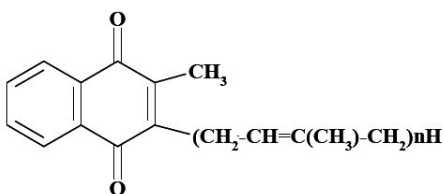
Într-o fiolă uscată se dozează 3 picături de soluție de vitamină E, se adaugă atent 6 picături de HNO_3 concentrat, iar eprubeta se agită ușor. Se formează o emulsie care se depune în mai multe straturi și se observă colorarea stratului uleios superior.

Experimentul 8. Reacția la vitamina K

Sunt cunoscute două vitamine naturale K: vitamina K₁ (filochinonă) și K₂ (menachinonă).



(filochinonă)



(menachinonă; n = 6, 7 sau 9)

Fig. 46. Vitamine K₁ și K₂

Un analog sintetizat chimic al vitaminei K₁ este vicasolul. La interacțiunea vicasolului cu cisteină în mediu bazic soluția se colorează în galben-deschis.

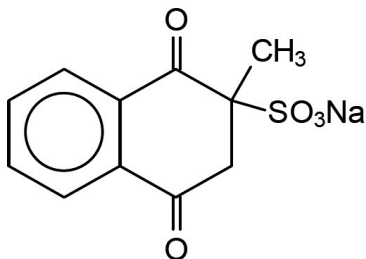


Fig. 47. Vicasol

În fiolă se dozează 5 picături soluție de vicasol, se adaugă 5 picături soluție de cisteină și 1 picătură de soluție 10% NaOH. Se observă schimbarea culorii soluției.

Întrebări și teste de control

1) Completați tabelul.

Nr	Denumirea vitaminei	Denumirea coenzimei	Tipul de reacție catalizată	Exemple de enzime
1				

2) Microflora intestinului sintetizează vitamina:

a) K; b) E; c) H; d) C.

3) Vitamina D se conține în:

a) grăsime de pește; b) fructe de pădure; c) gălbenuș de ou; d) coacăză; e) lapte.

4) Selectați termenii care nu se încadrează în grupul tematic respectiv și explicați de ce le-ați separat:

a) B₁; B₂; C; H; K.

b) A; D; B₁₂; E; K.

5) Vitaminele îndeplinesc funcții:

a) catalitice; b) de structură; c) energetice;

d) de transport; e) de protecție.

Lucrarea de laborator №10

Determinarea conținutului de vitamină C

Obiectivele lucrării de laborator

1. De însușit determinarea conținutului de vitamină C în produsele alimentare folosind metoda de titrare.

2. De învățat metoda fotocolorimetrică de determinare a vitaminei C.
3. De determinat conținutul de vitamină C în materialul vegetal analizat.
4. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre proprietățile chimice și importanța biologică a vitaminei C pentru organismele vii.

Caracteristica succintă a vitaminei C. Vitamina C sau acidul ascorbic, cea mai răspândită vitamină în natură, se sintetizează în plante din galactoză, iar la animale, cu excepția omului, maimuței și cobaiului, din glucoză. Pentru omul adult doza zilnică este de 50-100 mg. Vitamina C stimulează metabolismul glucidelor, lipidelor, a unor aminoacizi (tirozina, fenilalanina) și compuși aromatici. Acidul ascorbic are o acțiune antioxidantă de apărare a vitaminelor liposolubile și a glutatationului. Are acțiune antitoxică, mărește rezistența organismului la infecții și este un factor activator pentru numeroase enzime. Avitaminaza C produce la om boala numită scorbut, caracterizată prin hemoragii la nivelul gingiilor, pierderea dinților, tulburări digestive, anemie, imunitate scăzută. Cele mai bune surse de vitamină C sunt fructele citrice, tomatele, cartofii, coacăze, căpșuni, conopidă, spanac, kiwi, papaya, ardeii iuți.

Acidul ascorbic și acidul dehidroascorbic formează în celule un sistem de oxido-reducere foarte important, care ia parte la numeroase procese metabolice în organism. Acest sistem reglează potențialul de oxido-reducere celular și contribuie la transportul hidrogenului pe cale neenzimatică. Forma oxidată a acidului ascorbic se numește acid dehidroascorbic (fig. 48).

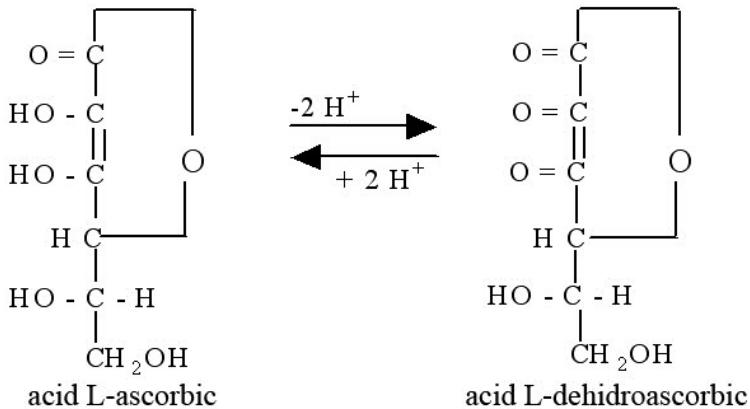


Fig. 48. Clivarea și atașarea hidrogenului la acidul ascorbic

La plantele din familia *Cruciferae* (varză, ridiche, hrean, rapiță, nap etc.) acidul ascorbic se găsește atât în stare liberă, cât și asociat cu proteine, formând un complex proteină-acid ascorbic, numit *ascorbinogen* (fig. 49).

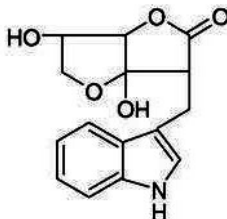


Fig. 49. Ascorbinogen

Această substanță în prezența acidului clorhidric se hidrolizează ușor formând acid ascorbic liber. Ascorbinogenul se hidrolizează în tractul digestiv.

Proprietățile chimice ale acidului ascorbic. Caracterul acid al acidului ascorbic, care este lipsit de gruparea carboxilică $-\text{COOH}$, este determinat de grupa $-\text{OH}$ enolică la C_3 . Iată de ce, acidul ascorbic interacționează cu baze diluate și formează săruri (fig. 50).

