

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»

2343

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З ДИСЦИПЛІНИ
«ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ІІІ КУРСУ ЗА НАПРЯМОМ 6.051701
«ХАРЧОВА ТЕХНОЛОГІЯ ТА ІНЖЕНЕРІЯ»
ЧАСТИНА ІІ.

Затверджено на засіданні
кафедри хімічної технології
високомолекулярних сполук.
Протокол №11 від 17.05.2011

Дніпропетровськ ДВНЗ УДХТУ 2012

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Технічна мікробіологія» для студентів III курсу напряму 6.051701 «Харчові технології та інженерія». Частина II. / Укл. Т.Ю. Коляда, Л.Л. Руднєва. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 52 с.

Укладачі: Т.Ю. Коляда
Л.Л. Руднєва

Відповідальний за випуск М.Я. Кузьменко, д-р хім. наук

Навчальне видання
Методичні вказівки
до виконання лабораторних робіт
з дисципліни
«Технічна мікробіологія»
для студентів III курсу напряму 6.051701
«Харчові технології та інженерія»
Частина II

Укладачі: КОЛЯДА Тетяна Юріївна
РУДНЄВА Лариса Леонідівна

Авторська редакція

Підписано до друку 13.11.12. Формат 60×84 1/16. Папір ксерокс. Друк різнограф.
Умов.-друк. арк. 1,45. Облік.-вид. арк. 1,49. Тираж 80 прим. Замовлення №37.
Свідоцтво ДК №303 від 27.12.2000.

ДВНЗ УДХТУ, 49005, м. Дніпропетровськ-5, просп. Гагаріна, 8.

Видавничо-поліграфічний комплекс ІнКомЦентру

Дисципліна «Технічна мікробіологія» викладається студентам за напрямом 6.051701 «Харчова технологія та інженерія». Для успішного засвоєння курсу і уміння застосовувати отримані знання на практиці передбачений лабораторний практикум.

Основна мета мікробіологічного практикуму – формування у майбутнього спеціаліста поняття про різноманітність мікроорганізмів, про їх розповсюдження в природних умовах, про їхню роль в багатьох процесах, що відбуваються у природі та технічному мікробіологічному процесі, про використання в тих чи інших галузях діяльності людини. Мікроорганізми мають особливе значення в технології харчових продуктів. Разом із тим мікроорганізми водночас із корисною функцією можуть викликати і псування харчових продуктів.

На лабораторних заняттях студент закріплює отримані теоретичні знання, засвоює методи мікробіологічного дослідження і правила роботи із культурами мікроорганізмів, а також методи їх знезаражування.

На першому лабораторному занятті студенти повинні ознайомитись із технікою безпеки і режимом роботи. Під час роботи в лабораторії необхідно виконувати наступне: вдягнути халат, шапочку чи хустинку. Перевірити, чи всі необхідні предмети є на місці, чи перебуває в робочому стані мікроскоп. Про всі недоліки або поломки доповідати викладачеві. Під час виконання лабораторних занять потрібно дотримуватись тиші, уникати лишнього ходіння по лабораторії, якомога менше відчиняти і зачиняти двері до лабораторії. Не дозволяється виносити за межі лабораторії будь-які матеріали (пробірки, фарби, предметні скельця, шприци і т. ін.). Особисті речі тримати у спеціально призначеному для цього місці.

На кожне лабораторне заняття студент повинен приносити: кольорові олівці, зошит для записів (лабораторний журнал), гумку для стирання олівців, простий олівець, лінійку. Змальовування мікробіологічних ознак мікроорганізмів виконувати або безпосередньо з препарату або із фотографічного знімка цього препарату із вказуванням ступеня збільшення.

Підготовленість студента до виконання лабораторної роботи визначає викладач за результатами співбесіди та оформлення лабораторного журналу і може допускати або не допускати до виконання конкретної роботи.

Для отримання допуску до роботи студент повинен знати:

1. Теоретичний матеріал із даної теми лабораторної роботи.
2. Методику виконання даної роботи.
3. Специфіку мікробіологічного процесу, який вивчається в процесі роботи.
4. Техніку безпеки виконання своєї конкретної лабораторної роботи.

Після закінчення практичної роботи студент повинен показати викладачеві свої результати, оформлені у лабораторному журналі. Записи повинні бути акуратно зроблені і мати такі розділи:

1. Назва роботи.
2. Мета роботи.

3. Прилади і матеріали.
4. Реактиви.
5. Хід виконання роботи.
6. Результати експерименту.
7. Висновки.

У пункті 6 студент може записати результати роботи у вигляді таблиці, малюнків, розрахунків або у вигляді детального опису роботи і її специфіки.

Після оформлення роботи відбувається співбесіда викладача із студентом.

Лабораторна робота оцінюється двома оцінками – за теоретичні знання і за техніку її виконання.

Після закінчення лабораторної роботи студент повинен прибрати робоче місце, протерти і поставити на місце мікроскоп, ретельно вимити руки з милом.

Всі інструменти після використання необхідно знезаразити прожарюванням на вогні горілки або спиртівки, кип'ятінням, дезинфекцією і т.п. Всі використанні матеріали з мікроорганізмами, використані мікробні культури і т. ін. необхідно знезаразити стерилізацією в автоклаві під тиском 0,1 МПа або дезинфекцією і лише після цього мити лабораторний посуд.

РОЗДІЛ II

Пропонований цикл лабораторних робіт (№№ 9-16) включає методики виділення продуктів мікробіологічного синтезу, дослідження їх фізико-хімічних та органолептичних властивостей, а також роботи для виявлення специфіки дії ферментів і їх властивостей.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9

ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ПРОЦЕС СКИСАННЯ МОЛОКА

Мета роботи: вивчити вплив різних факторів на процес скисання молока і вершків; визначити органолептичні показники отриманих продуктів.

Матеріали та обладнання: молоко, вершки; плоскодонна колба або стакан на 300 мл, стакани на 100мл і 200мл, термометр.

Завдання

1. Провести молочнокисле бродіння молока в різних температурних умовах.

2. Встановити залежність активності мікрофлори від температури процесу і продемонструвати графічно.

3. Порівняти можливість розвитку мікрофлори залежно від жирності молока.

4. Розглянути консистенцію утвореного молочнокислого продукту (простокваші) і описати її за зовнішніми ознаками і органолептичними ознаками (смак, запах та ін.)

Хід виконання роботи

Молочнокисле бродіння при різних температурних умовах.

У стакани на 200 мл налити по 100 мл молока і витримувати до початку скисання, заміряючи час у годинах. Пропоновані температури: 25-27°C; 20-22°C; 15-17°C; 8-10°C (холодильник); 2-4°C. Визначити оптимальну температуру скисання за такими ознаками:

а) швидкість скисання;

б) консистенція отриманого продукту;

в) органолептичні показники;

Отримані результати описати в кожному конкретному випадку, вказати оптимальний варіант, побудувати графік швидкості скисання молока від температури процесу. Результати досліду внести в таблицю 1.

Таблиця 1 – Вплив температури на процес молочнокислого бродіння

	Температура, °C				
	25-27°C	20-22°C	15-17°C	8-10°C	2-4°C
Тривалість скисання, год					
Консистенція продукту					
Органолептичні показники					

Вивчення можливості розвитку мікрофлори залежно від жирності молока.

У стакани на 100 мл (або 200 мл) налити по 50 мл молока різної жирності і вершків. Різну жирність молока отримують методом розведення. Для цього беруть 100 мл цільного молока, відливають 50 мл для проби №1; до молока, що залишилось, доливають 50 мл дистильованої води, перемішують і відливають знову 50 мл цього розведеного молока в колбу для проби №2; знову до залишку доливають 50 мл дистильованої води, перемішують і відбирають 50 мл суміші для проби №3.

Для отримання проби №4 змішують 25 мл цільного молока і 25 мл вершків.

Пробою №5 служитимуть вершки.

Увага! Молоко і вершки потрібно брати із відомою жирністю!

Всі 5 проб ставлять у термостат або тепле місце і відмічають час скисання у год.

Отримані результати записують у таблицю 2 і будують графік залежності часу скисання від жирності молока.

Таблиця 2 – Вплив вмісту жиру в молоці на процес молочнокислого бродіння

	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Проба №4	Проба №5
% вміст жиру					
Час скисання (год)					
Органолептичні показники					

Запитання для контролю знань

1. Що таке процес сквашування?
2. Від яких факторів залежить процес скисання молока і вершків?
3. Яким чином впливає вміст жиру в молоці на процес молочнокислого бродіння?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 10

ДОБУВАННЯ КАЗЕЇНУ З МОЛОКА

Мета роботи: навчитись виділяти казеїн з молока та вивчити його властивості.

