



BIOKEEMIA LABORA- TOORSED TÖÖD

TALLINN
1971

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Кафедра технологии пищевых продуктов

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО

Б И О Х И М И И

Составили: А.И. Кестнер, Э.Х. Сиймер

На эстонском языке

2

79688

Heaks kiidetud kateedri koosolekul

11.juunil 1971.a.

Koostajad: A.Köstner

E.Siimer

Vastutav toimetaja A.Kann

Trükkida antud 14. IX 1971. Paber 60x84/16
Trükipg.5,0. Tingpg.4,65.Tiraaz 300.Tell.555
TPI rotaprint, Tallinn, Koskla 2/9
Hind 14 kop.

SISSEJUHATUS

Biokeemia nagu iga teise keemiadistsipliini õppimisel on hädavajalik laboratoorne töö. Käesolevas kogumikus on esitatud kohustuslikud biokeemia laboratoorsete tööde eeskirjad Tallinna Polütehnilise Instituudi toiduainetetööstuse ja tootlustamise erialade üliõpilastele.

Laboratoorsed tööd teenivad antud juhul kaht eesmärki. Esiteks tutvuvad üliõpilased biokeemia olulisemate ainegruppide - valkude, nukleiinhapete, suhkrute, rasvade, ensüümide ja vitamiinide esindajate mõningate omadustega ning käärimisprotsessi kui tööstuslikult olulise biokeemiliste reaktsioonide kompleksiga. See praktiliste tööde külg on teoreetilise kursuse illustratsiooniks ja süvendamiseks. Teiseks on biokeemia laboratoorsete tööde ülesandeks üliõpilaste tutvustamine biokeemiliste uurimismetoditega. Tuleb silmas pidada, et biokeemilisi uurimismetodeid on teadusliku uurimistöö kõrval laialt rakendatud ka vahetult tööstus- ja kliiniliste laboratooriumide praktikas. Seetõttu on vastavate uurimismetodite põhimõtete omandamine hädavajalik kõigile toiduainetega tegelevatele inseneridele.

Kaasajal on biokeemias üheks olulisemaks uurimismetodiks kromatograafia. Ka esitatav laboratoorsete tööde programm näeb ette ainete paber-, vedelik- ja gaasikromatograafilise lahutamise. Praktiliste tööde tegemisel tuleb kasutada ka kolorimeetrilist ja mahtanalüüsi. Laboratoorsete tööde maht ja aparatuuri defitsiitsus ei võimalda aga üliõpilaste laboratoorsete tööde programmi lülitada selliseid komplitseeritud instrumentaalseid meetodeid, nagu ultratsentrifuugimine, mitmesugused spektroskoopiavõtted, isotoopide kasutamine jt.

Igasuguses uurimistöös on esimeseks lüliks antud probleemi käsitlevast kirjandusest ülevaate saamine. Seetõttu on laboratoorsete tööde programmi lülitatud ka kirjanduse ülevaate koostamine, mille abil üliõpilased tutvuvad neile hiljem äärmiselt vajaliku erialakirjanduse läbitöötamise meetodikaga.

Laboratoorsete tööde käigus omandatud teadmiste ja viimuste kinnistamiseks lõpeb programm väikesemahulise uurimistööga, nn. lõputööga. Lõputöö antakse igale üliõpilasele (või väikesele grupile) individuaalselt ja sisaldab teatud uudsuse elementi. Lõputöö resultate kasutatakse kateedri teaduslikus uurimistöös või laboratoorsete tööde meetodika täiustamisel.

KVALITATIIVSED REAKTSIOONID

Kvalitatiivsete katsete eesmärk on mõningate valkude, süsivesikute ja rasvade teoreetilisest kursusest tuntud iseloomulike reaktsioonidega tutvumine.

Kvalitatiivsete tööde eeskirjades antud ainete kogused on orienteeruvad ja töö tegemisel piisab silmamõõdust.

1. Valkude reaktsioonid

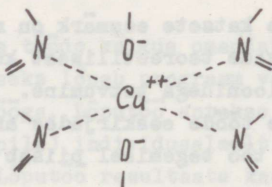
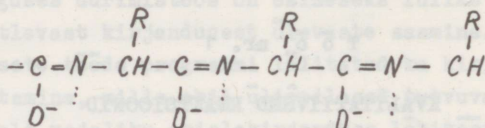
Valkudele on iseloomulik terve rida värvusreaktsioone, mida kasutatakse nende kvalitatiivseks ja ka kvantitatiivseks määramiseks. Valkude värvusreaktsioone võib jagada kahte gruppi. Üldreaktsioonid on seotud peptiidahela või aminohapete omadustega ja toimuvad seega kõikide valkudega.

Erireaktsioonid toimuvad mõne aminohappe külghelaga (aromaatse hüdroksüülrühma, - SH grupi, histidiini jm.). See- ga annavad valgud teatud erireaktsiooni ainult nende koostises selleks reaktsiooniks vajaliku aminohappe leidumisel. Enamus valke sisaldab aga kõiki tüüpilisi aminohappeid, seega on ka erireaktsioonid kasutatavad valkude üldiste reaktsioonidena. Ainult mittetäisväärtuslikel valkudel puuduvad mõned erireaktsioonid.

1.1. Biureedireaktsioon

Leeliselises keskkonnas moodustab polüpeptiidahel kompleksi Cu^{++} ioonidega.

Tekkiv kompleks on iseloomuliku ja küllalt stabiilse violetse värvusega. Biureedireaktsioon on kasutatav ka valkude kvantitatiivseks määramiseks (kolorimeetriliselt).

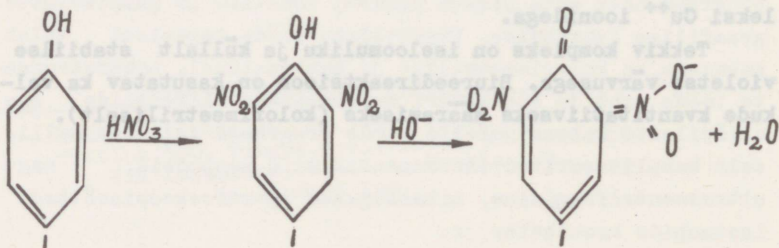


T ö ö k ä i k

Ühte katseklaasi valatakse 1 ml munavalgu lahust, teise sama hulk valguhüdrolüsaati. Mõlemasse lisatakse 1 ml 10% NaOH, mõni tilk 1% CuSO₄ lahust ja loksutatakse. Selgitada värvuse tekkimist.

1.2. Kaantoproteiinreaktsioon (Mulderi reaktsioon)

Kontsentreeritud lämmastikhappe sadestab valke pöördumata. Soojendamisel toimub eeskätt türosiini tuuma nitreerimine. Moodustunud nitrofenooli-tüüpi ühend on intensiivselt kollase värvusega ja käitub kui happe-aluse indikaator, omandades leeliselises keskkonnas oranži värvuse.



T ö ö k ä i k

Ühte katseklaasi valatakse 1 ml munavalgu lahust ja teise 1 ml valguhüdrolüsaati. Mõlemasse lisatakse 5-6 tilka konts. HNO_3 , reaktsioonisegu soojendatakse. Seejärel segu jahutatakse, lisatakse NH_4OH ammoniaagi lõhna säilumiseni. Kirjeldada toimuvaid muutusi.

1.3. Millon'i reaktsioon

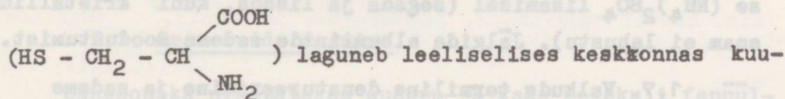
Reaktsioon on põhimõtteliselt analoogiline eelmisega. Elavhõbedasoolade juuresolekul annavad aga moodustunud nitroühendid tunduvalt intensiivsema punakaspruuni värvuse. Nagu eelmiseski reaktsioonis, reageerivad peale aromaatsete tuumade ka heterotsükklilised.

T ö ö k ä i k

Ühte katseklaasi võetakse 1 ml munavalgu lahust, teise 1 ml valguhüdrolüsaati, kolmandasse 1 ml želatiinilahust. Igasse katseklaasi lisatakse 5-6 tilka Millon'i reaktiivi ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 + \text{HNO}_3$). Reaktsioonisegu soojendatakse $40-50^\circ$ -ni. Jälgitakse toimuvaid muutusi ja tehakse järeldused želatiini struktuuri kohta.

1.4. Tioolreaktsioon

Tioolrühma - SH sisaldav aminohape tsüsteiin



T ö ö k ä i k

1 ml $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,5%-lisele lahusele lisatakse 20% NaOH kuni tekkiva sademe lahustumiseni. Lisatakse 0,5 ml

munavalgu lahust. Reaktsioonisegu keedetakse mõne minuti vältel pruunikasmusta kolloidse sademe tekkimiseni.

1.5. Valkude sadestamine triklooraädikhappega

Triklooraädikhape on laialt levinud valke denatureeriv sadestaja, kuid see ei sadesta valguhüdroolüsaate. Seega kasutatakse triklooraädikhapet valkude eraldamiseks väikese molekulaarsematest lämmastikuühenditest.

T ö ö k ä i k

Ühte katseklaasi valatakse 1 ml munavalgu lahust, teise sama kogus munavalgu hüdroolüsaati. Mõlemale lisatakse mõni tilk CCl_3COOH lahust. Jälgitakse sademe tekkimist.

1.6. Albumiinide ja globuliinide eraldamine

Globuliinid sadestuvad poolküllastatud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahusest, albumiinide sadestamiseks on vaja kõrgemat soolakontsentratsiooni.

T ö ö k ä i k

3 ml munavalgu lahusele lisatakse võrdne maht küllastunud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahust ja jäetakse 5 minutiks seisma. Globuliinide sade eraldatakse filtrimisel ja filtraadile kristallise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lisamisel (segada ja lisada, kuni kristallid enam ei lahustu). Jälgida albumiinide sademe moodustumist.

1.7. Valkude termiline denatureerimine ja sademe lahustuvuse sõltuvus pH-st

Kõik valgud denatureeruvad kõrgel temperatuuril, kusjuures denatureerumise temperatuur sõltub valgu loomusest ja keskkonnatingimustest. Tavaliselt kaasneb denatureerimisele ka valgu sadestumine. Isoelektrilisest täpist tunduvalt erineva pH puhul võib denatureerunud valk ka lahusesse jääda.

T ö ö k ä i k

Kahte katseklaasi valatakse 2 ml munavalgu lahust. Ühte katseklaasi lisatakse 1 ml kontsentreeritud äädikhapet. Mõlemaid lahuseid kuumutatakse keemiseni. Jälgitakse sademe tekkimist.

1.8. Valkude pöörduv sadestamine orgaaniliste lahustitega

Etanool, atsetoon jt. veega segunevad solvendid sadestavad valke. Sadestaja kontsentratsiooni vähenemisel lahustub saadud sade uuesti.

T ö ö k ä i k

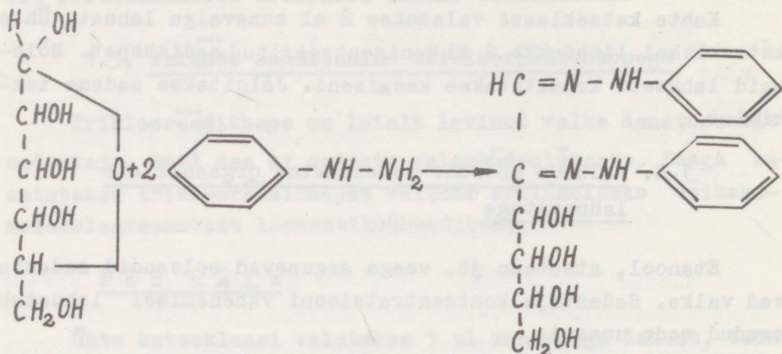
Katseklaasi valatakse 2 ml munavalgu lahust. Lisatakse ettevaatlikult ja segu pidevalt loksutades orgaanilist solventi selge sademe tekkimiseni. Segu lahjendatakse veega kuni sademe lahustumiseni. Kui orgaanilist solventi lisati ettevaatamatult kiiresti, võib toimuda ka denatureerumine ja sade ei lahustu täielikult.

2. Süsivesikute ja rasvade reaktsioonid

Suur osa vaadeldavaid süsivesikute reaktsioone on seotud neis reaktiivse poolatsetaalse hüdroksüülrühma esinemisega, mis reageerib kui aldehüüd.

2.1. Osasoonide saamine

Osasooniks nimetatakse suhkru ja kahe molekuli fenüülhüdrasiini liitumise produkti.



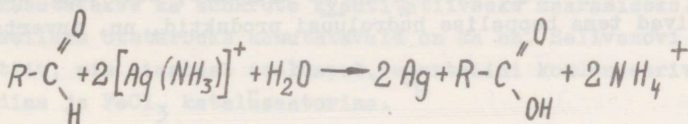
Osasoonid kristalluvad hõlpsasti lahustest, kusjuures kristallide kuju ja sulamistemperatuur on lähtesuhkrule iseloomulikud. Osasoone kasutati väga laialdaselt suhkrute uurimisel, kuid tänapäeval on selleks otstarbeks tavalisem kromatograafiliste meetodite kasutamine.

T ö ö k ä i k

2 ml taandava suhkru (glükoos, arabinoos, galaktoos) lahusele lisatakse 0,1 g fenüülhüdrasiini ja 0,2 g naatriumatsetaati. Reaktsioonisegu hoitakse aeg-ajalt loksutades 40 min. keeval vesivannil, jahutatakse jäävannil. Tekkinud kristalle vaadeldakse mikroskoobiga ja joonistatakse nende kuju.

2.2. Hõbepeegli reaktsioon

Suhkrutes sisalduv aldehüüdrühm taandab mitmete metallide sooli. Hõbeda ammoniakaalsest lahusest sadestub metall klaasi pinnale peeglina.



T ö ö k ä i k

Hoolikalt pestud katseklaasi valatakse 1 ml 1% Ag NO₃ lahust, lisatakse 0,5 ml kontsentreeritud NH₄OH ja 1 ml glükoosi lahust. Segu soojendatakse ettevaatlikult. Hõbe sadestub katseklaasi seintele peeglina. Määratud katseklaasi kasutamisel või ettevaatamatul soojendamisel tekib must sade.

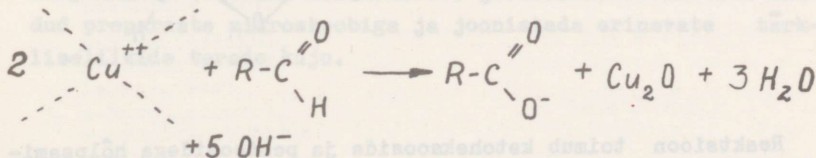
2.3. Sahharoosi hüdrolüüsi (inversiooni) kontroll Fehlingi lahusega

Üheks tavalisemaks reaktiiviks taandavate suhkrute määramisel on kahevalentse vase leeliselise tartraatkompleksi, nn. Fehlingi reaktiiv.

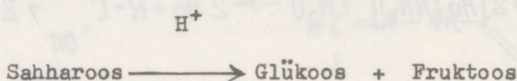
Aldehüdrihm taandab vase ühevalentseks oksiidiks, mis moodustab punase sademe.

Fehlingi reaktiiv saadakse Fehlingi I lahuse (CuSO₄ vesilahus) ja Fehlingi II lahuse (leeliselise K-Na-tartraadi vesilahus) kokkusegamisel.

Tekkiv vasekompleks reageerib aldoosi või ketoosi toimel järgmiselt:



Reaktsiooni annavad ainult taandavad suhkrud. Seega sahharoos Fehlingi reaktiiviga ei reageeri, küll aga reageerivad tema happelise hüdrolyüsi produktid, nn. invertsuhkur.

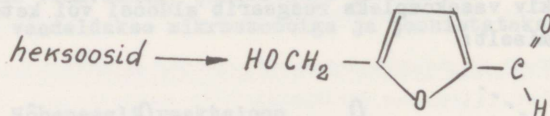
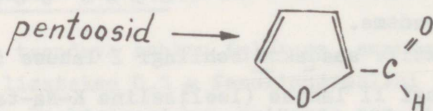


T ö ö k ä i k

Kahte katseklaasi valatakse ä 1 ml sahharoosi lahust. Ühte klaasi lisatakse 1 tilk kontsentreeritud HCl. Mõlemat lahust keedetakse 10 minutit keeval vesivannil ja mõlemale lisatakse ä 1 ml Fehlingi I ja II lahust. Saadud intensiivselt sinise lahuse soojendamisel tekib ühte katseklaasi (kumb?) tugev punane sade.

