

TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM  
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC  
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ PROTEIN - ENZYME

---

**BÀI THỰC HÀNH**

**HÓA SINH HỌC**

*Ngành:*

**CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM  
CÔNG NGHỆ SINH HỌC  
QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG THỰC PHẨM  
CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH  
CÔNG NGHỆ CHẾ BIẾN THỦY SẢN**

**Trình độ: *Cao đẳng chính quy***

**Tổng số giờ thực hành: *30 giờ***

**Năm 2015**

## Bài 1

# ĐỊNH TÍNH ACID AMIN VÀ PROTEIN

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc xác định các phản ứng màu dùng để nhận biết acid amin, protein; nguyên tắc xác định một số tính chất của acid amin và protein;
- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần thí nghiệm và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;
- Trình bày được các bước tiến hành xác định phản ứng màu của acid amin, protein; các bước tiến hành xác định một số tính chất của acid amin và protein;
- Tiến hành được các thao tác xác định phản ứng màu của acid amin, protein; tiến hành xác định một số tính chất của acid amin và protein theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Giải thích hiện tượng, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;
- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;
- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;
- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

\* **Nội dung bài thực hành:**

## 1. Các phản ứng màu đặc trưng

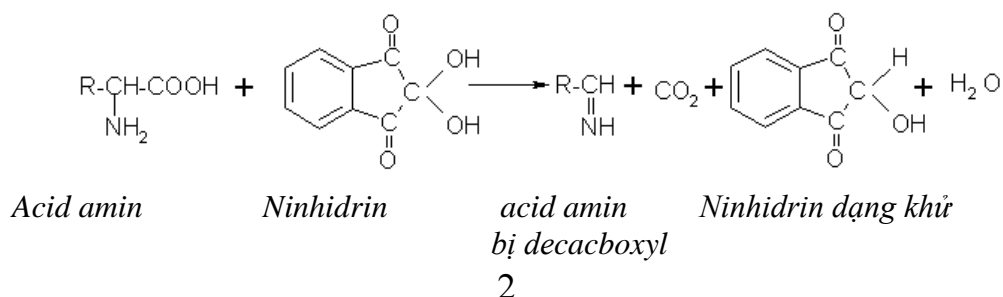
### 1.1. Phản ứng với ninhidrin

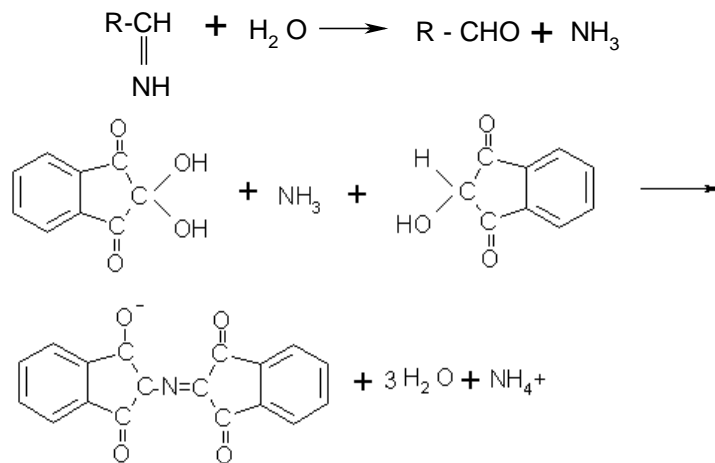
#### 1.1.1. Sơ lược về lý thuyết

Khi đun nóng, dưới tác dụng của ninhidrin, acid amin bị oxy hóa chuyển thành acid amin rồi đến amoniac và cacbonic. Acid amin bị giảm bớt 1 nguyên tử cacbon trở thành dạng aldehyd. Như vậy, acid amin có khối lượng phân tử nhỏ hơn và amoniac tạo thành sẽ oxy hóa ninhidrin tạo nên phức màu xanh tím, cường độ màu tương ứng với giá trị nitơ amin của acid amin.

Phản ứng màu của ninhidrin cũng xảy ra với acid amin mạch bên của peptid và protein cũng như với muối amoni, glucosemin và amoniac. Để định lượng chính xác acid amin, dung dịch nghiên cứu phải không có hợp chất trên.

Phương trình phản ứng của acid amin với ninhidrin như sau:





Phức chất màu xanh tím

### 1.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Albumin (lòng trắng trứng gà) 1%;
- Gelatin 1%;
- Acid Aspartic 1%;
- Glycin 1%
- Ninhidrin 0,1%;
- Nước cất.

### 1.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 1.1.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 4 ống nghiệm theo thứ tự:
 

+ Ống 1:	1ml Albumin 1%	+ 5 giọt Ninhidrin 0,1%;
+ Ống 2:	1ml Gelatin 1%	+ 5 giọt Ninhidrin 0,1%;
+ Ống 3:	1ml Glycin 1%	+ 5 giọt Ninhidrin 0,1%;
+ Ống 4:	1ml Acid Aspartic 1%	+ 5 giọt Ninhidrin 0,1%;
- Sau đó, tiến hành đun nóng 4 ống nghiệm trên trên ngọn lửa đèn cồn trong 1 phút. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

### 1.1.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 1.2. Phản ứng Xantoproteic

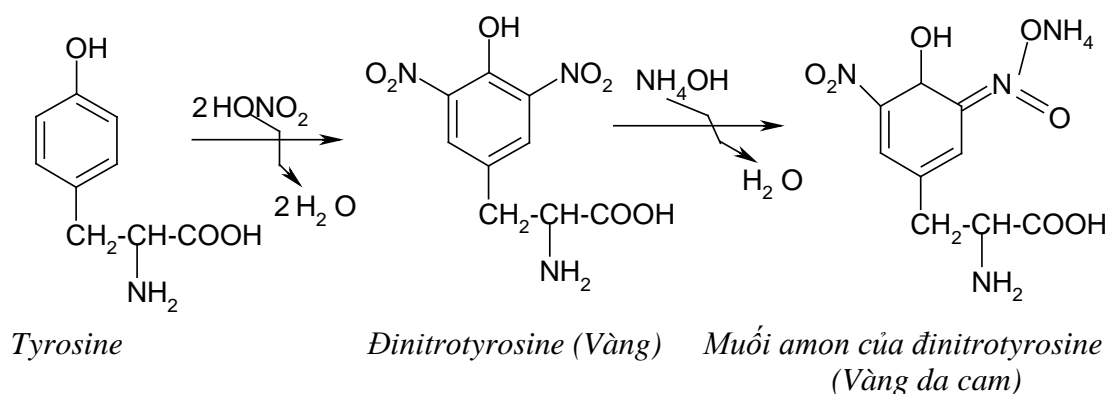
### 1.2.1. Sơ lược về lý thuyết

Khi đun nóng dung dịch protein hoặc polypeptid, acid amin vòng thơm có chứa trong đó tác dụng với acid nitric đậm đặc sẽ tạo thành hợp chất nitro có màu vàng.

Các hợp chất có vòng thơm như phenol hoặc các hợp chất có vòng khác cũng cho phản ứng này. Tuy nhiên, các protein không chứa acid amin vòng thơm sẽ không xảy ra phản ứng này.

Khi ta thêm dung dịch kiềm đặc ( $\text{NH}_4\text{OH}$  đặc hoặc  $\text{NaOH}$  30%) thì hợp chất nitơ vừa được tạo ra sẽ biến thành muối natri hoặc muối amoni của đinitrotirozin (phenylalanin; triptophan).

Phản ứng Xantoproteic của tyrosine xảy ra như sau:



### 1.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Phenol 0,1%;
- Albumin 1%;
- Gelatin 1%;
- $\text{HNO}_3$  dd;
- $\text{NaOH}$  30%.
- Nước cất.

### 1.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Tủ hút;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet); găng tay cao su; khẩu trang.

### 1.2.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 3 ống nghiệm theo thứ tự:
  - + Ống 1: 1ml Phenol 0,1%;
  - + Ống 2: 1ml Gelatin 1%;
  - + Ống 3: 1ml Albumin 1%;
- Thêm từ từ theo thành ống nghiệm, mỗi ống 10 giọt  $\text{HNO}_3$  dd;
- Đun sôi trên đèn cồn trong khoảng 1 phút, nếu thấy ống nghiệm nào xuất hiện màu vàng rơm thì giữ lại làm nguội để tiếp tục làm thí nghiệm với ống này. Còn ống nào không xuất hiện màu vàng rơm thì loại ra, dừng thí nghiệm với ống đó;

- Sau khi làm nguội ống được chọn, cẩn thận nhỏ từ từ theo thành ống nghiệm từng giọt NaOH 30% cho đến khi từ màu vàng chuyển sang màu vàng da cam. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả.