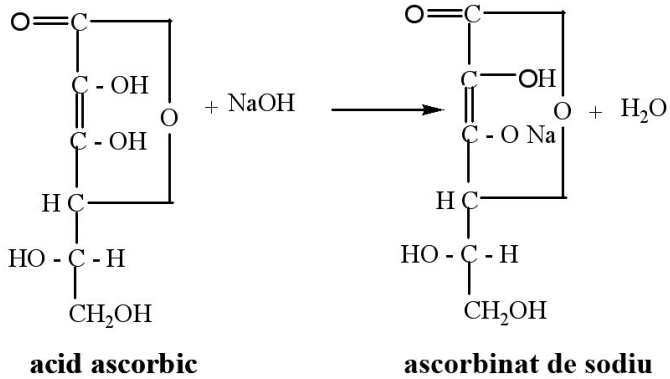


Fig. 50. Interacțiunea acidului ascorbic cu bază

Iodul, 2,6-diclorfenolindofenolul și alți oxidanți reduc acidul ascorbic până la acid dehidroascorbic (fig. 51).

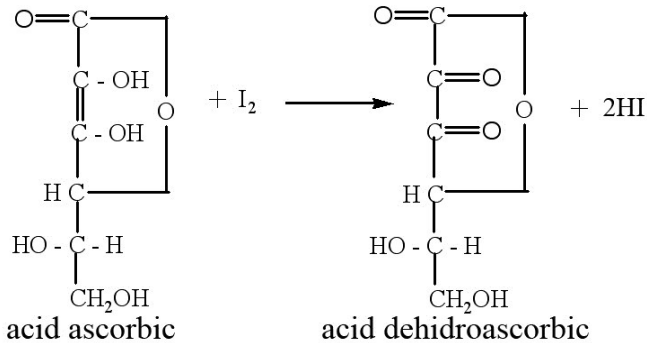


Fig. 51. Interacțiunea acidului ascorbic cu iodul

În prezența unor oxidanți mai puternici, în special în mediul neutru și bazic, acidul ascorbic se transformă ireversibil în acid oxalic și treonic (fig. 52).

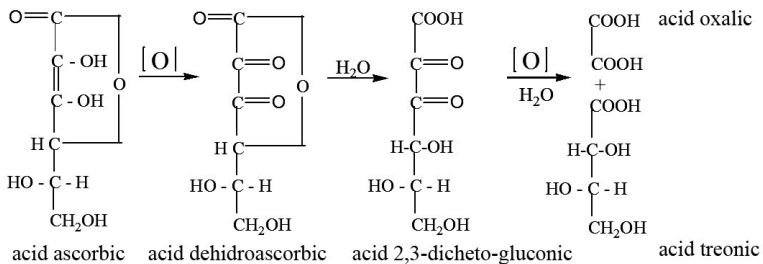


Fig. 52. Distrugerea acidului ascorbic în mediu bazic cu formarea acizilor oxalic și treonic

Vitamina C este foarte instabilă și se distruge în mediul neutru și bazic la temperatura 20°C, în prezența luminii, oxigenului, cationilor metalelor grele, enzimelor din clasa *oxidoreductazelor* (ascorbatoxidazei și polifenoloxidazei). Conținutul de acid ascorbic se reduce mult în procesul de păstrare a materiei prime alimentare, la conservarea și fierberea alimentelor.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) Fotocolorimetru.
- 2) Baloane cotate de 100 cm³.
- 3) Baloane cotate de 50 și 100 cm³.
- 4) Mojar cu pistil.
- 5) Pipete de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 cm³.
- 6) Cântar tehnic.
- 7) Sare de sodiu (soluție de 0,001n 2,6-diclorfenolindofenol).
- 8) Acid oxalic (soluție de 1%).
- 9) Cristale de acid ascorbic.
- 10) Filtru din hârtie.
- 11) Materie primă vegetală.

Experimentul 1. Determinarea cantitativă a acidului ascorbic folosind metoda Tillmans

Principiul metodei. Metoda se bazează pe capacitatea acidului ascorbic de a se oxida până la acid dehidroascorbic sub acțiunea 2,6-diclorfenolindofenol. În mediu bazic 2,6-diclorfenolindofenol are culoare albastră, în mediu acid – roșie, iar în cazul reducerii se decolorează.

Se cântărește și se mărunțește în mojar 1g de material vegetal, în care se adaugă apoi 9 ml soluție 2% HCl. Peste 10 min conținutul mojarului se amestecă și se filtrează. Apoi 3 ml de filtrat se dozează într-un balon conic și se titrează cu soluție 0,0005 M 2,6-diclorfenolindofenol. Se determină cantitatea de 2,6-diclorfenolindofenol folosit pentru titrare. Conținutul de acid ascorbic (mg/100 g produs) se determină ținând cont de faptul că 1 ml de 0,0005 M 2,6-diclorfenolindofenol corespunde cu 0,088 mg de acid ascorbic. Rezultatele experimentale se compară cu datele teoretice (tab. 3).

Tab. 3. Conținutul de vitamină C (G. Neamțu, 1993)

Denumirea produsului	Conținutul de acid ascorbic (mg /100 g)
Varză albă	17-25
Ceapă	60
Cartofi	15-22
Lămâi	40
Mărar	100-150
Mere	3-17
Struguri	3-12
Tomate	20-25
Pătrunjel	150
Coacăză neagră	100-400

Experimentul 2. Metoda fotocolorimetrică de determinare a acidului ascorbic

Principiul metodei. La soluția de acid ascorbic se adaugă 2,6-diclorfenolindofenol și se determină reducerea intensității culorii cu ajutorul fotocolorimetrului.

Proba produsului analizat (10 g) se pune în mojar, se mărunțește cu pistilul în prezența acidului oxalic de 1%, se transferă în balonul cotat de 100 cm³, apoi se aduce până la cotă cu acid oxalic și se agită. Conținutul balonului se filtrează într-un balon conic și se adaugă 6 cm³ 2,6-diclorfenolindofenol. Soluția obținută se transferă în cuvele fotocolorimetrului și se determină densitatea optică D_1 la $\lambda=540$ în raport cu apa distilată.