2.4. Selivanovi reaktsioon

Suhkrute kuumutamisel, eriti hapete juuresolekul, moodustub neist heterotsükliline aldehüüd furfurool või hüdroksümetüülfurfurool.



Reaktsioon toimub ketoheksooside ja pentoosidega hõlpsamini kui aldoheksoosidega.

Tekkinud ühendid polükondenseeruvad mitmealuselistele fenoo-

lide jt. ühenditega, andes värvilisi produkte, mida sageli kasutatakse ka suhkruite kvantitatiivseks määramiseks. Üks selleks otstarbeks kasutatavaid on ka nn. Selivanovi reaktiiv, mis sisaldab soolhapet, resorτσιini kondenseeriva agendina ja FeCl_3 katalüsaatorina.

T ö ö k ä i k

Ühte katseklaasi valatakse 1 ml fruktoosi lahust, teise sama hulk glükoosi lahust. Lisatakse 5 ml Selivanovi reaktiivi ja soojendatakse võrdsetes tingimustes 10 min. keeval vesivannil. Jälgitakse värvuse tekkimist.

2.5. Tärglise reaktsioon joodiga

Paljud polüsahhariidid, sealhulgas tärglis, moodustavad joodiga intensiivselt siniseid komplekse, mille puhul polüsahhariididel moodustab spiraali joodi molekulide ümber. Kõrgemal temperatuuril kompleks laguneb ja kaotab värvuse. Joodiga värvuvad natiivsed tärgliseterakesed on hõlpsamini vaadeldavad.

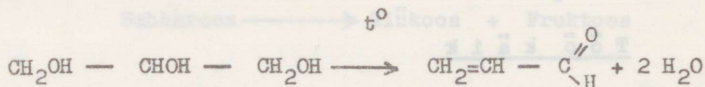
T ö ö k ä i k

1. Valada katseklaasi 5 ml tärgliselahust ja lisada 1 tilk joodilahust. Reaktsioonisegu kuumutada keemiseni ja jahutada katseklaasi alumine pool vesivannil. Kirjeldada ja seletada värvuse muutumist.

2. Mikroskoobi alusklaasidele kanda äärmiselt õhuke kiht tärglist või tärgliserikast materjali (jahu). Lisada tilk lahjendatud (vaevast helekollast) joodilahust. Vaadelda saadud preparaate mikroskoobiga ja joonistada erinevate tärgliseliikide terade kuju.

2.6. Akroleiiniproov

Glütseriini kuumutamisel, eriti vett siduvate ainete juuresolekul, tekib terava lõhnaga küllastamatu aldehüüd propenaal (akroleiin).



Sama reaktsiooni annavad ka rasvad, kuid ei anna glütseriini mittesisaldavad lipiidid.

* T ö ö k ä i k

Kuiva katseklaasi kanda 1 g KHSO_4 ja lisada mõni tilk taimeõli. Kuumutada põletil tõmbekapis soola sulamise ja reaktsioonisegu tumenemiseni. Nuusutada ettevaatlikult eralduvat lõhna (mürgine!).

K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Millised toodud valkude reaktsioonidest on üld- ja millised erireaktsioonid?
2. Milliste tehtud reaktsioonidega olete oma senises praktikas varem kokku puutunud?
3. Kuidas nimetada ühendit, mis tekib glükoosist hõbepeegli-reaktsioonis?
4. Kuidas käituks tärglis katse 2.3. tingimustes?
5. Milline lihtsam orgaaniline ühend segaks ksantoproteiin-reaktsiooni?

Reaktsioon toimub katehheksoidide ja pentosiidide hõlpsamini kui aldehheksoididega.

Tekkinud ühendid polükondenseeruvad mitmealuseliste fenool-

AMINOHAPETE PABERKROMATOGRAAFILINE LAHUTAMINE

Paberkromatograafia on üks jaotuskromatograafia liike. Jaotuskromatograafia võimaldab lahutada segu, mille komponendid omavad erinevaid jaotuskoefitsiente kahe omavahel mitteseguneva faasi vahel. Paberkromatograafias on liikumatuks faasiks tavaliselt paberisse sorbeerunud vesi. Paber on selle liikumatu faasi kandja. Liikuvaks faasiks on lahus mitmesugustest orgaanilistest vedelikest ja veest.

Paberkromatograafia võimaldab lahutada ainete mikrohulki. Seda kasutatakse edukalt valkude, süsivesikute, rasvade, antibiootikumide jm. uurimisel.

Sagedamini leiab kasutamist vertikaalne kromatograafia (tõusva või langeva vooluga). Antud töös uuritakse aminohapete lahutamist tõusva vooluga kromatograafia abil.

Tabelis 1 on toodud aminohapete lahutamiseks sagedamini kasutatavate liikuvate faaside koostised.

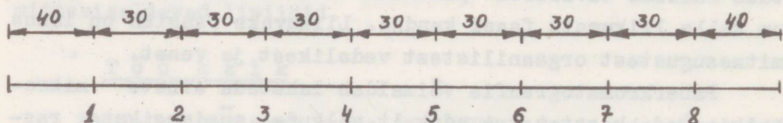
T a b e l 1

Aminohapete paberkromatograafias sagedamini kasutatavad liikuvad faasid (liikumatu faas - vesi)

Lahustajad	Lahustajate vahekord, mahuliselt
1. n-Butüülalkohol, asidikhape, vesi	4 : 1 : 5 (4:5:1)
2. n-Butüülalkohol, sipelghape (20% lahus), vesi	5 : 1 : 1
3. n-Butüülalkohol, n-propüülalkohol, vesi	12 : 5 : 3
4. n-Amüülalkohol, puridiin	11 : 1
5. Fenool, vesi	4 : 1

T ö ö k ä i k

Paberi ettevalmistamisel peavad käes olema kummikindad. Juhendaja soovitusel valitud kromatograafilisest paberist (näit. aeglane paber FN 15) lõigatakse välja ruut 29x29 cm. Tavalise pliatsi abil tõmmatakse 5 cm kaugusele alumisest servast stardijoon. Alumiseks servaks valitakse ruudu üks külg selliselt, et töös toimuks lahustaja liikumine paberi pikisuunas. Stardijoon jagatakse 9 osaks ja nummerdatakse järgmiselt:



J o o n. A.

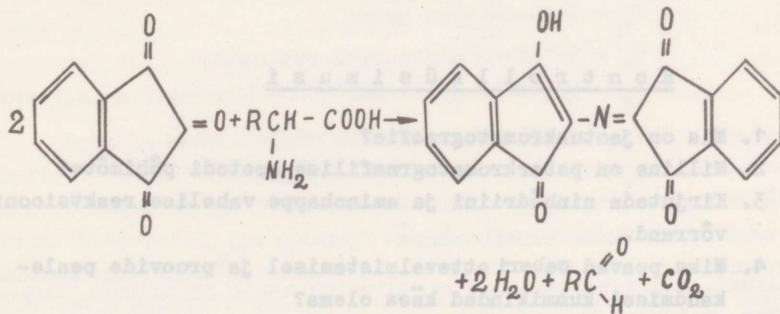
Uuritavast aminohapete segust (analüüsiks antakse 0,5 -1% aminohapete lahus) kantakse punktidesse 3 ja 6 kapillaarpipetiga proovid, ülejäänud punktidesse puhaste aminohapete lahused (kuus „tunnistajat“), kirjutades vastava aminohappe nimetuse stardipunkti juurde (alla). Soovitav tekki-va pleki diameeter on 5-6 mm (varem eraldi paberil katsetada). Paber kuivatatakse õhu käes või ventilaatoriga lahustaja eraldamiseks. Kui on vaja lahuse kontsentratsiooni suurendada, võib pärast eelmise pleki täielikku kuivamist samasse kohta kanda uus kogus ainet jne. Paber keeratakse rulli (stardijoon jääb alla) ja ömmeldakse nõela ja niidiga selliselt kokku, et paberi servad ei puutuks teineteise vastu. Selliselt rulli keeratud paber asetatakse Petri tassi lahustajasse, mis koosneb n-butüülalkoholist, äädikhapest ja veest. Kontrollitakse, kas rull on korralikult vertikaalasendis. Süsteem kaetakse kupliga, mille all tekib lahustajate küllastatud aur (vajalik tasakaaluks). Paber ei tohi puutuda kupli seinte vastu.

Märgitakse üles kromatografeerimise alguse kellaaeg. Lahustaja liigub kapillaarjõudude toimele üles, võttes startdijoonelt kaasa ka aminohapped, mis hakkavad erinevate kiirustega ülespoole liikuma.

Pärast 5-30-tunnilist kromatografeerimist (soovitav on, et lahustaja front jõuaks ülemise paberiserva lähedale; kromatografeerimise aeg oleneb kasutatavast paberist jt. tingimustest) võetakse paber kupli alt välja, märgitakse pliiatsiga lahustaja frondi asukoht ja kromatogramm kuivatatakse õhu käes või ventilaatoriga (fööniga).

Kromatogramm ilmutatakse ninhüdriniga, piserdades viimase lahust pulverisaatorist parajas koguses, et kogu paber oleks parajalt niisutatud (mitte liiga märg). Samuti võib kromatogrammi kasta ilmutusvannis olevasse ninhüdrinilahusesse. Paber kuivatatakse termostaadis 60-70° juures kuni hästi nähtavate värvilaikude tekkimiseni. Igale laigule tõmmatakse pliiatsiga ring ümber (värv aja jooksul kaob).

Ninhüdrini ja aminohapete vahel toimub leeliselises keskkonnas järgmine reaktsioon:



Enamus aminohappeid annab ninhüdriniga sinise või lilla värvuse, asparagiin - oranžikaspruuni, proliin ja hüdroksüproliin - kollase.

Saadud kromatogrammilt identifitseeritakse uuritavas

segus olnud komponendid "tunnistajate" abil ning liikuvuskoefitsientide R_f kaudu.

$$R_f = \frac{\text{aine liikumise kiirus}}{\text{lahustaja frondi liikumise kiirus}}$$

Praktiliselt leitakse R_f sel teel, et mõõdetakse lahustaja frondi kaugus stardijoonest 1 ja vastava komponendi laigu tsentri kaugus stardijoonest (kui laik on ilmselt ebasümmeetriline või "sabaga", mõõdetakse kaugus laigu kõige tumedama koha ja stardijoonest vahel) 3_x ,

$$\text{siis } R_f = \frac{1_x}{1}.$$

Konstantne suurus R_f sõltub paberi omadustest, lahustaja iseloomust ja puhtusest, temperatuurist, aine kontsentratsioonist lahuses jne., otseselt muidugi lahutatavate ainete jaotuskoefitsientidest.

Vihikusse märgitakse kõik katseandmed ja arvutused (lahustaja koostis, katse aeg ja kestvus, ruumi keskmine temperatuur, paberi liik, selle ruutmeetri mass jne.).

K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Mis on jaotuskromatograafia?
2. Milline on paberkromatograafilise meetodi põhimõte?
3. Kirjutada ninhüdroiini ja aminohappe vahelise reaktsiooni võrrand.
4. Miks peavad paberi ettevalmistamisel ja proovide pealekandmisel kummikindad käes olema?
5. Tabelis 2 on toodud mõnede aminohapete struktuurvalemid ja lahustuvused vees. Leida, kas ja kuidas on omavahel seotud aminohappe struktuur, lahustuvus ja R_f .

NB! Ninhüdroiini lahus on mürgine ja tuleb vältida tema satumist nahale!

Tabel 2

Mõnede aminohapete radikaalide struktuurvalemidH₂N - CHR - COOH ja lahustuvused vees 25°C juures

Nimetus	R	Lahustuvus vees g/100 g
Glütsiin (gly)	H-	25,0
Alaniin (ala)	CH ₃ -	16,6
Leutsiin (leu)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \end{array}$	2,2
Fenuülalaniin (phe)	 -CH ₂ -	3,0
Metioniin (met)	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	3,4
Histidiin (his)	$\begin{array}{c} \text{N}-\text{C}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	4,19

GEELKROMATOGRAAFIA

Vedelikchromatograafia meetoditest on üks enam levinuid geelchromatograafia e. geelfiltratsioon, mis võimaldab aineid jaotada nende molekuli suuruse järgi. Selle meetodi kasutamisel täidetakse kolonn geeliterakestega. Sagedamini kasutatakse dekstraangeele (Sephadex, Molselect) või polüakrüülamiidgeele (Biogel, Acrilex).

Geeli võib vaadelda mikropoorse materjalina, mis on läbitungimatu suuremolekulaarsetele ainetele, kuid millesse vabalt difundeeruvad väiksema molekulmassiga ained. Kõiki ülalnimetatud geele turustatakse erinevate poorisuurustega ridadena, kusjuures geeli mark näitab umbkaudset molekulmassi tuhandetes hapniku-ühikutes, mille suhtes antud geel on läbitungimatu. Vastavalt uuritava segu koostisele tuleb valida analüüsiks sobiv geel.

Geelchromatograafia kolonni iseloomustamiseks on otsustavaks sisse viia järgmised tähised:

V_t - kogu täidise maht;

V_v - täidises oleva vaba vee maht;

V_g - geeliterakeste maht;

V_m - geeli maatriksi (ruumvõre) maht;

V_x - uuritava aine väljumismaht.

Loomulikult kehtib võrdus $V_t = V_v + V_g$.

Ained, mille molekulmass ei võimalda nende difusiooni terades, väljuvad kolonnist teradesse tungimata, s.o.

$$V_x^{\min} = V_v.$$

Ained, mille molekulmass on küllalt väike, difundeeruvad teradesse ja liiguvad kolonnis aeglasemalt. Nende puhul

$$V_x^{\max} = V_t - V_m.$$

Aine liikumist kolonnis võib iseloomustada faktoriga

$$R_F = \frac{V_x - V_x^{\min}}{V_x^{\max} - V_x^{\min}}.$$

Vedelikkromatograafia puhul kogutakse kolonnist väljuv vedelik, nn. eluaat fraktsioonideks. Uurimistöös kasutatakse tavaliselt automaatseid fraktsioonikogujaid, antud töös kogutakse fraktsioonid käsitsi. Uuritava aine jaotumist fraktsioonides määratakse mõne keemilise või füüsikalise näitaja kaudu. Antud töös on fraktsioonide kuivainesisalduse mõõduks murdumisinäitaja.

T ö ö k ä i k

Mõõdetakse kolonni täidisosa pikkus ja diameeter, sellest leitakse V_t . Arvutatakse $V_m = k \cdot V_t$, kus k on kolonni täitematerjali iseloomustav koefitsient. Arvutatakse $V_x^{\max}$ ja sellest lähtudes kogutavate fraktsioonide arv

$$n = 1,2 \cdot \frac{V_x^{\max}}{1,5},$$

kus 1,2 on tagavarakoeftsient.

Kolmele katseklaasile märgitakse 1,5 ml mahule vastav kriips. Refraktomeeter ühendatakse termostaadiga, reguleeritakse valgustus ja mõõdetakse destilleeritud vee murdumisinäitaja. Nivoopudeli ja kolonni väljavoolutoru kõrguste vahe muutmise reguleeritakse eluaadi voolu kiirus piiridesse 0,5 - 0,8 ml/min., s.o. ühe 1,5-ml fraktsiooni kogumise aeg on 2 - 3 min. Nivoopudel eraldatakse kolonnist ja vee tase kolonnist lastakse geeli pinnani. Väljavoolutoru suletakse, geeli pinnale viiakse 1 ml uuritavat lahust. Väljavoolutoru juhitakse esimesse katseklaasi ja hoitakse avatud kuni proovi imbumiseni täldisesse. Geelisamba pinnale viiakse ettevaatlikult (geeli mitte üles hõljutada) 5 ml vett ja kolonn

ühendatakse uuesti nivoopudeliga. NB! Nii voolukiiruse reguleerimisel kui ka kromatografeerimisel olgu ühendustoru veega täidetud. Avatakse väljavoolutoru ja kogutakse eelnevalt määratud arv fraktsioone. Määratakse iga fraktsiooni murdumisnäitaja.

T u l e m u s t e e s i t a m i n e

Esitada graafiliselt murdumisnäitaja sõltuvus mahust. Teha järeldus segu komponentide arvu kohta ja leida nende komponentide V_x ja R_f väärtused.