### 1.2.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

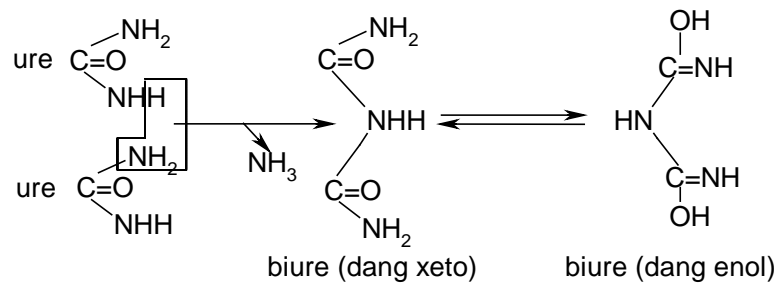
## 1.3. Phản ứng Biure phản ứng đặc trưng cho liên kết peptid

### 1.3.1. Sơ lược về lý thuyết

Trong môi trường kiềm, các chất có chứa từ hai liên kết  $-CO-NH-$  trở lên phản ứng với ion  $Cu^{2+}$ , tạo thành phức chất có màu xanh. Phân tử chứa rất nhiều liên kết peptid  $-CO-NH-$  cũng tạo thành phức chất màu xanh với ion  $Cu^{2+}$  trong môi trường kiềm, tương tự như phản ứng của protein. Người ta gọi phản ứng này là phản ứng Biure vì biure có chứa liên kết  $-CO-NH-$ . Cơ chế của phản ứng này được biểu diễn qua 2 giai đoạn:

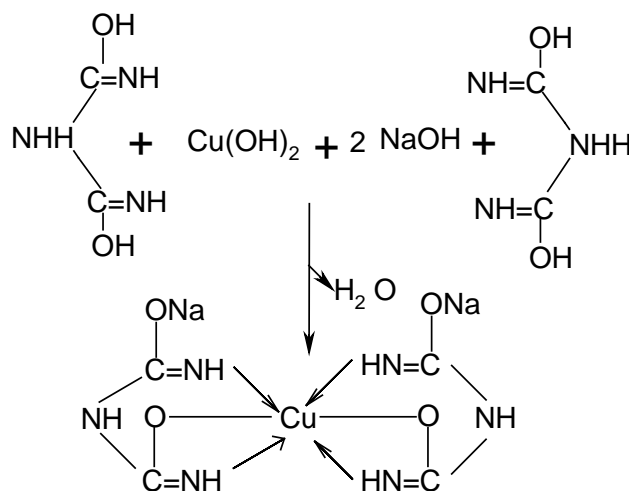
+ *Phản ứng thứ nhất*: là phản ứng tạo Biure.

Biure được tạo thành từ ure trong điều kiện nhiệt độ cao.

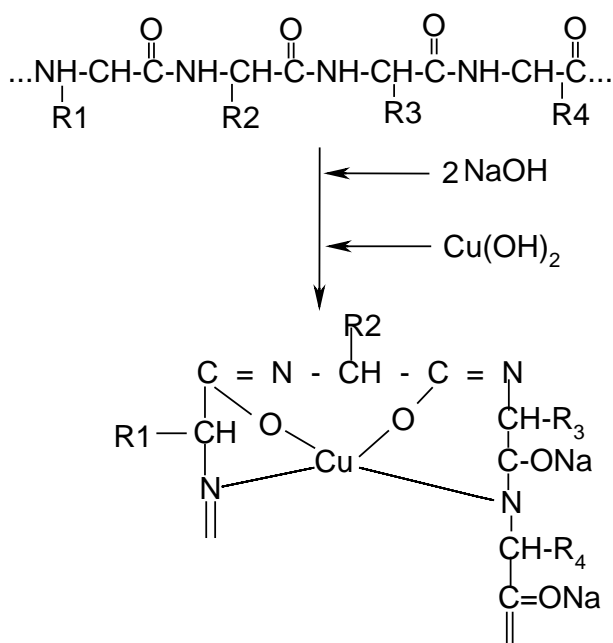


+ *Phản ứng thứ hai*: là tạo phức màu với  $Cu^{2+}$  và  $Na^+$ .

Hai phân tử Biure liên kết với một ion  $Cu^{2+}$  và hai  $Na^+$  để tạo thành phức hợp có màu theo phản ứng sau:



Trong môi trường kiềm mạnh, protein phản ứng với  $CuSO_4$  tạo thành phức chất có màu (tím, tím xanh hoặc tím đỏ).



Cường độ màu của phức hợp phụ thuộc vào độ dài của mạch peptid (số lượng liên kết peptid) có trong dung dịch.

Chính vì cường độ màu phụ thuộc vào mạch polypeptid dài hay ngắn, cho nên phản ứng biure được sử dụng để định lượng protein bằng phương pháp so màu.

### 1.3.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Albumin 1%;
- Gelatin 1%;
- Ure tinh thể;
- NaOH 10%;
- CuSO<sub>4</sub> 1%.
- Nước cất.

### 1.3.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 1.3.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 3 ống nghiệm:
  - + *Ống 1*: một ít urê tinh thể, đun nóng chảy trên ngọn lửa đèn cồn. Lúc đầu, urê nóng chảy. Sau đó cứng lại được Biurê, để nguội;
  - + *Ống 2*: 1ml Albumin 1%;
  - + *Ống 3*: 1ml Gelatin 1%;
  - Thêm vào mỗi ống 1ml NaOH 10% và vài giọt CuSO<sub>4</sub> 1%. (không nên cho quá nhiều CuSO<sub>4</sub> vì màu xanh của Cu(OH)<sub>2</sub> có thể lấn át màu của phản ứng Biurê);

- Lắc đều, quan sát, so sánh và ghi lại kết quả.

### **1.3.5. Kết quả và nhận xét**

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## **2. Tính kết tủa của acid amin và protein**

### **2.1. Kết tủa bằng dung môi hữu cơ**

#### **2.1.1. Sơ lược về lý thuyết**

Dung môi hữu cơ (cồn, aceton, ether,...) có thể làm kết tủa protein. Quá trình này xảy ra nhanh chóng, trong môi trường trung tính hoặc acid yếu với sự có mặt của các chất điện li (NaCl).

#### **2.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất**

- Lòng trắng trứng gà nguyên chất;
- NaCl (dạng bột);
- Cồn 96%;
- Aceton;
- Nước cất.

#### **2.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ**

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Tủ hút;
- Ống nghiệm có nút đậy;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### **2.1.4. Các bước tiến hành**

- Cho vào ống nghiệm 1ml lòng trắng trứng nguyên chất và một ít bột NaCl. Khuấy từ từ cho đến tan;
- Tiếp tục thêm vào 2ml cồn 96% (hoặc aceton), đậy nút, lắc đều tay khoảng 3 phút được kết tủa protein;
- Sau đó, gạn bỏ dịch trong, lấy kết tủa;
- Thêm vào ống nghiệm khoảng 2ml nước cất để làm giảm nồng độ cồn trong dung dịch và hoà tan hoàn toàn kết tủa protein;
- Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

\* Phản ứng này thường được sử dụng trong tách chiết protein khỏi các nguồn nguyên liệu sinh vật.

#### **2.1.5. Kết quả và nhận xét**

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### **2.2. Kết tủa bằng muối kim loại nặng**

#### **2.2.1. Sơ lược về lý thuyết**

Dưới tác dụng của các ion kim loại nặng ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , ...) protein bị kết tủa. Nhưng khi môi trường phản ứng thừa muối kim loại nặng, kết tủa protein có thể bị tan ra nhưng biến tính hoàn toàn.

#### **2.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất**

- Lòng trắng trứng nguyên chất;
- $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  5%;
- $\text{CuSO}_4$  5%;
- $\text{FeCl}_3$  5% ;
- Nước cất.

#### 2.2.3. *Trang thiết bị, dụng cụ*

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- *Các dụng cụ khác như:* Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### 2.2.4. *Các bước tiến hành*

- Lấy 3 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml lòng trắng trứng nguyên chất. Thêm vào ống 1 từng giọt  $\text{CuSO}_4$  5%. Quan sát sự tạo thành kết tủa. Sau đó cho thêm từng giọt  $\text{CuSO}_4$  5% và theo dõi protein này có tan trở lại hay không;

- Lặp lại thí nghiệm ở ống 2 với  $\text{FeCl}_3$  5% ;
- Lặp lại thí nghiệm ở ống 3 với  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  5%;
- Quan sát hiện tượng, so sánh và ghi kết quả thí nghiệm.

