

Datum: 6.5. 2004

Ime in priimek: Miljo Jovančič

440  
77

1. Pred merjenjem aktivnosti polifenol oksidaze iz krompirja pripraviš standardno raztopino substrata, tako, da raztopiš 1,52 mg DOPA (molska masa 197,2 g mol<sup>-1</sup>) v 4 ml pufra. Za test encimske aktivnosti odpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,8 ml standardne raztopine substrata ter 0,4 ml nerazredčenega krompirjevega ekstrakta in dopolniš do končnega volumna 3 ml z ustreznim pufrom. Po petih minutah naraste absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona (molski absorpcijski koeficient je 5012 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) na vrednost 0,66. (70 %)

- a) Izračunaj specifično aktivnost polifenol oksidaze (U/ml ekstrakta) v nerazredčenem ekstraktu!
- b) Izračunaj tudi preostalo množino substrata v kiveti po 5 minutah, delovanja enoima na substrat!

1U (enota encimske aktivnosti) je tista količina encima, ki pri izbranih pogojih reakcije pretvori 10<sup>-6</sup> mol substrata v produkt v eni minuti

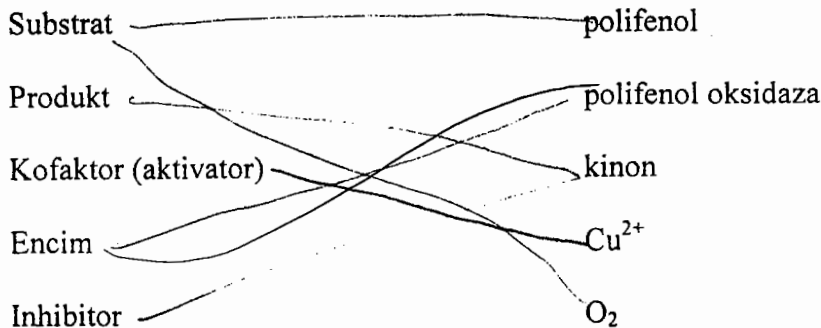
$m_{DOPA} = 1,52 \text{ mg}$   
 $M = 197,2 \text{ g mol}^{-1}$   
 $V_{1/2} = 3 \text{ ml}$   
 $t = 5 \text{ min}$   
 $\epsilon = 5012 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
 $A = 0,66$

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$   
 $c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = 1,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$   
 $\frac{dA}{dt} = \frac{0,66}{5 \text{ min}}$   
 $\frac{dc}{dt} = \frac{dA}{dt \cdot \epsilon \cdot l}$   
 $\frac{dc}{dt} = \frac{0,132}{5 \text{ min}}$   
 $\frac{dc}{dt} = \frac{1,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \cdot 0,008 \text{ l}}{5 \text{ min}} = 7,9 \cdot 10^{-8}$   
 $\frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ min}} = 0,079 \text{ U}$   
 $n_0 \text{ ml ekstrakt} = \frac{0,079 \text{ U}}{0,74} = 0,107 \text{ U}$

$M_s = \frac{m}{M} = \frac{1,52 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{197,2 \text{ g mol}^{-1}} = 7,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$   
 $M_s = 1,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol} = 1,93 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$   
 $M_p = C_p \cdot V = 3,196 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$   
 $\% = \frac{M_p}{M_s} = 20\% \checkmark$   
 $M_s = \frac{M_p}{\%} = \frac{3,196 \cdot 10^{-4}}{0,2} = 1,598 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

$2AC - KON$

2. Pojme na levi poveži z ustreznimi pojmi na desni. Možno je, da je posamezen pojem povezan z več pojmi! (30 %)



22/10

$m_{DOPA} = 1,52 \text{ mg}$   
 $V = 0,8$   
 $V = 0,4$   
 $V = 6 \text{ ml}$

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$   
 $c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = 1,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$   
 $n = 7,9 \cdot 10^{-8} \Rightarrow 0,079 \text{ U}$

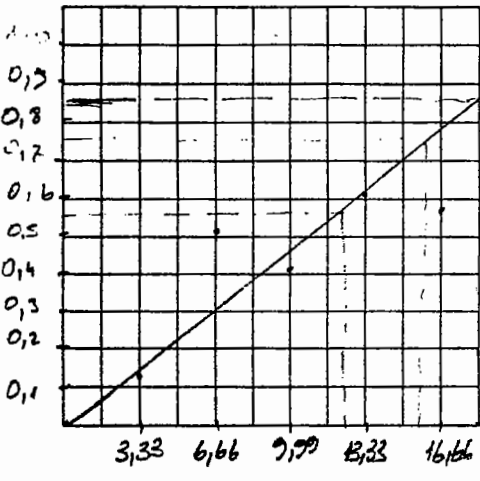
Datum: 22.4.2004

HOLEST

Ime in priimek: Mitja Jovančič

0,56  
88/10

1. Izračunaj vsebnost holesterola v mleku (mg/100 ml mleka) z 0,5 %, 1,6 % in 3,2 % maščobe. Določi tudi vsebnost holesterola v jajčnem rumenjaku (mg/100g rumenjaka). Razloži ali se določene vsebnosti holesterola v mleku z različnim deležem maščob skladajo s pričakovanji! (60 %)



mleko 0,5% =  $10,82 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$

V 2 ml mleko:  $10,82 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1} \cdot 6 \text{ ml} = 64,9 \cdot 10^{-3} \text{ mg}$   
 $64,9 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \frac{5}{3} = 0,108 \text{ mg}$

V 100 ml mleko:  $0,108 \text{ mg} \cdot 50 = \underline{5,4 \text{ mg/100ml}}$

mleko 3,2%

0,558 ... 5,4 mg/100ml

1,118 ...

$y = 10,8 \text{ mg/100ml}$

mleko 1,6%

0,558 ... 5,4 mg/100ml

0,854 ...

$y = 8,26 \text{ mg/100ml}$

58/10

$0,25 \text{ ml} \cdot 0,11 \text{ mg ml}^{-1} = 0,025 \text{ mg}$

$m = 0,02 \text{ mg}$

$y = \frac{0,02 \text{ mg}}{6 \text{ ml}} = 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$

ZAVDA !!!

2. Predpostavi, da si epruveto z mlekom z 1,6 % maščobe pred centrifugiranjem uravnotežil z insolentno.

a) 0,6 ml heksana

b) 0,6 ml H<sub>2</sub>O

Izračunaj kakšen je pravi rezultat v primeru a) in v primeru b)! (20 %)

V 2 ml mleko:  $18,2 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1} \cdot 6 \text{ ml} = 0,109 \text{ mg}$

$0,109 \text{ mg} \cdot \frac{5}{3} = 0,182 \text{ mg}$

V 100 ml mleko:  $0,182 \text{ mg} \cdot 50 = \underline{9,1 \text{ mg/100ml}}$

20%

$y = 8,26 \text{ mg/100ml}$

3. Heksan je relativno zelo hlapen in nam lahko med postopkom odpareva. Pojasni kako to vpliva na pravilnost rezultatov analize! Pojasni kako bi problem lahko rešil tako tehnično kot računsko! (20 %)

če nam del holesterola odpari ...

... ker je to go do 5 ml in to go ...  
... 3 ml to del ... 5 ml odpari in ...  
... pravega razmerja. Določilo bi ... holesterola.  
... do to v proizvedenih epruvtah  
... go je odparilo in to je ... uporabljen

Datum: 9.5. 2003

Ime in priimek: Miha Jolanič

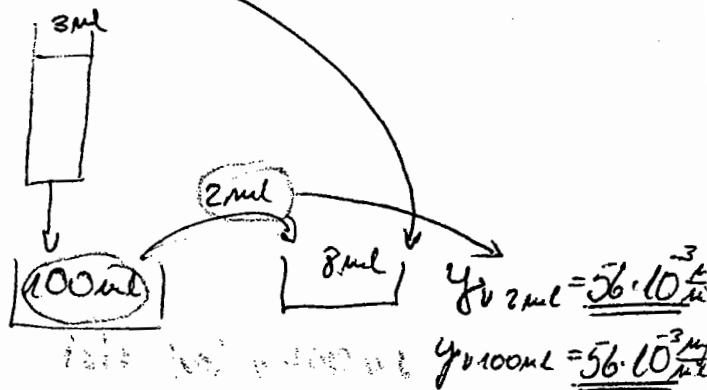
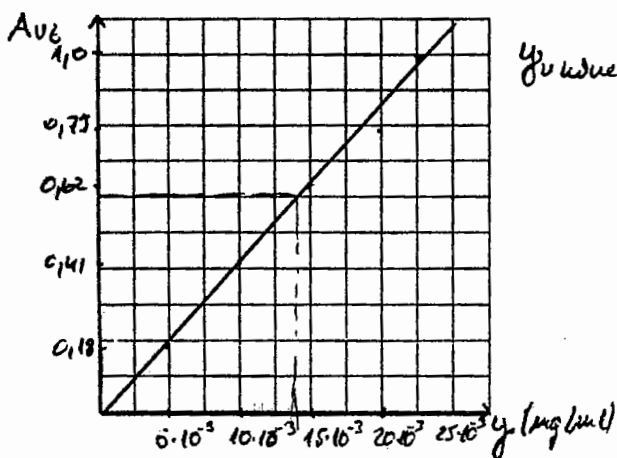
1. Tri mililitre (3 ml) sadnega soka naneseš na kolono napolnjeno z močno bazičnim ionskim izmenjevalcem Merc III. Nevezane komponente spereš z vodo, vezane kisline pa v 100 ml bučko s 7,1 % natrijevim sulfatom in dopolniš do oznake. Od eluata odvzameš 2 ml in dodaš vse potrebne reagente ( $H_2SO_4$ ,  $H_5IO_6$ , glicerol,  $NH_4VO_3$ ), tako, da je končni volumen 8 ml. Tako pripravljena raztopina ima absorbanco proti slepi probi 0,6. Vzoredno pripraviš tudi umeritveno krivuljo kjer odmeriš ustrezne volumne vinske kisline s koncentracijo 0,1 mg/ml (glej tabelo), dopolniš do 2 ml s 7,1 % natrijevim sulfatom in dodaš vse potrebne reagente, da je končni volumen 8 ml.

Dodatek stand. raztopine (0,1 mg/ml)	0,4 ml	0,8 ml	1,2 ml	1,6 ml	2,0 ml
Absorbanca pri 530 nm	0,18	0,41	0,62	0,79	1,0

- Nariši graf in izračunaj masno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku! (60%)
- Ali bi bil ta sok sploh užiten? (10%)

$$y_{\text{v soku}} = \frac{m_{\text{sta}}}{V_{\text{su}}} = \frac{y_{\text{sta}} \cdot V_{\text{sta}}}{V_{\text{su}}} = \frac{0,1 \text{ mg/ml} \cdot 0,6 \text{ ml}}{8 \text{ ml}} = 5,10$$

$$y_{\text{v soku}} = 14 \cdot 10^{-3} \text{ mg ml}^{-1}$$



v 100 ml:  $m_{\text{v u}} = y_{\text{v soku}} \cdot V = 5,6 \text{ mg}$

v 2 ml:  $m_{\text{v u}} = 5,6 \text{ mg}$

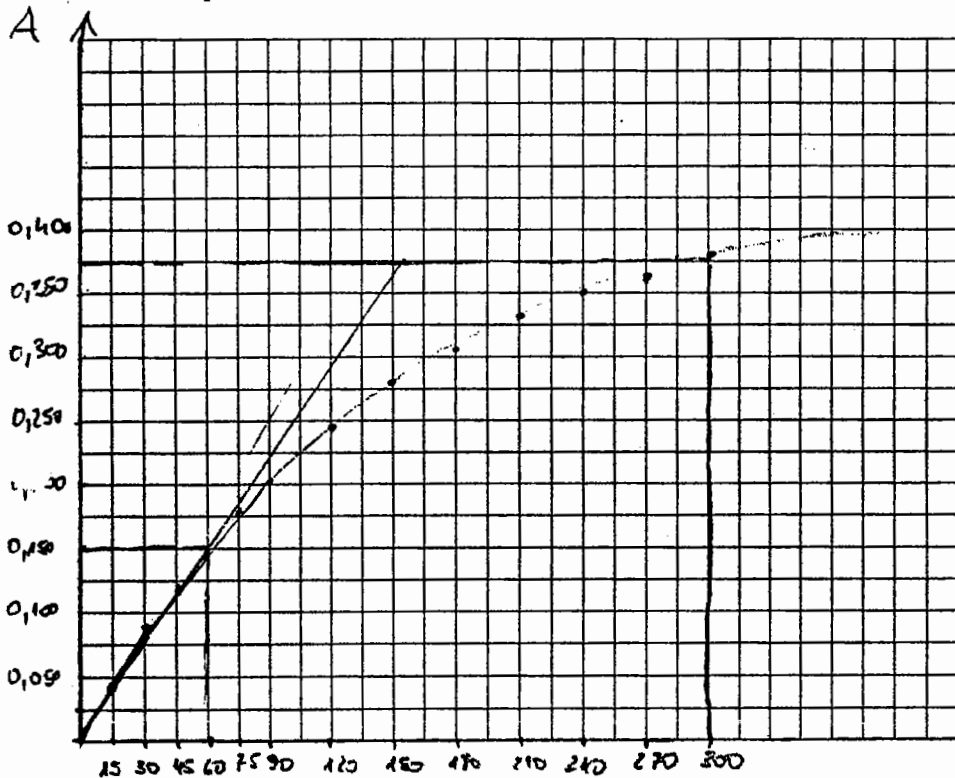
v soku:  $y_{\text{v u}} = \frac{5,6 \text{ mg}}{3 \text{ ml}} = 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$

2. Zakaj smo v postopku določevanja vinske kisline v soku uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo? (15%)

3. Zakaj smo v postopku določevanja vinske kisline dodali perjodovo kislino? (15%)

1. Nariš graf odvisnosti količine nastalega kinona od časa in IZRAČUNAJ (70%)

- a) Koliko enot encimske aktivnosti vsebuje 1ml surovega ekstrakta (U/ml)-iz tangente na krivuljo!  
 b) Predstavljaš si, da ne bi delali kontinuirno, ampak bi absorbanco pomerili prvič šele po 5 minutah, tako kot je opisano v pristopnem kolokviju. Koliko enot encimske aktivnosti bi določili v tem primeru

~~A<sub>50</sub>~~

$$A_{15\text{min}} = 0,150$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0,150 \text{ mol cm}^{-1}}{5012 \text{ l cm}}$$

$$c = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$$

$$\frac{c}{\Delta t} = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$M_{0,1\text{ml}} = \frac{c}{t} \cdot V_{\text{uv}} \cdot 10^6$$

$$M_{0,1\text{ml}} = \underline{\underline{0,089 \text{ U/ml}}}$$

$$M_{\text{ml ekstr}} = \frac{0,089 \text{ U} \cdot 2}{0,1} = \underline{\underline{0,178 \text{ U/ml}}}$$

b)  $A = 0,375$

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$$

45/0

$$M_{0,1\text{ml}} = 0,045 \text{ U/ml}$$

$$M_{\text{ml ekstr}} = 0,045 \text{ U} \cdot 2 = \underline{\underline{0,089 \text{ U/ml}}}$$

2. Zakaj dodamo v fosfatni pufer, ki ga uporabimo za ekstrakcijo polifenol oksidaze NaF? (15%)

Z NaF dobimo fluoridne ione, ki izboljšajo ustrojnost polifenol oksidaze.