Методичні вказівки

У процесі ферментативного згорання молока фосфоровмісний специфічний білок молока – казеїноген, - вступає в хімічні перетворення з утворенням казеїну. Кальцієва сіль казеїну, на відміну від кальцієвої солі казеїногену, нерозчинна у воді. Казеїн не висаджується при кип'ятінні молока. Сичужний фермент висаджує його із молока у вигляді так званого параказеїну (на цьому базується виробництво твердих сирів).

Кислоти також висаджують казеїн. При підкисленні молока казеїн випадає у вигляді білих об'ємних пластівців, які фільтруванням можна відділити від розчину.

Із казеїну виробляють клей для фанери і паперу, галаліт (пластмаса), в деяких зарубіжних країнах виробляють штучну шерсть (ланіталь, файбролен).

Казеїн також використовують як вихідну сировину у виробництві деяких амінокислот.

Завдання

1. Відділити казеїн із молока.
2. Провести якісний аналіз отриманого казеїну

Метод А

Матеріали та обладнання:

Складчасті фільтри, папір фільтрувальний, молоко; 0,1%-й розчин НАс, 0,1%-й розчин Na_2CO_3 , етанол, ефір, хлороформ, 10%-й розчин NaOH , 10%-й розчин HNO_3 , 1%-й розчин CuSO_4 , молібденовий реактив, лакмусовий папір.

Скляні палички, пробірки, піпетки на 1 мл і 2 мл, маленькі скляні лійки, зворотний холодильник, стакани або колби на 100 мл або 50 мл, ступка маленька з товкачиком, водяна баня.

Хід виконання роботи

До 10 мл сепарованого молока доливають 30 мл води, обережно помішуючи, додають по краплях 0,1%-й розчин оцтової кислоти (НАс) до припинення випадання казеїну, який відфільтровують, промивають водою, вносять у розчин карбонату натрію (Na_2CO_3), щоб очистити від жиру та інших сполук. Казеїн у розчині Na_2CO_3 розчиняється, а жир перебуває в емульгованому стані. Суміш фільтрують через вологий фільтр і жир залишається на фільтрі.

Із фільтрату розчином 0,1%-ї оцтової кислоти (НАс) знову висаджують казеїн. Осад відфільтровують, відтискають між листами фільтрувального паперу (по можливості насухо) і розтирають у ступці із 5-7 мл етанолу для зневоднення.

Для знежирення казеїн змішують спочатку із 6-7 мл ефіру, а потім з 6-7 мл хлороформу. Знежирений казеїн висушують на повітрі і розтирають у порошок, який використовують для гідролізу казеїну. Сухий знежирений препарат казеїну – білий аморфний порошок.

Гідроліз казеїну: в пробірку поміщають 0,05 г розтертого в порошок казеїну і доливають 3 мл 10%-ного розчину NaOH . Гідролізують із зворотним холодильником 1 год; суміш охолоджують і використовують гідролізат для реакцій на продукти гідролізу.

Виявлення білку в гідролізаті (біуретова реакція). В пробірку наливають 0,5 мл гідролізату, 5 крапель 10%-вого розчину гідроксиду натрію (NaOH) і краплю розчину сульфату міді. Спостерігається червоно-фіолетове забарвлення розчину, яке свідчить про наявність білку в гідролізаті казеїну.

Виявлення фосфорної кислоти (молібденова проба). В пробірку наливають 1-2 мл гідролізату, додають 12-15 крапель 10%-вого розчину азотної

кислоти (HNO_3) до слабокислої реакції на лакмус. Після цього суміш фільтрують у суху пробірку. З цієї пробірки відбирають 0,5 мл фільтрату і додають 2 мл молібденового реактиву і кип'ятять на водяній бані 2-3 хв. Спостерігають утворення жовтого забарвлення, а при охолодженні суміші – осад жовтого кольору амонійної солі фосфомолібденової кислоти.

Метод Б

Матеріали і обладнання:

Молоко, 1% розчин HCl , H_2O дистильована, 10% розчин NaOH , $\text{HNO}_3(\text{к})$, лакмусовий папір, молібденовий реактив, 1% розчин CuSO_4 .

Стакани на 50 мл, мірні циліндри на 10 мл, скляні палички, лійка скляна, бюретка, фільтри, пробірки із зворотним холодильником, штативи з пробірками, піщана баня, фільтрувальний папір.

Хід виконання роботи

У стакан на 50 мл відміряють циліндром 3 мл молока і додають 7 мл дистильованої води. Суміш перемішують і додають 10-15 крапель 1%-вого розчину соляної кислоти (HCl). Кислоту доливають дуже акуратно, **по краплях (!)**, оскільки в надлишку осад казеїну розчиниться. Суспензію перемішують. Через 3-5 хв утворюється об'ємний осад.

Після цього в стаканчик доливають 10 мл дистильованої води, перемішують і залишають стояти ще 5 хв. Рідину обережно зливають з осаду, а до нього знову доливають 10 мл дистильованої води. Знову обережно перемішують паличкою, дають відстоятися протягом 5 хв. і фільтрують через паперовий фільтр. Таким кількаразовим промиванням видаляють надлишок соляної кислоти.

Отриманий осад висушують між двома листочками фільтрувального паперу і далі проводять гідроліз казеїну.

Гідроліз казеїну

Гідроліз проводять для того, щоб виявити в гідролізаті фосфоровмісні білки.

Підсушений осад з фільтра переносять у пробірку із зворотним холодильником і доливають 6 мл 10%-ного розчину NaOH .

Пробірку нагрівають на піщаній бані 1 год. Рідину в пробірці охолоджують і нейтралізують концентрованою азотною кислотою (20-30 крапель) до слабокислої реакції на лакмус. Під час нейтралізації випадає осад високомолекулярних продуктів неповного гідролізу білка.

Вмісту пробірки дають відстоятися і фільтрують. Фільтрат збирають у пробірку для проведення якісних реакцій.

Проведення біуретової реакції

У пробірку вливають 5 крапель фільтрату (гідролізат казеїну), додають приблизно 10 крапель 10%-вого розчину NaOH і 2 краплі 1%-вого розчину

CuSO_4 . Спостерігають фіолетове або червоно-фіолетове забарвлення розчину, що свідчить про наявність білка у пробі.

Проведення молібденової проби

У пробірку наливають 10 крапель молібденового реактиву і до нього додають 5 крапель фільтрату. Суміш кип'яють 2-5 хвилин. У присутності фосфорної кислоти рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір. Після охолодження суміші випадає жовтий кристалічний осад комплексної сполуки $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

Метод В

Матеріали і обладнання:

Молоко, 1%-вий розчин оцтової кислоти (HAc), 1%-вий розчин NaOH , 1%-вий розчин фенолфталеїну, етанол, ефір, 1%-вий розчин CuSO_4 , молібденовий реактив.

Стакани або колби на 500 мл, фарфорова чашка, фільтрувальний папір, скляна паличка, скляна лійка, піпетка на 1 мл, х/б тканина для фільтрування.

Хід виконання роботи

100 мл молока розбавляють 200 мл дистильованої води і до цього розчину додають 0,6 мл 1%-вої оцтової кислоти. Отриману сироватку фільтрують через тканину, добре відтискають і промивають 1-2 рази дистильованою водою. Фільтрат зливають в окрему колбу і зберігають для наступної роботи (виділення молочного цукру, лабораторна робота №12).

Осад, який містить казеїн і жир, переносять у фарфорову чашку і розтирають із невеликим об'ємом 1%-вого розчину NaOH (по краплях!). Отриману кашоподібну масу продовжують нейтралізувати 1%-ним розчином NaOH до нейтральної реакції (за фенолфталеїновим папірцем) і трішки підігрівать. Отриманий розчин переливають у стакан і залишають відстоюватися на 20-30 хв. Жир, який при цьому спливає, збирають; розчин фільтрують від залишків жиру декілька разів через тонку тканину до стану, коли фільтрат буде лише трішки мутний.

Фільтрат знову підкислюють 1%-ю оцтовою кислотою (0,6-1 мл); осад казеїну відціджують, промивають дистильованою водою.

Отриманий таким чином осад казеїну знову розчиняють в 1%-му розчині лугу (NaOH) і знову висаджують оцтовою кислотою. Осад відфільтровують, промивають на фільтрі 1-2 рази дистильованою водою, підсушують між листками фільтрувального паперу, переносять у ступку, доливають трішки етанолу (щоб при розтиранні утворилась паста), підсушують на фільтрувальному папері, промивають спиртом і ефіром. Сушать на повітрі. Сухий знежирений препарат казеїну – білий аморфний порошок. Вихід 2-2,5 г.

Гідроліз казеїну

Аналогічно методу А.

Виявлення білка в гідролізаті

Аналогічно методу А.