#### 2.2.5. *Kết quả và nhận xét*

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## Bài 2

### ENZYME

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc xác định phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột bằng enzyme; nguyên tắc xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme;

- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần thí nghiệm và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;

- Trình bày được các bước tiến hành xác định phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột bằng enzyme; các bước tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme;

- Tiến hành được các thao tác xác định phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột bằng enzyme; thao tác xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ của enzyme theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;

- Giải thích hiện tượng, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;

- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;

- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;

- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

\* **Nội dung bài thực hành:**

#### 1. Phản ứng thủy phân tinh bột, saccharose bằng enzyme

##### 1.1. Phản ứng thủy phân tinh bột bằng amylase

###### 1.1.1. Sơ lược về lý thuyết

Amylase là nhóm enzyme thủy phân rất phổ biến ở động vật, thực vật và vi sinh vật. Chức năng của amylase là xúc tác phản ứng thủy phân tinh bột thành  $\alpha$ -D-glucose. Có nhiều loại amylase tham gia thủy phân tinh bột với các mức độ khác nhau như  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase, amylo 1,6-glucozitarase.

Ở người, amylase có nhiều ở tuyến nước bọt. Trong thành phần nước bọt hàm lượng amylase rất cao, cho nên nước bọt làm nhiệm vụ thủy phân tinh bột thành đường một phần ngay khi còn ở khoang miệng.

Dưới tác dụng của enzyme amylase hoặc đun nóng với acid vô cơ thì tinh bột bị thủy phân. Sự phân giải tinh bột qua các sản phẩm trung gian: tinh bột  $\rightarrow$  dextrin  $\rightarrow$  maltose  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-glucose.

###### 1.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Dung dịch tinh bột 1%;

- Dung dịch HCl 10%;

- Dung dịch Fehling A và B;
- Thuốc thử Liugol;
- Nước bột pha loãng 10 lần trong nước;
- Malt đại mạch;
- Nước cất.

#### 1.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ ẩm;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### 1.1.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 4 ống nghiệm:
  - + Ống 1: 2ml tinh bột 1% + 1ml nước bột pha loãng 10 lần;
  - + Ống 2: 2ml tinh bột 1% + 1ml HCl 10%;
  - + Ống 3: 2ml tinh bột 1% + 1ml nước cất;
  - + Ống 4: 3ml tinh bột 1% + 1lít malt đại mạch;
- Cho cả 4 ống vào tủ ẩm ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C trong 10 phút;
- Sau thời gian trên, làm nguội 4 ống bằng nước lạnh; lọc malt ở ống 4 rồi chia hỗn hợp của từng ống thành 2 phần:
  - + Phần 1: thực hiện phản ứng với thuốc thử Liugol;
  - + Phần 2: thực hiện phản ứng với thuốc thử Fehling;
- Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả.

#### 1.1.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### 1.2. Phản ứng thủy phân saccharose bằng nấm men bánh mì

#### 1.2.1. Sơ lược về lý thuyết

Trong nấm men chứa nhiều enzyme saccharase. Đây là enzyme thủy phân làm nhiệm vụ xúc tác phản ứng thủy phân saccharose thành 2 phân tử đường đơn là  $\alpha$ -D-glucose và  $\beta$ -D-fructose.

#### 1.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Men bánh mì;
- Saccharose 2%;
- Thuốc thử Fehling;
- Nước cất.

#### 1.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Cốc thủy tinh 50ml;
- Bình tam giác 100ml;
- Đèn cồn;

- Giấy lọc;
- *Các dụng cụ khác như:* Phễu thủy tinh; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Đũa thủy tinh; Giá đựng (ống nghiệm, đũa thủy tinh, pipet).

#### 1.2.4. Các bước tiến hành

- Cân 2g men bánh mì cho vào cối giã nhuyễn với 1ml nước cất. Chia dịch men làm 3 phần, cho vào 3 ống nghiệm. Sau đó làm tiếp như sau:
  - + *Ống 1:* đun sôi trên đèn cồn, để nguội + 4ml Saccharose 2%, lắc đều;
  - + *Ống 2:* không đun sôi + 4ml Saccharose 2%, lắc đều;
  - + *Ống 3:* không đun sôi + 4ml Nước cất, lắc đều;
- Sau đó, để yên các ống nghiệm trên ở nhiệt độ thường trong thời gian 10 phút;
- Sau thời gian trên, lấy các ống nghiệm ra, tiến hành lọc;
- Hút 1ml dịch sau khi lọc ở ống 1 + 1ml thuốc thử Fehling, tiến hành đun trên ngọn lửa đèn cồn. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm;
- Làm tương tự như vậy với dịch sau khi lọc ở ống 2 và ống 3. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

#### 1.2.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 2. Sự ảnh hưởng của một số yếu tố đến hoạt độ của amylase

### 2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

#### 2.1.1. Sơ lược về lý thuyết

Bản chất hóa học của enzyme là protein mà protein rất nhạy cảm với nhiệt độ nên nhiệt độ có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính enzyme. Phần lớn enzyme có hoạt tính cao ở nhiệt độ khoảng  $40^{\circ}\text{C} \div 60^{\circ}\text{C}$ . Nếu nhiệt độ quá thấp, hoạt tính của enzyme giảm, khi nhiệt độ quá cao làm biến tính protein-enzyme nên cũng làm cho enzyme mất hoạt tính.

#### 2.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Dung dịch tinh bột 1%;
- Nước bọt pha loãng 10 lần trong nước;
- Thuốc thử Liugol (Hoặc Iod 0,3 %);
- Nước cất.

#### 2.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Tủ âm;
- Tủ lạnh;
- Nồi cách thủy;
- Ống nghiệm;

- *Các dụng cụ khác như:* Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### 2.1.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 2ml tinh bột 1%; Sau đó tiến hành cho:

+ *Ống 1*: vào nồi cách thủy đang sôi ( $t^0 = 100^0\text{C}$ );

+ *Ống 2*: vào tủ ấm ở  $37\div 39^0\text{C}$ ;

- Đặt ngay các ống nghiệm tại vị trí đó trong thời gian 15 phút;

- Sau thời gian trên, giữ nguyên vị trí, cho vào mỗi ống nghiệm 1ml nước bọt pha loãng 10 lần và tiếp tục theo dõi thêm 15 phút nữa;

- Sau thời gian này, đem các ống ra để nguội rồi dùng thuốc thử Liugol để kiểm tra ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ amylase;

- Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

#### 2.1.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### 2.2. Ảnh hưởng của chất hoạt hóa và chất kìm hãm

#### 2.2.1. Sơ lược về lý thuyết

Chất hoạt hóa là những chất có tác dụng làm cho enzyme từ trạng thái không hoạt động trở thành hoạt động hoặc từ hoạt động yếu trở thành hoạt động mạnh hơn. Ngược lại, chất kìm hãm là những chất khi kết hợp với enzyme sẽ làm giảm hoạt động xúc tác của enzyme, cụ thể làm cho enzyme từ trạng thái hoạt động mạnh trở nên hoạt động yếu hoặc vô hoạt enzyme.

Các kim loại có ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme. Có những kim loại có tác dụng kích thích làm tăng hoạt tính của enzyme. Ngược lại, cũng có những kim loại làm giảm hoạt tính hay ức chế hoàn toàn hoạt tính của enzyme.

#### 2.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- NaCl 1%;

-  $\text{CuSO}_4$  1%;

- Nước bọt pha loãng 10 lần trong nước;

- Tinh bột 1%;

- Thuốc thử Liugol;

- Nước cất.