3. Poglej na digram in povej ob katerem času (meritvi) je hitrost reakcije največja! (15%)

Med 15 in 30 sekund je prejeto največja absorbanca torej tudi hitrost reakcije. (no vrednosti iz razpisa so kot največji molen ~~to~~ tojunkte no vrednosti)

2)  $1,52 \text{ mg} = m_{\text{DOPA}}$   
 $M_{\text{DOPA}} = 197,2 \text{ g/mol}$   
 $V = 4 \text{ mL}$  pufer

$0,8 \text{ mL}$  st. r. sub.  
 $+ 0,4 \text{ mL}$  neraz. erst.  


---

 $3 \text{ mL}$

$l = 1 \text{ cm}$   
 $t = 5 \text{ min}$   
 $\epsilon = 5012 \text{ V/mol cm}$   
 $A = 0,66$

a)  $A = l \cdot c \cdot \epsilon$   
 $c = \frac{A}{l \cdot \epsilon} = \frac{0,66}{1 \cdot 5012} = 1,317 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

a)  $U/\text{mL} = ?$   
 ner.erst.

$c = \frac{m}{V} \Rightarrow m = c \cdot V$   
 $= 1,317 \cdot 10^{-4} \cdot 3 \cdot 10^{-3} = 3,951 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$

$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = \frac{0,395}{5} = 0,079 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$

$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{0,079 \text{ U}}{0,4 \text{ mL}} = 0,198 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$

b)  $M_{\text{preostala UKIV}} = ?$   
 $t = 5 \text{ min}$

$m = 3,951 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$

$M_{\text{DOPA}} = \frac{m_{\text{DOPA}}}{M_{\text{DOPA}}} = \frac{1,52 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{197,2 \text{ g}} = 7,708 \text{ mol}$

$m = (7,708 - 3,951 \cdot 10^{-7}) \text{ mol} = 7,7079 \text{ mol}$

zac. m  
 sub.

kon. m  
 produktu

# 6.) Določanje aktivnosti perifernol oksidaz v krompirju:

1.)

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = 5012 \text{ L/mol cm}$$

$$A = 0,179$$

$$+ 0,14 \text{ mL DOPA}$$

$$+ 0,25 \text{ mL metaz. ekstr.}$$

$$+ \text{pufer}$$


---


$$3 \text{ mL} = V_K$$

$$a) \frac{V}{\text{mL ekstr.}} = ?$$

(mercur. ekstr.)

$$a) A = l \cdot c \cdot \epsilon$$

$$c = \frac{A}{l \cdot \epsilon} = \frac{0,179 \text{ mol cm}}{1 \text{ cm} \cdot 5012 \text{ L}} = 3,571 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$V = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$C = \frac{m}{V} \Rightarrow m = C \cdot V$$

$$= 3,57 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 3 \cdot 10^3 \text{ L}$$

$$= 1,071 \cdot 10^{-1} \text{ mol} = 0,1071 \mu\text{mol}$$

$$t = 30 \text{ s} = 0,5 \text{ min}$$

$$U = \frac{0,1071 \mu\text{mol}}{0,5 \text{ min}} = 0,214 \text{ U}$$

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{0,214}{0,25} = \underline{\underline{0,857 \text{ U/mL}}}$$

b) Mekaj minut  $\Rightarrow A \Rightarrow U = ?$

Encim bi razgradil več substrata. Nastalo bi več produktov  
A bi bila  $\uparrow$

$$\text{npr. } A = 0,821$$

$$t = 5 \text{ min}$$

$$c = 1,64 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$m = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

$$U = 0,098 = 0,1$$

$$\frac{U}{\text{mL}} = \underline{\underline{0,4}}$$

Spec. aktivnost po nekaj minutah bi bila nižja, kajti s podaljševanjem časa je naklon premice na grafu vedno bolj položen, kar se razgrajevanje substrata upočasnjuje. Zato so najboljši rezultati le nekaj sekund po dodatku encima k substratu. ✓

⑤ Pjani katere stopnje nastanka osnovnih produktov polimerizacije encimsko katalizirane in katere niso! 15

1. meencimsko:

2. encimsko:

- ①
- Substrat =  $O_2$  ✓
  - inhibitor = kinom ✓
  - aktivator =  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ✓
  - encim = polifenol oksidaza ✓
  - substrat = polifenol
  - produkt = kinom
  - kofaktor/aktivator =  $Cu^{2+}$

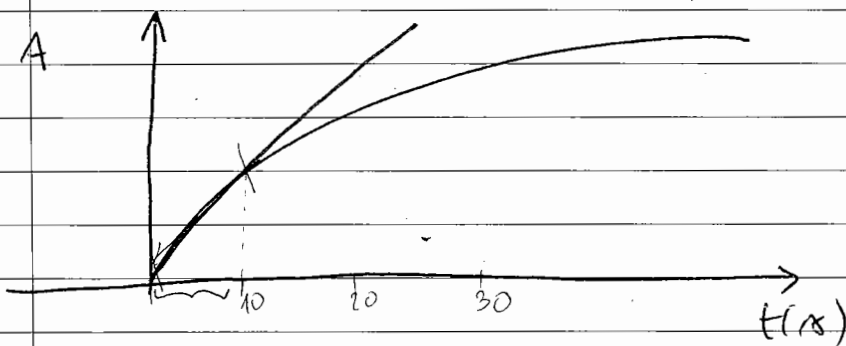
② Predlagaj 3 neodvisne postopke za preprečevanje ali upočasnitev encimskega pojavljanja sadja in zelenjave!

1. blanširanje
2. vakuumsko pakiranje
3. antioksidativna sredstva
4. pakiranje v modificirani atmosferi

③ Zakaj dodamo v fosfati pufri, ži ga uporabimo za ekstrakcijo polifenol oksidaze  $NaF^2$

zato, da inhibiramo encim že na začetku rezanja.  
 zato, da ga ne aktiviramo prehitro. Narezani krompir (dljše)  
 damo zato v ledeno umleli fosfati pufri z  $NaF$ .

④ Kdaj je hitrost reakcije največja (čas)?



Tam, kjer se tangenta pokrija s krivuljo.



# Poročilo (Določanje aktivnosti polifenol oksidaze v krompirju)

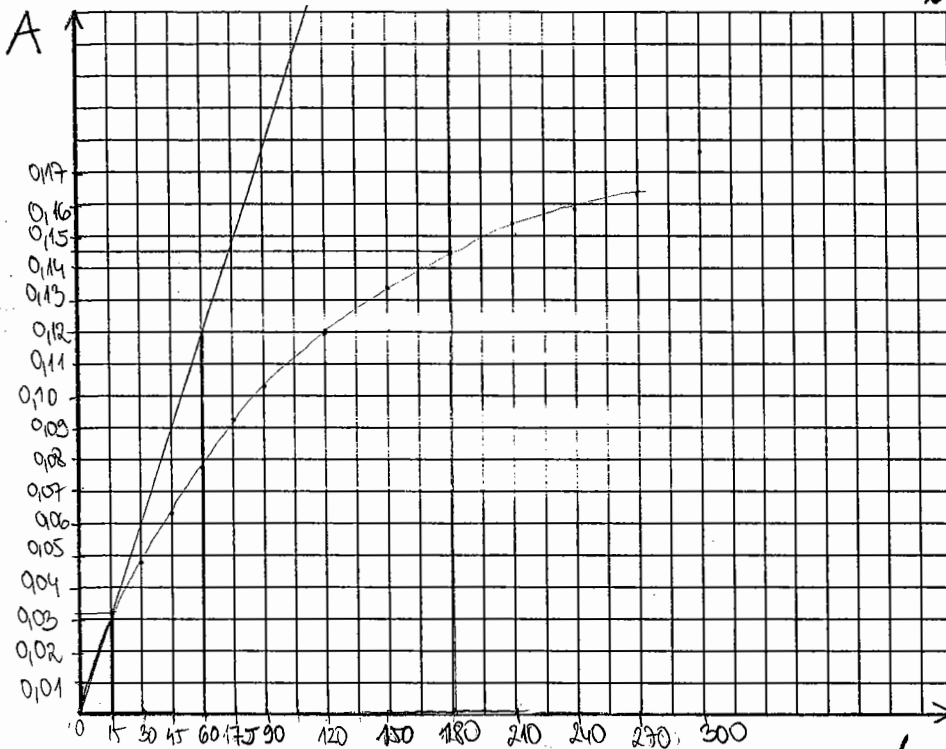
Datum: 16.5.2005

Ime in priimek: VESNA KUHAR

~~78~~ / 10

1. Nariš graf odvisnosti količine nastalega kinona od časa in izračunaj! (70 %)

- a) Koliko enot encimske aktivnosti vsebuje 1ml surovega ekstrakta (U/ml)-iz tangente na krivuljo!  
 b) Predstavljaš si, da ne bi delali kontinuirno, ampak bi absorbanco pomerili prvič šele po 3 minutah, in predpostavili, da je hitrost encimsko katalizirane reakcije konstantna v intervalu med 0 in 3 minutami.



a) pri  $t=1 \text{ min} \Rightarrow A=0,120$

$$\Delta A \rightarrow c \rightarrow M$$

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

55 / 10

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

$$= \frac{0,120 \cdot \text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}}{5012 \text{ L} \cdot 1 \text{ cm}}$$

$$c = 2,394 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

b) 3 min  $\Rightarrow A = 0,145$

$$c = \frac{0,145}{5012 \cdot 1} = 2,893 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$M = 2,893 \cdot 10^{-5} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 8,679 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$$

$$J = \frac{8,679 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}{3 \text{ min}} \cdot 10^6$$

3 min ... 8,679 · 10<sup>-8</sup> mol  
1 min ... x

$$V = 0,029 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$\frac{V}{\text{mL}} = \frac{0,029 \text{ U}}{0,1 \text{ mL}} = 0,289 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = \underline{0,29 \text{ U/mL}}$$

$$\times 2 \quad x = 2,893 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$$

$t(x)$

$$c = \frac{M}{V} \Rightarrow M = c \cdot V$$

$$= 2,394 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 3 \text{ mL}$$

$$= \underline{\underline{7,182 \cdot 10^{-8} \text{ mol}}}$$

$$V = \frac{\mu\text{mol}}{1 \text{ min}} = 0,07182$$

$$\frac{V}{\text{mL}} = \frac{0,07182 \mu\text{mol}}{0,1 \text{ mL}} = 0,718 \frac{\text{U}}{\text{mL}} = \underline{\underline{0,72 \text{ U/mL}}}$$

2. Pojasni katere stopnje v nastanku obarvanih produktov iz polifenolov so encimsko katalizirane in katere niso! (15%)

huj je ← 2

1. stopnja: encimska  
 2. -||- : neencimska

POSAMEZNA STOPNJA

8 / 10

3. Poglej na digram in povej ob katerem času (meritvi) je hitrost reakcije največja! (15 %)

Takrat, ko je tangenta skladna s krivuljo.  
 Prvih 15 sekund.

15 / 10

b) Enzim bi razgradil več produkta  $\Rightarrow$  nastalo bi več produkta, torej bi bila vsota A (če bi pustili reakcijo teči več minut)

$$\frac{\Delta A}{\Delta t}$$

$$\frac{0,179}{0,5 \text{ min}} = 0,358 \text{ } \frac{1}{\text{min}}$$

$$\frac{0,252}{3 \text{ min}} = 0,084 \text{ } \frac{1}{\text{min}}$$

$\hookrightarrow$  specifična aktivnost bi bila <sup>prša</sup> manjša. (na koncu)

$$\hookrightarrow 0,201 \frac{\text{U}}{\mu\text{L}} \text{ (če bi vedeli)}$$

ZARAJ?

6

## Pristopni kolokvij (Določanje aktivnosti polifenol oksidaze v krompirju)

90%

Datum: 11.5. 2005

Ime in priimek: VESNA KU HAR

1. Za test encimske aktivnosti odpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,4 ml raztopine substrata DOPA ter 0,25 ml nerazredčenega krompirjevega ekstrakta in dopolniš do 3 ml z ustreznim pufrom. Po 30 sekundah naraste absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona (molski absorpcijski koeficient je  $5012 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) na vrednost 0,179.

a) Izračunaj specifično aktivnost polifenol oksidaze (U/ml ekstrakta) v nerazredčenem ekstraktu! (10 %)

b) Pojasni kakšna bi določena vrednost specifične aktivnosti polifenol oksidaze v primerjavi z realno, če bi reakcijo pustil teči nekaj minut in šele nato izmeril absorbanco! Odgovor utemelji!