În cuvele cu soluție analizată se adaugă câteva cristale de acid ascorbic (culoarea 2,6-diclorfenolindofenolului dispare) soluția se agită, se fotocolorimetrează și se determină densitatea optică D_2 . Densitatea optică a soluției se calculează după formula: $D_x = D_1 - D_2$

Pentru a introduce o corecție la schimbarea intensității culorii la păstrarea soluției de 2,6-diclorfenolindofenol, se măsoară extincția amestecului (D_0), format din 10 cm³ de 2,6-diclorfenolindofenol, 6 cm³ de soluție de 1 % de acid oxalic. Ulterior se măsoară extincția (D) soluției proaspăt pregătite de 2,6-diclorfenolindofenol, din care se scade extincția (D_0).

Densitatea optică a soluției analizate se determină după formula:

$$D_x = D_1 + (D - D_0) - D_2$$

Corecția ($D-D_0$) se include în calcul atunci când calibrarea și determinarea D_1 și D_2 nu se face în aceeași zi.

Cu ajutorul unui grafic de calibrare se determină conținutul de acid ascorbic D_X . Pentru a alcătui graficul de calibrare 10 cm^3 soluția de acid ascorbic se transferă într-un balon cotate de 100 cm^3 și se aduce la cotă cu soluție de 1% acid oxalic (concentrația soluției diluate de substrat ascorbic este 100 mg/cm^3).

Experimentul 2. Metoda fotocolorimetrică de determinare a acidului ascorbic

Principiul metodei. La soluția de acid ascorbic se adaugă 2,6-diclorfenolindofenol și se determină reducerea intensității culorii cu ajutorul fotocolorimetrului.

Proba produsului analizat (10 g) se pune în mojar, se mărunțește cu pistilul în prezența acidului oxalic de 1%, se transferă în balonul cotate de 100 cm^3 , apoi se aduce până la cotă cu acid oxalic și se agită. Conținutul balonului se filtrează într-un balon conic și se adaugă 6 cm^3 2,6-diclorfenolindofenol. Soluția obținută se transferă în cuvele fotocolorimetrului și se determină densitatea optică D_1 la $\lambda=540$ în raport cu apa distilată.

În cuvele cu soluție analizată se adaugă câteva cristale de acid ascorbic (culoarea 2,6-diclorfenolindofenolului dispare) soluția se agită, se fotocolorimetrează și se determină densitatea optică D_2 .

Densitatea optică a soluției se calculează după formula: $D_X = D_1 - D_2$

Cu ajutorul unui grafic de calibrare se determină conținutul de acid ascorbic D_X .

Pentru a alcătui graficul de calibrare 10 cm^3 soluția de acid ascorbic se transferă într-un balon cotate de 100 cm^3 și se aduce la cotă cu soluție de 1% acid oxalic (concentrația soluției diluate de substrat ascorbic este 100 mg/cm^3).

În șase cilindre cu volumul de 20 cm³ se dozează de la 1 cm³ până la 6 cm³ soluție de acid ascorbic (care corespunde cu concentrațiile de 100; 200; 300; 400; 500; 600 mkg/cm³) și se amestecă cu 10 cm³ de soluție proaspăt pregătită de 2,6-diclorfenolindofenol. În fiecare cilindru volumul se aduce la cotă până la 16 cm³ cu soluție de acid oxalic 1%. Se determină densitatea optică a probelor, se completează tabelul și se desenează graficul – densitatea optică-conținutul de acid ascorbic mkg/cm³ (fig. 53).

Graficul de calibrare

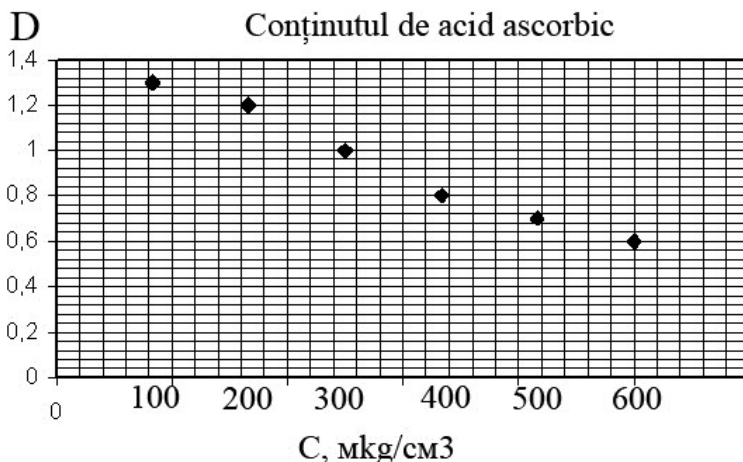


Fig. 53. Densitatea optică – conținutul de acid ascorbic, mkg/cm³

Recalcularea în mg (mg/100g produs) se realizează după formula:

$$X = \frac{C \times 100}{a \times 1000}$$

unde: **X** – conținutul de vitamină C în produsul analizat, mg/100 g produs;

C – conținutul de vitamină C din graficul de calibrare, mkg/cm³;

a – masa probei, g;

100 – recalcularea la 100 g produs;

1000 – recalcularea mg în mkg.

Întrebări de control

- 1) Care sunt proprietățile fiziologice ale acidului ascorbic?
- 2) Descrieți structura și proprietățile chimice ale acidului ascorbic.
- 3) În care produse vegetale acidul ascorbic se găsește în cantități mai mari ?
- 4) Descrieți metoda Tillmans de determinare cantitativă a vitaminei C.
- 5) Descrieți metoda fotocolorimetrică de determinare a acidului ascorbic.
- 6) Care reguli de securitate trebuie respectate la îndeplinirea acestei lucrări de laborator?

IV. Glucide

Lucrarea de laborator №11

Analiza calitativă a glucidelor

Obiectivele lucrării de laborator

1. De realizat reacții de culoare ale glucidelor.
2. De caracterizat în aspect comparativ mono- și diglucidele.

3. De generalizat și aprofundat cunoștințele studenților despre structura, funcțiile și importanța biologică a glucidelor.

Caracteristica succintă a glucidelor. Glucidele sunt compuși organici macromoleculari, molecule ciclice care conțin C, O, H. La majoritatea glucidelor H și O se conține în același raport ca și în H₂O (C₆H₁₂O₆). După capacitatea de a se hidroliza, se deosebesc monoglucide, diglucide și poliglucide.