#### 2.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;

- Tủ sấy;

- Tủ ấm;

- Ống nghiệm;

- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### 2.2.4. Các bước tiến hành

- Lấy 3 ống nghiệm cho vào mỗi ống nghiệm 2ml dung dịch nước bọt pha loãng và dung dịch muối kim loại theo thứ tự:

+ *Ống 1*: 1ml dung dịch NaCl 1%;

+ *Ống 2*: 1ml dung dịch  $\text{CuSO}_4$  1%;

+ *Ống 3*: 1ml dung dịch nước cất;

- Sau khi lắc đều, cho tiếp vào mỗi ống nghiệm trên 1ml dung dịch tinh bột 1%;
- Đặt các ống nghiệm đó vào tủ ấm ở 37<sup>0</sup>C trong 15 phút;
- Sau thời gian trên, lấy các ống nghiệm ra để nguội và nhỏ 3÷5 giọt thuốc thử Liugol;
- Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

#### 2.2.5. *Kết quả và nhận xét*

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### Bài 3

## ĐỊNH TÍNH GLUCID

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc xác định các phản ứng màu dùng để nhận biết đường khử, tinh bột, phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột;
- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần thí nghiệm và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;
- Trình bày được các bước tiến hành xác định các phản ứng màu dùng để nhận biết đường khử, tinh bột, phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột;
- Tiến hành được các thao tác xác định các phản ứng màu dùng để nhận biết đường khử, tinh bột, phản ứng thủy phân saccharose và tinh bột theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Giải thích hiện tượng, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;
- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;
- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;
- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

\* **Nội dung bài thực hành:**

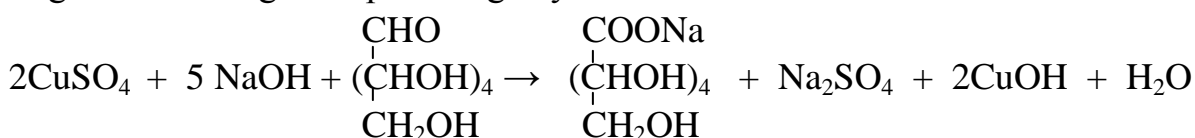
### 1. Các phản ứng khử đặc trưng cho các monosaccharid và disaccharid

#### 1.1. Phản ứng Trommer

##### 1.1.1. Sơ lược về lý thuyết

Một tính chất quan trọng của các phân tử glucid là tính khử do trong cấu trúc phân tử của chúng có chứa nhóm ceto (C=O) hay aldehyd (CHO) (ở cấu tạo mạch thẳng) hay nhóm OH-glucozid (ở cấu tạo mạch vòng).

Các phân tử glucid có tính khử có khả năng khử  $\text{Cu}^{2+}$  thành  $\text{Cu}^+$  tạo kết tủa màu đỏ gạch. Dựa vào phản ứng khử đó để xác định khả năng khử của các phân tử glucid. Phương trình phản ứng xảy ra như sau:



Sau đó,  $2\text{CuOH}$  chuyển thành  $\text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$

Như vậy, monosaccharid đã khử  $\text{Cu}^{2+}$  trong dung dịch  $\text{CuSO}_4$  thành  $\text{Cu}^+$  trong  $\text{CuOH}$  và  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

##### 1.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Glucose 1%;
- $\text{CuSO}_4$  5%;

- NaOH 10%;
- Nước cất.

### 1.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 1.1.4. Các bước tiến hành

- Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch glucose 1%;
- Tiếp đó, cho vào ống nghiệm đó 1ml dung dịch NaOH 10%, thêm vào từng giọt  $\text{CuSO}_4$  5% cho đến khi thấy xuất hiện các hạt kết tủa màu xanh (tức là lúc thừa  $\text{CuSO}_4$ );
- Đun từ từ ống nghiệm trên cho đến khi sôi. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm;
- Sau đó để nguội, quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

\* **Lưu ý:** Dung dịch  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  có màu xanh; dung dịch  $\text{CuOH}$  có màu vàng, kết tủa  $\text{Cu}_2\text{O}$  màu đỏ gạch.

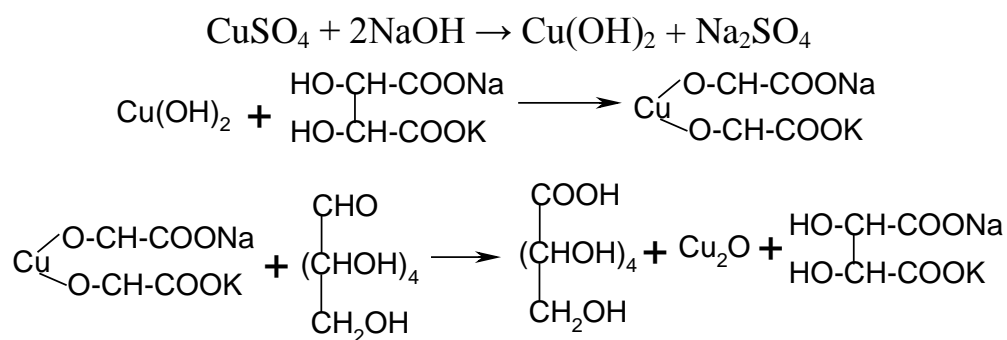
### 1.1.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 1.2. Phản ứng Fehling (phản ứng Trommer cải tiến)

### 1.2.1. Sơ lược về lý thuyết

Ngoài phản ứng Trommer, người ta còn sử dụng phản ứng Fehling để xác định tính khử của glucid và dùng trong định lượng các dạng đường khử. Thuốc thử Fehling là hỗn hợp  $\text{CuSO}_4$ , NaOH và muối Seignat.



\* **Chú ý:** Phản ứng Fehling ưu thế hơn phản ứng Tromer vì khi cho thừa thuốc thử Fehling không tạo thành  $\text{CuO}$ . Đây là cơ sở của phương pháp định lượng đường khử Bertrand.

### 1.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Glucose 1%;
- Maltose 1%;
- Saccharose 1%;

- Lactose 1%;
- Thuốc thử Fehling;
- Nước cất.

### 1.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 1.2.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào 4 ống nghiệm:

- |                            |                          |
|----------------------------|--------------------------|
| + Ống 1: 1ml Glucose 1%    | + 1ml thuốc thử Fehling; |
| + Ống 2: 1ml Maltose 1%    | + 1ml thuốc thử Fehling; |
| + Ống 3: 1ml Saccharose 1% | + 1ml thuốc thử Fehling; |
| + Ống 4: 1ml Lactose 1%    | + 1ml thuốc thử Fehling; |

- Sau đó, đem 4 ống nghiệm trên đun sôi trên ngọn lửa đèn cồn trong 2÷3 phút. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

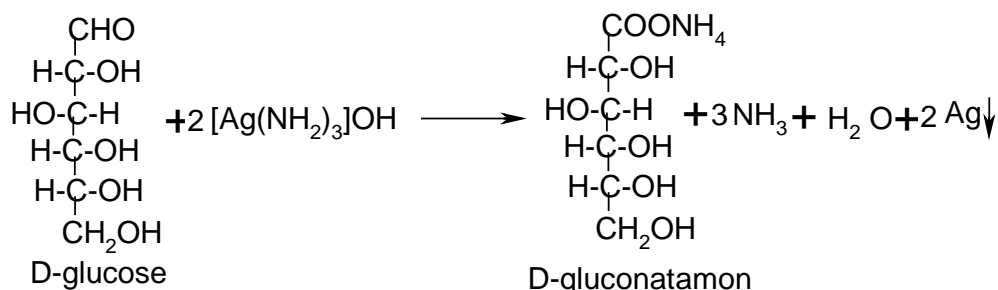
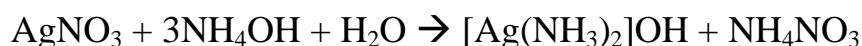
### 1.2.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 1.3. Phản ứng tráng gương

### 1.3.1. Sơ lược về lý thuyết

Các monosaccharid và các disaccharid có tính khử có khả năng khử các ion kim loại từ hóa trị cao xuống hóa trị thấp, thậm chí khử xuống giá trị không, giải phóng ra kim loại nguyên chất (còn gọi là phản ứng tráng gương). Trong phản ứng tráng gương, ion  $Ag^+$  bị khử thành  $Ag^0$  tức là giải phóng bạc kim loại. Phản ứng như sau:



### 1.3.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Glucose 5%;
- $AgNO_3$  5%;
- $NH_3$  dd;
- Nước cất.

### 1.3.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;

- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### 1.3.4. Các bước tiến hành

- Cho vào ống nghiệm 1ml  $\text{AgNO}_3$  5% và từng giọt  $\text{NH}_3$  đậm đặc để tạo thành kết tủa;
- Sau đó, thêm từ từ  $\text{NH}_3$  đậm đặc cho đến khi kết tủa tan hoàn toàn (không cho thừa  $\text{NH}_3$  đậm đặc);
- Tiếp tục, cho 3ml glucose 5% vào ống nghiệm trên rồi tiến hành đun sôi ống nghiệm đó trên ngọn lửa đèn cồn trong 5 phút. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

#### 1.3.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 2. Phản ứng màu của tinh bột với Iod

### 2.1. Sơ lược về lý thuyết

Tinh bột là polysacchride bao gồm amylose và amylopectin. Amylose là chuỗi mạch thẳng của các phân tử  $\alpha$ -D-glucose liên kết với nhau bằng liên kết  $\alpha(1-4)$  glucozid. Chuỗi mạch thẳng này cuộn lại thành hình xoắn lò xo nên có khả năng hấp thụ các phân tử của các chất khác vào trong lòng của vòng xoắn để tạo nên các dạng phức đặc biệt. Khi phân tử tinh bột hấp thụ vào vòng xoắn của amylose, phân tử Iod sẽ tạo nên phức chất có màu xanh đen đặc trưng. Đây là phản ứng đặc trưng của tinh bột người ta thường dùng để phát hiện sự có mặt của tinh bột trong các đối tượng nghiên cứu.