1U (enota encimske aktivnosti) je tista količina encima, ki pri izbranih pogojih reakcije pretvori  $10^{-6}$  mol substrata v produkt v eni minuti

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$V_K = 3 \text{ mL}$$

$$A = 0,179$$

$$t_1 = 30 \text{ s}$$

$$\epsilon = 5012 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$a) A = \epsilon \cdot l \cdot c \Rightarrow c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} =$$

$$= \frac{0,179 \cdot \text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}}{5012 \text{ L} \cdot 1 \text{ cm}} =$$

$$= 3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$\frac{c \cdot V}{t} = \frac{3,57 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L}}{0,5 \text{ min}} =$$

$$\frac{\text{mmol}}{\text{min}} = 2,142 \cdot 10^{-7} \text{ mol/min}$$

$$= 0,214 \text{ U}$$

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{0,214 \text{ U}}{0,25 \text{ mL}} = 0,856 \frac{\text{U}}{\text{mL}}$$

OBR. → 5

2. Pojme na levi poveži z ustreznimi pojmi na desni. Možno je, da določeni pojmi ostanejo brez "partnerja" (20 %)

substrat	o <sub>2</sub> ✓
aktivator	polifenol oksidaza ✓
inhibitor	kinon ✓
encim	Ca <sup>2+</sup> ✓?

20%

3. Encimsko porjavenje je v živilski tehnologiji največkrat nezaželeno. Predlagaj tri neodvisne postopke s katerimi bi upočasnil oziroma preprečil encimsko porjavenje sadja in zelenjave. (20 %)

- 1.) blanširanje ✓
- 2.) antioksidativna sredstva (c vitamini) ✓
- 3.) vakuumsko pakiranje ✓

EDTA

20%

- Če lukomur in določim enako s lukomurjem v obliki mekoj molekul šlrobo <sup>NI VIDEJI</sup> no <sup>glej</sup> ~~pridruženje~~ fragmente in enako naddruženje s rotacijsko le-tek do glukoze. Ne dobim pa celotne glukoze, ker se ne rotirajo več šlrobo.
- Če imam lukomur dobim nekaj fragmente šlrobo enako in to naprej rotirajo, do glukoze pri to se pride, do nastanka glukoze, ker se toleki detektorom samega šlrobo se ne moremo zato dobiti loših rezultat.
- Some enako ne morejo rotirati ~~šlrobo~~ velga šlrobo do glukoze, do to se toleki detektorom. Korajo prej nastali drojdi fragmenti toleki toleki rotirajo.
- Če mi ne morem ne morem nilekor dolati glukoze toleki toleki detektorom. No detektorom glukoze se ~~ne~~ več postopni kemijo tole, če se ne detektorom ne ~~morem~~ dobim loših rezultat (ker do " uvoza in šlrobo).

Some lukomur pa toleki kemij. ne do rotirajo proo toleki toleki brez enako, brez lukomur.

Noj pamburjo se temp. enako le malo znižajo deler' uhoze v šlrobo.

Reokwjo brez enako in lukomur doje loših negotih rezultat.

~~RETI~~ ZADEVO SIE LE POUZELI ~~NISTA~~  
~~RETI~~ NISTE PA POZIKULI RALLOZITI

# Pristopni kolokvij (Kvantitativna določitev holesterola v mleku)

Datum: 22.4. 2004

Ime in priimek: Mitja Jokusič

80

1. V analizo dobiš vzorec mleka. Vzameš 2,5 ml mleka, dodaš ustrežno količino KOH in etanola ter hidroliziraš. Nato dodaš 3 ml vode ter 7 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 2 ml in z uporabo standardnih raztopin določiš, da je v 2 ml heksanske faze 145 µg holesterola. Koliko holesterola je v 100 ml mleka? (40 %)



v 2 ml heks: 145 µg

$$\frac{145 \mu\text{g} \cdot 7}{2} = 507,5 \mu\text{g}$$

v 7 ml heks  $\Rightarrow$  2,5 ml mleka

2,5 ml  $\rightarrow$  507,5 µg

100 ml  $\dots x$

v 100 ml mleka = 20,3 mg

2. Ko si določeval holesterol v mleku, se del holesterola (20 %) ni ekstrahiral v heksansko fazo. Medtem, ko je bila ekstrakcija v primeru standardnih raztopin popolna. Pri računu si predpostavil, da se je tudi pri vzorcu ekstrahiral ves holesterol in določil, da 100 ml mleka vsebuje 15 mg holesterola. Kakšna je dejanska vsebnost holesterola v mleku? (20 %)

v 100 ml mleka = 15 mg

dejanska = ~~15 mg~~  $\left( \frac{150}{8} = 18,75 \text{ mg} \right)$

15 mg  $\dots$  100

18  $\dots$  120

15 mg  $\cdot$  1,2 = 18 mg

3. Zakaj smo vzorec mleka kuhali v KOH? (20 %)

Da smo raztopili triacilglicerole, da smo raztopili estersko vez.

nato, da bomo raztopili triacilglicerole. Da smo raztopili estersko vez.

4. Zakaj bomo heksan odparevali z dušikom in ne npr. s kisikom? (10 %)

Da ne bi reagirale proste OH skupine s kisikom, bomo odparevali heksan s dušikom.

Zato, da ne bi reagirale proste OH skupine s kisikom, bomo odparevali heksan s dušikom.

5. Zakaj se holesterol mnogo bolje topi v heksanu kot v vodi? (10 %)

Holesterol je nepolaren. Voda pa je polarna. Podobno se topi v nepolarnem zato se holesterol nepolaren.

holesterol bolje topi v nepolarnem heksanu. Ker je holesterol nepolaren. Je lipid, kemično steroid. Podobno se topi v podobnem, zato se holesterol bolje topi v nepolarnem heksanu.

$2\text{ml hex} \cdot 145\mu\text{g}$   
 $7\text{ml hex} \dots \otimes$   
 $\downarrow$   
 $25\text{ml}$

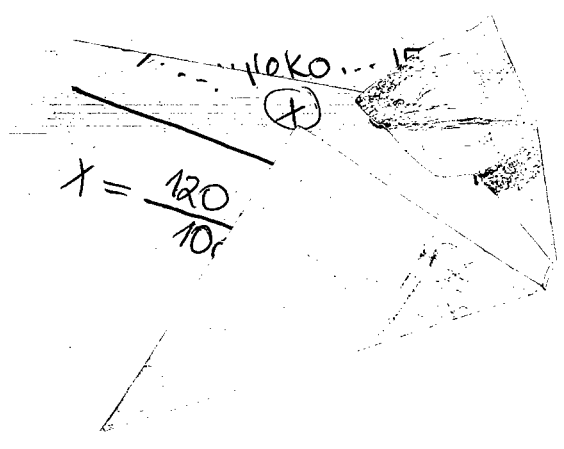
$$x = \frac{7\text{ml} \cdot 145\mu\text{g}}{2\text{ml}} =$$

$$x = 507.5\mu\text{g}$$

$25\text{ml} \cdot 507.5\mu\text{g}$   
 $100\text{ml} \dots \otimes$

$$x = \frac{100 \cdot 507.5}{25} =$$

$$x = \underline{\underline{2030\text{mg}}}$$



6.

2 ml metanol  
+ 5 ml heksan  
+ 3 ml vode

→ 2 ml  
A=0,935

UK: 0,1 µg/ml ⇒ 0,1 µg hol u 1 ml etand

1)  $V_{\text{HOL}} = 0,25 \text{ mL}$       $M_{\text{HOL}} = \rho_{\text{HOL}} \cdot V_{\text{HOL}} = 0,1 \cdot 0,25 = 0,025 \text{ µg}$

4 ml o-ftalcehid  
+ 2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  

---

6 ml

$0,025 \frac{\text{µg}}{\text{ml}} \cdot \frac{4}{5} = 20 \text{ µg}$

$\frac{20 \text{ µg}}{6 \text{ mL}} = 3,33 \frac{\text{µg}}{\text{mL}}$   
=

3) 25 mL mleka  
 3 mL H<sub>2</sub>O  
 + 7 mL heksan

2 mL  
 145 μg hol.

V 100 mL mleka hol. = ?

$$\frac{2 \text{ mL} \cdot 145 \mu\text{g hol}}{7 \text{ mL}} = x$$

$$x = 507,5 \mu\text{g}$$

$$\frac{25 \text{ mL ml.} \cdot 507,5 \mu\text{g}}{100 \text{ mL ml.}} = x$$

$$x = 20,3 \mu\text{g}$$

1) 100 mL mleka je 20,3 μg hol.

4) 100 mL mleka ... 15 μg hol.

20% hol. se mi ekstrahiralo v heksansko f.

• Dejanska vsebnost v mleku?

$$\frac{100\% \cdot 15 \mu\text{g}}{20\%} = x$$

$$x = \frac{120 \cdot 15}{100} = 18 \mu\text{g}$$

↳ Dejanska vsebnost.

5) Mleko: 1,6% maščobe

a) 0,6 mL heksana

b) 0,6 mL H<sub>2</sub>O

i pred centrifugiranjem utrnemo z:

a) 3 mL H<sub>2</sub>O  
 + 5 mL heksan

+ 5 mL  
 0,6 mL  
 -----  
 5,6 mL heksan

b) Ostane nepremesljivo.

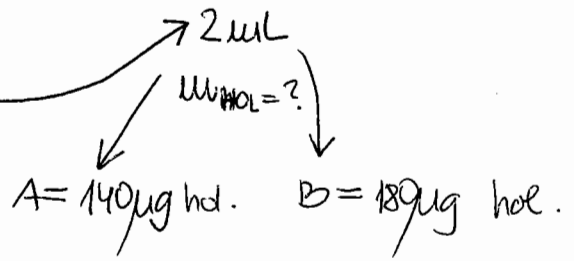


# 5.) Kwanti. dolocitev holesterola v mleku:

- ①  
 a) A: 3,2% maščobe }  
 B: 1,6% maščobe }

+ 4 mL mleka  
 + 6 mL heksana

$M_{\text{hol}}(100\text{mL}) = ?$   
 mleko



A:  $\frac{2\text{ mL} \cdot 140\text{ μg hol.}}{6\text{ mL} \cdot X}$

B:  $\frac{2\text{ mL} \cdot 180\text{ μg}}{6\text{ mL} \cdot X}$

$X = 420\text{ μg}$

$X = 540\text{ μg}$

$\frac{4\text{ mL} \cdot 420\text{ μg}}{100\text{ mL} \cdot X}$

$\frac{4\text{ mL} \cdot 540\text{ μg}}{100\text{ mL} \cdot X}$

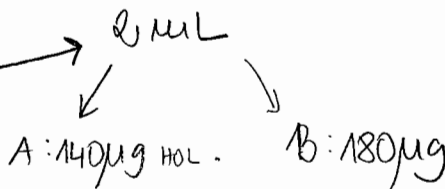
$X = 10,5\text{ μg}$

$X = 13,5\text{ μg}$

↳ A: v 100 g je 10,5 μg hol.  
 B: - - - 13,5 μg hol.

b) Eksperiment bi pokazal, ker ni logično, da ima vzorec A z 3,2% maščobe manj holesterola kot vzorec B z 1,6% maščobe.

②  
 + 4 mL mleka  
 + 5 mL heksana ⇐ 1 mL je odparil



A:  $\frac{2\text{ mL} \cdot 140\text{ μg}}{5\text{ mL} \cdot X}$

B:  $\frac{2\text{ mL} \cdot 180\text{ μg}}{5\text{ mL} \cdot X}$

$X = 350\text{ μg}$

$X = 450\text{ μg}$

$\frac{4\text{ mL} \cdot 350\text{ μg}}{100\text{ mL} \cdot X}$

$\frac{4\text{ mL} \cdot 450\text{ μg}}{100\text{ mL} \cdot X}$

$X = 8,75\text{ μg}$

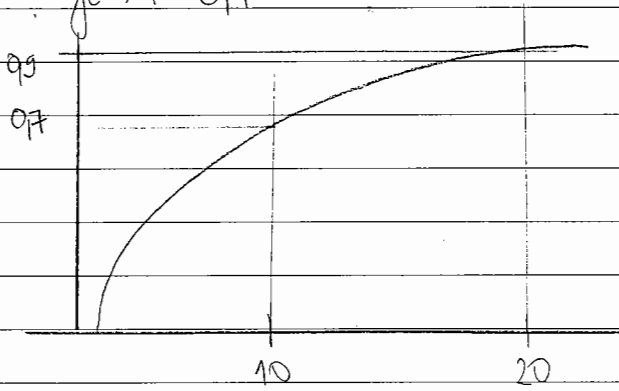
$X = 11,25\text{ μg}$

Toliko hol. v 100g mleka.

6.

$$\frac{0,9}{0,7} \cdot \frac{7,2 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{9,3 \text{ mg}}{\text{mL}}$$

pri 20 min je  $A = 0,9$   
pri 10 min je  $A = 0,7$



100% ..  $A = 1$

① Katero spojino bi se ekstrahirale v heksansko f. poleg holesterola, če mleka ne bi hidrolizirali s KOH? Vzemelj!

Če mleka ne bi hidrolizirali s KOH, poteci ne bi razbili triacilglicerolov, torej ne bi razcepili estrske veri.

↳ Poleg holesterola bi se v heksansko (nepolarno) fazo ekstrahirale: MK, maščobe, lipidi, estri

↳ Holesterol je kemično sterol, spada med lipide.

② Tik preden smo želeli investicijo zelo opazili, da nam je zmanjkalo dušika za odparevanje heksana, imamo pa argon. Ga lahko uporabimo?

Da. Za odparevanje ne bi smeli uporabiti kisika, saj ima holesterol 2 reaktivni mesti: dvojno vez, ter OH-skupino. Ta bi s kisikom reagirala, z dušikom ali argonom pa ne.

③ Zakaj smo varec mleka kuhali v KOH?

Zato, da smo razbili triacilglicerole. Da smo razcepili estrske veri.

④ Zakaj se holesterol mnogo bolje topi v heksanu kot v vodi?

• Ker je holesterol nepolaren.

• Je lipid, kemično sterol.

• Podobno se topi v podobnem, zato se holesterol bolje topi v nepolarnem heksanu.

⑤ Heksan je relat. zelo hlapien in lahko med postopkom odpora. Kako to vpliva na pravilnost rezultata analize? Kako bi problem rešil kemično in računsko?