Виявлення фосфорної кислоти

Аналогічно методу А.

Метод Г

Матеріали і обладнання:

Простокваша, дистильована вода, 1%-вий розчин NaOH, фенолфталеїн, 1%-вий розчин оцтової кислоти, етанол, ефір, 10%-вий розчин NaOH, 1%-вий розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10%-ний розчин HNO_3 , лакмусовий папірець, молібденовий реактив.

Колби на 500 мл і 300 мл, фарфорові чашки, стакан на 150 мл, фільтрувальний папір, пробірки, мірний циліндр на 10 мл, піпетки на 1 мл і 2 мл.

Хід виконання роботи

300 мл простокваші нагрівають (не кип'ятити!) до 70-80°C до розділення на 2 шари: твердої фази (казеїн і жир) і сироватки. Сироватку фільтрують, осад промивають 2 рази невеликою кількістю дистильованої води. Фільтрат зливають в окрему колбу і залишають для наступної роботи (виділення молочного цукру, лабораторна робота №12).

Осад з фільтру переносять у фарфорову чашку і розтирають з невеликим об'ємом 1%-вого розчину NaOH. NaOH додають по краплях до утворення кашоподібної маси, далі продовжують додавати розчин NaOH, постійно перевіряючи рН суміші з допомогою фенолфталеїнового або лакмусового папірця, до нейтральної реакції (рН=7). Після цього суміш трішки підігрівують, переливають у стакан і залишають відстоюватися на 20-30 хв.

Жир, який спливає на поверхню, збирають; розчин фільтрують для видалення решти жиру. (Якщо фільтрування через фільтрувальний папір проходить повільно, можна використати тонку полотнянку). Фільтрування вважається якісним, якщо розчин у прийомній колбі буде майже прозорий.

До фільтрату додають 2,5 мл 1%-ї оцтової кислоти. Казеїн, який випав, відціджують і промивають 1-2 рази дистильованою водою.

Для отримання вільного від домішок казеїну проводять його переосадження із гідроксиду натрію. Для цього осад з фільтру знову розчиняють у невеликій кількості 1%-вого розчину NaOH (розчин лугу додають невеликими порціями, старанно перемішуючи!) і отриманий розчин підкисляють 1%-ю оцтовою кислотою до випадання казеїну. (Контроль – за фенолфталеїновим папірцем. Надлишок кислоти неприпустимий! При рН<6 казеїн почне розчинятися!). Осад відфільтровують, промивають на фільтрі 1-2 рази дистильованою водою, підсушують між листками фільтрувального паперу

і переносять у фарфорову чашку. До казеїну в чашці доливають трішки етанолу – до пастоподібного стану, підсушують на фільтрувальному папері, промивають етанолом і ефіром. Сушать на повітрі.

Сухий знежирений препарат казеїну має вигляд білого аморфного порошку. Вихід 6-7 г.

Гідроліз казеїну

Аналогічно методу А.

Виявлення білка в гідролізаті

Аналогічно методу А.

Виявлення фосфорної кислоти

Аналогічно методу А.

Запитання для контролю знань

1. Що входить у склад молока?
2. Що таке казеїн?
3. Яким чином отримують казеїн із молока?
4. Як проводиться біуретова реакція?
5. З якою метою проводять молібденову пробу?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №11

ВИЯВЛЕННЯ ВМІСТУ КАЗЕІНОГЕНУ В МОЛОЦІ

Мета роботи: навчитись виділяти фосфоропротеїд казеїноген і визначати експериментальним шляхом його вміст у пробах молока, призначеного для виробництва твердих сирів.

Обладнання і матеріали: сепароване молоко, 0,04 н розчин H_2SO_4 , 0,1н розчин КОН, дистильована вода, 1%-й спиртовий розчин фенолфталеїну.

Складчасті паперові фільтри або фільтрувальний папір, 4 колби на 200 мл, мірний циліндр на 50 мл, бюретки, лійка.

Методичні вказівки

У молоці міститься специфічний білок казеїноген, який містить фосфор; 80% всіх білків молока припадає на долю казеїногену. Цей білок має кислотні властивості і в молоці міститься у вигляді розчинної кальцієвої солі.

Казеїноген належить до групи фосфопротеїдів – складних білків, що містять залишок фосфорної кислоти, який зв'язаний складноефірними зв'язками із залишками серину і треоніну.

Ізоелектрична точка казеїногену відповідає $pH=4,7$. У підкисленому розчині ($pH=4,7$) кальцієва сіль казеїногену розщеплюється на білок і фосфорну кислоту, які можна визначити за характерними реакціями: білок – біуретовою пробою, фосфорну кислоту – реакцією з молібденовим реактивом.

Визначення вмісту казеїногену в молоці базується на тому, що казеїноген має кислу реакцію і тому різниця між об'ємом розчину, який необхідний для нейтралізації молока і об'ємом, який витрачений на нейтралізацію сироватки після висадження казеїногену – це об'єм лугу, який потрібен для нейтралізації казеїногену. Знаючи еквівалентну масу казеїногену, можна визначити його вміст у молоці.

Завдання

1. Висадити казеїноген із проб молока титруванням сірчаною кислотою.
2. Відтитрувати проби з колб №1 і №2 гідроксидом калію в присутності фенолфталеїну.
3. Вирахувати за отриманими даними вміст казеїногену у даному молоці.
4. Порівняти отримані результати для різних типів молока і зробити висновки щодо вмісту в них казеїногену.

Хід виконання роботи

Готують 2 колби (колба №1; колба №2) об'ємом на 200 мл.

У колбу №1 наливають 40 мл H_2O і 20 мл молока.

У колбу №2 наливають 20 мл H_2O і 10 мл молока.

Вміст колби №1 титрують, постійно перемішуючи, розчином сірчаної кислоти (0,04 н) до випадання казеїногену в осад (титрувати по 1 краплині і щоразу старанно перемішувати!). Фіксують кількість витраченого розчину H_2SO_4 .

Вміст колби №2 також титрують розчином сірчаної кислоти, причому її повинно піти на титрування у 2 рази менше, ніж для вмісту колби №1 (у колбі №2 також висаджується казеїноген).

Розчин у колбі №1 (з осадом казеїногену) доливають дистильованою водою до загального об'єму 100 мл і фільтрують у чисту колбу або стакан. З отриманого фільтрату (це сироватка) відбирають 50 мл і виливають у чисту колбу на 200 мл.

Дані, отримані по ходу експерименту, вносять у таблицю 3.

Таблиця 3 – Результати досліджень лабораторної роботи

	Об'єм молока, мл	Об'єм води, мл	Об'єм H_2SO_4 , який пішов на титрування	Сумарний об'єм розчину в колбі	Об'єм H_2O , який треба додати до 100 мл
Колба №1	20 мл	40 мл	$V_1 =$	$20\text{мл} + 40\text{мл} + V_1 =$	$100 - (60 + V_1) =$
Колба №2	10 мл	20 мл	$0,5 V_1 =$	$10\text{мл} + 20\text{мл} + 0,5V_1 =$	-

Титрування лугом.

У колбу №2 (в якій міститься розчин і осад висадженого казеїногену) додають 1 мл розчину фенолфталеїну і титрують 0,1 н розчином КОН до появи стійкого світло-рожевого забарвлення, яке не щезає протягом 30 сек. Об'єм КОН, який пішов на титрування, записують у зошит.

У колбу із 50 мл сироватки також додають 1 мл фенолфталеїну і титрують 0,1 н розчином КОН до появи стійкого рожевого кольору.

Масову долю казеїногену в молоці (мг/мл) обчислюють за формулою

$$C=(V-V_0)*K*Q/V_m,$$

де V – об'єм КОН (мл), який витрачений на титрування молока в колбі №2;

V_0 – об'єм КОН (мл), який витрачений на титрування 50 мл сироватки;

K – коефіцієнт поправки на титр 0,1 н розчину КОН;

Q – маса казеїногену, еквівалентна 1 мл 0,1 н розчину КОН (11,315 мг);

V_m – об'єм молока, який використовували для аналізу (у даній лабораторній роботі – 10 мл).

Аналогічно проаналізувати інший сорт молока, результати співставити і зробити висновки.

Запитання для контролю знань

1. Який специфічний білок міститься у молоці?
2. Яке середовище має казеїноген?
3. За якими реакціями можна визначити білок, фосфорну кислоту?
4. На чому базується визначення вмісту казеїногену в молоці?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №12

ДОБУВАННЯ ЛАКТОЗИ ІЗ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

Мета роботи : ознайомитись із продуктами мікробіологічного синтезу на прикладі молочного цукру; провести якісні реакції для встановлення структури лактози.

Прилади і матеріали: молочна сироватка, етанол, реактив Фелінга.