Phản ứng màu với Iod của tinh bột chỉ xảy ra khi tinh bột còn giữ cấu trúc bình thường. Khi gặp nhiệt độ cao, chuỗi xoắn của amylose duỗi thẳng ra không có khả năng hấp thụ Iod được nên không tạo ra phức màu xanh đen đặc trưng khi cho tác dụng với Iod.

### 2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Tinh bột 1%;
- Thuốc thử Liugol;
- Nước cất.

### 2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Đèn cồn;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 2.4. Các bước tiến hành

- Cho vào ống nghiệm 1ml tinh bột 1% và thêm vào đó vài giọt dung dịch Liugol;

- Sau đó, đem đun sôi dung dịch trong ống nghiệm, quan sát sự mất màu của dung dịch;

- Để nguội, quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

## **2.5. Kết quả và nhận xét**

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## **3. Phản ứng thủy phân polysaccharid bằng acid**

### **3.1. Phản ứng thủy phân saccharose bằng HCl đậm đặc**

#### **3.1.1. Sơ lược về lý thuyết**

Khi thủy phân dung dịch saccharose bằng acid đậm đặc ta được hỗn hợp của hai đường khử là  $\alpha$ -D-glucose và  $\beta$ -D-fructose.

#### **3.1.2. Nguyên liệu, Hóa chất**

- Saccharose 5%;
- HCl<sub>đđ</sub>;
- NaOH 10%;
- Thuốc thử Fehling;
- Nước cất.

#### **3.1.3. Trang thiết bị, dụng cụ**

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Tủ hút;
- Bếp cách thủy;
- Ống nghiệm;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

#### **3.1.4. Các bước tiến hành**

- Cho vào ống nghiệm 2ml Saccharose 5% và 3 giọt HCl<sub>đđ</sub>;
- Đặt ống vào nồi cách thủy, đun trong 15 phút;
- Sau thời gian trên đem ra để nguội;
- Tiếp đó, cho vào ống 3 giọt NaOH 10% để trung hòa dịch thủy phân;
- Hút 2ml thuốc thử Fehling cho vào dung dịch trên rồi đem đun trên ngọn lửa đèn cồn khoảng 3 phút. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

#### **3.1.5. Kết quả và nhận xét**

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### **3.2. Phản ứng thủy phân tinh bột bằng HCl đậm đặc**

#### **3.2.1. Sơ lược về lý thuyết**

Dưới tác dụng của acid đậm đặc hoặc enzyme amylase, tinh bột bị thủy phân thành các sản phẩm trung gian như các dextrin, maltose và sản phẩm cuối cùng là  $\alpha$ -D-glucose. Các sản phẩm trung gian dextrin có màu với iod (amylo-dextrin cho màu tím, eritro-dextrin cho màu đỏ nâu). Maltose và glucose không có phản ứng màu với iốt nhưng có tính khử mạnh. Quá trình thủy phân tinh bột xảy ra ở những điều kiện xác định để tạo thành những sản phẩm tương ứng khác nhau.

Dựa vào phản ứng màu và phản ứng khử để xác định mức độ thủy phân của tinh bột.

### 3.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Tinh bột 1%;
- HCl<sub>đđ</sub>;
- NaOH 10%;
- Thuốc thử Liugol;
- Thuốc thử Fehling;
- Nước cất.

### 3.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm;
- Tủ hút;
- Bếp cách thủy;
- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet).

### 3.2.4. Các bước tiến hành

- Lấy 4 ống nghiệm, đánh số thứ tự từ 1 đến 4, cho vào mỗi ống 1 ml nước cất và 2 giọt thuốc thử Liugol, lắc đều;
- Lấy 1 ống nghiệm khác (ống A), cho vào 3ml tinh bột 1% và 5 giọt HCl đậm đặc, lắc đều.
  - Lấy 2 đến 3 giọt từ ống A cho vào ống 1 lắc đều;
  - Sau đó, đem đun ống A trên nồi cách thủy sôi:
    - + Sau 3 phút, lấy 2 đến 3 giọt dung dịch thủy phân trong ống A cho vào ống thứ 2. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm;
    - + Sau 5 phút nữa, lấy 2 đến 3 giọt thủy phân khác từ ống A cho vào ống thứ 3. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm;
    - + Sau 10 phút nữa, lấy 2 đến 3 giọt thủy phân khác từ ống A cho vào ống thứ 4. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm;
  - Lấy ống nghiệm A ra khỏi nồi cách thủy, để nguội. Cho vào đó 5 giọt NaOH 5% để trung hòa dịch thủy phân;
  - Sau đó, cho 1 lượng thuốc thử Fehling tương đương với lượng dịch thủy phân có trong ống nghiệm, đun sôi trong 3 phút. Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả thí nghiệm.

### 3.2.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích hiện tượng, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## Bài 4

# ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG KHỬ THEO PHƯƠNG PHÁP VI LƯỢNG CỦA RODZEVICH

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc định lượng đường khử theo phương pháp vi lượng của Rodzevich;
- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần đem phân tích và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;
- Trình bày được các bước tiến hành định lượng đường khử theo phương pháp vi lượng của Rodzevich;
- Tiến hành được các thao tác định lượng đường khử theo phương pháp vi lượng của Rodzevich theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Tổng hợp, xử lý, tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;
- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;
- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;
- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

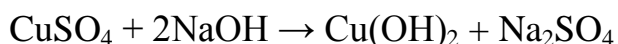
\* **Nội dung bài thực hành:**

### 1. Sơ lược về lý thuyết

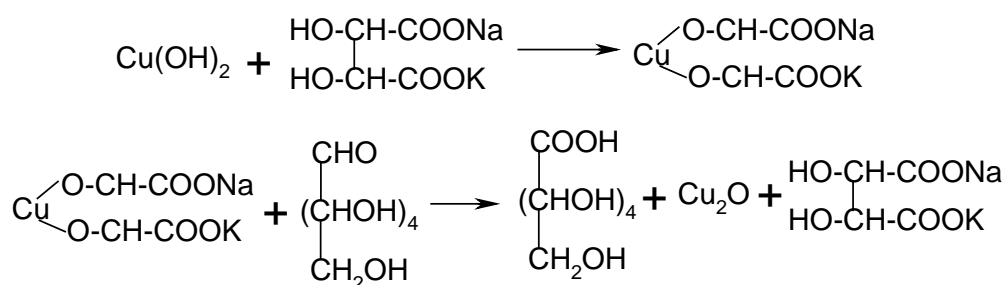
Phương pháp này dựa trên cơ sở trong môi trường kiềm các đường khử có thể khử dễ dàng đồng (II) oxide (CuO) thành đồng (I) oxide (Cu<sub>2</sub>O) dưới dạng kết tủa màu đỏ gạch và qua lượng CuSO<sub>4</sub> dư (không tham gia phản ứng) tính được lượng đường khử. Cơ chế của quá trình này xảy ra theo các giai đoạn sau:

Khi trộn hai dung dịch Fehling A (Fehling I) và Fehling B (Fehling II) với nhau sẽ xảy ra phản ứng giữa chúng theo hai giai đoạn:

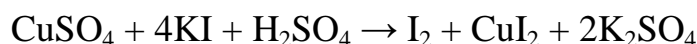
+ Đầu tiên tạo thành kết tủa Cu(OH)<sub>2</sub> có màu xanh da trời:



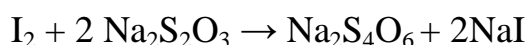
Sau đó, Cu(OH)<sub>2</sub> tác dụng với muối Seignet thành muối hòa tan có dung dịch màu xanh thẫm. Muối này là hợp chất không bền nên các đường khử có nhóm aldehyd hoặc ceton dễ dàng khử đồng (II) oxide (CuO) thành đồng (I) oxide (Cu<sub>2</sub>O) có màu đỏ gạch, bản thân đường bị oxy hóa khi tác dụng với dung dịch Fehling. Phương trình phản ứng xảy ra như sau:



Lượng  $\text{CuSO}_4$  dư (không tham gia phản ứng) cho tác dụng với KI trong môi trường  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sẽ giải phóng ra Iod tự do.