Če bi heksan odparil, bi na koncu dobili napačno vsebnost holesterola v mleku in sicer manjšo. Koncentracija holesterola v heksanu se spremeni, zato tega v heksanski fazi, če ta odpari.

↳ Kemično:

Pogledala bi manjšo količino in dopolnila, preden bi odpirala 2 ml heksanske f. strau.

↳ Računsko:

Preračunala bi na pravo vrednost.

5

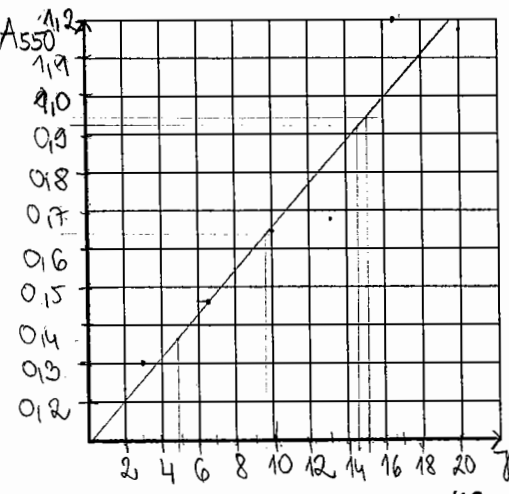
Poročilo (Določitev holesterola v mleku)

Datum: 9.5. 2005

Ime in priimek: VESNA KUCHAR

75%

1. Izračunaj vsebnost holesterola v mleku (mg/100 ml mleka) z 0,5 %, 1,6 % in 3,5% maščobe. (50 %)



① MLEKO 0,5% :  $\rho_{UK} = 49 \frac{\mu g}{mL}$

$M_{HOL} = 49 \frac{\mu g}{mL} \cdot 6 mL = 294 \mu g$

$$\begin{matrix} 2 mL & \cdot & 294 \mu g \\ 5 mL & \dots & X \end{matrix} \} X = 73,5 \mu g$$

5%

$$\frac{73,5 \mu g}{2 mL} \Rightarrow \boxed{\frac{37,5 \mu g}{100 mL}} \text{ HOL}$$

$$\frac{73,5 \mu g}{X} \cdot \frac{2 mL}{100 mL} \} X =$$

③ MLEKO 3,5% :  $\rho_{UK} = 1510 \frac{\mu g}{mL}$

$M_{HOL} = 90 \mu g$

$$\begin{matrix} 2 mL & \cdot & 90 \mu g \\ 5 mL & \dots & X \end{matrix} \} X = 225 \mu g$$

$$\frac{225 \mu g}{2 mL} \Rightarrow \boxed{\frac{112,5 \mu g}{100 mL}}$$

② MLEKO : 1,6% :  $\rho_{UK} = 9,6 \frac{\mu g}{mL}$

$M_{HOL} = 9,6 \frac{\mu g}{mL} \cdot 6 mL = 57,6 \mu g$

$$\begin{matrix} 2 mL & \cdot & 57,6 \mu g \\ 5 mL & \dots & X \end{matrix} \} X = 144 \mu g$$

$\frac{144 \mu g}{2 mL}$

$$\boxed{\frac{72 \mu g}{100 mL}}$$

3. Predpostavi, da si epruveto z mlekom z 1,6 % maščobe pred centrifugiranjem uravnotežiš z iste A

- a) 0,6 ml heksana
- b) 0,6 ml H<sub>2</sub>O

Izračunaj kakšen je pravilen rezultat v primeru a) in v primeru b)! (25 %)

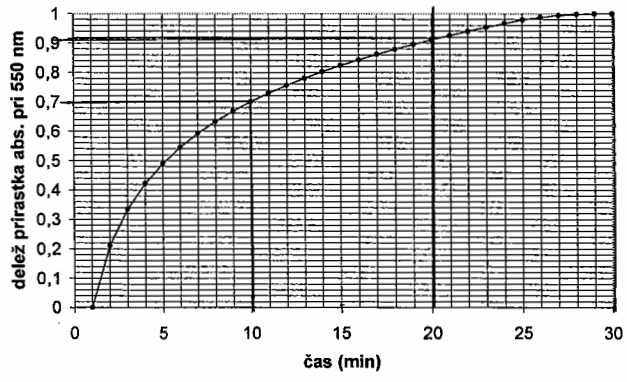
a)  $9,6 \frac{\mu g}{mL} \cdot 6 mL = 57,6 \mu g$

$$\frac{57,6 \mu g}{5,6 mL} \cdot 2 mL = X \Rightarrow X = 161,3 \mu g$$

b.) ostane nespremenjeno :  $72 \mu g / 100 mL$

$$\frac{161,3 \mu g}{2 mL} = \boxed{\frac{80,65 \mu g}{100 mL}}$$

3. Med vajo se nam je tako kot ponavadi mudilo, zato nismo počakli predpisanih 30 minut, da se razvije barva, ampak smo merili absorbcio nastalega kompleksa (A<sup>550</sup>) že po 10 minutah. Tudi pri pripravi umeritvene »točke« nismo bili najbolj načelni. Tu smo absorbcio določali po 20 minutah. Kolikšna je dejanska vsebnost holesterola v mleku, z 1,6 % maščobe, če je prirast absorbcije takšna funkcija časa kot je razvidno iz grafa? (25 %)



$A = 0,92$       1,6%

$\rho_{UK} = 1415 \mu g / mL$


$87 \frac{\mu g}{mL} = M_{HOL}$

$217 \mu g \dots 2 mL$

$$\frac{217 \mu g}{100 mL} \times \frac{0,9}{0,7}$$

$$\frac{217 \mu g}{2 mL} \Rightarrow \boxed{\frac{10,9 \mu g}{100 mL}}$$

Nelogično je, da ima vzorec A z 3,2% maščobe ~~maščobe~~ <sup>maščobe</sup> holesterola  
kot vzorec B z 1,6% maščobe. Da, eksperiment bi pomnila.





# Pristopni kolokvij (Kvantitativna določitev holesterola v mleku)

Datum: 5.5. 2005

Ime in priimek: VESNA KUHAR 80%

✓ 1. V analizo dobiš dva vzorca mleka. Vzorec A vsebuje 3,2 % maščob, medtem ko je v vzorcu B 1,6 % maščob. Oba vzorca analiziraš na enak način. Vzameš 4 ml mleka, dodaš ustrezno količino KOH, etanola, vode ter 6 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 2 ml in določiš maso holesterola. V 2 ml heksanske faze določiš za vzorec A 140 µg, za vzorec B pa 180 µg holesterola. Izračunaj koliko holesterola vsebuje 100 ml mleka. Ali bi eksperiment ponovil? Utemelji! (50 %)

A ... 3,2% maščob => 10,5 µg hol.  
B ... 1,6% -||- => 13,5 µg hol.

4 ml mleko  
6 ml heksan

→ 2 ml

A ... 140 µg  
B ... 180 µg 50%

Ⓐ  $\frac{2 \text{ ml} \cdot 140 \mu\text{g}}{6 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 420 \mu\text{g}$

Ⓑ  $\frac{2 \text{ ml} \cdot 180 \mu\text{g}}{6 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 540 \mu\text{g}$

A)  $\frac{4 \text{ ml} \cdot 420 \mu\text{g}}{100 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 10500 \mu\text{g} = 105 \mu\text{g}$

B)  $\frac{4 \text{ ml} \cdot 540 \mu\text{g}}{100 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 13500 \mu\text{g} = 135 \mu\text{g}$

u 100 ml mleka je toliko holesterola.

OBENI! →

✓ 2. Heksan je pri sobni temperaturi zelo hlapen. Predpostavi, da je med potekom eksperimenta, preden si odvzel 2 ml heksanske faze za nadaljnjo analizo, odparel 1 ml heksana. Ali to vpliva na rezultat? Če vpliva, uporabi podatke iz prve naloge in izračunaj pravilne vrednosti! (20 %)

DA, VPLIVA.

0%

A)  $\frac{1 \text{ ml} \cdot 140 \mu\text{g}}{6 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 840 \mu\text{g}$

B)  $\frac{1 \text{ ml} \cdot 180 \mu\text{g}}{6 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 1080 \mu\text{g}$

$\frac{4 \text{ ml} \cdot 840 \mu\text{g}}{100 \text{ ml} \cdot \text{X}} = 21 \mu\text{g}$

$\text{X} = 27 \mu\text{g}$

Prave vrednosti holester. v 100 ml mleka.

$\frac{5}{2}$  in  $\frac{6}{2}$

✓ 3. Pojasni katere spojine bi se ekstrahirale v heksansko poleg holesterola, če mleka ne bi hidrolizirali s KOH! Odgovor utemelji! (15 %)

če mleka ne bi hidrolizirali s KOH, potem ne bi razbili triacilglicerolov, torej ne bi razcepili esterske vezi. Poleg holesterola bi se v heksansko (nepolarno) fazo ekstrahirale maščobne kisline, lipidi, maščobe, estri.

15%

✓ 4. Tik preden smo želeli izvesti vajo smo opazili, da nam je zmanjkalo dušika za odparevanje heksana, imamo pa jeklenko z argonom. Ali bi za odparevanje lahko uporabili argon? Utemelji! (15 %)

Da, lahko. Za odparevanje ne bi smeli uporabiti kinka, saj ima holesterol 2 reaktivni mesti: dvojno vez ter OH-skup. Ta bi s kisikom reagirala, z dušikom ali argonom pa ne.

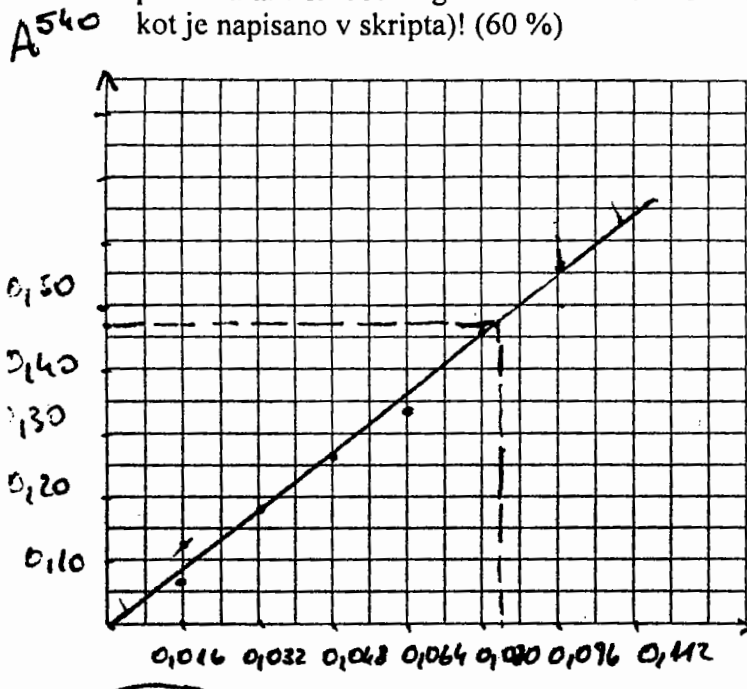
15%

Datum: 15.4.2003

Ime in priimek: Miha Jolaničič

75

1. Iz izmerjenih absorbanc pri 540 nm za raztopine znanih koncentracij glukoze nariši umeritveno krivuljo. S pomočjo umeritvene krivulje in ob upoštevanju razredčitve ter razmerja med molskima masama glukoznega preostanka v škrobu in glukoze določi delež škroba v moki (uporabi meritev, kjer smo postopek izvedli tako kot je napisano v skripta)! (60 %)



$$y_1 = \frac{\mu g}{V_{roz}} = \frac{0.14 \mu g}{25 ml} = 0.016 \mu g ml^{-1}$$

$$y_2 = 0.032 \mu g ml^{-1}$$

$$y_3 = 0.048 \mu g ml^{-1}$$

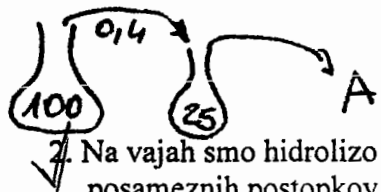
$$y_4 = 0.064 \mu g ml^{-1}$$

$$y_5 = 0.080 \mu g ml^{-1}$$

$$y_6 = 0.096 \mu g ml^{-1}$$

$$y_7 = 0.112 \mu g ml^{-1}$$

~~0.084~~  $y_{u\text{ v moki}} = 0.084$   
 $\mu_{škroba} = y \cdot V = 525 \mu g$



$$y_1 \cdot V_1 = y_2 \cdot V_2$$

$$y_2 = \frac{y_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{0.084 \mu g \cdot 25 ml}{100 ml} = 0.021 \mu g ml^{-1}$$

2. Na vajah smo hidrolizo škroba izvajali na različne načine. Naš namen je bil, da ugotovimo pomen posameznih postopkov (dodatek kisline, segrevanje, prisotnost encimov) na uspešnost hidrolize. Napiši izmerjene absorbance in komentiraj pomen posameznih postopkov za uspešen potek hidrolize! (40 %)

Dodatek HCl	Kuhanje	Encimska hidroliza	A <sup>540</sup>
✓	✓	✓	0.1471
✓	✓		0.1326
✓		✓	0.137
✓			0.1001
	✓	✓	0.377
	✓		0.1000
		✓	0.1111
			0.1000

% škroba =  $\frac{525 \mu g}{500 \mu g} \cdot 100 \cdot 0.9 = 94.5\%$

Če dodamo HCl in nato ugotovimo imamo več medij in ~~več~~ v le-tim, če ugotovimo razpršilo več škroba kot če ne ugotovimo. Encimski pa nato ugotovijo razpršilo dr glukoze ~~to~~ prehr kotere določimo škroba.

Če ne dodamo encimov določimo manj škroba, ker se ne ugotovijo ~~razpršilo~~ zama s kislino določimo le del glukoze ne pa vse. Ker pa to ugotovimo ne razpršilo, ugotovimo pa to bolje, ko to trdimo.