Фарфорова чашка, полотничка або фільтрувальний папір, лійка Бюхнера, колба Бунзена, водяна баня, стаканчик на 50 мл, скляна паличка, пробірки.

Методичні вказівки

Лактоза, або молочний цукор, міститься в молоці (4-5%). У промислових масштабах лактозу отримують як побічний продукт у виробництві сиру: вона

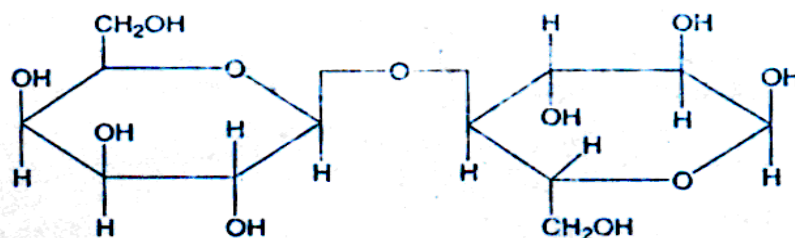
міститься у сироватці – водному розчині, що залишається після коагуляції білків молока. Молоко скисає, коли лактоза перетворюється в молочну кислоту завдяки життєдіяльності бактерій, наприклад *Lactobacillus bulgaricus*.

За хімічною будовою лактоза відноситься до дисахаридів, які відновлюють рідину Фелінга; після її гідролізу утворюється глюкоза і галактоза.

Лактоза – один із повноцінних цукрів і використовується в харчовій промисловості, а також у фармацевтичній – для виробництва антибіотиків: саме з неї готують поживні середовища для вирощування мікроорганізмів.

Брутто формула лактози $C_{12}H_{22}O_{11}$.

Структурна формула:



Реакція Фелінга

Для проведення реакції Фелінга, як правило, готують 1%-2% водні розчини вуглеводнів; змішують однакові об'єми розчинів досліджуваних вуглеводнів і реактиву Фелінга, нагрівають суміш до кипіння і спостерігають за утворенням червоного осаду закису міді.

Вуглеводи, які містять вільну карбонільну групу, здатні відновлювати реактив Фелінга. Реакція використовується для кількісного визначення вуглеводнів. Так, лактоза дуже легко вступає в реакцію Фелінга, в той час як сахароза не може реагувати з фелінговою рідиною внаслідок відсутності в її молекулі вільних карбонільних груп.

Осад гідроксиду міді також реагує з відновлюючими вуглеводами, утворюючи закис міді, але цей варіант менш зручний, тому що гідроксид міді може частково розкладатися під час нагрівання і давати чорний окис міді, який не реагує з відновниками в умовах досліду.

Якісна реакція на молочну кислоту

Якісною реакцією на молочну кислоту є взаємодія з нею феноляту заліза з утворенням комплексної сполуки яскраво-жовтого кольору.

Хлорид заліза (III) утворює з α -амінокислотами інтенсивне яскраво-жовте забарвлення завдяки виникненню стійких комплексних сполук. Вихідний розчин хлориду заліза також має коричнювато-жовтий колір; тому для більшої чіткості переходу забарвлення використовують його фіолетовий розчин, що містить фенолят заліза. α -оксикислоти витісняють фенол із цього феноляту і фіолетове забарвлення змінюється на жовте.

Завдання

1. Добути лактозу із молочної сироватки.
2. Визначити температуру плавлення ($T_{\text{пл.}}$) отриманого продукту.
3. Визначити, чи отриманий продукт є чистою лактозою чи монокрystalогідратом лактози.
4. Провести реакцію Фелінга і реакцію з фенолятом заліза молочної сироватки, витриманої у часі чи капустиного розсолу, які містять молочну кислоту – продукт окислення лактози молочнокислими бактеріями.

Хід виконання роботи

Сироватку, яка залишилась після добування казеїну, кип'ятять у фарфоровій чашці до коагулювання альбуміну сироватки. Відфільтровують його через полотнянку. Розчин знову випарюють до того моменту, поки з розчину не почне виділятися лактоза. Сирий кристалічний продукт, який викристалізувався із розчину, відфільтровують на лійці Бюхнера і сушать на повітрі. Подальшим випарюванням маточного розчину на водяній бані отримують другу порцію лактози. Підсушують і перевіряють $T_{\text{пл.}}$ експрес-методом.

Для отримання чистої лактози сирий продукт розчиняють у мінімальній кількості води (0,8-1,0 мл на 2,0-2,5 г продукту) і доливають

10,0 мл етанолу до помутніння розчину. Через декілька годин починають випадати кристали. Кристалізацію можна прискорити тертям скляною паличкою по стінках стакана.

Готовий продукт (чиста лактоза) відфільтровують і вимірюють $T_{\text{пл.}}$. Вихід чистої лактози 1,7-1,9 г.

Температура плавлення:

моногідрату: $T_{\text{пл.}}=201,6^{\circ}\text{C}$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{H}_2\text{O}$);

безводної лактози: $T_{\text{пл. безв.}}=223^{\circ}\text{C}$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$).

З отриманої лактози провести якісну реакцію з реактивом Фелінга (див. лаб. Роб. №13).

Проведення реакції Фелінга

Невелику кількість (на кінчику шпателя) лактози всипають у пробірку, доливають 1 мл води, перемішують до повного розчинення лактози. До утвореного розчину додають 1 мл рідини Фелінга і нагрівають на водяній бані. Спостерігають зміну забарвлення вмісту пробірки.

Аналогічно провести реакцію Фелінга із старою, витриманою в часі сироваткою, яка отримана в процесі ферментації молока в присутності *Lactobacillus bulgaricus* або капустиним розсолом. Записати спостереження.

Провести з такою сироваткою (розсолом) якісну реакцію на молочну кислоту.

До 0,5 мл 1%-ного розчину хлориду заліза (III) додати кілька краплин розчину фенолу до появи фіолетового забарвлення. В нову чисту пробірку

наливають 2 мл сироватки (розсолу) і додають 2-3 краплини добутої суміші. Спостерігають зміну забарвлення. Результати спостереження записують у робочий журнал.

Запитання для контролю знань

1. Який молочний цукор міститься в молоці (4-5%)?
2. Що відбувається з лактозою при скисанні?
3. Де використовується лактоза?
4. Напишіть брутто формулу та структурну формулу лактози.
5. Для чого використовується реакція Фелінга?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №13

КИСЛОТНИЙ ГІДРОЛІЗ САХАРОЗИ

Мета роботи: провести кислотний гідроліз сахарози, порівняти властивості сахарози і продуктів гідролізу, опираючись на дані якісних реакцій.

Прилади і матеріали: 1%-й розчин індиго синього, 0,1%-й розчин резорцину в 95%-му етанолі, 10%-й розчин Na_2CO_3 , 1%-й розчин глюкози, 0,2%-й розчин фруктози (або 5-10-й розчин меду), 1%-й розчин цукру (сахарози), 10%-й розчин H_2SO_4 , реактив Фелінга.

Методичні вказівки

Вуглеводи – це багатоатомні альдегідоспирти (кетоноспирти) і полімери цих сполук. У біосфері вуглеводів більше, ніж разом взятих інших органічних сполук. У рослинному світі на їхню долю припадає 80-90% з розрахунку на суху речовину. В тваринному організмі вуглеводи складають приблизно 20% від маси тіла.

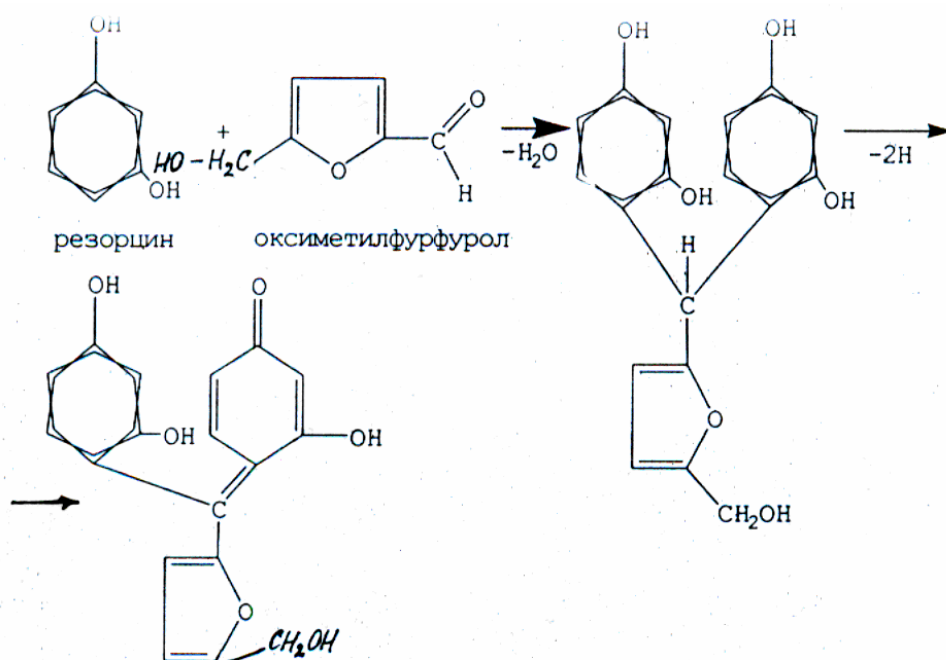
Рослини синтезують вуглеводи із неорганічних сполук у процесі фотосинтезу (для прикладу: щорічно рослини синтезують стільки вуглеводів, що в перерахунку на чистий вуглець це складає $4 \cdot 10^{10} \text{Т!}$); тваринні організми отримують їх із різноманітними харчовими продуктами; мікроорганізми досить активно розмножуються на вуглеводах, розкладаючи при цьому з допомогою ферментативних процесів складні вуглеводи до моносахаридів, які служать поживним середовищем для розмноження інших мікроорганізмів.