K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Missugused on dekstraani ja polüakrüülamiidi struktuurvalendid?
2. Skitseerige graafik, molekulmass - V_x . Märkige ühtlasi $V_x^{\min}$ ja $V_x^{\max}$ väärtused.
3. Miks ei tohi kolonnist eluaati koguda liiga kiiresti?
4. Millises tööstuslikus tehnoloogilises protsessis võiks kasutada geelfiltratsiooni?
5. Mis on murdumisnäitaja?

GAASIKROMATOGRAAFILINE ANALÜÜS

1. Üldmõisted

G a a s i k r o m a t o g r a a f i a on üks kromatograafia eriliike, mida kasutatakse lenduvate ainete (ained keemistemperatuuriga kuni $300-400^{\circ}\text{C}$) lahutamiseks.

Liikuv faas on gaasikromatograafias gaas, nn. kandegaas.

Liikumatu faas võib olla

a) tahke faas (näit. silikogeel, molekulaarsõelad, aktiivsüsi), lahutamine oleneb tahke faasi adsorptsioonilistest omadustest, sel juhul on tegemist gaasi-adsorbentkromatograafiaga;

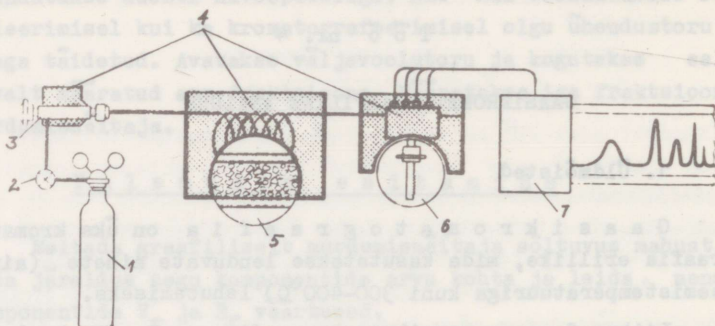
b) vedel faas (vähelenduvad orgaanilised ühendid), mis on õhukese kihina kantud inertse tahke aine pinnale, sel juhul on tegemist gaasi-vedelikkromatograafiaga.

Käesoleval ajal kasutatakse ainete lahutamisel põhiliselt gaasi-vedelikkromatograafiat. Ka antud töös toimub lahutamine gaasi-vedelikkromatograafia abil ja kõik alljärgnevad selgitused on seotud vaid selle meetodi kasutamisega.

2. Aparatuur ja kolonni täidised

Joonisel 1 on toodud kromatograafia põhimõtteline skeem.

Balloonist 1 antakse reduktori 2 ja kuluregulaatori 3 läbi dosaatori 4 kandegaas (näit. H_2 , He, N_2 , õhk) kolonni 5, kust väljub detektori 6 kaudu atmosfääri. Kolonn 5 asub termostaadis konstantsel töötemperatuuril.



J o o n i s 1. Gaasikromatograafi skeem.

1 - kandegaas, 2 - kuluregulaator, 3 - proovi sisseviimise koht, 4 - termostaadid, 5 - kolonn, 6 - detektor, 7 - isekirjutaja.

Kolonne temperatuurist kõrgemal temperatuuril asuva doosatori kaudu antakse kolonne uuritava segu proov, mis momentaalselt aurustub. Läbides koos kandegaasiga kolonne, segu komponendid lahutuvad. Kolonnist väljuva gaasisegu mõnd füüsikalist või keemilist näitajat määrav detektor on ette nähtud komponentide avastamiseks. Detektori signaalid (tavaliselt elektrilised) antakse üle mõõteriistale (vajaduse korral eelnevalt võimendades) või isekirjutajale 7.

2.1. Kolonn kujutab endast tavaliselt metallist või klaasist toru sisediameetriga 4 - 6 mm ja pikkusega 1 - 5 m. Ruumi kokkuhoiuks võib kolonnile anda spiraalse või U-kuju.

Tahke kandja. Kolonne täitmiseks kasutatakse poorseid, suure eripinnaga, inertseid, ühesuguse kuju ja mõõdetega osakestega materjale.

Tahke kandja valmistamise lähteaineks on enamikul juhtudel diatomiit. Laialt levinud on kromosorbid (kromosorb P, kromosorb W).

2.2. Vedelfaasid

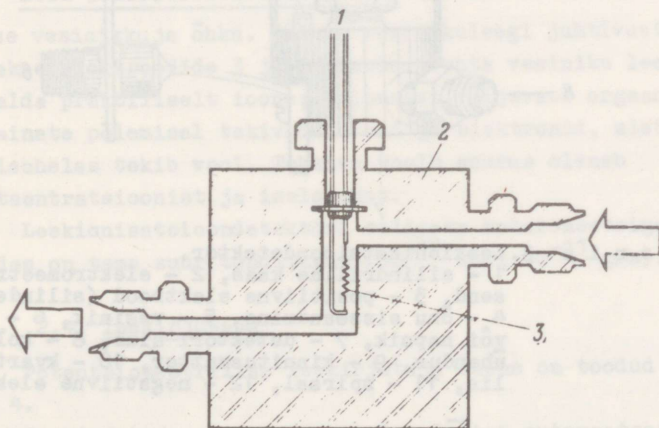
Vedelfaasidena kasutatakse mitmesuguseid orgaanilisi

ühendeid, mis on vähese lenduvusega, termiliselt stabiilsed, keemiliselt inertsed lahutatava segu komponentide suhtes, kuid peavad selektiivselt lahustama segu komponente. Vedelfaas kantakse koguses 5 - 20% tahkele kandjale (selleks lahustatakse vedelfaas mõnes kerges orgaanilises lahustajas, saadud lahusega immutatakse tahke kandja ja lahustaja aurutatakse välja).

Vedelfaasiga immutatud tahke kandja viiakse kolonni, täites selle ühtlaselt kogu pikkuses.

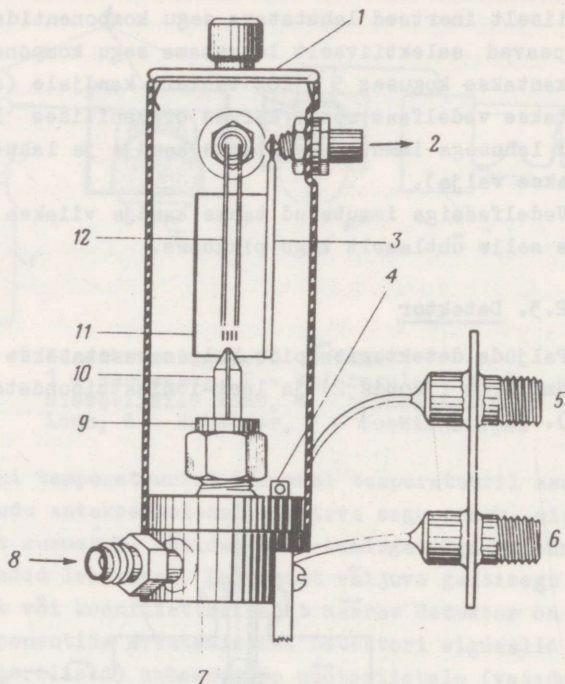
2.3. Detektor

Paljude detektoritüüpide hulgas kasutatakse sagedasti kataromeetrit (joonis 2) ja leek-ionisatsioonidetektorit (joonis 3).



Joonis 2. Soojusjuhtivusraku skeem.

1 - ühendus pingeallikaga ja sillaskemiga,
2 - detektoriblokk, 3 - kataromeetri niit.



J o o n i s 3. Leekionisatsioonidetektor.

1 - silindriline kaas, 2 - elektromeetri sisend, 3 - positiivne elektrood (silinder), 4 - õhu sisseandmine, 5 - vesinik, 6 - õhk või hapnik, 7 - detektori alus, 8 - kolonni ühendus, 9 - kinnitusmutter, 10 - kvartsespaalis, 11 - spiraal, 12 - negatiivne elektrood.

Kataromeeter on soojusjuhtivusdetektor.

Alalisvooluga köetava traadi (näit. volframniit) 3 temperatuur oleneb voolutugevusest ja detektorit läbiva gaasisegu soojusjuhtivusest. Volframniidi jahutamine sõltub põhiliselt soojust ülekandest niidilt gaasile. Seega niidi jahtumine oleneb gaasi soojusjuhtivusest. Gaaside soojusjuhtivus oleneb nende molekulkaalust. Näitena mõnede gaaside soojusjuhtivused ja molekulkaalud:

	$A \cdot 10^5$	M
Vesinik	41,6	2
Heelium	34,8	4
Metaan	7,2	16
Heksaan	3,0	86

Järelikult saadakse detektori suurim tundlikkus, kui kasutatakse kandegaasina vesinikku või heeliumit.

Temperatuuri muutumisega muutub traadi takistus. Detektori traat on lülitatud alalisvoolu (Wheatstone'i) silda, mille kaudu antakse signaalid isekirjutajale. Tavaliselt on kromatograafidel kaks detektorirakku, millest üks (võrdlusrakk) on monteeritud kolonni ette, tema traatelement on samuti ühendatud alalisvoolu silda.

Leek-ionisatsioonidetektorisse (joonis 3) antakse põletisse vesinikkuja õhku. Põleva vesinikuleegi juhtivust mõõdetakse elektroodide 3 ja 12 kaudu. Puhta vesiniku leek ei sisalda praktiliselt ioone; kolonnist väljuvate orgaaniliste ainete põlemisel tekivad ioonid ja elektronid, mistõttu välisahelas tekib vool. Tekkiva voolu suurus oleneb aine kontsentratsioonist ja iseloomust.

Leekionisatsioonidetektori eeliseks kataromeetriga võrreldes on tema suur tundlikkus (10^{-12} kuni 10^{-11} g/s).

2.4. Isekirjutaja

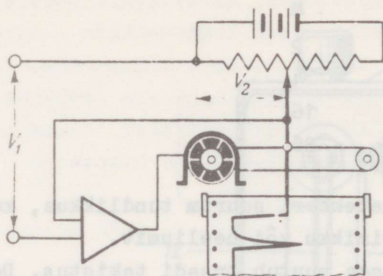
Potentsiomeetrilise isekirjutaja skeem on toodud joonisel 4.

Isekirjutaja on servomootoriga töötav automaatseade kompensatsiooniskeemiga.

Sisendsignaali V_1 kompenseeritakse pidevalt võrdse ja vastassuunalise signaaliga V_2 . Üheaegselt toimub diagrammilindi liikumine risti sule liikumise suunaga.

3. Kromatograafi- list lahutamist ise- loomustavad suurused

Kandegaasi hulka, mis on vajalik komponendi elueerimiseks kromatograafi kolonnist, nim. väljumismahuks.



J o o n i s 4. Isekirjutava potentsio-meetri skeem

Konstantse rõhu puhul on kandegaasi

voolu kiirus konstantne ja sel juhul võime komponente identifitseerida ka väljumisaja järgi.

Tähistades kandegaasi mahtkiiruse V -ga, väljumisaja t_R -ga, väljumismahu V_R -ga, kehtib seos

$$V_R = t_R V.$$

Tavaliselt loetakse mitmekomponendilise segu puhul üks komponentidest standardaineks (võrdlusaineks). Kui standardaine väljumismaht on V_{Rs} , siis mistahes komponendi i , mille väljumismaht on V_{Ri} , suhteline väljumismaht avaldub suuruse-
na $\alpha' = V_{Ri} / V_{Rs}$.

Parandatud väljumismahud (või suhtelised väljumismahud) arvestavad mittersorbeeruva aine väljumismahtu ja neid mõõdetakse kromatogrammilt mitte komponendi sisseviimise momendist, vaid õhu või lahustaja tipust alates. Taandatud väljumismaht V'_R avaldub komponendi väljumismahu V_R ja mittersorbeeruva komponendi väljumismahu V_M vahena:

$$V'_R = V_R - V_M.$$

Suhteline väljumismaht avaldub taandatud väljumismahtu-
de kaudu

$$\alpha' = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rs}}.$$

Suhtelised väljumismahud (väljumisajad) iseloomustavad kolonni selektiivsust - mida erinevamad on kahe kromatogrammil kõrvuti asetseva tipu väljumismahud, seda paremini on nad lahutatud, seda selektiivsem on kolonn.

Kolonni efektiivsust iseloomustab tipu laiuse ja tipu kauguse suhe, s.t. sisuliselt, kui kitsa frondina liigub komponent kolonnis.

Nagu rektifikatsiooni puhul, saab ka gaasikromatograafias kasutada teoreetiliste taldrikute arvu (ja ühe teoreetilise taldriku ekvivalentkõrguse) mõistet.

Praktiliselt saame iga komponendi jaoks määrata teoreetiliste taldrikute arvu valemiga

$$T = 16 \left(\frac{x}{y} \right)^2, \text{ kus}$$

T - teoreetiliste taldrikute arv;

x - tipu kaugus proovi sisseviimisest tipu maksimumini;

y - tipu laius nulljoonel.

Headel kromatograafilistel kolonnidel ulatub teoreetiliste taldrikute arv kümnetesse tuhandetesse, tavaliselt analüütilistel kolonnidel on 500 - 4000 taldrikut.

4. Ainete segude kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüs

Segu komponentide identifitseerimiseks kromatogrammil saab lihtsate segude puhul kasutada kirjanduses avaldatud andmeid suhteliste väljumismahtude kohta, kui mõni komponent on teada. Homoloogiliste ridade puhul kehtivad kindlad seaduspärasused (näit. süsiniku aatomite arvu ja väljumismahtude vahel), mis võimaldavad üksikuid homolooge kergesti identifitseerida.

Keerukamate segude puhul osutub vajalikuks oletatavate komponentide eraldi kromatografeerimine (puhtad reaktiivid) nende väljumismahu määramiseks. Sageli on otstarbekas nn. sisemise standardi kasutamine, kus uuritavale proovile lisatakse standardained ja määratakse segu komponentide suhtelised väljumismahud standardainete (standardaine) suhtes.

Segude kvantitatiivseks analüüsiks määratakse üksikute piikide (tippude) pindalad, need summeeritakse ja arvutatakse iga piigi pindalaprotsent. Tavaliselt on üksikute piikide pindalad võrdelised vastava aine kaal- või moolkontsentratsiooniga, kusjuures sageli tuleb tulemuste täpsustamiseks kasutada parandustegureid.

5. Kromatograafiline analüüs õppegaasikromatograafil ÖGK - 1

Kromatograaf ÖGK-1 töötab toatemperatuuril. Kolonni siseseviidav proov aurustub elektriküttega aurustajas (temp. 90°C). Detektoriks on kataromeeter. Kataromeetri elemendid on lülitatud alalisvoolu silda, millega on ühendatud millivoltmeeter (või isekirjutaja).

A n a l ü ü s i k ä i k

NB! Allpool on esitatud konkreetsed töötingimused ühele kindlale töörežiimile. Enne tööle asumist leppida juhendajaga kokku valitava töörežiimi suhtes!

1. Reduktori abil reguleeritakse kandegaasi rõhk kolonni ees 0,6 atü-le. Pärast gaasivoolu stabiliseerumist mõõdetakse kandegaasi kiirus väljundis stopperi abil (kiirus peab olema umbes 50 ml/min.).

2. Lülitatakse kromatograaf elektrivõrku ("võrk", "aurustaja").

3. Voolutugevus detektoris valitakse vastavalt kandegaasile. Kui kandegaasiks on õhk, ei tohi voolutugevus olla üle 60 mA.

4. Lülitatakse sisse millivoltmeeter (lülitati "U" ja piirkond 0,75 mV).

5. Kromatograafi tundlikkus lülitatakse 1 mV-le.

6. Mõõteriista osuti reguleeritakse nulli ("nulli asetamine").

10 minuti pärast on kromatograaf töökorras, kontrollitakse veel nulli asendit ja asutakse analüüsile.

Vihikusse valmistatakse eelnevalt tabel kahe veeruga, kus ühte veergu märgitakse aeg (0, 0.10, 0.20...0.50, 1.00, 1.10 jne.), teine veerg jääb mõõteriista näitude jaoks.

Meditisiinilise süstla (või mikrosüstla) abil võetakse mõnikümme (mõni) mg uuritavat lahust. Proov süstitakse kolonni, samaaegselt käivitatakse stopper.

Uuritav segu koosneb näiteks neljast komponendist: dietüüleeter, diisopropüüleeter, atsetoon, benseen. Komponendid väljuvad kolonnist nimetatud järjekorras.