Monoglucidele nu se hidrolizează în glucide mai simple, spre deosebire de di- și poliglucide. Monoglucidele sunt alcătuite dintr-o grupă carbonilică (aldehidică sau cetonică) și câteva grupe hidroxilice. Monoglucidele care conțin grupa aldehidică se numesc *aldoze*, iar cele care conțin grupa cetonică – *cetoze*. Dacă gruparea hidroxil este situată în dreapta față de primul atom de C (lângă grupa alcoolică CH₂OH), atunci monoglucida face parte din grupa D, dacă gruparea hidroxil este situată la stânga față de primul atom de C, atunci monoglucida se referă la gruparea L, în dependență de aranjarea spațială a hidroxilului glicozidic, monoglucidele se împart în α și β forme anomerice.

Cele mai răspândite monoglucide sunt pentozele și hexozele (fig. 54, 55).

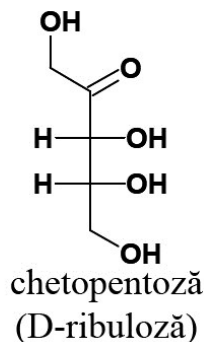
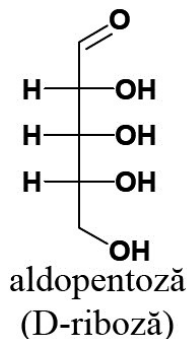


Fig. 54. Pentoze

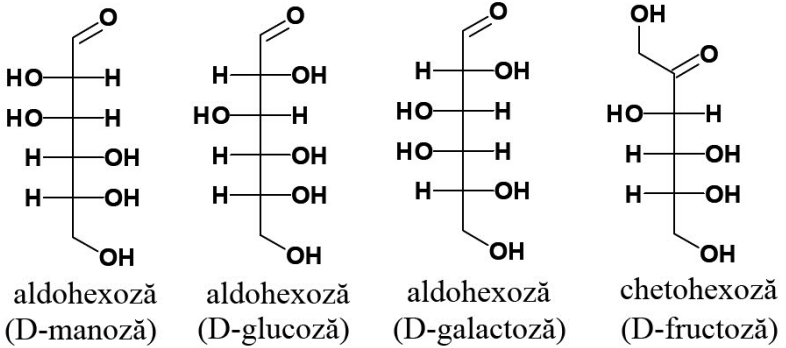
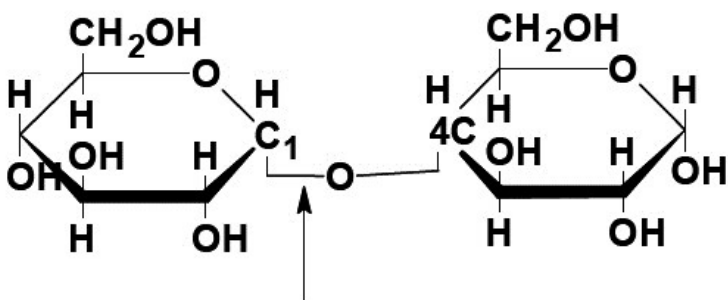


Fig. 55. Hexoze

Diglucidele sunt alcătuite din două resturi identice sau diferite de monoglucide. La diglucide de *tip maltoză* (maltoza, celobioza, lactoza etc.) legătura dintre monoglucide se realizează cu participarea hidroxilului glicozidic al unui monoglucid și hidroxilului alcoolic al altui monoglucid. Diglucidele de acest tip conțin un hidroxil semiacetalic liber și sunt reducătoare. Astfel, maltoza este alcătuită din două molecule de α -glucoză legate prin legătură α -(1,4)-glicozidică (fig. 56), celobioza este alcătuită din două molecule de β -glucoză legate prin legătură β -(1,4)-glicozidică, iar lactoza este alcătuită dintr-o moleculă de α -glucoză și o moleculă de β -galactoză asociate prin legătură α,β -(1,4)-glicozidică.



legătură α -(1-4) glicozidică

Fig. 56. Maltoză. Legătură α -(1-4)-glicozidică

La diglucide de tip *trehaloză* (trehaloza, zaharoza etc.) legătura dintre monoglucide se realizează cu participarea ambilor hidroxili glicozidici. Diglucidele de acest tip nu sunt reducătoare. Zaharoza este alcătuită dintr-o moleculă de α -glucoză și o moleculă de β -fructoză asociate prin legătură α -(1,2)-glicozidică (fig. 57).

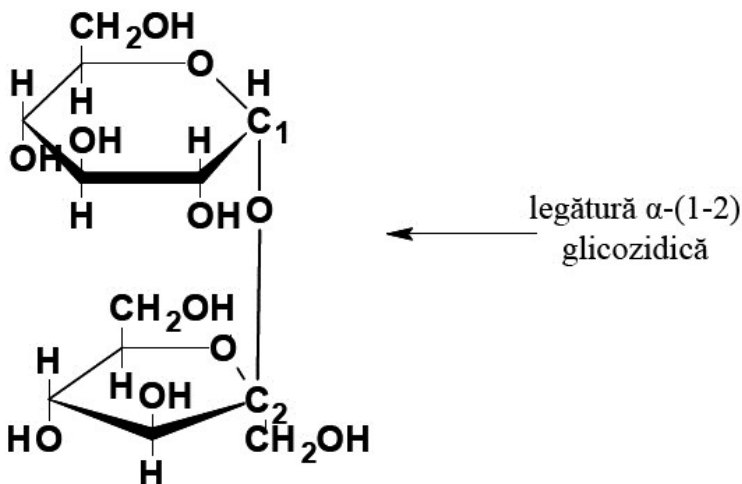


Fig. 57. Zaharoză. Legătură α -(1-2)-glicozidică

Poliglucidele sunt glucide macromoleculare care conțin mai mult de 10 resturi de monoglucide. În poliglucidele de natură vegetală sunt prezente legături (1-4) și (1-6) glicozidice, iar în poliglucidele de natură bacteriană și animală se întâlnesc și legături (1-3), (1-2) glicozidice. Poliglucidele se clasifică în:

1. Homoglucide (*poliglucide omogene* sau *homoglucani*) care sunt alcătuite din resturi ale unui monoglucid. Astfel, amidonul este alcătuit doar din resturi de α -glucoză, iar diglucidul amidonului este maltoza. Celuloza este alcătuită din resturi de β -glucoză, iar diglucidul celulozei este celobioza.