Залежно від будови і молекулярної маси вуглеводи поділяють на 3 основні групи: моносахариди, олігосахариди, полісахариди.

Моносахариди, які утворюються в процесі різних мікробіологічних синтезів є кінцевими складними органічними сполуками, які вже не можуть гідролізувати. Найпоширенішими з них у природному циклі є пентози і гексози. Виявити їх наявність у продуктах мікробіологічного синтезу можливо з допомогою певних якісних реакцій.

Реакція Селіванова на кетогексози.

При нагріванні із соляною кислотою кетогексоза перетворюється в оксиметилфурфурол, який із резорцином утворює сполуку червоного кольору (червоне забарвлення розчину):

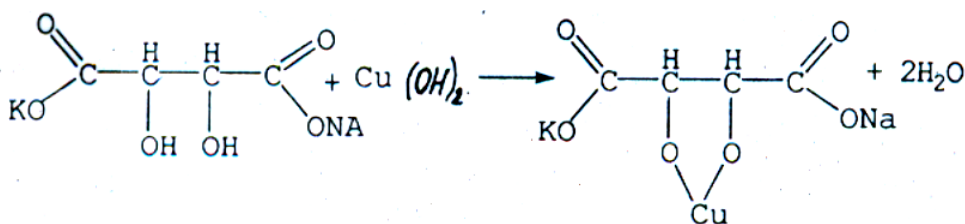
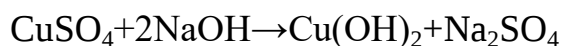


Альдогексози також дають цю реакцію, але вона протікає значно повільніше, що зумовлює специфічність реакції Селіванова на кетогексози.

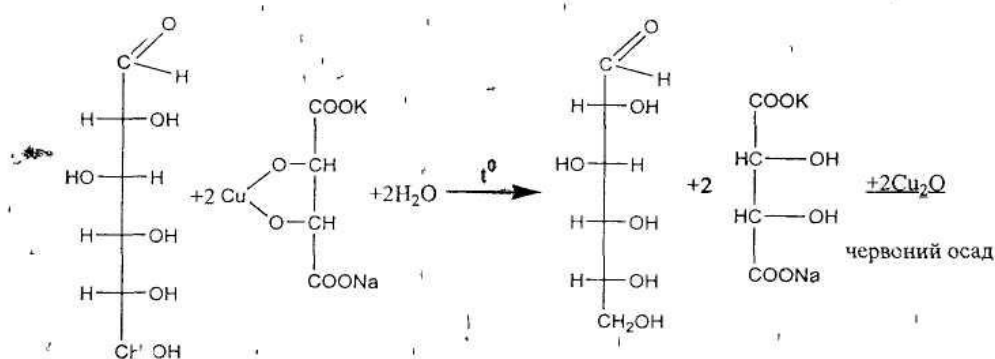
Реакція Фелінга (відновлення гідроксиду міді).

Суть реакції полягає у відновленні моносхаридами гідроксиду міді (II) в оксид міді (I). При проведенні реакції використовують реактив Фелінга – суміш мідного купоросу із сегнетовою сіллю (K,Na - виннокислий) в лужному середовищі.

При змішуванні мідного купоросу з лугом утворюється $Cu(OH)_2$, який у присутності сегнетової солі не випадає в осад за рахунок утворення комплексної сполуки:

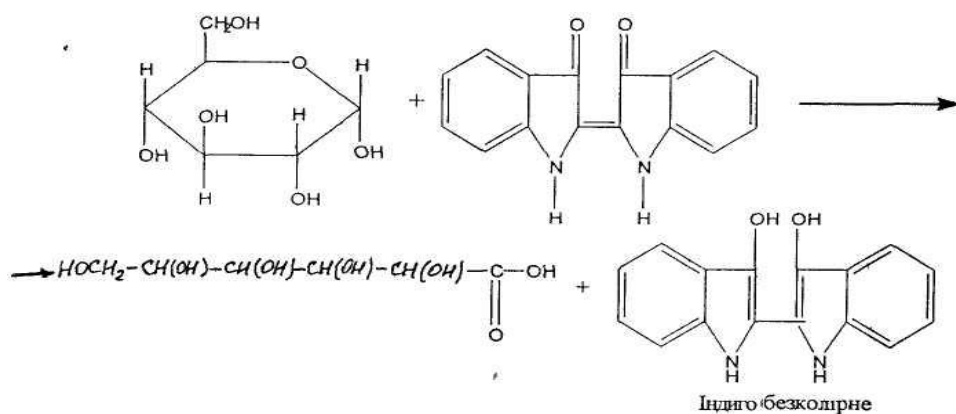


При взаємодії моносахаридів із фелінговою рідиною відбувається їх окислення і утворюється оксид міді (I):



Реакція Мюльдера на відновлення індиго.

Ця реакція базується на здатності моносахаридів відновлювати (знебарвлювати) індиго синє (у цій реакції приймає участь гідратна форма моносахариду):



Сахароза має молекулярну формулу $C_{12}H_{22}O_{11}$. Вона не відновлює реактив Толленса або Фелінга, тобто відноситься до невідновлюючих цукрів.

Під дією ферменту інвертази (із дріжджів) сахароза розщеплюється на глюкозу і фруктозу. Цей процес може відбуватися і під дією сильних неорганічних кислот.

Завдання

1. Провести кислотний гідроліз сахарози в присутності сильної мінеральної кислоти (H_2SO_4).

2. Провести якісні реакції отриманого гідролізату на присутність моносахаридів.

3. Результати дослідів записати у робочий журнал і зробити висновки із експериментальної роботи.

Хід виконання роботи

1. Кислотний гідроліз сахарози.

У пробірку наливають 4 мл 1%-ного розчину сахарози, 2 мл 10%-го розчину сірчаної кислоти (H_2SO_4) і кип'ятять 1-2 хв. Розчин охолоджують і нейтралізують сухим бікарбонатом натрію (NaHCO_3), додаючи його невеликими порціями, поки не припиниться виділення вуглекислого газу. З отриманим гідролізатом проводять якісні реакції на моносахариди.

2. Якісні реакції

а) Реакція Фелінга:

У пробірку наливають 1 мл гідролізату і доливають 1 мл реактиву Фелінга. Суміш нагрівають на киплячій водяній бані. Одночасно роблять контрольну пробу із 1%-ним розчином сахарози. Результати порівнюють і записують у зошит.

б) Реакція Селіванова:

У 3 пробірки наливають по 2 мл реактиву Селіванова і додають:

в 1-у пробірку – 2 краплі 1%-ного розчину фруктози;

в 2-гу пробірку – 2 краплі 1%-ного розчину сахарози;

в 3-ю пробірку – 2-4 краплі гідролізату.

Порівнюють отримані результати і записують у зошит, обґрунтовуючи побачені кольорові ефекти реакцій.

в) Реакція Мульдера

У 3 пробірки наливають:

в 1-у пробірку – 2 мл 1%-ного розчину глюкози;

в 2-гу пробірку – 2 мл 1%-ного розчину сахарози;

в 3-ю пробірку – 2 мл гідролізату.

У кожен пробірку додають 4-5 крапель розчину соди і 2 краплі розчину індиго синього і нагрівають. Спостерігають знебарвлення в певних пробірках. Якщо розчини в пробірках охолодити і покалатати, знову з'явиться синє забарвлення, оскільки індиго безбарвне окислюється за рахунок кисню повітря.

Результати спостереження записати в зошит, пояснити і обґрунтувати.

Запитання для контролю знань

1. На які основні групи поділяють вуглеводи залежно від будови і молекулярної маси?

2. Що таке вуглеводи?