Če ne ugotovimo ugotovimo, ne določimo bolj ugotovimo ugotovimo na škroba (ne ugotovimo več ugotovimo ugotovimo škroba) zato določimo manj glukoze in posledično manj škroba. Pa tudi encimski ne morejo delovati škroba na molekularni se ne prej ko, ugotovimo na primerne fragmente zato določimo manj škroba.

Če dodamo encim HCl imamo dr razpršilo bolj določimo

Pristopni kolokvij (Kvantitativna določitev škroba v moki) 100%

Datum: 15.4. 2004

Ime in priimek: Miha Jelencič Skupina: Čet1 Čet2 Pet1 Pon1

1. Kateri od naslednjih odgovorov veljajo za škrob? Pravilne trditve obkroži! (15 %)

- a) škrob se encimsko hidrolizira v želodcu *ustih*
- b) amiloza in amilopektin sta monomera, ki sestavljata polimerne molekule škroba
- c) celuloza in škrob sta sestavljena iz enakih monomernih enot polimer
- d) škrob je boljši reducent kot glukoza
- f) vse monomerne enote v škrobu so povezane z  $\alpha$ -1,4 glikozidno vezjo in  $\beta$

15%

2. Izračunaj, koliko odstotkov škroba vsebuje moka, če si uporabil za analizo 0,80 g moka. Po končani kislini hidrolizi si hidrolizat razredčil na 50 ml in za encimsko hidrolizo odpipetiral 0,3 ml tega hidrolizata. Po končani encimski hidrolizi si k 0,3 ml hidrolizata dodal 1 ml 3,5-dinitrosalicilne kisline, segreval in razredčil z vodo do 35 ml ter prelil v kiveto. Iz umeritvene krivulje si odčital, da je koncentracija glukoze v kiveti 0,11 mg/ml. (50 %)

$M_{moka} = 0,80 \text{ g}$

$y_{v \text{ kiveti}} = 0,11 \text{ mg/ml}$

$y_{v \text{ bočiču}} = \frac{y_{v \text{ kiveti}} \cdot V_{\text{bočiču}}}{V_{\text{odpipir}}}$

$y_{v \text{ bočiču}} = \frac{0,11 \text{ mg} \cdot 35 \text{ ml}}{0,3 \text{ ml}} = 12,83$

$M_{\text{škroba}} = 12,83 \text{ mg/ml} \cdot 50 \text{ ml} = 641,6$

$W = \frac{641,6 \text{ mg}}{800 \text{ mg}} \cdot 100 \cdot 0,5 = 72,2\%$

50%

3. Pretvori v ustrezne enote! (20 %)

$10,0076 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} = 0,0076 \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} = 7,6 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 7,6 \cdot 10^{-6} \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$

$0,045 \frac{\text{mol}}{\text{min}} = 2,7 \cdot 10^6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{h}} = 0,75 \frac{\text{mmol}}{\text{s}}$

$0,0076 \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} = \frac{0,0076 \cdot 10^{-3}}{1000} = \frac{0,0076 \cdot 10^{-6}}{1000}$

$0,045 \frac{\text{mol}}{\text{min}} = 0,045 \cdot 10^6 \cdot 60 = 0,045 \cdot 10^3 \cdot 3600$

20%

4. Na vajah bomo izvajali kislno in encimsko hidrolizo škroba v moki. Po prvi fazi (kislina hidroliza) bomo vzorec nevtralizirali z NaOH. Zakaj? (15 %)

Zato da bomo nevtralizirali pH, da bodo encimi lahko optimalno delovali (da se ne bodo deaktivirali).

$\frac{100 \text{ g}}{\text{h}} = \frac{\text{m}}{\text{s}}$

15%



1. a) škrob se encimsko hidrolizira v tankem črevesu.

b) Amilaza in amilopektin sta sestavljena iz glukoznih enot.

✓ vse komponente škroba so topne v vodi. Amilopektin ni.

2. d) Škrob je boljši reducant kot glu. Samo glu je reducant.

e) vse monomerne enote v amilaze so povezane z  $\alpha$ -1,4-glikoz. vezjo.

2. Kako najaji hidroliziramo škrob?

• Naredili bomo kislo hidrolizo z HCl, nato pa bomo raztopino škroba neutralizirali z NaOH, zato, da bomo neutralizirali pH.

Drugače encimi ne bi mogli delovati, ker bi se denaturirali.

• Ker pa hidroliziramo škrob do glu samo s tem da najpogosteje rešetate, ker lahko pride tudi do razgradnje drugih polisaharidov, (ne samo škroba) ter razgradnje glu.

↳ zato je bolj zanesljiva kombinacija kislinske in ENZIMSKE razgradnje z:

\*  $\alpha$ -amilazo in } do glu, katere  
\* amiloglukozidazo }

konc. potisk kvasnit. dolečinov.

3. a) Škrob se encimsko hidrolizira v želodcu. V ustih in tankem črevesu.

b) Amilaza in amilopektin sta polisaharidi, ki sestavljata polimerni molekule škroba. Amilaza & amilopektin sta polimera, ki sestavljata polisaharid.

c) Celuloza in škrob sta sestavljena iz enakih monomerov.

d) Vse monomerne enote v škrobu so povezane z  $\alpha$ -1,4-glikozidno vezjo. Tudi z  $\alpha$ -1,6-glikoz. vezjo.

4. Najaji bomo najjali kislino in encimsko hidrolizo škroba nimski.

Pol. fazi (kislina hidroliza) bomo vnaprej neutralizirali z NaOH. Zakaj?

Da bomo neutralizirali pH, da bodo encimi lahko spon delovali.

↳ da ne bo prišlo do denaturacije.

• KUHANJE

• DODATEK HCl

### 5) 1.) ENCIJSKA HIDROLIZA

• Ko smo dodali vse to tujce, je nastalo majhen produkt, brez je A  
najbolj, kar je logično.

↳ HCl za cepitev vezi potrebuje visoko T, prav tako tudi encimi za  
krajšo reakcijo.

### 2.) KUHANJE, HCl:

Kuhanka hidroliza potrebuje kuhanje, da se cepijo vezi. A je dokaj  
visoka. ↳ nastanejo mal. oligosaharidi.

### 3.) HCl, ENCIJSKA HIDROLIZA:

Tu se študo hidroliza na račun encimov ni ne kisline,  
saj ta brez visjih temperatur ne cepi vezi. A je manjša,  
kot če bi delovali samo encimi, verjetno zato, ker se del  
encimov v kislini denaturira.

### 4.) HCl:

A = 0; ne nastane nič sladkorja.

HCl potrebuje ? T.

### 5.) KUHANJE, ENCIPI:

Ena možnost je uporaba bolj cepilj. HCl. HCl.

• α-amilaza cepi α-1,4-glikoz. vezi v utraupsti; amiloglukozidaza pa  
α-1,4-glikoz. vezi od konce oligosaharidov proti; α-1,6-glikoz. vezi  
bolj proti.

↳ kuhanje specif. akt. encima iz dodatno prespeši.

### 6.) KUHANJE:

Prislušan kuhanje ga zelo malo, skoraj nič ne hidroliza.

### 7.) ENCIPI:

Kot pri (5.), le da brez kuhanja, na

### 8.) Nič od tega:

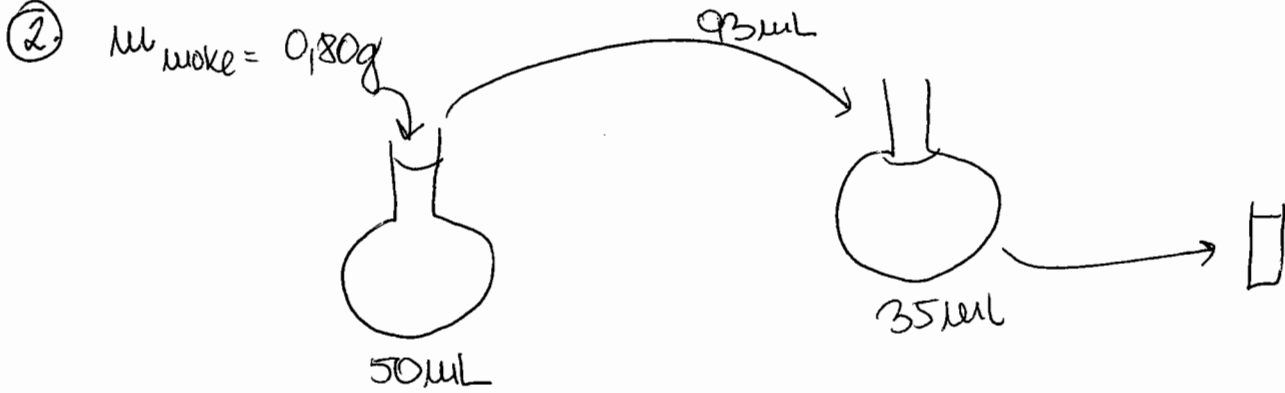
A = 0. Nastane ga popolnoma nič!

• Glu je način REDUCENT in  
reducira NITRO sk. R.

3,5-dinitrosalicilus vel  
do Amino sk.

↳ nastane manjšo  
obsevan produkt, ki  
omogoča spektrofotometri-  
čno določitev.

†



$$c_{\text{VK (KIVETA)}} = 0,11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$c_{\text{VK}} = c_{\text{VK}}(35 \text{ mL}) \quad c = \frac{m}{V}$$

$$m(35 \text{ mL}) = 0,11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 35 \text{ mL} = 3,85 \mu\text{g}$$

$$c(0,3 \text{ mL}) = \frac{3,85 \mu\text{g}}{0,3 \text{ mL}} = 12,83 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$c(0,3 \text{ mL}) = c(50 \text{ mL})$$

$$m(50 \text{ mL}) = 12,83 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 50 \text{ mL} = 641,67 \mu\text{g}$$

$$W(\text{AKCIO V MOKE}) = \frac{641,67 \mu\text{g} \cdot 0,9 \cdot 100\%}{0,18 \cdot 10^3 \mu\text{g}}$$

$$= \underline{\underline{72,21\%}} \quad (72,21)$$

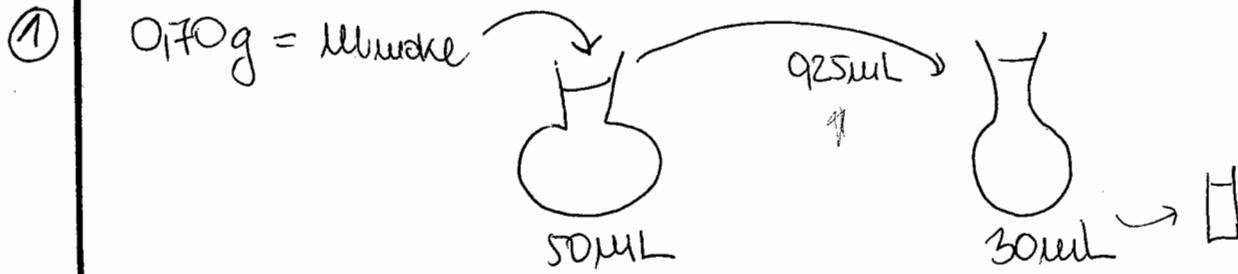
③ a)  $0,10076 \frac{\mu\text{g}}{\text{dm}^3} = 76 \cdot 10^{-2} \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 76 \cdot 10^{-6} \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$

$$= \frac{\cdot 10^{-3}}{10^3} \quad \frac{\cdot 10^3}{\cdot 10^3}$$

b)  $0,1045 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = 27 \cdot 10^5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{h}} = 0,75 \frac{\mu\text{mol}}{\text{s}}$

$$\cdot 10^6 \cdot 60 \quad \frac{\cdot 10^3}{\cdot 60}$$

# 4. Vauhit. določitev škroba v moki:



$$\rho_{\text{KIVETA}} = 0,11 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\rho_{\text{KIVETA}} = \rho(30\text{ mL}) = 0,11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$m = \rho \cdot V$$

$$= 0,11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 30\text{ mL} =$$

$$= 3,3 \mu\text{g}$$

$$W(\text{škroba v moki}) = \frac{a \cdot 0,9 \cdot 100}{b}$$

$$= \frac{660 \mu\text{g} \cdot 0,9 \cdot 100}{0,7 \cdot 103 \mu\text{g}} =$$

$$= \underline{\underline{84,9\%}}$$

$$\rho(0,25\text{ mL}) = \frac{3,3}{0,25} = 13,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\rho(0,25) = \rho(50)$$

$$m = 13,2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 50\text{ mL} =$$

$$m = \underline{\underline{660 \mu\text{g}}}$$

a... masa glu v vzorcu & razreditvami med

b... masa vzorca

0,9... koeficient razmerna velikosti mas glu. ostanka

W... delež škroba v moki

$$\uparrow \text{V KINET} \cdot \frac{25 \text{ mL} \cdot 100}{0.4 \text{ mL}} \Rightarrow \uparrow \text{V } 100 \text{ mL bucler}$$

$$\uparrow \text{V } 100 \text{ bucler} \cdot 100 \rightarrow \mu \text{ gln}$$

$$\text{Mskrob} = \mu \text{ gln} \cdot 0.9$$

## Dodatek k vaji določevanje škroba v moki

Optimalno izvajamo hidrolizo škroba tako kot je napisano v skripta.

Na vajah bomo pri določenih skupinah izpustili posamezne stopnje v postopku hidrolize škroba na glukozo z namenom, da bomo lahko ovrednotili pomen posameznih stopenj (dodatek kisline, kuhanje, encimska hidroliza).