2. Heteroglucide (*poliglucide neomogene* sau *heteroglicani*) sunt alcătuite din diferite resturi de monoglucide. Astfel, hemicelulozele sunt substanțe complexe care dau prin hidroliză pentoze (L-arabinoză, D-xiloză), hexoze (D-glucoză, D-galactoză) și acid galacturonic.

Poliglucidele se hidrolizează, precum diglucidele, doar în mediu acid.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) NaOH (soluție de 5%).
- 2) CuSO₄ (soluție de 5%).
- 3) Rezorcină.
- 4) HCl (soluție de 25%).
- 5) Reactivul Barfed (6,5 g de Cu(CH₃COO)₂ se dizolvă în 100 ml de apă fierbinte la o t = 70°C, amestecul se filtrează și se adaugă 1 ml de CH₃COOH).
- 6) Soluția Lugol (0,3 g de iod și 0,6 g de potasiu iodat se dizolvă în 15 ml de apă distilată, se diluează cu apă până la volumul de 100 ml).

- 7) Fiole, pipete, baie de apă, baghete de sticlă.
- 8) Glucoză (soluție de 5%).
- 9) Fructoză (soluție de 5%).
- 10) Lactoză (soluție de 5%).
- 11) Maltoză (soluție de 5%).
- 12) Amidon (soluție de 0,1%).

Monoglucide

Experimentul 1. Reacția Trommer

Principiul metodei. Metoda este folosită pentru analiza calitativă a monoglucidelor reducătoare (glucoza, fructoza etc.). Monoglucidele în mediu bazic reduc oxidul de cupru (II) în oxid de cupru (I) și se formează un precipitat de culoare roșie-închisă.

Într-o fiolă se dozează 6 picături soluție 5% glucoză, 3 picături soluție 5% NaOH și 2 picături soluție 5% CuSO₄. Fiola se agită și se încălzește ușor până la schimbarea culorii soluției.

Experimentul 2. Reacția Selivanov la chetoze

Principiul metodei. La încălzirea fructozei sau a altor chetoze cu acid clorhidric și rezorcină se observă colorarea soluției în roșu-vișiniu.

Într-o fiolă se dozează 15 picături soluție 5% de fructoză, 3 picături soluție 25% HCl și câteva cristale de rezorcină. Acest amestec se încălzește la baia de apă, timp de 5-10 minute, la $t = 80^{\circ}\text{C}$, până la colorarea soluției.

Experimentul 3. Reacția Barfed

Principiul metodei. Metoda respectivă ne permite să deosebim monoglucidele reducătoare de diglucide. Oxidarea glucidelor nu se realizează în mediu bazic (vezi reacția Trommer), ci într-un mediu neutru. În aceste condiții diglucidele reducătoare, spre deosebire de monoglucide, practic nu se oxidează. La interacțiunea monoglucidelor cu reactivul Barfed se formează un precipitat de culoare roșie-brună.

Într-o fiolă se dozează 5 picături soluție 5% de glucoză, se adaugă 5 picături de reactiv Barfed. Amestecul se agită, se încălzește până la fierbere și se observă schimbarea culorii soluției.

Diglucide

Experimentul 4. Reacția Trommer

Principiul metodei. Diglucidele au proprietăți reducătoare datorită prezenței grupării aldehydice libere în molecula de lactoză (în restul de glucoză) și molecula de maltoză (în al doilea rest de glucoză).

Într-o fiolă se dozează 4 picături soluție 5% de lactoză (maltoză), se adaugă 3 picături soluție 5% NaOH și 2 picături soluție 5% CuSO₄. Conținutul fiolei se agită și se încălzește până la schimbarea culorii soluției.

Poliglucide

Experimentul 5. Reacția amidonului cu iodul

Principiul metodei. La interacțiunea amidonului cu iodul se formează un complex de adsorbție de culoare

albastră. La încălzire soluția se decolorează, însă reapare la răcire, fapt care vorbește despre formarea unui complex instabil dintre amidon și iod.

La 5 picături de soluție 0,1% amidon se adaugă o picătură soluție Lugol, soluția din fiolă se agită și se observă schimbarea culorii soluției.

Întrebări și teste de control

- 1) Ce reprezintă și care sunt funcțiile glucidelor în celulă?
- 2) După care criterii se clasifică glucidele?
- 3) Care este mecanismul de formare a diglucidelor?
- 4) Monoglucide:
 - a) fructoză ; b) amidon; c) glucoză;
 - d) celuloză; e) riboză; f) galactoză.
- 5) Diglucide:
 - a) glucoză; b) amidon; c) fructoză;
 - d) celuloză; e) zaharoză; f) maltoză.
- 6) Care din glucidele menționate participă la reacția Trommer?
 - A. Glucoza, fructoza, lactoza, trehaloza.
 - B. Zaharoza, riboza, arabinoza, xiloza.
 - C. Manoză, fructoza, galactoză, trehaloza.
 - D. Arabinoza, glucoza, zaharoza, riboza.
- 7) Care din glucidele menționate intră în reacție cu rezorcină în mediu acid?
 - A. Ribuloza, glucoza, riboza, manoză.
 - B. Manoză, xiluloza, arabinoza, galactoză.
 - C. Fructoza, riboza, glucoza, galactoză.
- 8) Care din glucidele menționate participă la reacția Barfed?
 - A. Glucoza, fructoza, riboza, lactoza.
 - B. Zaharoza, manoză, fructoza, galactoză.

- C. Riboza, lactoza, arabinoza, xiloza.
 D. Arabinoza, trehaloza, manoza, glucoza.
- 9) Care din glucidele menționate au proprietăți reducătoare?
 A. Zaxapoza, lactoza, maltoza.
 B. Celobioza, maltoza, trehaloza.
- 10) Selectați termenii care nu se încadrează în grupurile tematice respective și explicați de ce le-ați separat:
 a) amidon; glicogen; inulină; celuloză.
 b) celuloza; lignină; pectină; glicogen; amidon.
- 11) Care este monomerul celulozei?
 A. Chitină. B. Glucoză. C. Aminoacid.
 D. Carbon. E. Glicerină. F. Amidon.
- 12) Zaharoză:
 a) glucoză + glucoză; b) fructoză + glucoză;
 c) glucoză + galactoză; d) fructoză + fructoză.
- 13) Cel mai răspândit glucid pe Pământ este:
 a) zaharoza; b) amidon; c) celuloză;
 d) glicogen; e) hemiceluloză.