Chuẩn độ lượng Iod tạo thành bằng Natri thiosulphat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) chuẩn, qua đó tính được lượng đường khử có trong dung dịch.



## 2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Quả chín ngọt (Chuối, hồng xiêm, nho, xoài, táo,...);
- Dung dịch Fehling;
- Dung dịch KI 30%;
- Dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25%;
- Dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N;
- Tinh bột 0,5%;
- Vaseline;
- Nước cất.

## 3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Buret loại 25ml;
- Bình định mức loại 100ml, 1000ml;
- Cối chày sứ;
- Cốc thủy tinh loại 50ml, 100ml;
- Bình tam giác 50ml;
- Giấy lọc;
- Các dụng cụ khác như: Dao, Đũa thủy tinh; Phễu thủy tinh; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet 5ml, 10ml; Giá đựng (buret, ống nghiệm, pipet, đĩa thủy tinh, phễu,...)

## 4. Các bước tiến hành

### 4.1. Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm

- Cho vào cối sứ 2g nguyên liệu, thêm vào đó một vài giọt nước cất nghiền kỹ thành dạng chất đồng thể;
- Sau đó, cho thêm 20ml nước cất vào cối sứ, tiếp tục nghiền, để lắng, chiết lấy phần nước trong sang cốc;
- Lặp lại như vậy khoảng 2 đến 3 lần, kết thúc quá trình chiết rút;

- Dùng 10ml nước cất tráng lại cối chày sứ có chứa cả bã cho vào cốc đựng dịch chiết ở trên;

- Chuyển toàn bộ dịch chiết từ cốc sang bình định mức ( $V = 100\text{ml}$ ), tráng cốc lần nữa bằng ít nước cất rồi chuyển dịch tráng cốc cho vào bình định mức, dùng nước cất dẫn đến định mức của bình;

- Sau đó, tiến hành lọc dịch chiết qua phễu lọc có giấy lọc hoặc bông thu được dịch chiết trong để xác định lượng đường khử trong dung dịch.

#### 4.2. Tiến hành thí nghiệm

- Cho vào 2 bình tam giác 50ml gồm:

+ *Bình 1* (mẫu cần phân tích): 1ml dung dịch đường + 2ml nước cất + 1ml Fehling A + 1ml Fehling B;

+ *Bình 2* (mẫu đối chứng (thay dịch đường bằng nước cất)): 3ml nước cất + 1ml Fehling A + 1ml Fehling B;

- Đun sôi 2 bình trên trong 2 phút (kể từ lúc xuất hiện bọt sôi đầu tiên). Sau khi đun sôi, dung dịch vẫn còn màu xanh đặc trưng và ở dưới có một lớp kết tủa  $\text{Cu}_2\text{O}$  màu đỏ gạch là được. Nếu dung dịch mất màu hoàn toàn chứng tỏ lượng dung dịch Fehling cho vào không đủ để oxy hóa hoàn toàn lượng đường có trong dung dịch mẫu thí nghiệm. Trường hợp đó phải làm lại thí nghiệm với lượng dung dịch đường ít hơn hoặc pha loãng dung dịch đường. Ngược lại, nếu không có lớp kết tủa  $\text{Cu}_2\text{O}$  màu đỏ gạch thì phải tăng lượng dung dịch đường, giảm nước cất (luôn đảm bảo thể tích là 5ml);

- Tiếp theo, làm nguội bình trên rồi cho thêm vào hỗn hợp 1ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25% và 1ml KI 30%, lắc đều và giữ trong bóng tối trong 20 phút;

- Sau đó, cho vào bình trên vài giọt hồ tinh bột 0,5%, lắc đều;

- Tiến hành chuẩn độ  $\text{I}_2$  tạo thành bằng  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N đến khi dung dịch mất màu xanh. Ghi lại kết quả chuẩn độ;

- Lặp lại thí nghiệm chuẩn độ như trên thêm 2 lần nữa để lấy giá trị trung bình nhằm tăng tính chính xác của kết quả thí nghiệm;

#### 5. Kết quả và nhận xét

Từ kết quả chuẩn độ, ta xác định được hàm lượng đường khử có trong nguyên liệu dựa vào công thức sau:

$$X = \frac{(a - b) \times f \times 3,3 \times V \times 100}{w \times V_1}$$

Trong đó:

X: Hàm lượng đường khử có trong nguyên liệu (%)

a: Số ml dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N dùng để chuẩn độ mẫu đối chứng (lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)

b: Số ml dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N dùng để chuẩn độ mẫu đem phân tích (lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)

f: Hệ số hiệu chỉnh nồng độ của dung dịch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1N  
3,3: Hệ số chuyển thành đường  
V: Tổng thể tích dịch chiết, (ml)  
 $V_1$ : Thể tích dịch chiết lấy thí nghiệm, (ml)  
w : Khối lượng nguyên liệu, (g)  
100: Hệ số chuyển thành phần trăm.  
*\* Tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được.*

## Bài 5

# ĐỊNH TÍNH LIPID

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc xác định khả năng hòa tan, phản ứng thủy phân, sản phẩm thủy phân của lipid và nguyên tắc xác định chỉ số acid, chỉ số iod của chất béo;

- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần đem phân tích và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;

- Trình bày được các bước tiến hành xác định khả năng hòa tan, phản ứng thủy phân, sản phẩm thủy phân của lipid và xác định chỉ số acid, chỉ số iod của chất béo;

- Tiến hành được các thao tác xác định khả năng hòa tan, phản ứng thủy phân, sản phẩm thủy phân của lipid và xác định chỉ số acid, chỉ số iod của chất béo theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;

- Tổng hợp, xử lý, tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;

- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;

- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;

- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

\* **Nội dung bài thực hành:**

### 1. Khả năng hòa tan của lipid

#### 1.1. Sơ lược về lý thuyết

Lipid nói chung, chất béo nói riêng không tan trong nước nhưng tan trong các dung môi hữu cơ. Mức độ hòa tan của lipid sẽ khác nhau phụ thuộc vào bản chất của dung môi. Do vậy, tiến hành thí nghiệm thực hiện phản ứng xác định khả năng hòa tan của lipid với các loại dung môi khác nhau để từ đó xác định được loại dung môi hòa tan tốt lipid.

#### 1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Dầu thực vật;

- Dung môi: Cồn 96<sup>0</sup>, Aceton, Ether ethylic, Nước cất.

#### 1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;

- Tủ sấy;

- Ống nghiệm có nút đậy;

- Các dụng cụ khác như: Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml; Giá đựng ống nghiệm và pipet; khẩu trang.



- Đũa thủy tinh;
- Nồi cách thủy.

#### 2.1.4. Các bước tiến hành

- Cho vào bình tam giác 1ml dầu thực vật (mỡ động vật) và 10ml KOH 30% trong cồn;
- Đun trong nồi cách thủy trong 1 giờ, khuấy đều được dung dịch quánh;
- Thêm vào đó 20ml nước cất, lắc đều được xà phòng kali (có bọt xà phòng).

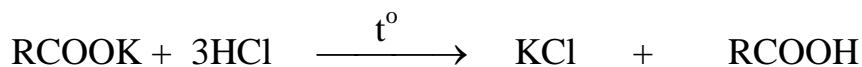
#### 2.1.5. Kết quả và nhận xét

Giải thích, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

### 3. Phản ứng phát hiện acid béo của lipid

#### 3.1. Sơ lược về lý thuyết

Dựa vào phản ứng giữa dung dịch xà phòng tác dụng với acid đậm đặc tạo thành acid béo tự do và muối tương ứng. Từ đó, phát hiện được acid béo của lipid và tiến hành kiểm tra acid béo tự do vừa hình thành. Phản ứng xảy ra như sau:



#### 3.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Dung dịch xà phòng Kali;
- Ether ethylic;
- NaOH 0,01%;
- HCl đậm đặc;
- Phenolphtalein 1% trong cồn 96%V;
- Nước cất.

#### 3.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Ống nghiệm có nút đậy;
- Các dụng cụ khác như: Cốc thủy tinh loại 50ml; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 10ml; Giá đựng ống nghiệm và pipet.