Sissesüstitud aine sobiva koguse puhul ulatuvad esimestele komponentidele vastavad millivoltmeetri näidud vähemalt poolele skaala ulatusele. Kui ainet viidi kolonni liiga palju, lähevad mõõteriista näidud skaalast välja (piigid „lähevad lõhki“), liig väikese ainekoguse puhul jääb analüüs ebatäpseks. Mõlemal juhul tuleb doseerimist korrata pärast 10-minutilist vaheaega.

Töö lõpetamisel tuleb pärast kõigi komponentide kolonnist väljumist

- 1) lülitada välja millivoltmeeter;
- 2) tundlikkuse ümberlüüti keerata asendisse "-";
- 3) detektori voolu ümberlüüti keerata asendisse "0";
- 4) lülitada välja aurustaja;
- 5) lülitada seade võrgust välja (lüüti "võrk");
- 6) sulgeda gaasiballooni reduktor ja mõne aja pärast ventiiil.

Saadud katseandmete põhjal koostatakse tabel 3.

Keemistemperatuurid ja molekulmassid võetakse käsiraamatust. Komponendi väljumsaeg on ajavahemik proovi sisseviimisest kolonni kuni komponendile vastava piigi maksimumini. Väljumismaht kandegaasi cm^3 -tes arvutatakse väljumsaja ja kandegaasi mahtkiiruse kaudu. Piikide pindalade leidmiseks võib kasutada planimeetrit või talitatakse järgmiselt. Joonistatakse kromatogramm, võttes millimeetripaberile abstsissiteljeks aja (sekundites) ja ordinaatteljeks millivoltmeetri näidu mV-tes. Kromatogramm kopeeritakse vatmanile, kust lõigatakse piigid välja ja kaalutakse ära. Eeldusel, et

T a b e l 3

Neljakomponentse segu gaasikromatograafiline analüüs

.....197....., kandegaas -...., kandegaasi mahkkiirus.....cm³/min,
 kromatograafi tundlikkus.....mV, mõõteriista tundlikkus.....mV, detektori
 voolmA.

Komponent	Kee- mis- tempe- ratuur °C	Mole- kul- mass	Välju- mis- aeg s	Suhteline väljumis- aeg diiso- propüül- eetri sub- tes	Välju- mis- maht cm ³	Tippu- de pind- alad Si	Tipu pind- ala % 100 Si	Komponentide sisaldus uuri- tavas segus, kaal %	Oletades, et pindalal on võrdelised kaalkontsent- ratsiooniga	Oletades, et pindalal on võrdelised moolkontsent- ratsiooniga
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10

1. Dietüül-
eeter

2. Diisoo-
pü-
puul-
eeter

3. Atsetoon

4. Benseen

paber on ühtlane, on piikide pindalad võrdelised nende massiga (kaaluga). Tabelisse kantaksegi piikide pindalad massiühikutes (mg).

Oletades, et komponentide sisaldused kaaluprotsentides on uuritavas segus võrdelised vastavate piikide pindaladega, on arvud veergudes 8 ja 9 ilmselt võrdsed. Veeru 10 andmed arvutatakse veeru 8 ja komponentide moolmasside kaudu.

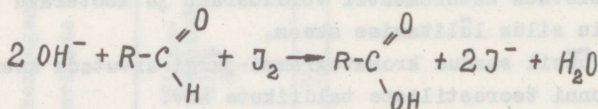
K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Kuidas seletada ainete lahutamist gaasikromatograafias?
2. Joonistada kataromeetri võrdlusraku ja mõõteraku alalisvoolu silda lülitamise skeem.
3. Analüüsil saadud kromatogrammi järgi arvutada kasutatud kolonni teoreetiliste taldrikute arv.
4. Kuidas sõltub komponentide väljumismaht (väljumisaeg)
 - a) kolonni temperatuurist;
 - b) rõhkude vahest kolonni otste vahel;
 - c) kolonni pikkusest;
 - d) analüüsitava aine kogusest;
 - e) komponentide moolmassist ja polaarsusest?

AMÜLAASI AKTIIVSUSE MÄÄRAMINE

Amülaasideks e. amülolüütilisteks ensüümideks nimetakse tärklis hüdroolüüsivaid ensüüme. Amülaasi aktiivsust võib määrata substraadi viskoossuse vähenemise, joodikompleksi värvuse kadumise, produktide kolorimeetrilise määramise j.m. teel.

Kasutatava meetodi aluseks on hüdroolüüsil lõhustuvatest sidemetest tekkivate poolatsetaalsete rühmade määramine nende oksüdeerimisel joodiga leeliselises keskkonnas.



Oksüdeerijat lisatakse liias ja aldehüüdrühmade sisaldus määratakse tagasitiitrimisel. Ensüümi aktiivsus avaldatakse rahvusvahelistes ühikutes U, s.o. M-ekv. lõhustunud sidemeid minutis 1 g preparaadi kohta. Ensüümi aktiivsus sõltub oluliselt temperatuurist ja vesinikioonide kontsentratsioonist. Seetõttu valmistatakse substraadi ja ensüümi lahused puhvris (atsetaatpuhver pH=4,8) ja hüdroolüüs viiakse läbi kindlal rahvusvaheliselt standardiseeritud temperatuuril 30°C.

T ö ö k ä i k

Valmistatakse uuritavast preparaadist lahus. Selleks kaalutakse analüütilistel kaaludel 0,3 g preparaati täpsusega 0,0001 g, lahustatakse see väheses hulgas puhverlahuses ja viiakse kvantitatiivselt 100-ml mõõtkolbi, mis täidetakse kriipsuni.

Võetakse 3 lihvorgiga seisukolbi - üks pimekatse, ülejäänud paralleelkatsete jaoks. Kõigisse pipeteeritakse 10 ml 1% tärkliiselahust puhvris, soojendatakse vesivannil 29°-30°C 10 min. Seejärel lisatakse ühte kolbi 1 ml dest. vett ja teistesse 1 ml amülaasilahust. Stopperi või sekundiosutiga kellaga fikseeritakse täpselt aeg. Hoitakse vesivannil 30°C juures 10 min. Fikseeritakse täpselt aeg ja lisatakse 5 ml 0,3 n NaOH lahust fermendi inaktiveerimiseks ja segu leelistamiseks ning 5 ml 0,1 n J₂ lahust. Lastakse seista pimedas 20 min. Seejärel lisatakse 2 ml 1n HCl ja tiitritakse 0,1 n tiosulfaadiga

$$AA = \frac{\Delta V \cdot 50 \cdot V}{v \cdot t \cdot a}$$

AA - amülaasi aktiivsus U/g;

ΔV - pimekatsel ja katsel kulunud tiosulfaadi hulkade vahe;

a - preparaadi kaal g-des;

V - maht, milles on preparaat lahustunud /ml/;

v - lisatud amülaasilahuse hulk /ml/;

t - hüdrolüüsi aeg /min./;

50 - M-ekv. lõhustunud sidemeid, mis vastab 1 ml-le 0,1n tiosulfaadile.

Juhul kui enne tiitrimist uuritav segu ei ole intensiivselt sinise värvusega, on tärglise hüdrolüüs kulgenud liiga kaugele ja ka katse seega nurjunud. Katse kordamisel vähendada fermentilahuse kogust või hüdrolüüsi aega, vastavalt muutes ka arvutusvalemit.

Katsetulemuste esitamine

Esitatakse paralleelkatsete tulemused ja nende keskmine.

Arvutatakse, mitu ühikut ensüümi kasutati õnnestunud ning liiga sügavalt hüdrolüüsunud proovides.

Kontrollküsimusi

1. Kuidas ja mille alusel jaotatakse amülaase?
2. Kus leidub ja kust saadakse amülaase?
3. Milleks kasutatakse amülaase?
4. Miks oli antud juhul vajalik pimekatse?
5. Kuidas muutuks saadav tulemus, kui
 - a) tiitrida üle pimekatse?
 - b) lisada kontrollkatsele joodilahust veidi vähem kui 5 ml?

RASVA TIITRI MÄÄRAMINE

Rasva tiitriks nimetatakse rasvast eraldatud rasvhapete hangumistemperatuuri.

Rasvhapete hangumistemperatuur iseloomustab rasva paremini, kui rasva oma hangumistemperatuur. Rasva hangumisel toimub protsess järk-järgult, rasv kaldub kergesti ülejahutamisele, hangumine toimub laias temperatuurivahemikus ja hangumise alg- ja lõpptemperatuuri on raske määrata. Seejärel määratakse rasvale harilikult sulamistemperatuur.

Rasvhapete hangumine toimub märgatavalt kitsamas temperatuurivahemikus ja rasva tiiter iseloomustab hästi nii rasva ennast kui ka temast saadavaidprodukte (näiteks sõltub rasva tiitrist otseselt temast saadava seebi kõvadus).

Rasva ja temast eraldatud rasvhapete hangumistemperatuurid on omavahel tihedalt, kuigi mitte alati otseselt seotud. Vedelamatel rasvadel (näit. taimeõlidel) on ka tiitrid madalamad, ja vastupidi.

Tavaliselt on rasvhapete hangumistemperatuurid 10 - 30 deg kõrgemad vastava rasva hangumistemperatuurist.

Rasvhapped hanguvad eutektiliste segudena. Mõnede puhaste rasvhapete sulamistemperatuurid:

palmitiinhape	(16:0) +64°C
palmitoleiinhape	(16:1) +47°C
steariinhape	(18:0) +69,4°C
oleiinhape	(18:1) +14°C
linoolhape	(18:2) -11°C

(Arvud sulgudes näitavad vastavalt süsiniku aatomite arvu ja kaksiksidemete arvu rasvhappe molekulis). Nagu näha, on küllastamata rasvhapped tunduvalt madalama sulamistemperatuuriga.

Rasvhapete hangumistemperatuuri määramisel jälgitakse kindlatesse jahtumistingimustesse viidud rasvhapete tempe-

ratuuri. Hangumise ajal toimub eralduva kristallumissoojuse arvel temperatuuri käigu muutus. Olenevalt eeskätt soojusvahetusest ümbrusega (jahtumistingimustest) ja segamise viisist ning intensiivsusest võib temperatuur hangumise ajal jääda konstantseks või tõusta teatud maksimumini. Rasva tiitriks loetakse vastavalt kas konstantset temperatuuri või temperatuuri maksimumi.

1. Rasvhapete saamine

Ümarkolbi kaalutakse 30 g rasva, lisatakse 25 ml KOH 40% vesilahust ja 30 ml etanooli.

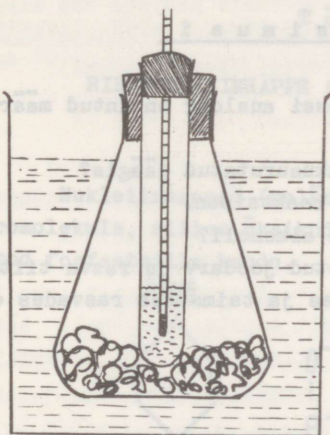
Rasv seebistatakse püstjahuti all keeval vesivannil, kuni segu muutub homogeenseks.

Pärast seebistumise lõppu valatakse segu suurde portselankaussi ja aurutatakse kuni etanooli täieliku eraldumiseni (lõhna kadumine). Saadud seep lahustatakse soojendamisel 100 ml destilleeritud vees ja lisatakse vähehaaval 20% väävelhapet (kulub umbes 100–120 ml) kuni happelise reaktsioonini (kontroll indikaatorpaberiga). Segu soojendatakse, kuni poaletekkiv rasvhapete kiht muutub täiesti läbipaistvaks.

Portselankausi sisu valatakse ettesoojendatud lahuslehtrisse, eraldatakse alumine kiht ja pestakse 2 – 3 korda a 20 ml kuuma dest.veega. Pestud rasvhapped filtritakse sulas olekus läbi kuiva paberfiltrit (soojas kuivatuskapis) suurde kaalutud katseklaasi (diameetriga 20 mm, pikkusega 130 mm). Määratakse rasvhapete saagis, arvutatakse saagis protsentides lähterasva kohta ja võrreldakse seda teoreetilise saagisega (arvutatakse, võttes keskmiseks rasvhappe molekulkaaluks steariinhappe molekulkaalu ja oletades, et kogu rasv koosneb triglütseriididest).

2. Rasva tiitri määramine

Rasva tiitri määramise seade on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Rasva tiitri määramise seade.

happeid segatakse käsitsi termomeetriga aeglase kiirusega (mitte puutuda katseklaasi seinu) kuni rasvhapete hangumise alguseni (segu hägustub). Siis asetatakse termomeeter 5 cm kõrgemale rasvhapete keskele ja segamine lõpetatakse. Stopperi järgi märgitakse üles termomeetri näit iga 30 sek. järel. Joonistatakse graafik $t=f(T)$ kristallumise ajal ja pärast kristallumise lõppu 5 - 10 min. jooksul. Tehakse kaks paralleelkatset, erinevus nende tulemuste vahel ei tohi ületada 0,2 deg.

Tavaliselt rasva tiitri määramiseks NSV Liidus kasutatav Žukovi aparatuur kujutab endast 20 - 30-mm läbimõõduga klaasilindrit, mis on ümbritsetud klaaskestaga (ϕ 40-50 mm). Vaakumi tõttu seinte vahel on soojuse ülekanne tiitri määramisel tunduvalt väiksem, mistõttu saadavad tulemused võivad olla umbes 0,5 deg kõrgemad kui meie poolt kasutatavas nn. Wolfbaueri seadmes.

Katseklaas varustatakse korgiga, millest läbi pandud, kergelt korgis liikuv termomeeter (jaotustega vähemalt 0,2 deg) ulatub peaaegu katseklaasi põhja. Katseklaas koos termomeetriga asetatakse läbi kummikorgi 250-300-ml koonilisse kolbi, mille põhjas on vatikiht.

Tahkete rasvade analüüsil toimub jahutamine 20°C vees, vedelate rasvade analüüsil kasutatakse jää-vee segu (0°C).

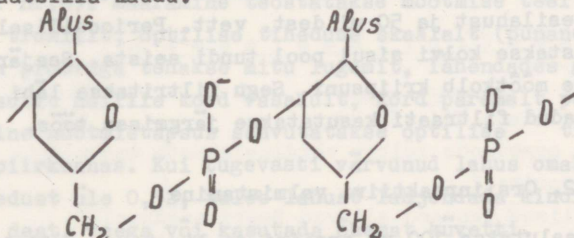
Koonuskolb asetatakse suuremas klaasnõus olevasse jahutusvedelikku ja rasv-

Kontrollküsimusi

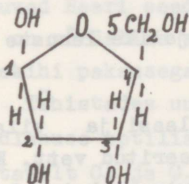
1. Millise tehnoloogilise protsessi analoog on antud maaramise esimene osa?
2. Millised ained sisalduvad kokkuaurutatud jäägis?
3. Kirjutada rasva seebistamise reaktsioon.
4. Miks lisati reaktsioonisegule alkoholi?
5. Kas ja kuidas on omavahel seotud joodarv ja rasva tiiter?
6. Millised on tähtsamad loomsetes ja taimsetes rasvades esinevad rasvhapped?

RIBONUKLEIINHAPPE (RNA) SISALDUSE MÄÄRAMINE PÄRMIS

Nukleiinhapped (polünukleotiidid) kujutavad endast makromolekule, milles üksikud nukleotiidid on omavahel ühendatud fosfaatsilla kaudu.



Ribonukleiinhappes on süsivesikuks D-riboos β -furanosvormis.



Lämmastikalustena esinevad põhiliselt adeniin, guaniin (puriinalused), tsütosiin ja uratsiil (pürimidiinalused)

Reeglina on esterside RNA-s moodustunud fosfaadi kaudu riboosi kolmanda ja viienda süsiniku aatomi juures asuvate hüdroksüülrühmade vahel (side $C^3 - P - C^5$).

RNA määramismeetodid põhinevad üksikute koostisosade määramisel. Nii kasutatakse RNA sisalduse kindlaks tegemisel fosfori määramist pärast proovi tuhastamist, lämmastikaluste kvantitatiivset määramist spektroskoopiliselt või süsivesik-komponendi värvireaktsioone.

Antud töös hüdrolüüsitakse RNA molekulid leeliselises keskkonnas.