3. На чому базується реакція *Мульдера*?

4. Під дією ферменту інвертази (із дріжджів) сахароза розщеплюється на які складові?

ДОБУВАННЯ МАЛЬТОЗИ ФЕРМЕНТАТИВНИМ РОЗЩЕПЛЕННЯМ КРОХМАЛЮ

Мета роботи: ознайомитись із процесом ферментації крохмалю діастазою, отримати солодовий цукор (мальтозу) і довести її будову за допомогою хімічних реакцій.

Прилади і матеріали: картопля, ячмінь, розчин Люголя, етанол, рідина Фелінга, 10%-й розчин Na_2CO_3 , 1%-й розчин індиго синього.

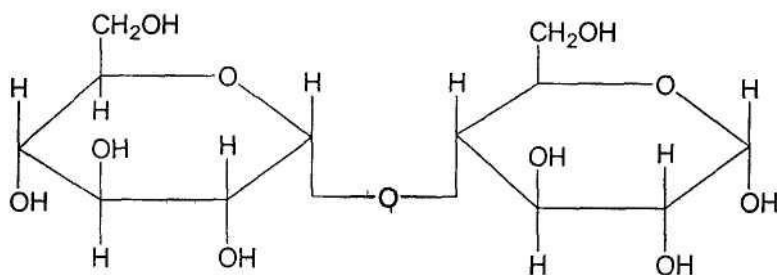
Марля, стакан на 200 мл, чашка Петрі, мірний циліндр на 10 мл, колба на 100 мл, водяна баня, ділильна лійка, фарфорова чашка, термометр.

Методичні вказівки

Дисахарид мальтозу, або солодовий цукор, отримують у промисловості на одній із стадій ферментативного розщеплення крохмалю в етанол за допомогою ферменту проростків ячменю – діастази. Це харчовий, добре засвоюваний цукор.

Подальший ферментативний гідроліз мальтози за допомогою ферменту дріжджів (мальтазою) або неорганічних кислот призводять до моносахариду глюкози.

Брутто-формула мальтози: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{H}_2\text{O}$ (кристалогідрат мальтози). Структурна формула мальтози:



Завдання

1. Отримати крохмаль із картоплі і витяжку з ферментом діастазою з проростків ячменю.
2. Провести ферментативний гідроліз крохмалю і якісні реакції на отриману в процесі ферментації мальтозу.

Хід виконання роботи

1. Добування крохмалю (підготовча робота).

1-2 картоплини обчистити від шкірки, потерти на дрібній тертці. Отриману картопляну кашку загорнути в подвійний шар марлі, опустити в стакан із водопровідною водою, інтенсивно прополоснути, відтиснути і знову розмочити. В результаті крохмаль збирається на дні стакана, а клітинні стінки (ЖМИХ) залишаються в марлі. Для кращої очистки крохмаль промивають декількома порціями холодної води декантацією (тобто обережно зливають: з осаду воду, так, щоб осад крохмалю залишився на дні стакана). Крохмаль переносять на фільтрувальний папір і сушать на повітрі. Вихід біля 10% від маси взятої картоплі.

2. Приготування солоду (підготовча робота).

Солод готують пророщенням ячменю. Для цього 50 г ячменю трішки змочують водою і розкладають на вологій тканині, покладений в чашку Петрі, зверху також прикривають вологою тканиною. Витримують при кімнатній температурі 2-4 доби, слідкуючи, щоб тканина була постійно волога. Утворені проростки відділяють від зерен ячменю. Після цього зважують 1 г проростків, розтирають їх, додають 5 мл води і настоюють 1 год. при 30-40°C (розчин повинен бути ледь теплим на дотик). Після настоювання витяжку фільтрують і використовують для гідролізу крохмалю.

3. Гідроліз крохмалю.

Суспензію 5 г крохмалю в 5 мл холодної води вливають тоненькою цівкою при безперервному перемішуванні в колбу на 100 мл в якій попередньо закип'ятили 35 мл води. Колбу ставлять на гарячу водяну баню і нагрівають 1 год. для отримання добре провареного крохмального клейстеру. Через 1 год. клейстер у колбі охолоджують до 55°C, додають водну витяжку із солоду (див. п. 2) і перемішують.

Клейстер оцукрюють 3-4 год. на водяній бані при 50-60°C. Реакція вважається закінченою, якщо проба з розчином йоду не дає забарвлення. Розчин фільтрують і упарюють на водяній бані до 7,5 мл. До залишку доливають 12,5 мл етанолу, добре перемішують і залишають на ніч у ділильній лійці. На дні лійки зсідуються декстрини у вигляді в'язкої рідини, яку зливають. Спиртовий розчин випарюють до сиропоподібного стану. До отриманого сиропу доливають 10 мл етанолу і дають розчину закипіти. Утворену спиртову суміш виливають у ділильну лійку, відділяють шар, що не розчинився у спирті (зливають через краник), знову залишають на 1 добу. Після відстоювання розчин декантують від осаду, що випав, спирт частково випаровують (до початку кристалізації мальтози).

Отримані кристали мальтози очищають перекристалізацією із 85%-го етанолу. В результаті отримують чисту мальтозу у вигляді порошку або безбарвних кристалів. Визначають $T_{пл}$ і проводять якісні реакції. Вихід 1,2-1,5 г.

$T_{пл.літ} = 102-103^{\circ}\text{C}$ (моногідрат $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{H}_2\text{O}$).

$T_{пл.літ} = 160-165$ (чиста мальтоза $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$).

4. Якісні реакції мальтози.

а) Реакція Фелінга.

Невелику кількість (на кінчику шпателя) мальтози всипають у пробірку, доливають 1 мл води і добре перемішують до повного розчинення мальтози. До цього розчину додають 1 мл фелінгової рідини, нагрівають до кипіння і спостерігають випадання червоного осаду оксиду міді (I).

б) Реакція Мульдера.

У пробірку з 1 мл води насипають на кінчику шпателя мальтозу і розчиняють при перемішуванні. До утвореного розчину додають 4-5 крапель 10%-вого розчину соди і 2 краплі 1%-вого розчину індиго синього і нагрівають. Спостерігається знебарвлення синього розчину; при охолодженні суміші і перемішуванні знову з'являється синє забарвлення внаслідок окислення безбарвного індиго киснем повітря.

Результати спостережень записують у лабораторний журнал.

Запитання для контролю знань

1. Напишіть бруто-формулу та структурну формулу мальтози.
2. Що таке солод?
3. Як готується крохмальний клейстер?
4. Які існують якісні реакції мальтози?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 15

ДОБУВАННЯ ЛІГНІНУ КИСЛОТНИМ ГІДРОЛІЗОМ СОНЯШНИКОВОГО ЛУШПИННЯ АБО ТИРСИ

Мета роботи: отримати і ознайомитися із побічним продуктом виробництва гідролізного спирту і дріжджів.

Прилади і матеріали: соняшникове лушпиння або тирса, етанол, бензол, 72%-на сірчана кислота, дистильована вода, набір розчинників по 5-10 мл.

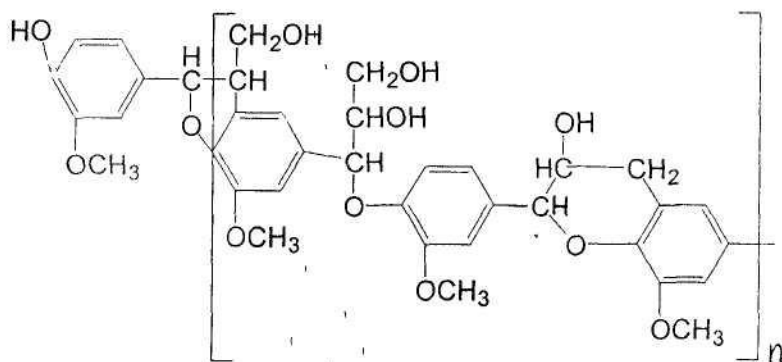
Ступка і товчачик; шліфувана колба з корком на 200 мл або апарат Сокслета, або круглодонна колба із зворотним холодильником; фільтрувальний папір, конічна колба на 200 мл, мірний циліндр на 10 мл, лійка Бюхнера, колба Бунзена, пробірки, шпатель.

Методичні вказівки

Лігнін – основна частина здерев'янілих рослинних тканин. Накопичується як відходи виробництва гідролізного спирту та дріжджів із деревини та іншої рослинної сировини. В рослинах він зв'язаний із целюлозою і пентозанами і при кип'ятінні з бісульфітом кальцію переходить у розчин (сульфітні луги і барда).

Лігнін – високомолекулярна сполука, яка складається із конденсованих по вуглецевих зв'язках різних залишків, генетично пов'язаних із коніферилловим спиртом $3,4(\text{CH}_3\text{O},\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$.