#### 3.4. Các bước tiến hành

- Cho vào ống nghiệm 3ml dung dịch xà phòng Kali và 1ml HCl đậm đặc, lắc đều được acid béo nổi lên trên bề mặt dung dịch;
- Chuyển acid béo sang ống nghiệm khác. Thêm vào đó 1ml ether ethylic, đậy nút lại, lắc đều đến khi tan hoàn toàn acid béo;
- Chia dung dịch acid béo tan trong ether ethylic trên làm 2 phần bằng nhau:
  - + Cho vào phần thứ nhất 1 giọt phenolphtalein, lắc đều, sau đó cho từ từ từng giọt NaOH 0,01% cho đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng thẫm;
  - + Sau đó, cho phần thứ hai vào phần thứ nhất;
  - Quan sát hiện tượng và ghi lại kết quả.

### 3.5. *Kết quả và nhận xét*

Giải thích, nhận xét, đánh giá kết quả thu được.

## 4. **Xác định một số chỉ số của lipid**

### 4.1. *Xác định chỉ số acid*

#### 4.1.1. *Sơ lược về lý thuyết*

Chỉ số acid là số mg KOH cần thiết để trung hòa lượng acid béo tự do có trong 1gam chất béo.

#### 4.1.2. *Nguyên liệu, Hóa chất*

- Dầu thực vật;
- Cồn 96%V;
- Dung dịch phenolphthalein 1% trong cồn 96%V;
- Dung dịch KOH 0,1N;
- Vaseline;
- Nước cất.

#### 4.1.3. *Trang thiết bị, dụng cụ*

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Bình tam giác 250ml có nút đậy;
- Buret loại 25ml;
- Bình định mức 1000ml;
- *Các dụng cụ khác như:* Cốc thủy tinh loại 50ml; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 10ml; Giá đựng pipet; Phễu thủy tinh.

#### 4.1.4. *Các bước tiến hành*

- Cho vào bình tam giác 1g dầu thực vật và 10ml cồn 96%V, đậy nút lại, lắc đều cho dầu tan hoàn toàn;
- Cho vào bình 3 giọt dd phenolphthalein 1%, tiến hành chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng bền trong 30 giây. Ghi lại kết quả chuẩn độ;
- Lặp lại thí nghiệm chuẩn độ thêm 2 lần nữa để lấy giá trị trung bình nhằm tăng tính chính xác của kết quả thí nghiệm.

#### 4.1.5. *Kết quả và nhận xét*

Từ kết quả chuẩn độ, ta xác định được chỉ số acid của dầu thực vật dựa vào công thức sau:

$$X = V \cdot f \cdot 5,6$$

*Trong đó:*

X: Chỉ số acid

V: Số ml KOH 0,1N dùng để chuẩn độ  
(lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)

f: Hệ số điều chỉnh nồng độ KOH 0,1N

5,6: Số mg KOH tương đương với 1ml KOH 0,1N

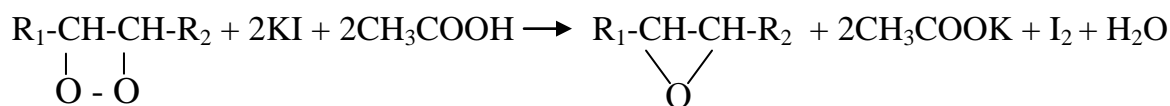
*\* Tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được.*

### 4.2. *Xác định chỉ số peroxide*

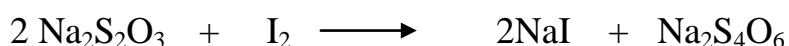
#### 4.2.1. Sơ lược về lý thuyết

Chỉ số peroxide là số gam Iod được giải phóng do lượng peroxide có trong 100g chất béo.

Chỉ số peroxide phản ánh chất lượng dầu thực vật. Các peroxide tạo thành trong quá trình ôi hóa của chất béo, trong môi trường acid có khả năng phản ứng với KI giải phóng  $I_2$  theo phản ứng:



Lượng  $I_2$  giải phóng ra được chuẩn độ bằng dung dịch  $Na_2S_2O_3$ :



#### 4.2.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Dầu thực vật;
- Hỗn hợp acid acetic đặc;
- Chlorofooc;
- KI bão hòa;
- Tinh bột 0,5%;
- $Na_2S_2O_3$  0,002N (pha loãng trước khi dùng từ dung dịch  $Na_2S_2O_3$  0,1N);
- Vaseline;
- Nước cất.

#### 4.2.3. Trang thiết bị, dụng cụ

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Bình tam giác 250ml có nút đậy;
- Buret loại 25ml;
- Bình định mức loại 250ml, 1000ml;
- Các dụng cụ khác như: Cốc thủy tinh loại 50ml; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 10ml; Giá đựng pipet; Phễu thủy tinh.

#### 4.2.4. Các bước tiến hành

- Lần lượt cho vào hai bình tam giác:
  - + Bình 1: 2ml nước cất;
  - + Bình 2: 2g dầu thực vật;
- Tiếp đó, thêm vào mỗi bình 20ml hỗn hợp acid acetic và chlorofooc (theo tỉ lệ 2:1), 5ml KI bão hòa;
- Đậy nút bình, lắc đều. Để yên trong tối 50ph;
- Sau đó, đem bình ra cho 50ml nước cất và vài giọt hồ tinh bột 0,5%, lắc đều.
- Tiến hành chuẩn độ lượng  $I_2$  giải phóng ra bằng  $Na_2S_2O_3$  0,002N đến khi dung dịch mất màu xanh. Ghi lại kết quả chuẩn độ;

- Lặp lại thí nghiệm chuẩn độ thêm 2 lần nữa để lấy giá trị trung bình nhằm tăng tính chính xác của kết quả thí nghiệm.

#### 4.2.5. Kết quả và nhận xét

Từ kết quả chuẩn độ, ta xác định được chỉ số Peroxide của dầu thực vật dựa vào công thức sau:

$$X = \frac{(V_k - V_t) \times f \times 0,0002538 \times 100}{g}$$

Trong đó:

X: Chỉ số Peroxide

$V_k$ : Số ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,002N dùng để chuẩn độ bình kiểm tra  
(lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)

$V_t$ : Số ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,002N dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm  
(lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)

f: hệ số hiệu chỉnh nồng độ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,002N

0,0002538: Số gam Iod tương ứng với 1ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,002N

g: Số gam dầu thực vật đem phân tích.

\* *Tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được.*

## Bài 6

# ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN

\* **Mục tiêu:** Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được nguyên tắc định lượng vitamin C và vitamin A;
- Thực hiện được công việc chuẩn bị dụng cụ, hóa chất thí nghiệm, nguyên liệu cần đem phân tích và sử dụng thành thạo các dụng cụ và thiết bị thí nghiệm;
- Trình bày được các bước tiến hành định lượng vitamin C và vitamin A;
- Tiến hành được các thao tác định lượng vitamin C và vitamin A theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Tổng hợp, xử lý, tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được;
- Có ý thức chấp hành nội quy, an toàn lao động trong phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị;
- Có tinh thần tự giác, chuyên cần, trung thực, cẩn thận, khiêm tốn, cầu thị trong thực hành;
- Có khả năng làm việc theo nhóm, có tác phong công nghiệp trong thực hiện công việc.

\* **Thời gian thực hành:** 5 giờ

\* **Nhóm thực hành:** 15-20 sinh viên

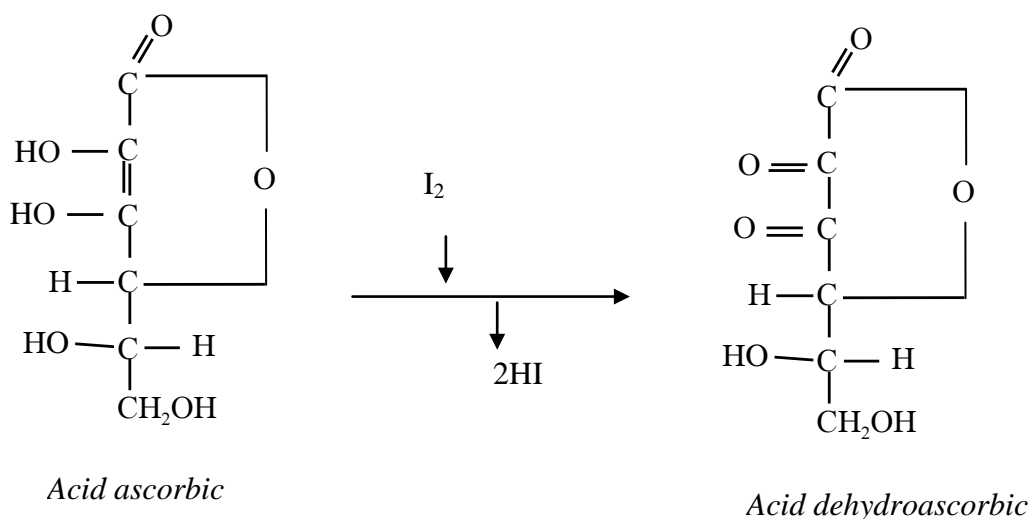
\* **Địa điểm thực hành:** Phòng Thí nghiệm Hóa sinh

\* **Nội dung bài thực hành:**

### 1. Định lượng vitamin C (acid ascorbic)

#### 1.1. Sơ lược về lý thuyết

Dựa vào tính chất khử của acid ascorbic đối với các chất màu để định lượng vitamin C trong nguyên liệu. Phản ứng xảy ra như sau:



#### 1.2. Nguyên liệu, Hóa chất

- Rau quả tươi (rau cải, táo, cam, bưởi,...)
- HCl 2%;
- Tinh bột 0,5%;
- $I_2$  0,01N;

- Nước cất.