Pentoosid annavad orsiiniga (1,3-dihüdroksü-5-metüülbenseen ehk 5-metüülresortsiin) happelises keskkonnas katalüsaatori ($FeCl_3$) juuresolekul rohelise värvuse. Värvuse

intensiivsuse järgi saab kvantitatiivselt määrata RNA sisaldust uuritavas lahuses, kasutades võrdluseks standardlahuseid (kindla pentoosisisaldusega valmistatud lahused).

1. Proovi ettevalmistamine

Uuritavast proovist võetakse analüütilistel kaaludel (0,0001 g täpsusega) umbes 0,1-g kaalutis, mis viiakse kvantitatiivselt 100-ml mõõtkolbi. Kolbi lisatakse 30 ml 10% NaOH vesilahust ja 50 ml dest. vett. Perioodiliselt loksutades lastakse kolvi sisul pool tundi seista. Seejärel täidetakse mõõtkolb kriipsuni. Segu filtritakse läbi paberfiltriri. Saadud filtraati kasutatakse järgmises töös.

2. Orsiinreaktiivi valmistamine

Kaalutakse 100 mg orsiini ja lisatakse sellele 10 ml FeCl_3 lahust konts. soolhappes (0,1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ on lahustatud 100 ml konts. soolhappes). Pärast orsiini täielikku lahustumist on reaktiiv valmis.

3. Fotomeetrilisteks mõõtmisteks vajalike lahuste valmistamine

Võetakse neli puhast ja kuiva katseklaasi ja viiakse igasse katseklaasi pipetiga 10 ml destilleeritud vett. Klaasipliiatsiga märgitakse katseklaasil vee nivoo, katseklaasid tühjendatakse ja nummerdatakse.

1. Pimekatseks võetakse esimesse ja teise katseklaasi kummassegi 2 ml destilleeritud vett ja lisatakse teise pipetiga mõlemasse katseklaasi 2 ml orsiinreaktiivi.

2. Kolmandasse katseklaasi võetakse 2 ml filtraati ja 2 ml orsiinreaktiivi.

3. Võrdluskatseks võetakse neljandasse katseklaasi 2 ml standardlahust ja lisatakse 2 ml orsiinreaktiivi.

Standardlahus saadakse nn. põhilahuse (100 mg arabinosi ühes liitris vees) lahjendamisel. Standardlahuse kontsentratsiooni soovitatav praktikumi juhataja.

Kõik neli katseklaasi asetatakse 20 min. keevasse vee-sivanni. Pärast jahtumist viiakse lahuste mahud dest. vee-ga 10 ml-ni (kriipsuni katseklaasil).

4. Lahuste fotometreerimine

Lahused fotometreeritakse fotomeetril ФЭКН-57 vastava instruksiooni järgi (vt. lisa 1).

Kasutatakse 10-mm küvette, lainepikkust 656 mμ (val-gusfilter nr.8). Määramine teostatakse mõõtmise teel parem-poolselt trumliilt, optilise tiheduse skaalalt (punane skaa-la). Sama prooviga tehakse mitu lugemit, lähendades galvano-meetri osutit nullile kord vasakult, kord paremalt poolt. Maksimaalne mõõtmistäpsus saavutatakse optilise tiheduse $D = 0,4$ piirkonnas. Kui tugevasti värvunud lahus omab opti-list tihedust üle 0,52, tuleb lahust lahjendada kindlas va-hekorras dest. veega või kasutada õhemat küvetti.

5. Tulemuste arvutamine

Oletatakse, et uuritavate lahuste optilised tihedused alluvad Beerri seadusele, mille järgi lahuse optiline tihe-dus on võrdeline aine kontsentratsiooniga lahuses ning la-husekihi paksusega.

Tähistades uuritava lahuse optilise tiheduse D_1 , stan-dardlahuse optilise tiheduse D_2 , lahuste kontsentratsioonid vastavalt C_1 ja C_2 , on ilmne, et

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{C_1}{C_2},$$

kust $C_1 = \frac{D_1}{D_2} \cdot C_2$.

Erineva paksusega küvettide kasutamisel tuleb seda tu-lemuste arvutamisel arvestada. Teades, et kogu lahuse hul-k mõõtkolvis oli 100 ml, leiame selles sisalduva riboosi hul-ga mg-des ja arvutame riboosi sisalduse % -des algproovis.

Riboosi sisaldus RNA-s sõltub selles leiduvatest alus-
test (nende moolmassist). Moolmassid RNA koostisosadele on
järgmised: H_3PO_4 -98; riboos-150; uratsiil-112; tsütosiin-
111; adeniin-135; guaniin-151. Keskmine riboosi sisaldus
RNA-s on 46%.

Seega saame RNA ligikaudse sisalduse uuritavas proovis
arvutada, kui jagame riboosi sisalduse 0,46-ga.

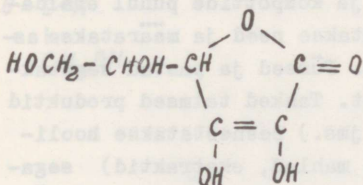
K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Kirjeldada RNA struktuuri.
2. Kas arabinoos kõlbab võrdluslahuste tegemiseks riboosi
määramisel?
3. Millised lahused alluvad Beer'i seadusele?
4. Seletada fotomeetri ФЭКХ -57 töö põhimõtet.

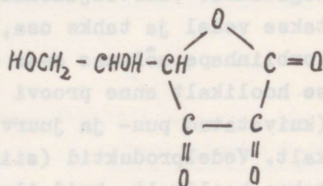
ASKORBIINHAPPE (C-VITAMIINI) MÄÄRAMINE

I. A s k o r b i i n h a p e j a t a o m a d u s e d

Looduses esineb L-askorbiinhape taandatud ja oksüdeeritud vormis



askorbiinhape



dehüdroaskorbiinhape

L-askorbiinhape on valge kristalliline aine sulamistemperatuuriga 190-192°C, hästi lahustuv vees, halvasti lahustuv orgaanilistes lahustajates. Niiskel kujul oksüdeerub kergesti õhuhapniku toimel, eriti leeliselises keskkonnas. Happelises keskkonnas aga katalüüsivad oksüdatsiooni rasked metallid (Cu, Fe, Zn, Sn, Ag).

Askorbiinhappe üleminek taandatud vormist oksüdeeritud vormi ja vastupidi toimub väga kergesti. Organismides võtab ta aktiivselt osa redoksreaktsioonidest ja mitmesuguste ühendite sünteesist. Askorbiinhappe taandavad omadused on tema keemiliste määramismeetodite aluseks. Enam levinud ja üheks täpsemaks L-askorbiinhappe kvantitatiivse määramise meetodiks on indofenoolmeetod kahe modifikatsiooniga (H₂S kasutamisega ja ilma). Jodomeetrilisi määramismeetodeid ja ligikaudseid ning ekspressmeetodeid siin ei kirjeldata nende kasutamise võimaluste piiratuse tõttu.

II. Proovide võtmine ja materjalide ettevalmistamine

Keskmine proov võetakse vastavalt üldistele juhistele. Marjade ja väiksemate viljade puhul laotatakse nad õhukese kihina klaasile ja võetakse proovid erinevatest kohtadest. Luuviljalistel (ploomid, kirsid) eemaldatakse eelnevalt kivid. Õunte, kartulite, tomatite jm. analüüsil lõigatakse erinevatest eksemplaridest lõigud, mis peenestatakse ja segatakse. Juurviljakonservide ja kompotide puhul eraldatakse vedel ja tahke osa, kaalutakse need ja määratakse askorbiinhape mõlemas osas eraldi. Püreed ja pastad segatakse hoolikalt enne proovi võtmist. Tahked taimsed produktid (kuivatatud puu- ja juurviljad jms.) peenestatakse hoolikalt. Vedelproduktid (siirupid, mahlad, ekstraktid) segatakse hoolikalt, kuid ilma loksutamisetä aeratsioonil vältimiseks. Tablette ja dražeesid võetakse analüüsiks 30-50 tükki, kaalutakse ja peenestatakse uhmris.

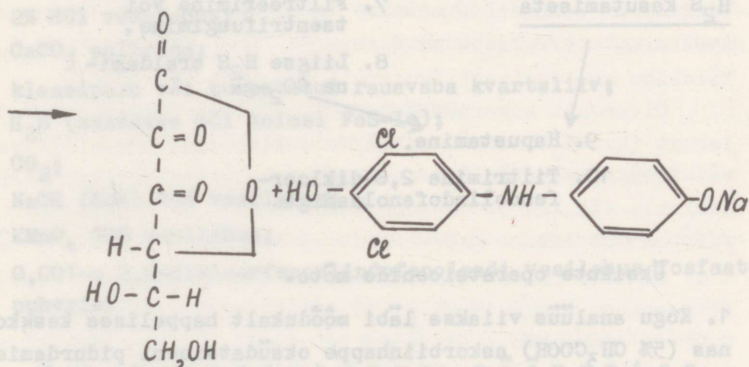
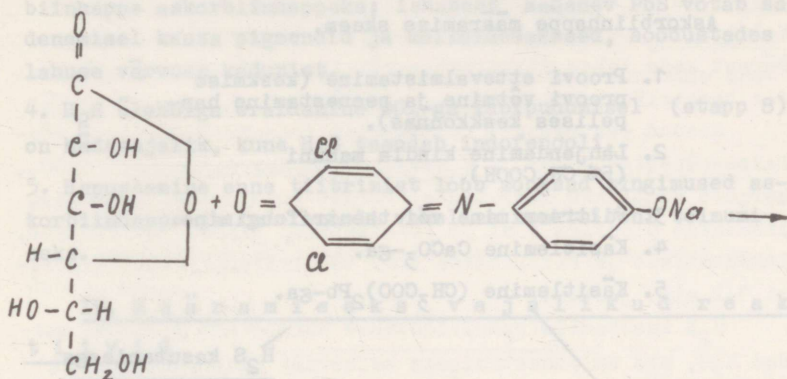
Analüüsiks sobiv kaalutis võetakse arvestusega, et see sisaldaks askorbiinhapet 0,1 - 0,2 g.

Orienteeruvad ainehulgad:

- a) puuviljad, juurviljad, marjad - 10-50 g;
- b) konservid ja keedised - 20-50 g;
- c) vitaminiseeritud siirupid ja kontsentratsioonid - 1-2 g;
- d) mahlad - 1-50 g;
- e) dražeed ja tabletid - 1-2 g.

III. Indofenoolmeetod ja L-askorbiinhappe määramise skeem

Happelises keskkonnas taandab askorbiinhape 2,6-dikloorfenoolindofenolaadi (roosa värvus) leukovormi (värvusetä):



Allpool esitatud askorbiinhappe skeemi on lülitatud kõik töö teostamisel vajalikud protseduurid. Olenevalt uuritava materjali koostisest, võib mõned operatsioonid teostamata jätta (näit. puhta askorbiinhappe või dražeeade puhul piisab lahuse valmistamisest, hapustamisest ja tiitrimisest 2,6-dikloorfenoolindofenolaadiga).

Askorbiinhappe määramise skeem.

1. Proovi ettevalmistamine (keskmise proovi võtmine ja peenestamine happelises keskkonnas).
2. Lahjendamine kindla mahuni ($5\% \text{CH}_3\text{COOH}$).
3. Filtreerimine või tsentrifuugimine.
4. Käsitlemine CaCO_3 -ga.
5. Käsitlemine $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ -ga.

H_2S kasutamisetä

H_2S kasutamisega

6. Käsitlemine H_2S -ga.
7. Filtreerimine või tsentrifuugimine.
8. Liigse H_2S eraldamine CO_2 -ga
9. Hapustamine.
10. Tiitrimine 2,6-dikloor-fenoolindofenolaadiga.

Üksikute operatsioonide mõte.

1. Kogu analüüs viiakse läbi mõõdukalt happelises keskkonnas ($5\% \text{CH}_3\text{COOH}$) askorbiinhappe oksüdatsiooni pidurdamiseks. Produkti peenestamisel äädikhappe juuresolekul toimub askorbiinhappe üleminek ekstrakti.
2. Käsitlemine CaCO_3 -ga (etapp 4) inhibeerib askorbiinhappe oksüdatsiooni ning suurendab lahuse pH 5-ni. Sellel pH väärtusel sadestuvad lahusest välja kõrvalised redutseerivad ained ja valgud Pb-atsetaadi lahuse lisamisel (etapp 5).
3. Käsitlemine H_2S -ga on vajalik, kui osa askorbiinhappest esineb dehüdroaskorbiinhappena (mis ei taanda indofenooli), kui analüüsitakse sulfiteeritud produkti või kui lahused on tugevasti värvunud või sogased. H_2S taandab dehüdroaskor-

biinhappe askorbiinhappeks; lahusest sadenev PbS võtab sadenemisel kaasa pigmendid ja kolloidosakesed, soodustades lahuse värvuse kadumist.

4. H_2S ülehulga eraldamine CO_2 -ga läbipuhumisel (etapp 8) on hädavajalik, kuna H_2S taandab indofenooli.

5. Hapustamine enne tiitrimist loob soodsad tingimused askorbiinhappe ja indofenooli vahelise reaktsiooni toimumiseks.

IV. M ä ä r a m i s e k s v a j a l i k u d r e a k t i i v i d

- 1) CH_3COOH 5% vesilahus;
- 2) $(CH_3COO)_2Pb$ 5% lahus 5%-lises äädikhappes;
- 3) 2% HCl vesilahus;
- 4) $CaCO_3$ pulbrina;
- 5) klaasipuru või kuumutatud rauavaba kvartslüü;
- 6) H_2S (saadakse HCl toimel FeS -le);
- 7) CO_2 ;
- 8) $NaOH$ (KOH) 10% vesilahus;
- 9) $KMnO_4$ 10% vesilahus;
- 10) 0,001-n 2,6-dikloorfenoolindofenolaadi vesilahus fosfaatpuhvrts.

V. A s k o r b i i n h a p p e m ä ä r a m i s e K ä i k

Tahkete produktide uurimisel pannakse uhmrisse 5-10 g pestud klaasipuru või rauavaba kuumutatud kvartslüüa, lisatakse kaalutis kaalukaustist ja peenestatakse hoolikalt, lisades kogu aeg vähehaaval 5%-list äädikhapet, et kaalutis oleks kogu aeg kaetud vedelikuga (hapet on üldse umbes kolmekordne kogus kaalutise suhtes).

Uhmernatut sega viiakse lehtri abil kvantitatiivselt üle 100-ml mõõtkolbi, kasutades pesemiseks 5% CH_3COOH ja

täites kolva sama lahusega kuni kriipsuni. Kolb suletakse, kolvi sisu loksutatakse ja jäetakse 10 minutiks seisma. Pärast seda lahus filtritakse või tsentrifuugitakse, kogudes tsentrifugaadid kokku.

Saadud (esimesest) filtraadist (tsentrifugaadist) võetakse pipetiga 10 ml ja lisatakse vähehaaval 0,4 g CaCO_3 , kergelt vedelikku loksutades. Pärast vahutamise lõppemist lisatakse pipetiga 5 ml 5% Pb-atsetaadi lahust äädikhappes, loksutatakse ja filtritakse (või tsentrifuugitakse) kiiresti 1-2 min. jooksul.

H_2S kasutamise puhul lastakse uuritavast lahusest saadud H_2S , mis on puhastamiseks eelnevalt läbi vee juhitud, 5-10 min. jooksul paraja kiirusega läbi Kippi aparaadist (või mõnest teisest seadmest). Vedelik filtritakse läbi paberfiltrii. Seejärel juhitakse lahusest läbi redutseerivatest ainetest vabastatud (pesemine KMnO_4 -ga) CO_2 kuni H_2S täieliku eraldumiseni (kontroll plumbaatpaberiga!).

Olenevalt askorbiinhappe sisaldusest võetakse 0,5-10 ml lahust (kui H_2S ei kasutatud, võetakse sama kogus filtraati või tsentrifugaati, mis saadi pärast Pb-atsetaadiga käsitlemist), viiakse 50-ml koonilisse kolbi, kuhu eelnevalt on valatud 50% lahuse mahust kontsentreeritud CH_3COOH või 1 ml 2% HCl . Lahust loksutatakse, viiakse vedeliku maht destilleeritud veega 15 ml-ni ja tiitritakse mikrobüretist 0,001 n 2,6-dikloorindofenoolindofenolaadi lahusega (kuni 1 min.) püsiva roosa värvuse tekkimiseni.

Tiitrimiseks võetud optimaalse lahusehulga puhul kulub indofenoolilahust 1-2 ml. Kui reaktiiv kulu on sellest suurusest märksa erinev, tehakse tiitrimine uuesti sobiva lahusehulgaga.