Хімічна будова частини лігніну з ялини представлена приблизною формулою (послідовність окремих частин ще точно не встановлена):



Завдання

1. Провести гідроліз полісахаридів і отримати лігнін.
2. Ознайомитися із зовнішнім виглядом отриманого лігніну, перевірити його розчинність у органічних розчинниках і воді.
3. Спостереження записати в робочий журнал.

Хід виконання роботи

1. Гідроліз лігніну.

10 г соняшникової лузги добре розтирають (можна взяти деревну тирсу), заливають сумішшю спирту і бензолу (1:1) і витримують 1 добу для видалення жирно-воскових домішок (настоювання можна замінити тривалим кип'ятінням у колбі із зворотним холодильником). Після цього суміш фільтрують, промивають невеликою кількістю розчинника і висушують на повітрі.

Сухий залишок переносять у конічну колбу на 200 мл, доливають 10 мл 72%-ї H_2SO_4 і залишають на 48 год. Після цього в колбу доливають 80 мл дистильованої води і кип'ятять майже 1 год. для завершення гідролізу полісахаридів. Колбу охолоджують, осад лігніну відфільтровують на лійці Бюхнера, промивають великою кількістю води і сушать у сушильній шафі або на повітрі. Вихід = 3 г. Лігнін має вигляд порошку рудого кольору.

2. Перевірка розчинності лігніну.

У декілька пробірок внести невеликі кількості лігніну (на кінчику шпателя) і влити в кожну з пробірок по 1 мл розчинників, вказаних викладачем. Результати спостереження бажано оформити у вигляді таблиці.

Запитання для контролю знань

1. Що таке лігнін?
2. Яку хімічну будову має частина лігніну?
3. Як розчиняється лігнін у органічних розчинниках і воді?
4. Як проводиться гідроліз лігніну?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 16

ВИЯВЛЕННЯ ДІЇ ФЕРМЕНТІВ І ВИВЧЕННЯ ЇХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Мета роботи: ознайомитися із специфікою дії ферментів і їхніми властивостями на прикладі ферментів амілази і сахарази.

Методичні вказівки

Ряд ферментів розщеплює лише певні окремі речовини, тобто відзначаються абсолютною специфічністю. Але більшість ферментів виявляють відносну специфічність – розщеплюють групу речовин, які мають однаковий тип зв'язків у молекулі (пептидний, ефірний та ін.). Наприклад, специфічним субстратом для ферменту амілази є крохмаль, для ферменту сахарази – сахароза і т.п.

Ферменти досить термолабільні і виявляють оптимальну активність при температурі 35-45°C. Підвищення температури вище 50°C знижує їхню активність, далі відбувається руйнування структури молекули ферменту.

Кожен фермент виявляє свою активність лише при певному рН середовища. Так, для амілази слини оптимальне значення рН середовища складає 6,8. У кислому і лужному середовищі активність цього ферменту знижується і крохмаль повністю не розщеплюється, лише до стадії декстринів, які з розчином йоду дають червоно-фіолетове або червоно-буре забарвлення.

Активатори і інгібітори також мають значний вплив на активний центр ферменту – сприяють його активності або блокують. Для ферменту слини амілази активатором служить хлорид натрію, інгібітором – сульфат міді.

Завдання

1. Провести ферментативний гідроліз крохмалю з метою виявлення дії ферменту амілази.
2. Виявити специфічність дії ферментів на прикладі розщеплення крохмалю і сахарози (цукру).
3. Перевірити вплив температури на активність ферментів.
4. Вивчити вплив рН середовища на активність ферментів.
5. Ознайомитися із впливом активаторів та інгібіторів на активність ферментів на прикладі ферменту амілази.

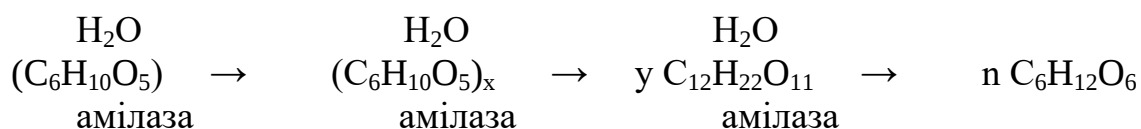
Хід виконання роботи

Ферментативний гідроліз крохмалю.

Матеріали і обладнання:

1%-й розчин крохмалю, розчин Люголя, 5%-й розчин CuSO_4 , 10%-й розчин NaOH .

Пробірки, водяна баня, фільтрувальний папір, маленькі лійки. Фермент слини амілаза в певних умовах здійснює гідроліз крохмалю до мальтози і глюкози:



Виявити продукти гідролізу можна з допомогою реакцій з розчином йоду (реактивом Люголя) і реакцій Троммера або Фелінга.

Негідролізований крохмаль дає з йодом синє забарвлення (позитивна реакція), глюкоза такого забарвленню не дає. Позитивну реакцію Троммера або Фелінга (цеглясто-червоне забарвлення) дає глюкоза, в той час як крохмаль не може дати такої реакції внаслідок відсутності функціональних альдегідних груп.

Перш, ніж проводити якісні реакції, необхідно приготувати препарат із ферментом амілазою.

Приготування розчину ферменту слини амілази

Прополіскують рот дистильованою водою. Знову набирають у рот воду, тримають 2 хв., випускають воду з рота на підготовлений фільтр з пробіркою і фільтрат використовують у подальших експериментах.

Проведення ферментативного гідролізу

У 4 пронумеровані пробірки наливають по 5 крапель розчину крохмалю.

У пробірки №1 і №2 вносять по 3 краплі дистильованої води (контроль).

У пробірки №3 і №4 вносять по 3 краплі розчину слини.

Всі пробірки струшують і ставлять у термостаті при 37°C на 15 хв.

Після термостатування в пробірки №1 і №3 додають по 2 краплі розчину Люголя. В одній із пробірок спостерігають зміну забарвлення.

У пробірки №2 і №4 додають по 2 краплі розчину CuSO_4 і по 8 крапель розчину NaOH , нагрівають до кипіння. Відмічають результат. Результат експерименту вносять у таблицю 4.

Таблиця 4 – Гідроліз крохмалю амілазою слини

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакції	
			З розчином Люголя	Троммера
1	крохмаль	H ₂ O (контроль)		
2	крохмаль	H ₂ O (контроль)		
3	крохмаль	амілаза		
4	крохмаль	амілаза		

Виявлення специфічності дії ферментів.

Матеріали і обладнання: розчин Люголя, 5%-й розчин CuSO₄, 10%-й розчин NaOH, 1%-й розчин крохмалю, 2%-й розчин сахарози (цукру), розчин слини, дріжджі, скляний пісок, дистильована вода, толуол; пробірки, піпетки або скляні трубочки, маленька ступка з товкачиком, циліндр на 50 мл, піпетка на 1 мл або циліндр на 10 мл, лійка середнього розміру (діаметр 3-5 см), фільтрувальний папір, гумова груша.

Визначення специфічності амілази.

Для досліду беруть 4 пронумеровані пробірки. В пробірки №1 і №2 вносять по 10 крапель розчину крохмалю, в пробірки №3 і №4 – по 10 крапель розчину цукру. В усі 4 пробірки додають по 4 краплі розчину слини, струшують і поміщають у термостат на 15 хв. при 37 °С.

Після термостатування в пробірки додають реактиви:

- у пробірки №1 і №3 додають по 1 краплині розчину Люголя;
- у пробірки №2 і №4 додають по 1 краплині розчину CuSO₄ і по 4 краплі розчину NaOH та нагрівають до кипіння. Записують свої спостереження у таблицю 5.

Таблиця 5 – Визначення специфічності дії ферменту амілази

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакції	
			З розчином Люголя	Троммера
1	крохмаль	амілаза		
2	крохмаль	амілаза		
3	сахароза	амілаза		
4	сахароза	амілаза		

Визначення специфічності сахарози.

Для проведення цього експерименту спочатку потрібно отримати фермент сахарози із дріжджів.

Приготування розчину ферменту сахарази: 0,5г дріжджів розтирають у ступці з 1 г скляного піску, доливають 48,5 мл дистильованої води і 1 мл толуолу. Суміш ретельно перемішують, фільтрують через складчастий фільтр. Фільтрат з ферментом сахарази використовують у нижченаведеному досліді. Беруть знову 4 пробірки з такою нумерацією: №5, №6, №7, №8.

У пробірки №5 і №6 вносять по 10 крапель розчину крохмалю, в пробірки №7 і №8 – по 10 крапель розчину цукру. В усі 4 пробірки додають по 4 краплі розчину ферменту сахарази і ставлять на 15 хв. в термостат при 37°C.