Vajo bomo izvajali na 8 načinov

Skupina (ZATEHTA)	Dodatek HCl	Kuhanje	Encimska hidroliza	A <sup>540</sup>
1. Skupina (ZATEHTA 1)	✓	✓	✓	0,546 - 0,077 = 0,469
2. Skupina (ZATEHTA 1)	✓	✓		0,394
3. Skupina (ZATEHTA 2)	✓		✓	0,180 - 0,077 = 0,103
4. Skupina (ZATEHTA 2)	✓			0,00
5. Skupina (ZATEHTA 3)		✓	✓	0,346 - 0,077 = 0,269
6. Skupina (ZATEHTA 3)		✓		0,011
7. Skupina (ZATEHTA 4)			✓	0,188 - 0,077 = 0,111
8. Skupina (ZATEHTA 4)				0,001

### ZATEHTA 1

1. SKUPINA dodamo kislino, kuhamo, po nevtralizaciji dodamo encime
2. SKUPINA dodamo kislino, kuhamo, po nevtralizaciji nato namesto encimov dodamo vodo

### ZATEHTA 2

3. SKUPINA dodamo kislino, ne kuhamo, po nevtralizaciji dodamo encime
4. SKUPINA dodamo kislino, ne kuhamo, po nevtralizaciji dodamo namesto encimov vodo

### ZATEHTA 3

5. SKUPINA ne dodamo kisline, kuhamo, nevtralizacija ni potrebna, dodamo encime
6. SKUPINA ne dodamo kisline, kuhamo, nevtralizacija ni potrebna, namesto encimov dodamo vodo

### ZATEHTA 4

7. SKUPINA Škrob samo raztopimo (ne dodamo kisline, ne kuhamo), po nevtralizaciji dodamo encime
8. SKUPINA Škrob samo raztopimo (ne dodamo kisline, ne kuhamo), po nevtralizaciji dodamo namesto kisline vodo

*kol. hidroliza potrebuje visjo T, da se cepijoneži.*

*- škrob bolj donetau za hidrolizo, šku*

1	0,469
2	0,394
3	0,103
4	0,00
5	0,269
6	0,011
7	0,111
8	0,001

• ko raztopino mislimo ne segrevati, ne encimsko hidrolizirati, ne dodati  
HCl, mi razpadlo mič škroba ( $A=0.001$ )

↳ posledica eksper. napake

---



# Poročilo (Določitev škroba v moki)

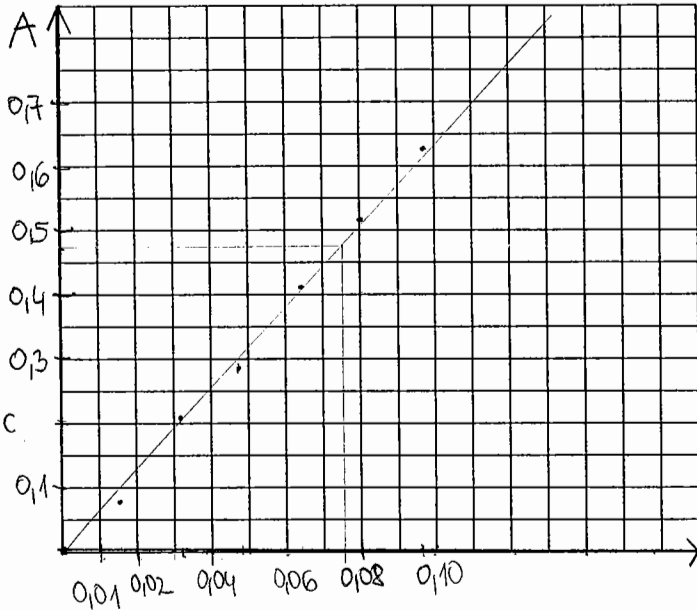
85

Datum: 25.4. 2005

Ime in priimek: VEJNA KUHAR

1. Iz izmerjenih absorbanc pri 540 nm za raztopine znanih koncentracij glukoze nariši umeritveno krivuljo. S pomočjo umeritvene krivulje in ob upoštevanju razredčitve ter razmerja med molskima masama glukoze in preostanka v škrobu in glukoze določi delež škroba v moki (uporabi meritev, kjer smo postopek izvedli tako kot je napisano v skripti)! (60%)

$$M_{moke} = 0,50g$$



$$0,076 \frac{mg}{ml} \cdot \frac{25ml}{0,14ml} \cdot 100 = \underline{\underline{475 \frac{mg}{ml}}}$$

↳ mglu

$$W(\text{škroba v moki}) = \frac{475mg \cdot 0,9 \cdot 100}{500mg} = \underline{\underline{85,5\%}}$$

60%

$$T_{VKMETI} = 0,076 \frac{mg}{ml}$$

2. Na vajah smo hidrolizo škroba izvajali na različne načine. Naš namen je bil, da ugotovimo pomen posameznih postopkov (dodatek kisline, segrevanje, prisotnost encimov) na uspešnost hidrolize. Napiši izmerjene absorbance in komentiraj pomen posameznih postopkov za uspešen potek hidrolize! (40%)

	Dodatek HCl	Kuhanje	Encimska hidroliza	A <sup>540</sup>
1	✓	✓	✓	0,469
2	✓	✓		0,394
3	✓		✓	0,103
4	✓			0,00
5		✓	✓	0,269
6		✓		0,1011
7			✓	0,1111
8				0,001

25%

(A=0,469)

- 1.) Ko namo dodali HCl, kuhali in encimsko hidrolizirali je nastalo največ produkta (A je najvišja) => HCl za cepten vezi potrebn. ↑ T, prav tako encimi => za hitrejšo reakcijo.
- Kadar škrob le segrevamo, ga zelo malo hidroliziramo, skoraj nič. (A = 0,1011)
  - če ga samo encimsko hidroliziramo, ga kar nekaj razpade, → ekopenim. neudar ne toliko, kot kombinacija s kuhanjem in dodatkom m. kislina
  - če dodamo samo HCl, ga ne razpade 0. kislinska hidroliza potrebuje njo temperaturo, da se vezi vezi. Zato je HCl & skupaj s kuhanjem zelo uspešna (A = 0,394)
  - škrob je bolj doveten za hidrolizo z encimi, če vnetopno segrevamo, saj neud, da povisava temp. pospeši hitrost razpadanja škroba. nastanilo več produkta (A = 0,269)

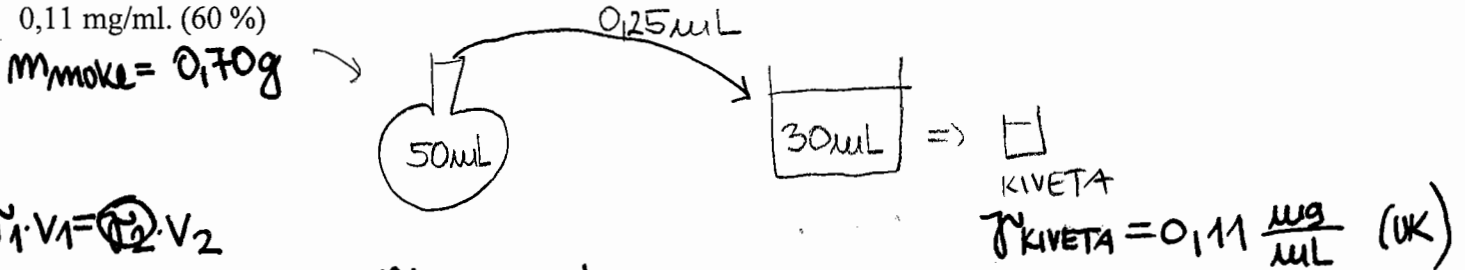


✓ 1. Kateri od naslednjih odgovorov veljajo za škrob? Pravilne trditve obkroži! (20 %)

- a) škrob se encimsko hidrolizira v tankem črevesu
- b) amiloza in amilopektin sta sestavljena iz glukočnih enot
- c) vse komponente škroba so topne v vodi
- d) škrob je boljši reducent kot glukoza
- e) vse monomerne enote v amilozi so povezane z  $\alpha$ -1,4 glikozidno vezjo

74%

✓ 2. Izračunaj, koliko odstotkov škroba vsebuje moka, če si uporabil za analizo 0,70 g moke. Po končani kislini hidrolizi si hidrolizat razredčil na 50 ml in za encimsko hidrolizo odpipetiral 0,25 ml tega hidrolizata. Po končani encimski hidrolizi si k 0,25 ml hidrolizata dodal 1 ml 3,5-dinitrosalicilne kisline, segreval in razredčil z vodo do 30 ml ter preli v kiveto. Iz umeritvene krivulje si odčital, da je koncentracija glukoze v kiveti 0,11 mg/ml. (60 %)



$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

$c_2 = \frac{c_1 V_1}{V_2} = \frac{0,11 \frac{mg}{ml} \cdot 30ml}{0,25 ml} = 13,2 \frac{mg}{ml}$

$c(0,25ml) = c(50ml)$

$c = \frac{m}{V}$

60%

$m = c \cdot V_{vsecke} = 13,2 \frac{mg}{ml} \cdot 50ml = 660 mg$

$n(\text{škroba v moki}) = \frac{660mg \cdot 0,9 \cdot 100\%}{700mg} = 84,86\%$

✓ 3. Pojasni kako bomo na vaji hidrolizirali škrob! (20 %)

Naredili bomo kislinsko hidrolizo z HCl, nato pa bomo raztopino škroba neutralizirali z NaOH, zato, da bomo neutralizirali pH. Drugače encimi ne bi mogli delovati, ker bi se denaturirali.

→ kateri encimi

↳ najprej bomo zatehtali določeno maso moke, nato naredili kisl. hidrolizo, hidrolizat bomo razredčili in nekaj tega hidrolizata odpipetirali. Po končani encimski hidrolizi bomo k hidrolizatu dodali 3,5-dinitrosalicilno kisl. segrevali in razredčili z dest. vodo. Nato bomo prešli v kiveto in fotometrično (merili absorbanco). Naredili bomo še umeritveno krivuljo in odčitali koncentracijo glukoze v kiveti.

Datum: 20.5. 2004

Ime in priimek: Miha Jolanič

30%

1. 700 mg sojine moke suspendiraš v ekstrakcijskem pufu (skupen volumen suspenzije je 70 ml). Po končani ekstrakciji odvzameš 1 ml ekstrakta (suspenzije) in ga preliješ v 25 ml bučko ter razredčiš z destilirano vodo. Nato narediš test encimske aktivnosti tripsina (tripsin+ substrat+ voda) in primerjaš dobljeno absorbanco po desetih minutah z meritvijo kjer si poleg tripsina in substrata namesto vode dodal 1,5 ml razredčenega ekstrakta. V epruveti kjer si imel samo tripsin in substrat je absorbanca pri 410 nm 0,38. V primeru, ko si poleg encima in substrata dodal še ekstrakt je absorbanca pri 410 nm 0,11!

- Izračunaj koliko tripsinskih enot vsebuje 1 mg soje (TIU/mg), ! (40 %)
- Ali je meritev dobro izpeljana. Če so potrebne kakšne spremembe v izvedbi eksperimenta, predlagaj, kaj bi bilo potrebno narediti, da bi bil rezultat bolj pravilen? (20 %)

700mg / 70ml  
 25ml 1,5ml  
 700mg ... 700mg  
 1ml moku ... 1 ml  
 M = 70 mg  
 70mg ... 25ml  
 x ... 1,5ml

$A_1 = 0,11$   
 $A_2 = 0,38$

$TIU = \frac{A_2 - A_1}{0,01} = 27 TIU$

$TIU/mg\ moku = \frac{27 TIU}{0,6mg} = 45 TIU$

• Ekstrakt bi moral biti bolj razredčen

60%

$M\ moku = 0,6mg$

2. Tripsinski inhibitor iz soje je (20 %)

- a) majhna organska molekula, ki se veže na tripsin.
- b) protein.
- c) dober kelator za  $Cu^{2+}$  ione, ki so kofaktorji tripsina.
- d) kovalentno modificirana aminokislina.
- e) pomemben člen obrambe rastline pred škodljivci

20%

3. V soji določamo aktivnost tripsinskega inhibitorja na način, ki je opisan v skripta. Ali se izmerjena aktivnost tripsinskega inhibitorja v TIU enotah razlikuje od prave vrednosti, če sojin ekstrakt poleg tripsinskih inhibitorjev vsebuje tudi proteine, ki so podobno kot BAPNA substrat za tripsin. Peptidi, ki so produkti reakcije ne absorbirajo pri 410 nm kjer merimo količino nastalega produkta iz substrata BAPNA. Pojasni ali to vpliva na izmerjeno aktivnost tripsinskega inhibitorja in odgovor utemelji! (20 %)

~~to vpliva na rezultat, ker je BAPNA in podobni substrati in reakcija preko katerega izpeljemo meritev encimske aktivnosti. Reakcija od avtomatičnega razkroja AA razkroja avtomatičnega, če imamo še druge prave substrate.~~

↑ A  
 ① substrat

② 2 substrata

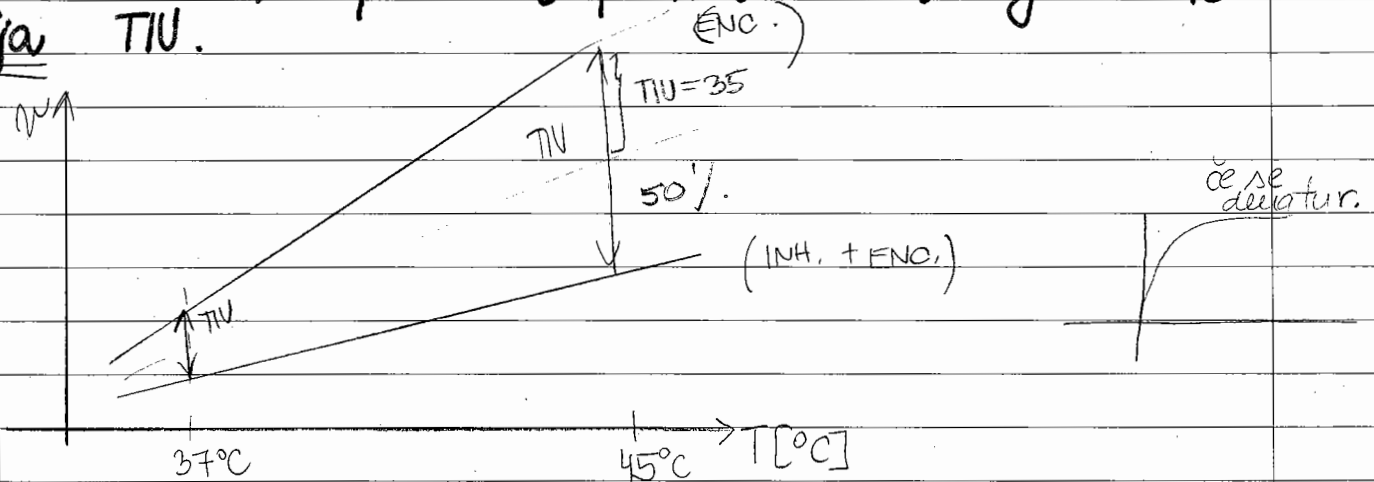
ker mora reagirati z njima A

Kaj meniš koliko TIU bi došlo v vzorcu v primerjavi s pravo me-  
 delavostjo, če bi termostats nastavil na 45°C in ne na 37°C?  
 ① Pri 45°C se miti tripsini miti trp. inhibitor ne denaturirata?