V. Lipide

Lucrarea de laborator №12

Analiza uleiurilor și grăsimilor vegetale

Obiectivele lucrării de laborator

1. De efectuat analiza calitativă a gliceridelor.
2. De analizat produsele hidrolizei gliceridelor.
3. De determinat conținutul de sare de bucătărie în margarină sau unt de vacă.

Caracteristica generală a lipidelor. *Lipidele* reprezintă o categorie de substanțe organice solubile în solvenți organici (cloroform, acetona, benzen, eter etilic),

dar insolubile în apă și săruri minerale. Lipidele simple reprezintă compuși alcătuiți doar din acizi grași și alcooli, iar lipidele compuse formează complexe cu proteine (*lipoproteide*), glucide (*glicolipide*), fosfor (*fosfolipide*).

În funcție de tipul alcoolului care intră în componența lipidelor, se deosebesc:

- *gliceride* (conțin glicerol);
- *ceride* (conțin alcooli alifatici superiori);
- *steroizi* (conțin alcooli policiclici – steroli).

Cele mai răspândite lipide în natură sunt gliceridele (fig. 58), esterii ai acizilor grași cu glicerolul, substanțe de rezervă care se acumulează în cantități mari în semințele și fructele la unele specii de plante și care se folosesc în industria alimentară la obținerea grăsimilor vegetale.

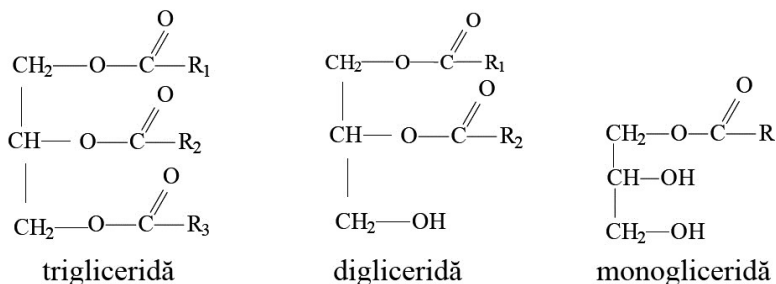


Fig. 58. Mono-, di-, și trigliceride (R_1 , R_2 , R_3 – radicali ai acizilor grași)

Acizii grași care intră în componența grăsimilor sunt:

- saturați, nu conțin legături duble (palmitic – $C_{15}H_{31}COOH$, stearic – $C_{17}H_{35}COOH$, arahidonic – $C_{19}H_{39}COOH$).
- nesaturați, care conțin legături duble, (oleic – $C_{17}H_{33}COOH$, linoleic – $C_{17}H_{31}COOH$, linolenic – $C_{17}H_{29}COOH$).

Gliceridele se clasifică în:

a) *grăsimi* – la $t = 20^{\circ}\text{C}$ au consistență solidă și conțin acizi grași saturați;

b) *uleiuri* – la $t = 20^{\circ}\text{C}$ au consistență lichidă și conțin acizi grași nesaturați, excepție fac uleiul de cocos și uleiul boabelor de cacao. Grăsimile lichide se transformă în solide prin hidrogenizarea la locul legăturilor duble (prepararea margarinei).

Funcțiile biologice ale lipidelor. Lipidele reprezintă o sursă energetică de bază a organismului și se descompun în mitocondrii până la CO_2 , H_2O și ATP. Un șir de lipide, precum fosfolipide, glicolipide și colesterolul, intră în componența membranelor celulare. Lipidele se păstrează în organismul animal cel mai des în țesutul adipos, îndeplinând funcții de termoizolare și de apărare de leziuni mecanice. Lipidele intră în componența hormonilor, participând astfel la reglarea metabolismului, asigură pătrunderea în celulă a substanțelor liposolubile, a vitaminelor D, E, A și a altor substanțe hidrofobe. Unele lipide fiind cofactori participă la reacții de transport transmembranar al electronilor, la coagularea sângelui.

Lipidele determină, în mare parte, valoarea nutritivă și calitățile gustative ale produselor alimentare. Acizii grași nesaturați din componența gliceridelor se oxidează datorită atașării oxigenului la locul legăturilor duble. Astfel, la acțiunea luminii, la contactul cu oxigen și cu vapori de apă grăsimile sunt supuse degradării, cunoscută sub denumirea de *râncezire*. Acumularea produselor de oxidare duce la pierderea proprietăților organoleptice și scăderea valorii nutritive a grăsimilor. Oxidarea grăsimilor poate fi prevenită prin introducerea antioxidanților – tocoferoli, hidrochinona, derivați ai acidului galic.

Reactive, vase, aparate și material biologic

- 1) K_2SO_4 cristalic.
- 2) CH_3COOH glacial.
- 3) HCl concentrat.
- 4) KOH (soluție de 10%) sau NaOH (soluție de 60%) în C_2H_5OH .
- 5) $NaHCO_3$ (soluție de 1%).
- 6) $CaCl_2$ (soluție de 5%).
- 7) $MgCl_2$ (soluție de 5%).
- 8) $AgNO_3$ (soluție 0.05 n).
- 9) K_2CrO_4 .
- 10) Ulei vegetal, margarină, unt de vacă.

Experimentul 1. Formarea emulsiei

În două fiole se dozează câte 2-3 picături de ulei, în una din ele se adaugă 2 ml de apă, în cealaltă – 2 ml bicarbonat de sodiu. Fiolele se agită puternic și se formează o emulsie stabilă și una instabilă.

Experimentul 2. Saponificarea gliceridelor

Principiul metodei. Gliceridele se descompun prin hidroliză în mediu bazic în acizi grași și glicerol. Acizii grași în mediu respectiv formează săruri de sodiu sau de potasiu. Această reacție se numește saponificare.

Într-un balon conic de 50 ml se dozează 0,5 ml de ulei și se adaugă 10 ml soluție alcoolică de KOH sau NaOH. Balonul se astupă și se pune în baie de apă clocotită până nu dispar sărurile de K sau Na.

La adăugarea de 10 ml H_2O se obține o soluție de săpun, dacă fiola se agită se formează spumă. Sărurile de K

și Na sunt solubile în apă și se folosesc în experimentele următoare.