Після термостатування в пробірки №5 і №7 наливають по 2 краплі розчину Люголя; в пробірки №6 і №8 додають по 2 краплі CuSO_4 і по 8 краплі розчину NaOH та підігрівають до закипання. Спостерігають за зміною забарвлення у пробірках і роблять висновки. Результати даного експерименту заносять у таблицю 6.

Таблиця 6 – Визначення специфічності дії ферменту сахарази

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакції	
			з розчином Люголя	Троммера
5	крохмаль	сахараза		
6	крохмаль	сахараза		
7	сахароза	сахараза		
8	сахароза	сахараза		

Роблять загальний висновок про розщеплення субстратів лише специфічними ферментами і результати вносять в узагальнюючу таблицю 7.

Таблиця 7 – Специфічність дії ферментів

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакції	
			з розчином Люголя	Троммера

Визначення впливу температури на активність ферментів

Матеріали і обладнання:

1%-й розчин крохмалю, розчин слини, 2%-й розчин сахарози, розчин ферменту сахарази, розчин Люголя, 5%-й розчин CuSO_4 , 10%-й розчин NaOH .

Пробірки, піпетки, штатив для пробірок, термостат.

Готують 5 пробірок: №1, №2, №3, №4, №5. В усі пробірки вносять по 10 крапель 1%-го розчину крохмалю. В пробірку №1 додають 5 крапель дистильованої води (контроль).

У пробірки №2 і №3 додають по 5 крапель розчину слини; в пробірки №4 і №5 додають по 5 крапель кип'яченого розчину слини. Пробірки струшують і поміщають у термостат на 15 хв. при температурі 37°C. Після прогрівання пробірки охолоджують і проводять реакції з розчином Люголя (по 1 краплині в пробірки №1, №2, №4), а також реакцію Троммера (в пробірки №3 і №5 додають по 1 краплині CuSO_4 і по 4 краплі NaOH та нагрівають).

Аналогічно проводять експерименти із ферментом сахаразою, використовуючи *активний розчин* сахарози і *дезактивований кип'ятінням* для розщеплення 2%-го розчину цукру. Для контролю в пробірку №6 вносять 10 крапель 2%-го розчину цукру і 5 крапель дистильованої води. У пробірки №7 і №8 – по 10 крапель розчину цукру і по 5 крапель розчину з ферментом сахаразою. У пробірки №9 і №10 – по 10 крапель розчину цукру і по 5 крапель кип'яченого розчину сахарози.

Після термостатування проводять реакції з розчином Люголя і реакцію Троммера, як вказано вище. Результати записують у вигляді таблиці 8.

Таблиця 8 – Вплив температури на активність ферментів

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Температура, °C	Реакції	
				з розчином Люголя	Троммера
1	крохмаль	H_2O , контроль	37		
2	крохмаль	амілаза	37		
3	крохмаль	амілаза	37		
4	крохмаль	амілаза дезактивована	100		
5	крохмаль	амілаза дезактивована	100		
6	цукор	H_2O , контроль	37		
7	цукор	сахараза	37		
8	цукор	сахараза	37		
9	цукор	сахараза дезактивована	100		
10	цукор	сахараза дезактивована	100		

Вплив рН середовища на активність ферментів

Матеріали і обладнання:

1%-й розчин крохмалю, дистильована вода, 0,2%-й розчин соляної кислоти; розчин слини, розбавлений у 10 разів, розчин Люголя. Пробірки, піпетка на 1 мл або мірний циліндр на 5 мл, піпетки звичайні, груша гумова.

У 8 пронумерованих пробірок наливають по 1 мл дистильованої води. У пробірку №1 вносять 1 мл розчину соляної кислоти, перемішують, відбирають 1 мл утвореної суміші і переносять в пробірку №2. Вміст пробірки №2 перемішують, відбирають 1 мл утвореної суміші і переносять в пробірку №3 і так далі до №8. З пробірки №8 відбирають 1 мл суміші і виливають.

Таким чином, в усіх пробірках залишають по 1 мл суміші і отримують розведення соляної кислоти у спадній концентрації, що відповідає різним значенням рН середовища (для наочності рН у кожній пробірці визначають із допомогою універсального індикатора).

Після цього в кожну пробірку додають по 2 мл розчину крохмалю і по 1 мл розчину слини. Пробірки струшують і поміщають у термостат на 15 хв. при температурі 37°C. Після термостатування їх охолоджують і додають у кожну по 1 краплині розчину Люголя. Відмічають, при якій концентрації HCl (рН середовища) відбувся повний гідроліз крохмалю.

Результати спостереження записують у таблицю 9.

Таблиця 9 – Вплив рН середовища на активність амілази

№ пробірки	Субстрат	Фермент	рН середовища	Реакції з розчином Люголя (інтенсивність забарвлення розчину)
1	крохмаль	амілаза		
2	крохмаль	амілаза		
3	крохмаль	амілаза		
4	крохмаль	амілаза		
5	крохмаль	амілаза		
6	крохмаль	амілаза		
7	крохмаль	амілаза		
8	крохмаль	амілаза		

Вивчення впливу активаторів та інгібіторів на активність ферментів

Матеріали і обладнання:

Розчин слини, розведений у 5 разів; дистильована вода, 1% розчин крохмалю, 1%-й розчин CuSO₄; 1%-й розчин NaCl; пробірки, піпетки.

У 3 пробірки відміряють по 10 крапель розчину слини. Потім додають:

у пробірку №1 – краплю розчину NaCl;
у пробірку №2 – краплю розчину CuSO₄;
у пробірку №3 – краплю дистильованої води (контроль).

Перемішують, вносять у кожну пробірку по 5 крапель розчину крохмалю і залишають на 3-5 хв. при кімнатній температурі. Після цього у всі пробірки додають по 1 краплі розчину Люголя, перемішують, спостерігають за забарвленням розчинів і визначають, у якій пробірці виявилась дія активатора чи інгібітору. Результати роботи оформляють у робочому журналі у вигляді таблиці 10.

Таблиця 10 – Дія активатора та інгібітора на активність амілази

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Реакція з йодом в присутності:		
			води	CuSO ₄	NaCl
1	крохмаль	амілаза			
2	крохмаль	амілаза			
3	крохмаль	амілаза			

Запитання для контролю знань

1. Назвіть специфічний субстрат для ферменту амілази та ферменту сахарози.
2. При якій температурі ферменти виявляють оптимальну активність?
3. Поясніть поняття «активатори» і «інгібітори».
4. Як впливають активатори і інгібітори на ферменти?
5. За допомогою яких реакцій можна виявити продукти гідролізу?
6. Поясніть вплив рН середовища на активність амілази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Асонов, Н.Р. Микробиология [Текст] / Н.Р. Асонов. – М. : Колос. 1997, – 352с.
2. Емцев, В.Г. Микробиология [Текст] / В.Г. Емцев, В.К. Шильникова. – М.: Агропромиздат, 1990. – 191 с.
3. Воробьева, Л.И. Промышленная микробиология [Текст] / Л.И. Воробьева. – М. : МГУ, 1989, 237 с.
4. Техника безопасности в микробиологической промышленности [Текст] / Под ред. Цигальницкого В.М. – М.: Лесная промышленность. 1988.– 128 с.
5. Жвирблянская, А.Ю. Микробиология в пищевой промышленности [Текст] / А.Ю Жвирблянская, О.А. Бакушинская – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 500 с.
6. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія [Текст] / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ,

2004. – 471 с.

7. Векірчик, К.М. Мікробіологія з основами вірусології [Текст] / К.М. Векірчик. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.

8. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии [Текст] / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин. – М.: Мастерство, 2001. – 224 с.

9. Векірчик, К.М. Практикум з мікробіології [Текст] / К.М Векірчик. – К.: Либідь, 2001. – 144 с.

10. Панкратов, А.Я. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии [Текст] / А.Я Панкратов, В.С Григоров. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 216 с.

11. Жвирблянская, А.Ю. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности [Текст] / А.Ю Жвирблянская, О.А. Бакушинская. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 312 с.

12. Нецепляев, С.В. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения [Текст] / С.В Нецепляев, Л.Я. Панкратов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 224 с.

13. Слюсаренко, Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств [Текст] / Т.П. Слюсаренко – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 207 с.

14. Практикум по биохимии [Текст] / Под ред. С.Е. Северина и Г.Н. Соловьевой. – М.: МГУ, 1989. – 510 с.

15. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений [Текст] / Г.В. Лазурьевский. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.

16. Биотехнология: учебное пособие для вузов [Текст] / Под ред. И.С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.

17. Панкратов, А.Я. Терминологический словарь по технической микробиологии [Текст] / А.Я. Панкратов, Е.С. Анюшкин. – Воронеж: Издат. Воронеж. ун-та, 1989. – 69 с.