### 1.3. **Trang thiết bị, dụng cụ**

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Buret màu loại 25ml;
- Bình định mức 50ml;
- Cối chày sứ;
- Cốc thủy tinh loại 50ml;
- Bình tam giác 100ml;
- Giấy lọc;
- Các dụng cụ khác như: Dao, Đũa thủy tinh; Phễu thủy tinh; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet 5ml, 10ml; Giá đựng (buret, ống nghiệm, pipet, đĩa thủy tinh, phễu,...)

### 1.4. **Các bước tiến hành**

#### 1.4.1. **Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm**

- Cho vào cối sứ 2g nguyên liệu và 10ml HCl 2%, nghiền nhỏ, chắt nước chiết sang cốc;
- Sau đó, cho thêm 10ml HCl 2% vào cối sứ, tiếp tục nghiền, rồi lại chắt nước chiết sang cốc;
- Lặp lại như vậy lần thứ 3, kết thúc quá trình chiết rút;
- Dùng 10ml HCl 2% tráng lại cối chày sứ có chứa cả bã cho vào cốc đựng dịch chiết ở trên;
- Chuyển toàn bộ dịch chiết từ cốc sang bình định mức (V = 50ml), tráng cốc lần nữa bằng ít nước cất rồi chuyển dịch tráng cốc cho vào bình định mức, dùng nước cất dẫn đến định mức của bình;
- Đặt bình định mức trong bóng tối khoảng 10 phút cho lượng acid ascorbic có trong nguyên liệu được hòa tan hoàn toàn;
- Sau thời gian trên, đem ra lọc lấy dịch trong.

#### 1.4.2. **Tiến hành thí nghiệm**

- Lấy 10ml dịch trong vừa lọc ở trên cho vào bình tam giác, thêm vào đó 10 giọt tinh bột 0,5%, lắc nhẹ;
- Dùng I<sub>2</sub> 0,01N chuẩn độ cho đến khi dung dịch bắt đầu xuất hiện màu xanh lam nhạt là được. Kết thúc chuẩn độ, đọc và ghi lại kết quả chuẩn độ;
- Lặp lại thí nghiệm chuẩn độ như trên thêm 2 lần nữa để lấy giá trị trung bình nhằm tăng tính chính xác của kết quả thí nghiệm.

### 1.5. **Kết quả và nhận xét**

Từ kết quả chuẩn độ, ta xác định được hàm lượng vitamin C có trong nguyên liệu dựa vào công thức sau:

$$X = \frac{V_c \cdot V \cdot 0,00088 \cdot 100}{V_f \cdot g}$$

Trong đó:

X: Hàm lượng vitamin C có trong nguyên liệu (%)  
V<sub>c</sub>: Số ml dung dịch I<sub>2</sub> 0,01N dùng để chuẩn độ  
(lấy giá trị trung bình sau 3 lần chuẩn độ)  
V<sub>f</sub>: Số ml dung dịch mẫu đem phân tích (10ml)  
V: Dung tích mẫu đem pha loãng (50ml)  
0,00088: số gam vitamin c tương đương với 1ml I<sub>2</sub> 0,01N

\* *Tính toán, nhận xét và đánh giá kết quả thu được.*

## **2. Định lượng vitamin A**

### **2.1. Sơ lược về lý thuyết**

Trong môi trường anhydric acetic ((CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O), vitamin A tác dụng với antimon clorua (SbCl<sub>3</sub>) tạo thành phức chất màu xanh có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 620nm, cường độ màu tỉ lệ với lượng vitamin A có trong dung dịch màu. Vì thế, có thể dùng phương pháp so màu để xác định hàm lượng vitamin A.

### **2.2. Nguyên liệu, Hóa chất**

- Dầu cá;
- Dầu cá tiêu chuẩn (5000UI/ml) (dầu cá đã được tiêu chuẩn hóa vitamin A);
- (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O;
- SbCl<sub>3</sub> bão hòa trong clorofooc không ngậm nước;
- Clorofooc;
- Nước cất.

### **2.3. Trang thiết bị, dụng cụ**

- Cân điện tử;
- Tủ sấy;
- Máy so màu UV- VIS;
- Tủ hút;
- Bình định mức loại 25ml, 50ml;
- Micropipet loại 500μl, 1000μl;
- Ống nghiệm;
- *Các dụng cụ khác như:* Bình tam giác 100ml; Cốc thủy tinh loại 50ml, 100ml, 500ml; Đũa thủy tinh; Phễu thủy tinh; Kẹp gỗ; Bóp cao su; Pipet nhỏ giọt; Pipet loại 5ml, 10ml; Giá đựng (ống nghiệm, pipet, đũa thủy tinh, phễu,...).

### **2.4. Các bước tiến hành**

- Cho vào bình định mức (V=25ml) 2,5ml dầu cá, dùng clorofooc hòa tan dầu cá và dẫn đến định mức của bình;
- Hút 0,4ml dầu cá trong clorofooc, cho vào ống nghiệm sạch đã sấy khô, thêm vào đó 1 đến 2 giọt anhydric acetic (xuất hiện thể vẩn đục) và 4ml dung dịch SbCl<sub>3</sub>, lắc đều và để yên ở nhiệt độ thường trong 10 giây;
- Sau đó, đem đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 620 nm, cuvet đối chứng chứa SbCl<sub>3</sub>;
- Ghi lại kết quả thí nghiệm;
- Tiến hành làm lại thí nghiệm như trên 2 lần nữa để lấy giá trị trung bình nhằm tăng tính chính xác kết quả thí nghiệm.

• **Xây dựng đồ thị đường chuẩn**

Thực hiện xây dựng đường chuẩn với dầu cá tiêu chuẩn (5000UI/ml) có sẵn như sau:

- Cho vào bình định mức (V=50ml) 10ml dầu cá theo tiêu chuẩn (5000UI/ml), sau đó dùng clorofooc hòa tan dầu cá và dẫn đến định mức của bình;

- Lấy 1ml dầu cá trong clorofooc (1000UI/ml) làm dung dịch gốc tiếp tục pha loãng. Chuẩn bị 6 ống nghiệm sạch đã sấy khô, đánh số thứ tự từ 1 đến 6, sau đó pha loãng dầu cá trong clorofooc có lượng vitamin A như bảng sau:

<i>Chất pha loãng</i> \ <i>TT</i>	1	2	3	4	5	6
<i>Dầu cá (1000UI/ml)</i>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<i>Clorofooc (ml)</i>	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
<i>Số đơn vị UI</i>	0	100	200	300	400	500

$$(1UI = 0,3\mu\text{g retinol hoặc } 1UI = 0,5\mu\text{g vitamin A})$$

- Theo thứ tự từng ống nghiệm, lấy 0,4ml dầu cá đã pha loãng cho vào ống nghiệm, sau đó tiếp tục tiến hành thí nghiệm giống như thí nghiệm trên, so màu, xác định được các trị số mật độ quang tương ứng với lượng vitamin A. Ghi lại kết quả thí nghiệm;

- Từ đó, xây dựng được đồ thị chuẩn bằng cách vẽ đồ thị biểu diễn sự biến thiên của mật độ quang theo số đơn vị UI (*với trục tung là giá trị mật độ quang ( $OD_{620}$ ) và trục hoành là số đơn vị UI*).

**2.5. Kết quả và nhận xét**

- Từ các trị số mật độ quang (OD) ở ống thí nghiệm, đối chiếu với đồ thị chuẩn, xác định được lượng vitamin A có trong 0,4ml dung dịch thí nghiệm. Từ đó, suy ra hàm lượng vitamin A có trong 100ml dầu cá. Ngoài ra, có thể dùng phần mềm Excel để xử lý kết quả thu được.

- Nhận xét và đánh giá kết quả thu được.