Pimekatseks võetakse 1 ml 2% HCl või kontsentreeritud CH_3COOH sellises koguses, nagu kasutati lahuse hapustamisel enne tiitrimist, viiakse selle maht destilleeritud veega 15 ml-ni ja tiitritakse 2,6-dikloorfenoolindofenolaadi lahusega roosa värvuse tekkimiseni.

Vedelproduktide analüüsil lahjendatakse uuritav vedelik otsekohe 5% CH_3COOH -ga mõõtkolvi 100 ml-ni ja edasine lahuse käsitlemine on analoogiline tahkete produktide analüüsil kasutatuga.

VI. Askorbiinhappe sisalduse arvutamine

Askorbiinhappe sisaldus uuritavas aines mg%-des avaldub valemiga

$$x = \frac{a \cdot n \cdot 88,03 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100}{V \cdot V_2 \cdot g},$$

kus x - askorbiinhappe sisaldus uuritavas aines mg%;

a - tiitrimiseks kulunud indofenooli lahuse hulk milliliitrites, millest on lahutatud pimekatseks kulunud hulk;

n - indofenooli lahuse normaalsus;

88,03 - askorbiinhappe ekvivalentkaal ($M/2$);

V_1 - vedeliku üldine hulk, mis saadi filtraadi (vedelprodukti) käsitlemisel Pb-atsetaadiga ml;

V_2 - üldine lahuse hulk, mis võeti Pb-atsetaadiga käsitlemiseks;

V - tiitrimiseks võetud lahuse hulk ml;

V_3 - segu üldine hulk, mis saadi uuritava aine kaalutise ekstraheerimisel vedelikuga ml;

g - kaalutis g.

Kui on lähtutud eespool toodud lahuste hulkadest, siis ilmselt $V_1 \approx 15$ ml (mahu suurenemine CaCO_3 arvel on tühine), $V_2 = 10$ ml ja $V_3 = 100$ ml.

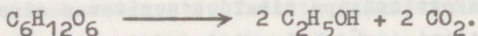
- NB! 1. Askorbiinhappe määramine tuleb läbi viia kiiresti (eriti pärast CaCO_3 lisamist), kahjustamata määramise korrektsust.
2. Paralleelkatsete erinevus ei tohiks ületada 5%.
3. Kui on vaja eraldi määrata askorbiinhapet ja dehidroskorbiinhapet, tuleb määramised läbi viia nii H_2S kasutamisega kui ka ilma.

ETANOLKÄÄRIMISE KÄIGU UURIMINE

Etanoolkäärimisel toimuvad pärmide elutegevuse tagajärjel suhkrutega protsessid, mis viivad etüülalkoholi ja teiste produktide tekkimiseni.

Pärmide arenemine sõltub pärmil hulgast ja füsioloogilisest aktiivsusest, toitekeskkonna koostisest, temperatuurist, pH-st jt. teguritest.

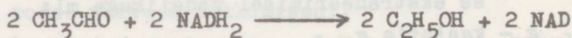
Etanoolkäärimise summaarsed protsessid võivad kirjeldada võrrandiga



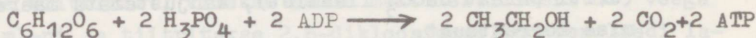
Tegelikult kujutab käärimine endast keerulist fermentatiivsete reaktsioonide kompleksi, kus etüülalkoholi ja süsihappegaasi kõrval tekivad ka kõrgemad alkoholid, happed, aldehyüdid jm.

Suhkrute käärimise esimene etapp (kuni püroviinamarihappe moodustumiseni) on analoogiline anaeroobse glükolüüsiga süsivesikute oksüdeerumisel kudedes.

Püroviinamarihappe dekarboksüleerumisel tekivad atseetaldehyüdid taandub $NADH_2$ toimel etüülalkoholiks.



Umbes 50% käärimisel vabanevast energiast salvestub ATP makroergilistes sidemetes. Ühe molekuli glükoosi lagunemisel fosforüleerub summaarselt 2 ADP molekuli, nii et summaarsed alkoholikäärimise reaktsiooni võime täpsustatult kirjutada järgmiselt:



Alkoholkäärimise kõrvalprodukte nimetatakse puskariõlideks. Kõrgematest alkoholidest tekib suuremal hulgal iso-

amüülalkoholi, amüülalkoholi ja butüülalkoholi. Peale alkoholide on puskariõlides happeid, estreid, atseetaldehüüdi jt. ühendeid. Suur osa kõrgematest alkoholidest tekib aminohapete desamiinimisel ja dekarboksüülimisel.

Seoses mitmesuguste biokeemiliste protsessidega muutuvad käärimise ajal käärimislahuse happesus, amiinse lämmastiku sisaldus, etüülalkoholi ja aldehüüdide sisaldus jne. Käärimise käigu kulgemist saame seega jälgida keskkonna füüsikaliste ja keemiliste omaduste määramisega. Käärimise intensiivsuse otseseks mõõduks on sobiv võtta eralduva CO₂ hulk.

T ö ö k ä i k

Valmistatakse õppejõu poolt soovitatud toitekeskkond ja filtritakse vajaduse korral. 500 - 1000-ml varem kaalutud koonilisse kolbi valatakse 300 ml söödet ja kaalutakse, ülejäänud sööde valatakse teise väiksemasse koonilisse kolbi (100 - 200 ml) ja kasutatakse hiljem alglahusena analüüsideks. Kolvid suletakse vatikorkidega. Happelukk mahitakse paberisse. Kolvid ja happelukk steriliseeritakse autoklaavis 0,5 atü juures 20 min. jooksul. Suuremas koonilises kolvis olev sööde jahutatakse 30°C-ni, lisatakse kindel kaalutis pagaripärmi või katseklaasis agaril kasvatatud puhast pärmikultuuri (see uhutakse 5 ml steriliseeritud veega toitekeskkonna hulka) ja kolb suletakse kontsentreeritud väävelhappega täidetud happelukuga (hapet lukus umbes 40% kuulikeste mahust). Kolb koos happelukuga kaalutakse 0,01-g täpsusega ja asetatakse käärima 30°C juurde termostateeritud ruumi või termostaati. Käärimine kestab kaks nädalat. Selle aja jooksul tuleks võimaluse korral iga päev kolb üle kaaluda, märkides üles kuupäeva, kellaaja ja kaalu. Kaalukadu võrdub praktiliselt käärimisel eralduva CO₂ hulgaga.

Kahe nädala pärast käärinud lahus tsentrifuugitakse või filtritakse ja viiakse läbi järgmised analüüsid:

1) amiinse lämmastiku sisalduse määramine alglahuses ja käärinud lahuses (vt. lisa 2);

- 2) pH määramine alg- ja käärinud lahuses (З.В. Бородина и др., Исследование продовольственных товаров, Гос. изд. торг. лит., Москва 1962, стр. 45-48, 53-56);
- 3) tiitritava happesuse määramine alg- ja käärinud lahuses. (З.В. Бородина и др. Исследование продовольственных товаров, Изд. "Экономика", Москва 1970, стр. 80-85);
- 4) etüülalkoholi sisalduse määramine käärinud lahuses (ibid. lk.12-15 ja 234-235). Lahuse tiheduse järgi alkoholi sisalduse leidmiseks võib kasutada tabelit lisa 3.

Katseandmed vormistatakse tabelina, kus on toodud analüüside tulemused (amiinne lämmastik mg/ml, tiitritav happesus pH). Arvutatakse välja üldine etüülalkoholi saagis (g ja %). Graafiku kujul vormistatakse käärimise käigu intensiivsuse olenevus ajast (eraldunud CO₂ hulk sõltuvalt käärimise ajast).

K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Miks kasutatakse happelukku?
2. Kuidas muutub käärimise käigus amiinse lämmastiku sisaldus?
3. Kas veini käärimist saab läbi viia pärmikultuuri kasutamiseta?

ESTAGARI VALMISTAMINE JA SELLE OMADUSTE UURIMINE

Läänemere vetikas *Furcellaria fastigiata* sisaldab polüelektrolüüdi iseloomuga heteropolüсахhariidi karragenaani, mille keemiline koostis ja geeli moodustavad omadused on sarnased üldtuntud agarile. Karragenaan leiab tööstuslikku kasutamist agari asendajana ja ENSV-s toodetuna kannab estagari nime. Estagari lahuseid võib vaadelda paljude teiste biogeensete polüelektrolüütide lahuste mudelitena. Agari lahuste omadused (viskoossus ja geeli tugevus) sõltuvad lahuse kontsentratsioonist, agari keskmisest molekulkaalust ja molekuli laengust. Estagar hüdroolüüs keetmisel suhteliselt kergesti, eriti hapete juuresolekul. Hüdroolüüs vähendab estagari lahuse viskoossust ja geeli tugevust.

T ö ö k ä i k

Vetikate kaalutis ~ 20 g pestakse ohtralt külma kraaniveega, pressitakse kuivaks läbi marli, kaalutakse uuesti ja paigutatakse keeduklaasi, lisatakse ettenähtud hulk ekstraherimislahust ja hoitakse nõrgal keemisel 2 tundi. Keeduklaasi koos sisuga kaalutakse enne ja pärast keetmist. Segu filtritakse läbi eelnevalt kuuma veega soojendatud filtriri. Ettevaatust! Impudelit soojendada ettevaatlikult, kaustades esialgu vähest hulka kuuma vett.

Jääkvetikad ja ekstrakt kaalutakse, ekstrakt võetakse järgneva uurimiseks. Määratakse ekstrakti kuivaine, saadava geeli tugevus ja sulamistemperatuur, 10 x lahjendatud ekstraktist määratakse viskoossus ja happelise hüdroolüüsi kiirus.

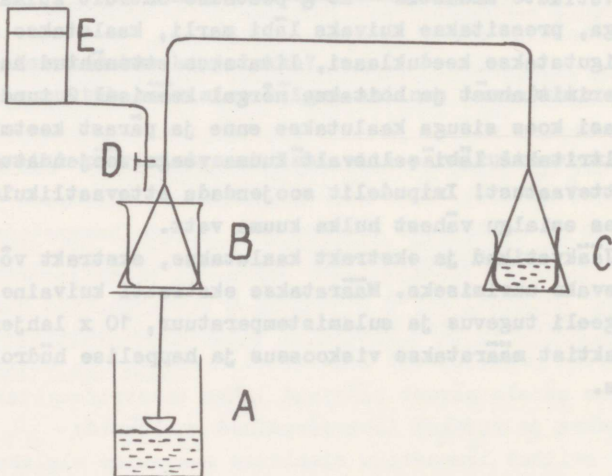
Määramismeetodid

a) kuivaine määramine.

Puhtasse kuiva kaalutud (0,001 g täpsusega) kaaluklaasi kaalutakse umbes 10 g ekstrakti, mille järel avatud kaanega klaasike asetatakse kuivatuskappi $102^{\circ} - 105^{\circ}\text{C}$ juurde. Umbes kahe tunni pärast klaasike jahutatakse eksikaatoris ja kaalutakse. Järgnevalt kaalutakse tunni tagant, kaalumist teostatakse konstantse kaaluni. Erinevus paralleelsete määramiste vahel ei tohi olla üle 0,2%;

b) geeli tugevuse määramine.

Viiele 100-ml keeduklaasile (diameetriga 4 - 4,5 cm) kantakse märgid, mis vastavad 30 ml vee mahule. Agariekstrakt valatakse keeduklaasidesse märgini ning keeduklaasid asetatakse seejärel kristallisaatorisse, milles on 20°C vesi. Vee tase kristallisaatoris peab olema kõrgemal ekstrakti nivooost klaasides. Klaasid hoitakse 20°C juures 1 tund. Tugevus määratakse Valente seadmega, mille skeem on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Valente seadme skeem.

Määramisel täidetakse kõigepealt veenõu E, kaalutakse mõõtenõu B ja pannakse tagasi oma kohale. Seejärel tasakaalustatakse seade vasturaskuse C muutmise teel. Keeduklaas uuritava geeliga paigutatakse survevarda alla nii, et selle otsik A puudutaks geeli pinda enam-vähem tsentris. Seejärel avatakse kraan D, lastes veel voolata mõõtenõusse B kiirusega 10–20 g/sek. Kui otsik A murrab geeli pinnast läbi, suletakse otsekohe kraan D ja kaalutakse mõõtenõu B. Selles oleva vee kaal annabki geeli tugevuse. Erinevus paralleelsete määramiste vahel ei tohiks olla üle 10%;

c) geeli sulamistemperatuuri määramine.

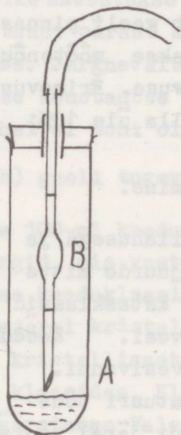
Kaks katseklaasi täidetakse pooleni agarilahusega ja suletakse kummikorgiga. Lahus jäetakse 20°C juurde mitte vähem kui kolmeks tunniks. Seejärel asetatakse katseklaasid keeduklaasi, milles on termomeeter ja 60°C vesi. Keeduklaas asetatakse omakorda sama temperatuuriga vesivanni. Vanni soojendatakse sellisel viisil, et temperatuuri tõus oleks 1 deg 2–3 min. jooksul. Iga tõusnud kraadi järel võetakse üks katseklaas välja, kallutatakse ja vaadeldakse, kas geel on muutunud. Temperatuur, mille juures katseklaasi sisu vedelaks muutub, ongi agari sulamistemperatuur. Erinevus paralleelkatsete vahel ei tohi olla rohkem kui 1 deg;

d) happelise hüdroolüüsi kiirus.

Kümme korda lahjendatud agarilahus neutraliseeritakse metüülpuna järgi, lisatakse ettenähtud kogus hapet, fikseerides happe lisamisel aja, segatakse hoolega ja paigutatakse segu viskosimeetrisse. Lahuse viskoossus määratakse 6 – 7 korda ilma viskosimeetrit termostaadist välja võtmata. Määramised viiakse läbi iga 10 min. järel ühe tunni vältel või (suurema happesuse puhul) tihedamini kuni viskoossuse langemiseni umbes 1/10 esialgsest;

e) viskoossuse määramine.

Agarilahuste viskoossuste määramiseks kasutatakse dots.V.Mihkelsoni konstrueeritud seadet (vt.skeem joonisel 7).



3-4 ml uuritavat lahust valatakse katseklaasi A. Kogu seadis asetatakse vesivanni (termostaati) temp. 30°C ja hoitakse seal enne mõõtmise algust vähemalt 10 min. Mõõtmiseks imetakse lahus viskosimeetrisse B veidi kõrgemale ülemisest mõõtejoonest. Imitoru vabastatakse ja mõõdetakse vedeliku meniski ülemisest alumise mõõtejooneni langemise aeg. Katset korratakse kolm korda.

Uuritava lahuse viskoossus sentipuaasides (cp) avaldub ligikaudselt

Joonis 7. Viskosimeeter agarilahuste kinemaatilise viskoossuse mõõtmiseks.

$$\eta = k \cdot t,$$

kus t - keskmine aeg;

k - viskosimeetri konstant.

Agarilahuse viskoossuse iseloomustamiseks määratakse samal viisil ka destilleeritud vee viskoossus. Saadud tulemustest arvutatakse suhteline viskoossus.

$$\eta_K = \frac{\eta_x - \eta_w}{\eta_w}$$

η_x - uuritava lahuse viskoossus;

η_w - vee viskoossus.

Siit arvutatakse karakterne viskoossus

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1 - \eta}{c},$$

kus c on lahjendatud agarilahuse ekstraheerunud kuivaine g/ml.

NB! Viskoossus sõltub oluliselt temperatuurist, mistõttu viskosimeetri termostateerimine on hädavajalik;

f) katseandmete esitamine.

Esitatakse ekstraheerimisel vee ja kuivaine bilanss. Kui ekstraheerimisel kasutati mingi soola lahust, arvutatakse soola kontsentratsioon lahuses.

$$C_t = \frac{C_o \cdot G_{so}}{G_{st}},$$

kus C_o - soola lähtekontsentratsioon;

G_{so} - ekstraktsioonisegu lähtekaal;

G_{st} - ekstraktsioonisegu lõppkaal.

Eksperimentaalselt leitud ekstrakti kuivainest ja arvutatud soola kuivainest leitakse ekstraheerunud ainete saagis

$$S = \frac{G_E \cdot (C_k - C_t) \cdot 100}{G_V},$$

kus C_k - määratud kuivaine;

G_E - ekstrakti kaal;

G_V - kuivade vetikate kaal.