Experimentul 3. Formarea acizilor grași liberi

Principiul metodei. La adăugarea sărurilor minerale și încălzirea fiolei, soluția de săpun obținută în experimentul anterior, se acidifică formându-se acizi grași liberi. Acizii grași sunt insolubili în apă și formează un strat uleios la suprafața soluției.

La 20 ml soluție de săpun se adaugă 3-5 picături acid clorhidric sau sulfuric concentrat, se amestecă și se lasă pentru stratificare.

Experimentul 4. Proba acroleinică la glicerol

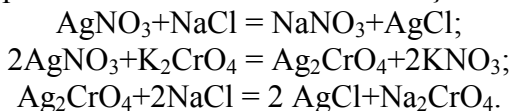
Principiul metodei. La încălzire în prezența sulfatului de potasiu glicerina se deshidratează și se formează aldehida acrilică (*acroleină*) – lichid cu miros acru și iritant.

Reacția se efectuează sub nișa de ventilare. La 2-3 picături de ulei se adaugă 100-200 mg K_2SO_4 , amestecul se încălzește cu atenție și se miroase.

Experimentul 5. Determinarea conținutului de sare de bucătărie în margarină sau unt de vacă

Principiul metodei. Sarea de bucătărie este un aditiv alimentar important și joacă un rol mare în desfășurarea proceselor fiziologice din organism. În industria alimentară sarea de bucătărie se folosește în calitate de conservant care exercită un efect distructiv asupra microflorei produsului. Pentru determinarea conținutului de sare de bucătărie în untul de vacă și margarină se folosește metoda

argentometrică. În calitate de indicator este utilizat cromat de potasiu. În procesul de titrare au loc trei reacții:



În urma reacției a doua se formează un precipitat de culoare roșie-cărămizie care este mai solubil decât precipitatul de culoare albă AgCl și la începutul titrării dispare dizolvându-se la interacțiunea cu NaCl. Din momentul când toți ionii de clor se leagă cu ionii de argint ultima reacție se încheie și culoarea roșie-cărămizie a soluției indică sfârșitul titrării. Soluția pentru titrare se răcește deoarece odată cu creșterea temperaturii soluției se mărește și solubilitatea precipitatului de Ag₂CrO₄. pH soluției trebuie să fie neutru, întrucât în mediu acid precipitatul Ag₂CrO₄ se dizolvă, iar în mediu bazic se formează AgOH greu solubil, care se precipită mai repede decât Ag₂CrO₄.

Ordinea îndeplinirii experimentului. Într-un balon conic de 100 cm³ se pun 5 g de margarină, se amestecă cu 50 cm³ apă distilată, balonul se acoperă și se pune pe o baie de apă timp de 7 min. Apoi balonul se agită energic, se răcește la temperatura camerei timp de 20 min și se filtrează. Se iau 10 cm³ de filtrat, se adaugă 3 picături cromat de potasiu și se titrează cu o soluție 0,05 n AgNO₃ până la colorarea soluției în roșu-cărămiziu. Culoarea respectivă nu trebuie să dispară la agitare soluției.

Conținutul de sare de bucătărie în margarină X (în %) se calculează după formula:

$$X = \frac{100V \times 0.0029V_1K}{m},$$

unde: V – cantitatea de soluție AgNO_3 , folosită la titrarea soluției, cm^3 ;

0,0029 – titrul 0,005 n soluției de AgNO_3 , g/cm^3 ;

V_1 – volumul total al soluției, cm^3 ;

K – coeficientul de corecției a soluției 0,005 n de AgNO_3 ;

m – masa margarinei, g.

Perfectarea lucrării. Rezultatele lucrării sunt prezentate în formă de tabel:

Nr	Denumirea reacției	Reactive folosite	Efecte observate	Mecanismul molecular al reacțiilor
1				

Întrebări și teste de control

- 1) Ce reprezintă și care sunt funcțiile biologice ale lipidelor?
- 2) Care sunt criteriile de clasificare a lipidelor?
- 3) Care acizi grași intră în componența gliceridelor?
- 4) Ce transformări chimice stau la baza saponificării și rănțezirii gliceridelor?
- 5) Prin ce se deosebesc grăsimile de uleiuri?
- 6) Descrieți principiul metodei argentometrice de determinare a conținutului de sare de bucătărie în margarină și untul de vacă. Care reacții chimice au loc în procesul de titrare?
- 7) Lipide:
 - a) clorofilă; b) ceride; c) gliceride; d) pectină; e) cumarină.
- 8) Lipide:
 - a) biopolimeri alcătuiți din glicerină;
 - b) substanțe complexe alcătuite din glicerină și acizi grași;
 - c) compuși hidrofobi;
 - d) compuși hidrofilii.
- 9) În componența gliceridelor intră:

a) aminoacizi; b) glucoză; c) baze azotate; d) acizi grași; e) glicerină.

10) Selectați termenii care nu se încadrează în grupurile tematice respective și explicați de ce le-ați separat:

a) lipoproteide, glicolipide, fosfolipide, gliceride;

b) acid oleic, acid palmitic, acid linolic, acid linolenic, acid arahidonic;

c) acid palmitic, acid oleic, acid stearic, acid arahic, acid lauric.

Glosar

Acizi nucleici – substanțe organice macromoleculare alcătuite din nucleotide, responsabile pentru stocarea, reproducerea și realizarea informației genetice în celulă.

Anabolism – totalitatea proceselor chimice de biosinteză a compușilor organici care intră în componența materiei vii cu consum de energie.

Catabolism – totalitatea proceselor chimice de descompunere a substanțelor complexe în substanțe mai simple cu degajare de energie în formă de căldură și ATP.

Enzime – substanțe de natură proteică care catalizează reacții chimice specifice.

Fenoli – substanțe organice care conțin în molecula lor inelul benzenic, la care sunt atașate una sau mai multe grupări hidroxilice.

Glucide – substanțe organice, molecule ciclice care au în compoziția lor atât grupări carbonilice, cât și grupări hidroxilice.

Lipide – o categorie de substanțe organice foarte eterogene solubile în solvenți organici, dar insolubile în apă și săruri minerale.

Proteine – substanțe organice azotate macromoleculare, alcătuite dintr-un număr variabil de aminoacizi, cu o configurație tridimensională particulară.

Vitamine – compuși organici indispensabili vieții, care se găsesc în alimente sau se prepară sintetic, cu rol esențial în menținerea proceselor celulare vitale.