Utemelji!

Mi vsi TIU je aktivnost encima večja, hitrost reakcije se pospeši,  
 nastane več produkta. (če mi preseževa T, kjer se encim dena-  
 turirajo).

↳ nastalo bi več produkta, s tem bi bila večja A ter  
 večja TIU.



② a) tripsin je bolj aktiven v bazičnem kot v slabo kislem pH. ✓ DA

b) tripsinski inhibitor iz soja razgrajuje substrat BAPNA, vendar počasneje  
 kot tripsin. X NE

↳ Trp. inhibitor zavira delovanje tripsina, ne razgrajuje BAPNA.

c) tripsin je pomemben člen obrambe rastline pred škodljivci. X NE

↳ Trp. inhibitor je pomemben člen obrambe rastlin pred insekti.

d) Del tripsinskih inhibitorjev iz soje se denaturirata v kislem pH. Če reakc.  
 zmes v kateri so soji ekstrakt, tripsin in BAPNA nakisamo z ocetno k.,  
 bo nastalo več obarvanega produkta kot, če me tega naredimo. X NE

③ Ali se izboljša aktivnost tripsinskega inhibitorja v TIU evotah različne  
 odprave medlasti, če so ekstrakt poleg trips. inhibitorjev vsebuje tudi  
 encime, ki so podobni kot tripsin razgrajujejo BAPNA, a niso inhibirani  
 s trips. inhibitorji. Ali to vpliva na izboljšano aktivnost trips. inhibitorja  
 ni utemelji! Da, nima vpliva na izboljšano aktivnost.

↳ Ker ti encimi niso inhibirani preko trips. inhibitorjev, ne razgradi  
 več substrata BAPNA, torej bo A večja ter večja trips. inhibitorja  
 manjša, kot pa če soji ekstrakt vsebuje samo tripsin.

↳ V tem primeru bi se odcepilo manj p-uitroamiluma, večja  
 bi bila vsebnost tripsin. inhibitorja.

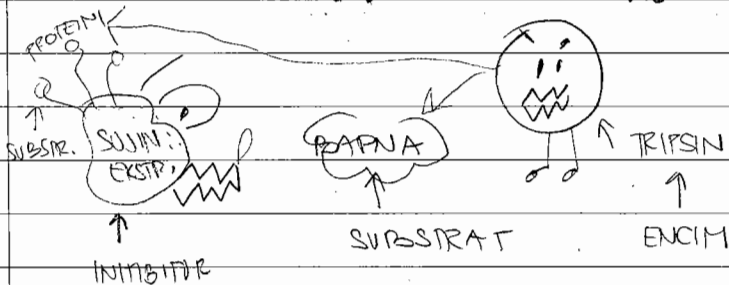
A je \_\_\_\_\_ 2

tripsin inhibitor iz soje je:

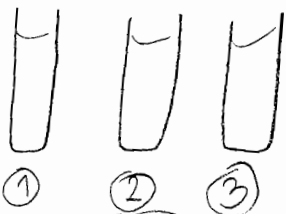
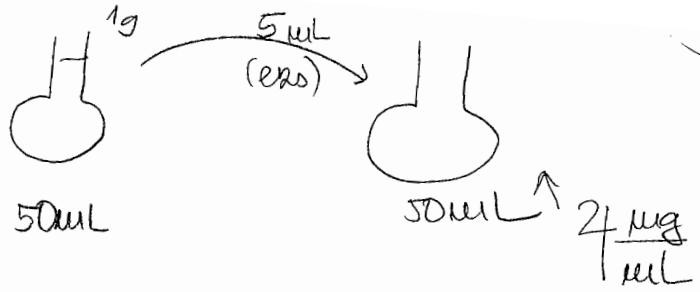
- ④ a) majhna org. molekula, ki se veže na tripsin
- b) protein
- c) dober kelator za  $\text{Cu}^{2+}$  ione, ki so kofaktorji tripsina
- d) kovalentno modifikirana AK
- e) pomemben člen obrambe rastlin pred škodljivci

⑤ Za boljše rezultate pri izračunu TIU/mg: Ekstrakt bi moral biti bolj razredčen.

⑥ V soji določamo akt. trip. inhib. Ali se izmenjuje aktivnost trip. inhibicije v UTN evotah različije od prave medustri, če so in ekstrakt preg. trip. inhibitorjev različije še proteine, ki so podobni kot BAPNA substrat za tripsin. Peptidi, ki so produkti reakcije ~~ne~~ absorbirajo pri 410nm tjer moramo kol. nastalega produkta iz substrata BAPNA. Ali to vpliva na izmenjevo aktivnost + inhibitorja in utemelji! Da, vpliva. Ker mora tripsin razgrajevati 2 substrata, je na koncu manj produkta, torej manjša A, kot če bi razgrajeval samo 1 substrat. Dobimo različno A. A je logično?



④  $V = 50 \text{ mL}$   
 $5 \text{ mL ekstrakt} = V$

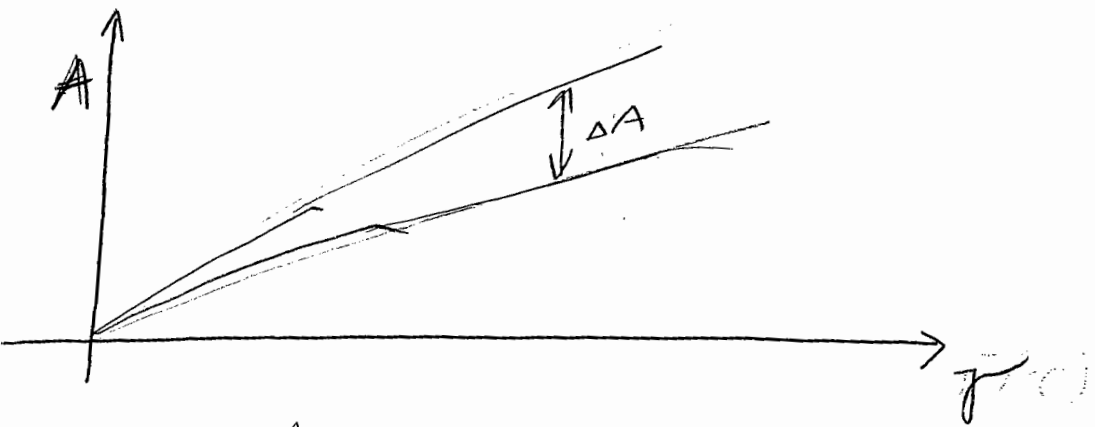


ENCIM + EKSTRAKT  
 ↓  
 manj p-nitroanilina

2 mL VODA + ENCIM  
 ↓  
 NI INHIBICIJE  
 ↳ največja možna kol. p-nitroanilina

Thyrsin razgr. substrat  
 ↓  
 nastaja p-nitroanilin  
 Rumena

$\Delta A \Rightarrow 40\% - 60\%$  relativne A p-nitroanilina  
 v 10 min



$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{1g}{50mL} = 20 \frac{\mu g}{mL}$$

$$m = \rho \cdot V = 20 \cdot 5 = 100 \mu g$$

$$0,8 \frac{\mu g}{mL}$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{100}{50} = 2 \frac{\mu g}{mL} \Rightarrow m = \rho \cdot V = 2 \frac{\mu g}{mL} \cdot 2 mL = 4 \mu g$$

$$ATI_{10} = \frac{0,501 - 0}{0,01} = 50,1 TIU$$

$$\frac{TIU}{\mu g} = \frac{50,1}{4} = 12,5 \frac{TIU}{\mu g}$$

→ če namesto 1 mL naredimo 5 mL ekstrakta, se razgradi encimsko manj produkta in je tudi manjša absorbanca, kar pomeni manjši TIU/μg.

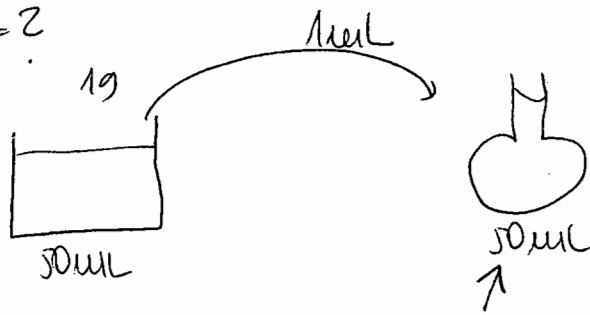
3.

1mg soje  
1ml mercur. ekstr.

$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ mg soje} \\ 1 \text{ ml mercur. ekstr.} \end{array} \right\} \text{TIU} = 2$

1g soje  
+ 50ml NaOH

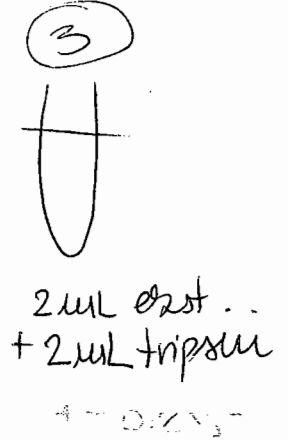
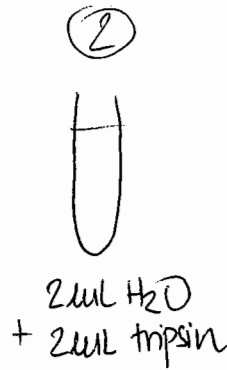
Ves



3 epruvete

1ml :  $A_{TRIP} = 0,1501$   
 $A_{TRP. EKST.} = 0,246$

$V(\text{tripsin}) = \underline{\underline{2 \text{ mL}}}$   
EKST.



$\text{TIU} = \frac{0,1501 - 0,246}{0,01} = 25,5 \text{ TIU}$

$\frac{\text{TIU}}{\text{mg}} = \frac{25,5 \text{ TIU}}{0,8 \text{ mg}} = \underline{\underline{31,9 \text{ TIU/mg}}}$  ✓

$\frac{\text{TIU}}{\text{mL}} = \frac{25,5 \text{ TIU}}{2 \text{ mL}} = 12,75 \frac{\text{TIU}}{\text{mL}}$

$\rho = \frac{m}{V} = \frac{1g}{50 \text{ mL}} = \underline{\underline{20 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}}$

$\rho(50 \text{ mL}) = \rho(1 \text{ mL})$   
 $m = \rho \cdot V = 20 \cdot 1 = 20 \text{ mg}$

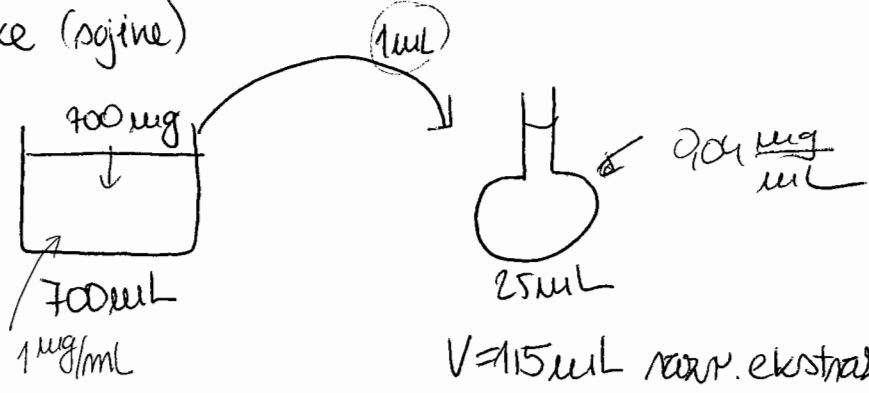
$\rho' = \frac{20}{50} = \underline{\underline{0,4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}}$

$m(\text{ekstr.}) = \rho' \cdot V = 0,4 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 2 \text{ mL} = \underline{\underline{0,8 \text{ mg}}}$

$\rho_1 V_1 = \rho_2 V_2$   
 $\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} =$

$= \frac{12,75 \text{ TIU/mL} \cdot 50 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = \underline{\underline{637,5 \frac{\text{TIU}}{\text{mL}}}}$  ✓

3.  $m = 700 \mu\text{g}$  make (sojine)



$$A_1 = 0.38$$

$$A_2 = 0.11$$

• TIU/ $\mu\text{g}$  ...  $1 \mu\text{g} = ?$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{700 \mu\text{g}}{700 \text{ mL}} = 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\rho(700 \text{ mL}) = \rho(1 \text{ mL})$$

$$m = \rho \cdot V = 1 \mu\text{g}/\text{mL} \cdot 1 \text{ mL} = 1 \mu\text{g}$$

$$\rho(25 \text{ mL}) = \frac{1 \mu\text{g}}{25 \text{ mL}} = \underline{\underline{0.04 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}}$$

$$\text{TIU} = \frac{A_2 - A_1}{0.01} = \frac{0.38 - 0.11}{0.01} = 27 \text{ TIU}$$

$$m(15 \text{ mL}) = \rho \cdot V$$

$$= 0.04 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 15 \text{ mL}$$

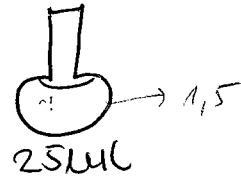
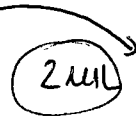
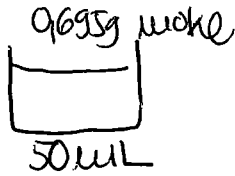
$$= \underline{\underline{0.06 \mu\text{g}}}$$

$$\frac{\text{TIU}}{\mu\text{g}} = \frac{27 \text{ TIU}}{0.06 \mu\text{g}} = \underline{\underline{450 \text{ TIU}/\mu\text{g}}}$$

### 3. Določanje aktivnosti tripsin. inhibitorja v soji:

①

0,695g sojine moko  
V=50ml



t=10 min

1,5ml ekstrakt

+ tripsin  
+ substrat  
+ voda

A=0,145

+ tripsin  
+ substrat  
+ ekstrakt (inhib.)