Suurust $(C_k - C_t) / 10$ kasutatakse karakterse viskoossuse arvutamisel.

Arvutatakse geeli keskmine tugevus

$$\bar{\rho} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \rho_i,$$

kus $\bar{\rho}$ - keskmine tugevus;

ρ_i - üksikmääramise tulemus;

N - määramiste arv.

Arvutatakse geeli tugevuse standardhälve

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{\rho} - \rho_i)^2}{N-1}}$$

Happelise hüdrolüüsi tulemused esitatakse graafikuna hüdrolüüsi aeg - karakterne viskoossus.

K o n t r o l l k ü s i m u s i

1. Kirjutada lõik polüglükuroonhappe kui agari analoogi ahe-
last.
2. Milline agari füüsikalistest omadustest on teie arvates
kõige suurema tehnoloogilise tähtsusega?
3. Millisesse biopolümeeride klassi kuulub karrageenan?
4. Milliseid geelimoodustavaid biopolümeere te veel teate?
5. Millised on agari tehnoloogilise ja laboratoorse kasuta-
mise viisid?

KIRJANDUSE ÜLEVAATE KOOSTAMINE

Iga teadusliku töö vältimatuks etapiks on uuritava probleemi kohta kirjanduse ülevaate koostamine. Maailma-kirjandusest ülevaate saamiseks on kõige sobivam kasutada referaatajakirja, kuid küsimusega lähemaks tutvumiseks on tingimata vaja lugeda originaalartikleid. Käesolev töö on ette nähtud referaatajakirja "Реферативный журнал. Биохимия" ja mõne biokeemiaalase eriajakirjaga tutvumiseks ning kirjanduse kokkuvõtte koostamise meetodika omandamiseks.

Töö koosneb kolmest etapist.

1. Kartoteegi koostamine.
2. Originaalartikliga tutvumine.
3. Kokkuvõtte koostamine.

Töö meetodika

1. Kartoteegi koostamine:

- a) valmistatakse joonestuspaberist kaardid mõõtmetega 144 x 206 mm;
- b) selgitatakse välja antud küsimust puudutavad võtmesõnad. Näit. teemal "Vitamiinide süntees loomorganismis" "ВИТАМИНЫ" ja "СИНТЕЗ";
- c) iga ettenähtud ajavahemikus ilmunud referaatajakirja numברי lõpus oleva võtmesõnade indeksi järgi leitakse vajalikud referaadid;
- d) täidetakse kaardid vastavalt eeskujule. Tingimata kirjutatakse pealkiri nii originaalkeeles kui tõlkes. Artikli referaadi võib ümber kirjutada või konspekteerida.

Baliga B.R., Rajagopalan R. Intestinal synthesis of B-complex vitamins in rats as influenced by feeding of curds. Влияние творога на синтез витаминов группы В в кишечнике крыс.

J. Food Sci. and Technol. (India), 1967, № 4, № 3, 120-122; РЖХ 6 Ф1790 (1969).

Uuriti tiamiini, riboflaaviini, pantotenaati, püridoksiini, B₁₂ ja koliini. Rotte toideti 8 nädalat, 3 g kohupiima kindlustab vitamiinide õige taseme uriinis ja maksas, kohupiimale vastav vitamiinide kogus aga mitte. Autorid arvavad, et kohupiim intensiivistas vitamiinide sünteesi sooltes.

Kui antud küsimuse kohta on ilmunud materjali rikkalikult, võib selle etapi lõpetada pärast 20 kaardi koostamist.

2. Originaalartikliga tutvumine.

Koos õppejõuga valitakse välja artikkel lähemaks tutvumiseks. Vajalik ajakiri hangitakse TPI raamatukogust või raamatukogudevahelise abonemendi kaudu. Originaalartiklist tõlgitakse katsemetoodika, järeldused ja muud olulisemana tunduvad osad, antakse ülevaade katseandmete tabelitest ja graafikutest, tuuakse mõni uus viide varem ilmunud kirjan-dusele seoses artikli sisuga.

3. Aruande vormistamine.

Aruanne vormistatakse standardformaadis lehtedel ja peab sisaldama järgmised osad:

- a) tiitelleht;
- b) ülevaade tehtud töö mahust: läbivaadatud ajakirjad, kasutatud võtmesõnad;
- c) kokkuvõtte kaartidest.

Kokkuvõtte tuleks koostada üldistavana, reeglina iga viidet korduvalt kasutades. Kaartide omavahel seostamata ümberjutustamine ei ole lubatud. Tekstis märgitakse kasutatud viited numbritena nurksulgudes vastavalt osale e.

Näitena katkend ülevaatest eeltoodud teemal.

".... Uurititi askorbiinhapet [2,3,7], B-grupi vitamiine [4,5, 10-12], retinooli [3,6,9,10]. Katseloomadena kasutati rotte [1 - 4], küülikuid [5 - 8], koeri [9 - 12]. Analüüsiti uriini [4,6,7,11], verd [1], maksa [4,7,8]...." ;

d) ülevaade detailselt uuritud artiklist;

e) kirjanduse loetelu.

N ä i d e

-
4. Baliga B.R., Rajagopalan, R. Intestinal synthesis of B-complex vitamins in rats as influenced by feeding of curds. J.Food Sci. and Technol. (India), 1967 N^o 4, N^o 3, 120 PEX 6 1790 (1969).
-

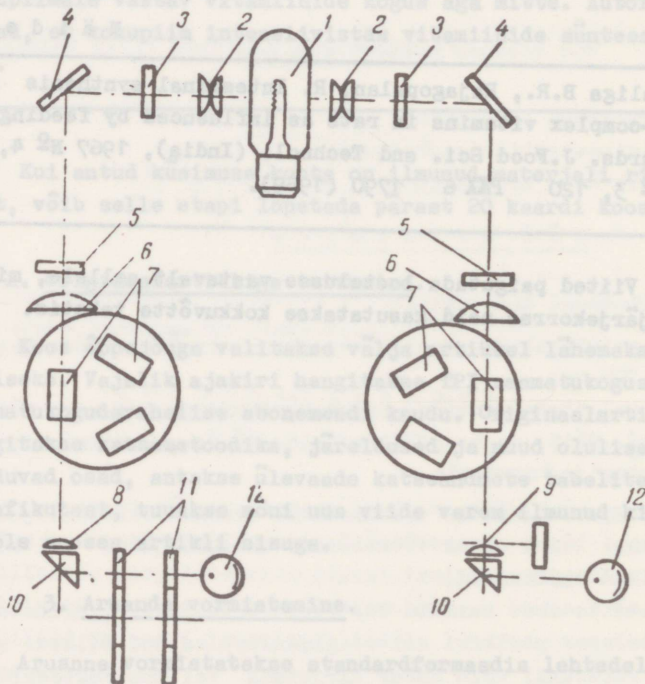
Viited paigutada loetelusse vastavalt sellele, millises järjekorras neid kasutatakse kokkuvõtte tekstis.

Fotoelektrilise kolorimeetri ФЭК-Н-57 skeem

ja optilise tiheduse määramine

Fotoelektrilises kolorimeetris ФЭК-Н-57 on kaks vastupinge põhimõttel lülitatud fotoelementi. Üks neist asub "kontroll"-valgusvoos. Selline skeem võimaldab automaatselt kompenseerida voolumuutusi valgustis.

Valgusvoogude võrdsustamiseks kasutatakse seadmes piludiafragmat. Null-instrumendina lülitatakse välisahelasse galvanomeeter.



Joonis 8. Fotokolorimeetri ФЭК-Н-57 optiline skeem.
 1 - valgusallikas, 2 - kondensorid, 3 - soojusfiltrid, 4 - peeglid, 5 - valgusfiltrid, 6 - laatsed, 7 - kuvetid, 8 - laatsed, 9 - piludiafragma, 10 - prismad, 11 - neutraalsed kiilud, 12 - fotoelemendid.

Fotomeetri optiline skeem on toodud joonisel 8.

Valgusallikast 1 tulev valgus suunatakse kondensorite 2,2¹ abil peeglitele 4,4¹; enne peeglitele langemist läbivad valgusvood infrapunast kiirgust absorbeerivad soojusfiltrid 3,3¹. Peegeldunud valgusvood läbivad valgusfiltrid 5,5¹, läätsed 6,6¹ ja küvetid 7,7¹. Läätsede 8,8¹ ja pöördprisma-de 9,9¹ kaudu suunatakse valgusvood fotoelementidele 10,10¹. Läätses 9¹ ette on asetatud piludiafragma 1¹, mis on ühenduses mõõtevõlliga. Vasakpoolse fotoelemendi ette on asetatud kaks neutraalset kiilu - suure tihedusega 12 ja väikese tihedusega 13. Seepärast vasakpoolne valgusvoog läbib kiilud, parempoolne - diafragma. Fotoelemendid 10,10¹ on diferentsiaalskeemi järgi lülitatud galvanomeetri 14 külge (sel juhul, kui galvanomeeter on seadme sisse konstrueeritud nagu kolorimeetril ФЭК-М).

Mõõtmise läbiviimine

20 min. enne mõõtmisi lülitatakse sisse stabilisaator. Lahuste optilisi tihedusi saab mõõta vasakpoolsest ja parempoolsest trumlilt. Antud töös kasutati mõõtmisi parempoolsest trumlilt. See meetod võimaldab suure täpsusega mõõta optilisi tihedusi alla 0,5.

Vajaduse korral kontrollitakse "elektrilist nulli". Selleks lastakse 20 min. jooksul valgusvood fotoelemendile, seejärel kaetakse valgusvood vastava siibri abil ja kontrollitakse galvanomeetri nullasendit 1-2 min. jooksul.

Valgusvoogude teeale asetatakse lahustajaga (pimekatse lahusega) täidetud küvetid. Parempoolse trumli optilise tiheduse skaala keeratakse nulli. Seejärel lülitatakse galvanomeeter esimesse asendisse ja kiilu 12 abil seatakse galvanomeetri osuti nulli. Siis lülitatakse galvanomeeter järkjärgult neljandale tundlikkusele ja reguleeritakse nulli kiilu 13 abil. Galvanomeeter lülitatakse välja ja paremale poole asetatakse küvett uuritava lahusega. Galvanomeeter lülitatakse esimesele tundlikkusele ja mõõtevõlli keeramisega seatakse galvanomeetri osuti nulli. Siis suurendatakse galvanomeetri tundlikkust ja täpsustatakse mõõtmist. Lugemid teostatakse parempoolsest trumlilt (punaselt skaalalt).

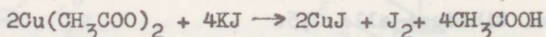
NB! Galvanomeetriga tuleb töötada ettevaatlikult. Enne suuremale tundlikkusele lülitamist tuleb väiksema tundlikkuse juures galvanomeeter viia nulli. Mitte unustada galvanomeetri väljalülitamist mõõtmiste vaheajal (küvettide vahetamisel).

L i s a 2

Aminse lämmastiku määramine

=====

Meetod põhineb aminohapete ja mitmete peptiidide omadusel moodustada vasega lahustuv kompleks, mis määratakse jodomeetriliselt. Meetodi olemus on järgmine: nõrgalt leeliselises keskkonnas lisatakse kindlale kogusele uuritava lahusele vaskfosfaadi suspensiooni boraatpuhveris. Pärast loksutamist sadestuvad välja valgud ja polüpeptiidid. Sade filtritakse ning läbipaistvas filtraadis määratakse pärast aadikhappe ja KJ lisamist eralduv jood tiosulfaadiga tiitrimisel.



Reaktiivid

1. 27,3 g CuCl_2 1 l destilleeritud vees.
2. 64,5 g Na_2HPO_4 lahustatakse 500 ml destilleeritud vees (ilma CO_2). Lisatakse 7,2 g NaOH ja viiakse lahuse maht destilleeritud veega 1 l.
3. Boraatpuhver: 57,21 g booraksit lahustatakse 1,5 l destilleeritud vees, lisatakse 100 ml 1n HCl ja viiakse veega lahuse maht 2 l.
4. Vaskfosfaadi suspensioon: segatakse 1 mahuosa reaktiivi 1, 2 mahuosa reaktiivi 2, 2 mahuosa reaktiivi 3.
5. 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
6. Indikaator - tümoolftaleiin.

Määramise tehnika

2 ml uuritavat filtraati pipeteeritakse 50-ml mahuga mõõtkolbi, lisatakse 2-3 tilka tümoolftaleiini ja 2 n NaOH lahust kuni nõrgalt sinise värvuseni. Pärast seda lisatakse kolbi 30 ml vaskfosfaadi suspensiooni ja täidetakse märgini destilleeritud veega, loksutatakse ning 5 min. pärast filtritakse läbi paberfiltrii. 5-10 ml filtraati hapustatakse 0,5 ml jää-aädikhappega, lisatakse 0,5 g KJ ja tiitritakse 0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ lahusega. Indikaator - tärklise lahus.

$$\text{Arvutus: } B = \frac{a \cdot b \cdot 2,8 \cdot k}{c \cdot d},$$

kus B - amiinse lämmastiku hulk mg N/ml;

a - tiitrimiseks kulunud 0,1 n tiosulfaadi hulk ml;

b - reaktsioonisegu kogumaht ml (siin 50 ml);

2,8-1 ml 0,1 n tiosulfaadile vastav amiinse lämmastiku hulk mg;

k - 0,1 n tiosulfaadi normaalsuse parandusfaktor;

c - määramiseks võetud uuritava lahuse hulk ml;

d - tiitrimiseks võetud filtraadi hulk ml.

Etanooli vesilahuste tihedused 20°C juures g/cm³

Etanooli kaal %	,0	,1	,2	,3	,4	,5	,6	,7	,8	,9
0	820	801	782	763	745	726	707	689	670	652
1	633	615	596	578	559	541	522	504	486	468
2	450	432	414	396	378	360	342	324	307	289
3	272	254	237	219	202	185	168	151	134	117
4	100	084	067	050	034	017	000	984*	968*	951*
5	935	919	903	887	871	856	840	824	808	793
6	777	762	746	731	715	700	685	670	655	639
7	624	609	594	579	564	550	535	520	505	490
8	475	460	446	431	416	401	386	371	357	342
9	328	313	298	284	270	255	241	226	212	198
10	184	169	155	141	127	114	100	086	072	058
11	044	030	016	003	989*	975*	961*	948*	934*	920*
12	907	893	880	866	852	839	825	812	798	785
13	772	758	745	732	719	706	693	680	667	654
14	640	627	614	601	588	575	562	549	536	523

0,97

Toiduainete tehnoloogia kateeder

Biokeemia loengute programm

erialadele KO (1007) ja KÜ (1011)

51 tundi

1. Sissejuhatus.

1.1. Üldmõisteid.

1. Biokeemia olemus. Seos teiste teadustega. Biokeemia osatähtsus kaasaja maailmapildis. Biokeemia kui toiduainete tootmise ja kasutamise teoreetiline alus.

2. Eluprotsesside iseloomustus. Elusorganismide tüüpiline koostis ja mikroheterogeensus. Ainevahetuse suunad ja tähtsus. Autoreplikatsioon, reageerimine ja liikuvus. Toit kui elusorganismide produkt ja ainevahetuse alus.

3. Biokeemia ajalugu. Ebataadlik periood. Esmase arengu periood. Iseseisvaks teaduseks kujunemine. Öitseng XX sajandil. Edasise arengu perspektiivid.

4. Biokeemia literatuur. Õpikud, populaarteaduslikud väljaanded, teaduslik ja refereeriv perioodika.

1.2. Biokeemia olulised struktuurid.

1. Biokeemia ühendite üldiseloomustus. Tüüpilised elemendid, struktuurid, funktsionaalsed rühmad ja keemilise sideme liigid. Vesinikside. Hüdratatsioon. Biokeemia stereostruktuuride osatähtsus ja labiilsus.

2. Biopolümeerid. Jaotus polümeerhomoloogideks ja determineeritud polümeerideks. Lineaarsed ja hargnenud ahelaga Bp-lahused. Hüdratatsioon, geelid ja soolid. Bp. esindajad ja tähtsus.

3. Tüüpilisi struktuure. Pürimidiinrida. Pürimidiinid, puriinid, pteriinid ja flaviinid. Nende tautomeeria. Porfüriini derivaadid.