Bibliografie

1. Neamțu G. Biochimie vegetală (partea structurală). – București: Editura didactică și pedagogică, 1993.-332 p.
2. Palamarciuc L., Vrabie T., Scifos A. Biochimie. Îndrumar de laborator. – Chișinău: U.T.M., 2007.- 112 p.
3. Vrabie T., Musteață G. Biochimie. – Chișinău: U.T.M., 2006.- 234 p.
4. Владимирова Е.Г., Ушакова Г.И., Кушнарёва О.П. Биохимия зерна, биохимия хлебопечения; биохимия бродильных производств: Методические указания к лабораторному практикуму. – Оренбург, 2004.- 61 с.
5. Виноградова А.А, Мелькина Г.М., Фомичева Л.А. Лабораторный практикум по общей технологии пищевых производств. – Москва, 1991.- 336 с.
6. Григорча П.Д., Глижин А.Г. Технологическая биохимия. Лабораторные работы. – Кишинёв: Молд. ГУ, 2004.- 247 с.
7. Згардан Д., Некула Л., Ботезату Н., Санду Ю. Биохимия. Методические указания к лабораторному практикуму. – Кишинёв: Т. У. М., 2010.- 117 с.
8. Кольман Я., Рем К. Наглядная биохимия. Россия, Москва. 2000.- 469 с.
9. Петров О.А., Пуховская С.Г. Практикум по биохимии. Методические указания. – Иваново, 2006.- 60 с.
10. Кучеренко А.О., Шугалей В.С. Методическое пособие по курсу биохимии растений. – Ростов-на-Дону, 2004.-25 с.

Anexa 1

α -Aminoacizii proteinogeni standard

Denumirea	Denumirea prescurtată	
1	2	3
<i>Alifatici</i>		
Glicină	Gly	
Alanină	Ala	A
Valină*	Val	V
Leucină*	Leu	L
Izoleucină*	Ile	I
<i>Серосодержащие</i>		
Cisteină	Cys	C
Metionină*	Met	M
<i>Neutri</i>		
Serină	Ser	S
Treonină*	Thr	T
Asparagină	Asn	N
Glutamină	Gln	Q
<i>Acizi</i>		
Acid glutamic	Glu	E
Acid aspartic	Asp	D
<i>Bazici</i>		
Lizină*	Lys	K
Arginină	Arg	R
Histidină	His	H
<i>Aromatici</i>		
Tirozină	Tyr	Y
Triptofan*	Trp	W
Fenilalanină*	Phe	F
<i>Iminoacizi</i>		
Prolină	Pro	P
* – aminoacizi esențiali		

**Calcularea conținutului de zahăr
invertit (mg) după metoda Bertrand**

Zahăr, mg	Cupru, mg	Zahăr, mg	Cupru, mg	Zahăr, mg	Cupru, mg	Zahăr, mg	Cupru, mg
1	2	3	4	5	6	7	8
10	20,6	33	64.8	56	105.7	79	143.7
11	22,6	34	66.7	57	107.4	80	145.3
12	24,6	35	68.5	58	109.2	81	146.9
13	26,5	36	70.3	59	110.9	82	148.5
14	28,50	37	72.2	60	112.6	83	150.0
15	30,50	38	74.0	61	114.3	84	151.6
16	32.5	39	75.9	62	115.9	85	153.2
17	34.5	40	77.7	63	117.6	86	154.8
18	36.4	41	79.5	64	119.2	87	156.4
19	38.4	42	81.2	65	120.9	88	157.9
20	40.4	43	83.0	66	122.6	89	159.5
21	42.3	44	84.8	67	124.2	90	161.1
22	44.2	45	86.5	68	125.9	91	162.6
23	46.1	46	88.3	69	127.5	92	164.2
24	48.0	47	90.1	70	129.2	93	165.7
25	49.8	48	91.9	71	130.8	94	167.3
26	51.7	49	93.6	72	132.4	95	168.8
27	53.6	50	95.4	73	134.0	96	170.3
28	55.5	51	97.1	74	135.6	97	171.9
29	57.4	52	98.8	75	137.2	98	173.4
30	59.3	53	100.6	76	138.9	99	175.0
31	61.1	54	102.3	77	140.5	100	176.5
32	63.0	55	104.0	78	142.1		

Funcțiile unor vitamine hidrosolubile în cataliză

Vita mină	Coenzime	Enzime	Reacții catalizate
B ₁	Tiamină pirofosfat	Dehidrogenaze	Decarboxilarea α -cetoacizilor în cadrul metabolismului glucidic
B ₂	FAM, FAD	Oxidaze și reductaze	Reacții de oxido-reducere în cadrul oxidării intracelulare
B ₆	Piridoxalfosfat	Amino transferaze, carboxilaze	Transferul de grupe aminice în procesul de sinteză și metabolism al aminoacizilor
B ₅	NAD ⁺ , NADP ⁺	Dehidrogenaze anaerobe	Reacții de oxido-reducere în cadrul oxidării intracelulare
H	Biocitină	Carboxilaze	Transferul CO ₂ în cadrul metabolismului proteic și lipidic

Notă: FAM – Flavinmononucleotidă
 FAD – flavinadenindinucleotidă
 NAD⁺ – nicotinamidadenindinucleotidă
 NADP⁺ – nicotinamidadenindinucleotidfosfat

Cuprins

Tehnica de securitate în laboratorul de biochimie.....	3
I. Acizi nucleici	
№1. Hidroliza nucleoproteidelor.....	5
II. Aminoacizi și proteine	
№2. Determinarea conținutului de amoniac după metoda Conway-Bairn.....	14
№3. Determinarea potențiomtrică a derivaților formolici ai α -aminoacizilor.....	20
№4. Analiza calitativă a aminoacizilor și proteinelor.....	27
№5. Extracția și analiza proteinelor simple.....	36
III. Enzime, coenzime și vitamine	
№6. Determinarea activității enzimei invertaza.....	40
№7. Determinarea activității enzimei polifenoloxidaza.....	49
№8. Determinarea conținutului de glutation redus.....	55
№9. Analiza calitativă a vitaminelor.....	60
№10. Determinarea conținutului de vitamină C.....	73
IV. Glucide	
№11. Analiza calitativă a glucidelor.....	81
V. Lipide	
№12. Analiza uleiurilor și grăsimilor vegetale.....	89
Glosar	97
Bibliografie	98
Anexe	99