4. Optilised isomeerid. D- ja L-rea absoluutne struktuur.

1.3. Biokeemia uurimismeetodid.

1. Üldmõisted. Keemiliste, füüsikaliste ja bioloogiliste meetodite ühtsus. Põhiülesanded: analüüs, eraldamine ja fraksioneerimine, omaduste ja struktuuri määramine. Bioloogiliste ühendite ebastabiilsus. Mikromeetodid.
2. Kromatograafilised meetodid. Kromatograafia põhimõisted. Paber-, õhukese kihi ja kolonnkromatograafia. Geelfiltratsioon, loonvahetus ja adsorptsioon. Gaasikromatograafia.
3. Elektroforees. Analüütiliste ja preparatiivsete meetodite vormistus.
4. Optilised meetodid. Kolorimeetria ja spektroskoopia. Elektronmikroskoopia. Röntgenstruktuuranalüüs.
5. Hüdrodünaamilised meetodid. Viskoossus, difusioon, ultratsentrifuugimine.

2. Valgud.

2.1. Valkude ehitus.

1. Sissejuhatus. Valkude eriline koht teiste ainete hulgas. Valkude bioloogilised funktsioonid. Valgud toidus.
2. Valkude struktuur. Primaarne, sekundaarne, tertsiaarne ja kvaternaarne struktuur. Molekulmass, globulaarsed ja fibrillaarsed valgud.
3. Aminohapped. Üldvalem, valkudes esinevad ja muud aminohapped.

2.2. Valkude omadused.

1. Füüsikalised omadused. Hüdratisatsiooni osatähtsus. Valkude sadestamine ja kristallimine. Denatureerumine. Kollageeni liimistumine. Elektrilised omadused, isoelektriline täpp.
2. Keemilised omadused. Aminohapete reaktsioonid. Proteolüüs. Roiskumine.
3. Analüüs. Kvalitatiivne määramine. Biureedi-, ninhüdriin-, ksantoproteiin- ja Millon'i reaktsioon. Kvantitatiivse määramise meetodid. Valkude lahutamine. Aminohappelise järjekorra ja struktuuri määramine.

4. Süntees. Mikrobioloogiline ja keemiline süntees.

2.3. Valkude esindajad.

1. Üldandmed. Liht- ja liitvalgud. Nomenklatuur.

2. Liitvalgud. Albumiinid, globuliinid, prolamiinid, glüteeliinid, aluselised valgud, tugivalgud.

3. Kromoproteiinid. Hemoglobiini vormid ja tähtsus. Hemoglobiini muutumine soolamisel.

4. Muud liitvalgud. Fosfo-, metallo-, glüko- ja lipoproteiidid. Kaseiini struktuur ja koaguleerimine.

5. Peptiidid. Üldomadused. Funktsioonid koensüümide, toksiinide ja antibiootikumidena. Glutatioon.

6. Toiteväärtus. Asendamatute aminohapete normid. Erinevate valkude võrdlus.

3. Nukleiinhapped.

3.1. Struktuur.

1. Nukleiinhapete liigitus ja koostisained. Ahela ehitus. Komplementaarsuse mõiste.

2. RNA ja DNA struktuur.

3. Autoreplikatsioon.

3.2. Funktsioonid.

1. Geneetika põhimõisted. Kromosoomid ja geenid. Alleelid. Retsessiivsed ja dominantsete tunnused. Tunnuste ristumine. Geeni molekulaarbioloogiline mõiste.

2. Geneetiline kood. Tripletid.

3. Valgu süntees. m- RNA süntees, ribosoomid, t- RNA ja aktiveerimise osatähtsus.

4. Viirused. Struktuur ja omadused.

4. Süsivesikud.

4.1. Üldandmed.

1. Klassifikatsioon ja nomenklatuur.

2. Leidumine. Tähtsus taimede ehitusmaterjali ja toiduna. Tehniline kasutamine.

3. Süsivesikute stereokeemia. D- ja L-rida. Heworthi ja Fisheri valemid.

4.2. Monosahhariidid.

1. Monosahhariidide füüsikalised ja keemilised omadused. Muutarotatsioon, taandavad omadused, glükoosid, N-ühendite moodustumine. Boorhappe reaktsioonid.
2. Monosahhariidide esindajad. Pentoosid (arabinoos, riboos, desoksüriboos, ksüloos). Heksoosid (glükoos, mannoos, fruktoos). Teised monosahhariidid.
3. Monosahhariidide derivaadid. Alkoholid, aminosuhkrud, oon- ja uroonhapped.

4.3. Oligo- ja polüsahhariidid.

1. Oligosahhariidide omadused. Nende jaotus taandavateks ja mittetaandavateks. Suhkrute magusus. Esindajad: sahharoos, maltoos, isomaltoos, laktoos, tsellobioos, rafinoos.
2. Homopolüsahhariidid. Tähtsused, amülaas ja amülopektiin. Amülolüütilised ensüümid. Glükogeen, dekstriinid, dekstraanid, tselluloos, inuliin, lihheniin.
3. Heteropolüsahhariidid. Pektinained, agar, algiinhapped, hemitselluloos, mukopolüsahhariidid.

4.4. Süsivesikute analüüs.

1. Kvalitatiivne analüüs. Suhkrute lahutamine, spetsiifilised reaktsioonid. Tähtsused värvusreaktsioon.
2. Kvantitatiivne analüüs. Keemilised ja füüsikalised meetodid. Polüsahhariidide hüdrolyüs.

5. Lipiidid.

5.1. Rasvad.

1. Üldomadused. Lipiidide definitsioon. Rasvade struktuur, keemilised ja füüsikalised omadused, leidumine ja tähtsused.
2. Rasvhapped. Looduslike rasvhapete iseloomulikud jooned. Rasvhapete tähtsamad esindajad.

3. Rasvade klassifikatsioon. Loomsete ja taimsete rasvade jaotus ja esindajad.
4. Rasvade muutumise keemia. Hüdreerimine. Autooksüdatsioon mehhanism ja tähtsus õlivärvide kuivatamisel ning rasva riknemisel. Sikatiivid ja antioksüdandid.
5. Näiteid rasvadest. Piimarasv, kalarasv, taimeõlid.

5.2. Teised lipiidid.

1. Vahad. Struktuur, omadused ja esindajad.
2. Fosfatiidid. Struktuur, omadused. Letsitiinid, kefaliniid jt. fosfatiidid. Nende rakenduslik tähtsus.
3. Steroidid. Steriolid. Steriidid. Kolesterool ja ateroskleroos. Sapihapped jt. steroidid.
4. Muud lipiidid. Isoprenoidi mõiste. Karotinoidid, kausük, Sfingosiidid ja tserebroosiidid.

5.3. Analüüs.

1. Üldpõhimõisted. Kvantitatiivne ja kvalitatiivne määramine. Rasvade ja lipiidide eraldamine. Rasvhapete gaasikromatograafia.
2. Rasvu iseloomustavad arvud. Happe-, seebistus-, jood-, peroksiid-, Reichert-Meissli- ja Polenske arv. Nende tähtsus ja varieerumise piirid.

6. Ensüümid.

6.1. Üldomadused.

1. Ensüümide tähtsus. Põhimõisted ensüöloogiast.
2. Ensüümide nomenklatuur. Rahvusvaheline ensüümide klassifikatsioon. Indeks. Ensüümi aktiivsuse ühik.
3. Ensüümide saamine. Eraldamine kudedest, puhastamine. Ebastabiilsusega seotud ettevaatusabinõud.

6.2. Kineetika.

1. Ensüümi toime mehhanism. Aktiivne tsenter. Koschlandi hüpotees. Lüsotsüün. Aktivaatorid. Konkureeriv ja mittekonku-

reeriv, pöörduv ja mittepöörduv inhibeerimine. Allosteeriline regulatsioon.

2. Kineetika. Põhiline kineetiline võrrand. Michaelise-Menten võrrand. Kiiruse sõltuvus pH ja T° .

3. Spetsiifilisus. Absoluutne ja suhteline spetsiifilisus, kiiruse sõltuvus substraadi struktuurist.

4. Koensüümid, NAD, NADP, LSH, GSH, tsütokroomid. Koatsülaas, kokarboksülaas.

6.3. Ensüümid. praktikas.

1. Fermentpreparaatide saamine. Sügav- ja pindkultuur. Kultiveerimise tingimused. Tähtsamad produktendid. Preparaatide eraldamine.

2. Kasutamine tööstuses. Amülaaside, proteaaside, pektinaaside, tsellulaaside, glükoosi oksüdaasi tööstuslik kasutamine.

3. Seotud ensüümid. Ensüümide sidumise eesmärgid ja meetodid. Seotud ja mikrokapseldatud ensüümide omadused ja kasutamise teed.

7. Muud orgaanilised ained.

7.1. Vitamiinid.

1. Põhimõisted. Vitamiinide avastamine. Hüpo-, hüper- ja avitaminoos. Kriitilised vitamiinid.

2. Alifaatsed vitamiinid. Rasvhapped, pangaamhape, koliin ja askorbiinhape.

3. Isotsüklilised vitamiinid. Retinool, kaltsiferool, inosiit, PAB, naftokinoonid.

4. Heterotsüklilised vitamiinid. Tiamiin, riboflaviin, püridoksaal, nikotiinhape, biotiin, pteridiinid, flavoonid, tsüaankobalamiin, tokoferoolid, fenuülkromaanvitamiinid.

5. Vitamiinide analüüsi meetodid.

7.2. Hormoonid.

1. Põhimõisted. Tähtsamad siseseretsiooninäärmed.

2. Hormoonide esindajad. Aromaatsetes hormoonid: adrenaliin, türoksiin. Valkhormoonid. Insuliin. Steroidhormoonid.
3. Hormoonide toime näited. Insuliin, glükogeen, adrenaliin, türoksiin.

7.3. Mitmesugused orgaanilised ained.

1. Lämmastik-ekstraktiivained. Kreatiin, kreatiniin, karnosiin. Nende osa organismi energieetikas. Liha ja kala ise-loomulikud ekstraktiivained.
2. Orgaanilised happed. Äädik-, piim-, õun-, merivaik-, viin- ja sidrunhappe esinemine ja kasutamine.
3. Aromaatsetes ja hüdroaromaatsetes ained. Parkained. Parkimine. Flavonoidid, nende osatähtsus.
4. Lõhna- ja maitseained. Lõhna- ja maitseainete struktuur. Eeterlikud õlid.
5. Alkaloidid. Toiduainete tööstuses olulisi alkaloide. Narkootikumid.
6. Bakteritsiidsetes ained. Antibiootikumid, fütontsiidid, lütsotsüün.
7. Toksilised ained. Bakteriaalsed toksiinid, aflatoksiinid, loomsed ja taimsed mürgid.

8. Mineraalained ja vesi.

8.1. Vesi organismis.

1. Vee esinemine ja funktsioonid organismis. Vee kogus, vee esinemise vormid.
2. Organismi veebilanss. Summaarne veebilanss, osmootse rõhu ja pH reguleerimine. Isotoonilised lahused. Donnani tasakaal.

8.2. Mineraalained.

1. Makroelemendid. K, Na, Ca, Mg, P, Cl bioloogilised funktsioonid ja inimorganismi vajadus nende järele.
2. Mikroelemendid. Br, J, F, Ca, Fe, Mo, Co füsioloogilised funktsioonid. Radioaktiivsed isotoobid.

9. Bioloogilised struktuurid.

9.1. Tsütoloogia alused.

1. Membraanid. Membraanide ehitus. Aktiivne ja passiivne transport. Osmoos.
2. Raku ehitus. Tuum, mitokondrid, ribosoomid, vakuoolid, tsentrosoomid, nende funktsioonid.
3. Raku pooldumine. Mitoosi ja meioosi mõiste. Mitoosi etapid.

9.2. Histoloogia alused.

1. Koed. Loomsete kudede liigid ja esindajad. Liha ja kala toiteväärtus.
2. Veri. Vererakud ja plasma. Vere funktsioonid. Vere hüübimine ja aglutineerumine.
3. Taimsete kudede ehitus. Lehed, lihavad koed, varukoed. Taimsete toiduainete toiteväärtus.

10. Bioenergeetika.

10.1. Bioenergeetika alused.

1. Organismi termodünaamika. Organismi termodünaamilised funktsioonid. Vaba energia. Vaba energia saamine ja kasutamine.
2. ATP. Struktuur, termodünaamilised ja keemilised omadused, Makroorgilised sidemed.
3. Bioloogiline oksüdatsioon. Erinevus põlemisest. Tsütokroomsüsteemi töö.
4. Hingamisprotsesside tähtsus. Loomsete ja taimsete produktide hingamine.

10.2. NADH_2 teke organismis.

1. Glükolüüs. Reaktsioonid püruvaadini, püruvaadi muundumise teed. Atsetüül CoA.
2. Glükoosi oksüdeerimise pentoostsükkel.
3. Trikarboksüülhapete tsükkel. Etapid, bilanss. Väheproduktide osa ainevahetuses.

4. Rasvade oksüdatsioon. Glütseriini oksüdatsioon. Rasvhape β -oksüdatsioon.

11. Biofüüsikalisi funktsioone.

1. Närvirakk. Närviraku ehitus. Närviimpulsi levik. Mediatorid.
2. Lihased. Lihaste struktuur. Lihaste kokkutõmbumine.
3. Ärritatavus. Näiteid meeleorganite tööst.

12. Ainegruppide metabolism.

12.1. Metabolismi põhimõtted.

1. Ainevahetuse suunad. Ainete omastamine, ümbertöötamine ja süntees. Homeostaas.
2. Ainevahetuse uurimise meetodid.

12.2. Süsivesikute reaktsioone.

1. Fotosüntees. Klorofüllli molekul. Primaarse füüsikalise-keemilise reaktsiooni etapid. Järgnevad reaktsioonid.
2. Süsivesikute tasakaal. Bilanss. Glükogeeni moodustumine. Glükolüüs. Seos rasvade ainevahetusega.

12.3. Rasvade reaktsioone.

1. Rasvade tasakaal. Atseetoatsetaadi teke. Maksa osatähtsus.
2. Rasvade süntees.

12.4. Valkude reaktsioone.

1. Aminohapete reaktsioonid. Desamiinimine, ümberamiinimine, dekarboksüülimine. Tekkinud amiinide bioloogiline tähtsus. Histamiin.
2. Valkude tasakaal. Spetsiifiliste valkude süntees. Valgu bilanss. Ammoniaagi moodustumine.
3. Karbamiidi süntees.

13. Toitumine.

13.1. Seedeorganite ehitus ja töö.

1. Suu ja neel. Sülje koostis ja eritumine.
2. Magu. Protsessid maos, maomahla eritumine.
3. Soolled. Seedemahlade eritumine, hüdroolüüs, toitainete imendumine. Vee imendumine. Soolte mikrofloora.

13.2. Organismi energiaetika.

1. Energia kulu. Põhiaiinevahetus, füüsilise koormuse mõju. Elanikkonna grupid. NSVL elanike toitumism normid.
2. Kalorsus. Toitainete ja toiduainete kalorsus.

13.3. Vajadus muude ainete järele.

1. Valkude toiteväärtus ja omastatavus. Toiduainete valkude omadused.
2. Toidu süsivesikud, nende omadused.
3. Rasvad ja lipiidid toidus.

S I S U K O R D

Sissejuhatus.	3
Töö nr. 1. Kvalitatiivsed reaktsioonid.	5
Töö nr. 2. Aminohapete paberkromatograafilise lahutamise	15
Töö nr. 3. Geelkromatograafia	20
Töö nr. 4. Gaasikromatograafia.	23
Töö nr. 5. Amülaasi aktiivsuse määramine.	34
Töö nr. 6. Rasva tiitri määramine	37
Töö nr. 7. Ribonukleiinhappe sisalduse määramine pärmis	41
Töö nr. 8. Askorbiinhappe sisalduse määramine	45
Töö nr. 9. Etanoolkäärimise uurimine.	52
Töö nr. 10. Estagari valmistamine ja selle omaduste uurimine	55
Kirjanduse ülevaate koostamine.	61
Lisa 1. Fotoelektrilise kolorimeetri ФЭ KH-57 skeem ja optilise tiheduse määramine.	64
Lisa 2. Amiini lämmastiku määramine.	66
Lisa 3. Etüülalkoholi vesilahuste tihedused 20°C juures.	68
Lisa 4. Biokeemia loengute programm.	69

Hind 14 kop.

A-

32078

79 688

TÜ RAAMATUKOGU



1 0300 00533130 3