A=0,24

• Koliko TIU/mg vsebuje 1mg soje?

$$TIU = \frac{A_2 - A_1}{0,01}$$

$$\frac{TIU}{mg} = \text{---}$$

$$TIU = \frac{0,45 - 0,24}{0,01} = 21 \text{ TIU}$$

0,695mg ...

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{0,695 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} = 13,9 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$m = \rho \cdot V = 13,9 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 2 \text{ mL} = 27,8 \text{ mg}$$

$$\rho(50 \text{ mL}) = \rho(2 \text{ mL})$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{27,8 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} = 1,112 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \quad (V 25 \text{ mL})$$

$$m = \rho \cdot V = 1,112 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 1,5 \text{ mL} = 1,668 \text{ mg}$$

$$\frac{TIU}{mg} = \frac{21}{1,668} = 12,16 \frac{TIU}{mg}$$

②

$$\frac{1143 \text{ mg}}{\mu\text{L}} = \frac{10^{-3} \text{ g}}{10^{-6} \text{ m}^3} \cdot \frac{1}{\text{m}^3} = 1143 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{L}} = \frac{10^{-6}}{10^{-6}} \frac{\text{g}}{\mu\text{L}}$$

$$= 1143000 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 1143 \cdot 10^6 \frac{\text{g}}{\mu\text{L}}$$

$$\checkmark \text{ m}^3 \cdot 10^3 \cdot \text{dm}^3 \checkmark$$

$$\checkmark \frac{\text{g}}{\mu\text{L}} \checkmark$$



2.) če vzamemo 5 mL, je absorbanca večja, ker nastane ~~več~~ <sup>več</sup> produkta; če pa vzamemo toliko mL kot na vaji, pa je ~~več~~ <sup>več</sup> produkta in s tem ~~več~~ <sup>manjša</sup> A. (ker TIV je večja)

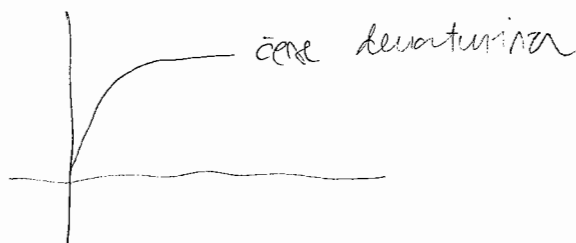
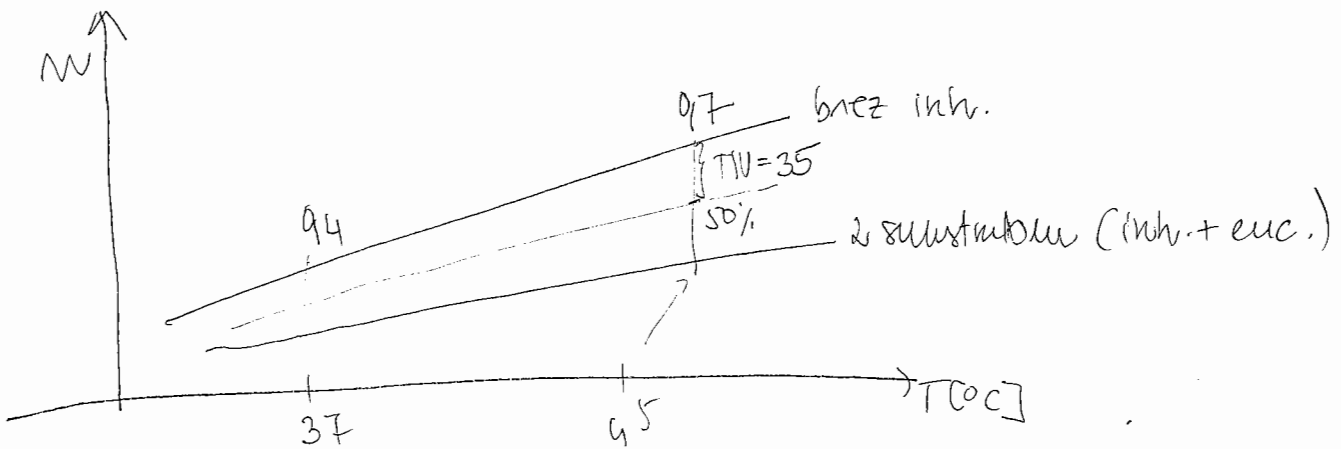
2.) če vzamemo 5 mL, je absorbanca manjša, ker nastane manj produkta in je tako TIV večja. Če pa vzamemo 1 mL kot na vaji, pa je več produkta in s tem večja absorbanca ter manjša TIV.

$$A = 0,501 - 0,128 = 0,373$$

$$TIV = \frac{A \cdot R \cdot l}{0,01}$$

$$10 \frac{1}{5}$$

3)





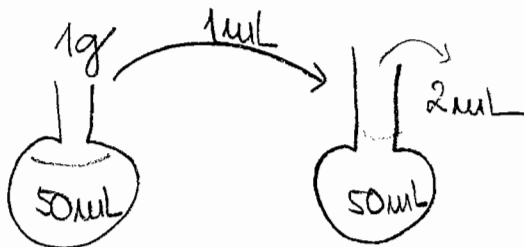
# Poročilo (Določanje aktivnosti tripsinskega inhibitorja v soji)

Datum: 18.4. 2005

Ime in priimek: Vesna Kuhar

80%

✓ Izračunaj koliko enot encimske aktivnosti vsebuje 1mg moke in koliko enot encimske aktivnosti vsebuje 1 ml nerazredčenega ekstrakta! (60 %)



$$TIU = \frac{0,501 - 0,246}{0,01} = 25,5 \text{ TIU}$$

$$\frac{1000 \mu\text{g} \cdot 50 \text{ mL}}{x \cdot 1 \text{ mL}} = 20 \mu\text{g}$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{20 \mu\text{g}}{1 \text{ mL}} = 20 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\frac{TIU}{\mu\text{g}} = \frac{25,5 \text{ TIU}}{0,8 \mu\text{g}} = 31,9 \frac{\text{TIU}}{\mu\text{g}}$$

$$\rho(50 \text{ mL}) = \rho(1 \text{ mL})$$

$$\rho_1 V_1 = \rho_2 V_2$$

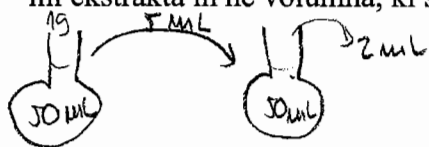
$$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{20 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 1 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 0,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$m = \rho \cdot V = 0,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 2 \text{ mL} = 0,8 \mu\text{g}$$

60%

$$\frac{TIU}{\text{mL}} = \frac{25,5 \text{ TIU}}{2 \text{ mL}} \cdot \frac{50}{1} = 637,5 \frac{\text{TIU}}{\text{mL}}$$

2. ✓ Pojasni in izračunaj koliko inhibitorskih enot tripsinske aktivnosti bi določil, če bi v 50 ml bučki razredčil 5 ml ekstrakta in ne volumna, ki si ga uporabil na vajah! (20 %)



$$\frac{1000 \mu\text{g} \cdot 50 \text{ mL}}{x \cdot 5 \text{ mL}} = 100 \mu\text{g}$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{100 \mu\text{g}}{5 \text{ mL}} = 20 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\rho_1 V_1 = \rho_2 V_2 \Rightarrow \rho_2 = \frac{20 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 5 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 2 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$m = \rho \cdot V = 2 \cdot 2 = 4 \mu\text{g}$$

$$\frac{0,373}{0,01} = 37,3 \text{ TIU}$$

$$\frac{TIU}{\mu\text{g}} = \frac{37,3 \text{ TIU}}{4 \mu\text{g}} = 9,3 \frac{\text{TIU}}{\mu\text{g}}$$

OBRENI! →

$$\rho = 2 \mu\text{g}/\text{mL}$$

3. ✓ Kaj meniš koliko TIU bi določil v vzorcu v primerjavi s pravo vrednostjo, če bi termostat nastavljal na 45 °C in ne na 37 °C. Pri 45 °C se niti tripsin niti tripsinski inhibitor ne denaturirata: Odgovor obvezno utemelji! (20 %)

Pri višji temperaturi je aktivnost encima večja, hitrost reakcije se pospeši, nastane več produkta. (če ni presežena temperatura, kjer se encimi denaturirajo)

10%

↳ nastalo bi več produkta, o tem bi bila večja absorbanca, ter manjša TIU. → Ker se ob ZRASTU



# Pristopni kolokvij (Določanje aktivnosti tripsinskega inhibitorja v soji)

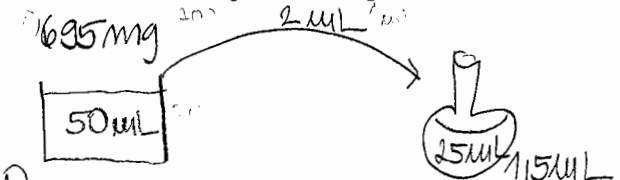
Datum: 15.4.2005

Ime in priimek: VESNA KUHAR

90%

1. 0,695 g sojine moke suspendiraš v ekstrakcijskem pufru (skupen volumen suspenzije je 50 ml). Po končani ekstrakciji odvzameš 2ml ekstrakta (suspenzije) in ga preliješ v 25 ml bučko ter razredčiš z destilirano vodo. Nato narediš test encimske aktivnosti tripsina (tripsin+ substrat+ voda) in primerjaš dobljeno absorbanco po desetih minutah z meritvijo kjer si poleg tripsina in substrata namesto vode dodal 1,5 ml razredčenega ekstrakta. V epruveti kjer si imel samo tripsin in substrat je absorbanca pri 410 nm 0,45. V primeru, ko si poleg encima in substrata dodal še ekstrakt, je absorbanca pri 410 nm 0,24.

- Izračunaj koliko tripsinskih enot vsebuje 1mg soje (TIU/mg), ! (45%)



$$A_2 = 0,45$$

$$A_1 = 0,24$$

$$4) TIU = \frac{0,45 - 0,24}{0,01} = 21 TIU$$

$$TIU/mg = \frac{21 TIU}{1,668 mg} = 12,6 TIU/mg$$

1) 0,695 mg / 50 mL = X / 2 mL

$$X = 27,8 \mu g$$

3)  $\rho(50 mL) = \rho(2 mL) \Rightarrow \rho = \frac{m}{V} = \frac{27,8}{2} = 13,9 \frac{\mu g}{mL}$

$$m = \rho \cdot V = 13,9 \cdot 1,5 = 20,85 \mu g$$

$$V_1 \cdot \rho_1 = V_2 \cdot \rho_2$$

$$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{13,9 \cdot 2}{25} = 1,112 \frac{\mu g}{mL}$$

2. Obkroži da ali ne! (20%; za nepravilen odgovor se v okviru naloge odbije 5%)

Tripsin je bolj aktiven v šibko bazičnem kot v šibko kislem pH.	= 8,2	<input checked="" type="radio"/> da	<input type="radio"/> ne
Tripsinski inhibitor iz soje razgrajuje substrat BAPNA, vendar počasneje kot tripsin.	10%	<input type="radio"/> da	<input checked="" type="radio"/> ne
Tripsin je pomemben člen obrambe rastline pred škodljivci.		<input type="radio"/> da	<input checked="" type="radio"/> ne
Del tripsinskih inhibitorjev iz soje se denaturira v kislem pH. Če reakcijsko zmes v kateri so sojin ekstrakt, tripsin in BAPNA nakisamo z očetno kislino, bo nastalo več obarvanega produkta kot, če tega ne naredimo.		<input checked="" type="radio"/> da	<input checked="" type="radio"/> ne

3. V soji določamo aktivnost tripsinskega inhibitorja na način, ki je opisan v skripta. Ali se izmerjena aktivnost tripsinskega inhibitorja v TIU enotah razlikuje od prave vrednosti, če sojin ekstrakt poleg tripsinskih inhibitorjev vsebuje tudi encime, ki so podobno kot tripsin razgrajujejo substrat BAPNA, a niso inhibirani s tripsinskimi inhibitorji. Pojasni ali to vpliva na izmerjeno aktivnost tripsinskega inhibitorja in odgovor utemelji!

(20%) Da, to vpliva na izmerjeno aktivnost, ker ti encimi niso inhibirani preko tripsinskih inhibitorjev, se razgradi več substrata BAPNA, torej bo absorbanca večja in vsebnost tripsinskega inhibitorja manjša, kot pa če sojin ekstrakt vsebuje samo tripsin. => V tem primeru bi se odcepilo nekaj p-nitroanilina, večja vsebnost trips inhibitorja.

4. Pretvori! (15%)

$$1,43 \text{ mg/ml} = 1430$$

$$g/m^3 = 143 \cdot 10^4 \quad \mu g/l = 143 \cdot 10^{-6} \quad g/\mu l$$

$$143 \frac{\mu g}{mL} = \frac{10^3 \cdot 10^3}{10^3} \frac{g}{m^3}$$

$$1430 \frac{g}{m^3} = \frac{10^4}{10^3} \frac{\mu g}{L}$$

$$143 \cdot 10^4 \frac{\mu g}{L} = \frac{143}{10^6} \frac{g}{\mu L}$$

$$\frac{143 \cdot 10^4}{10^{12}} \frac{g}{\mu L}$$

15%

Datum: 8.4. 2004

Ime in priimek: Miljo Juhovič Skupina: Čet1 Čet2 Pet1 Pon1

1. Kakšen naboj bo imel ionski izmenjevalec, ki ga bomo uporabili pri vaji in zakaj? (15 %)

Imeli bomo anionski izmenjevalec, ker bo imel pozitivno nabojo, ker bo imel pozitivno nabojo, do bo vezal pozitivne ione in ostale org. kislina.

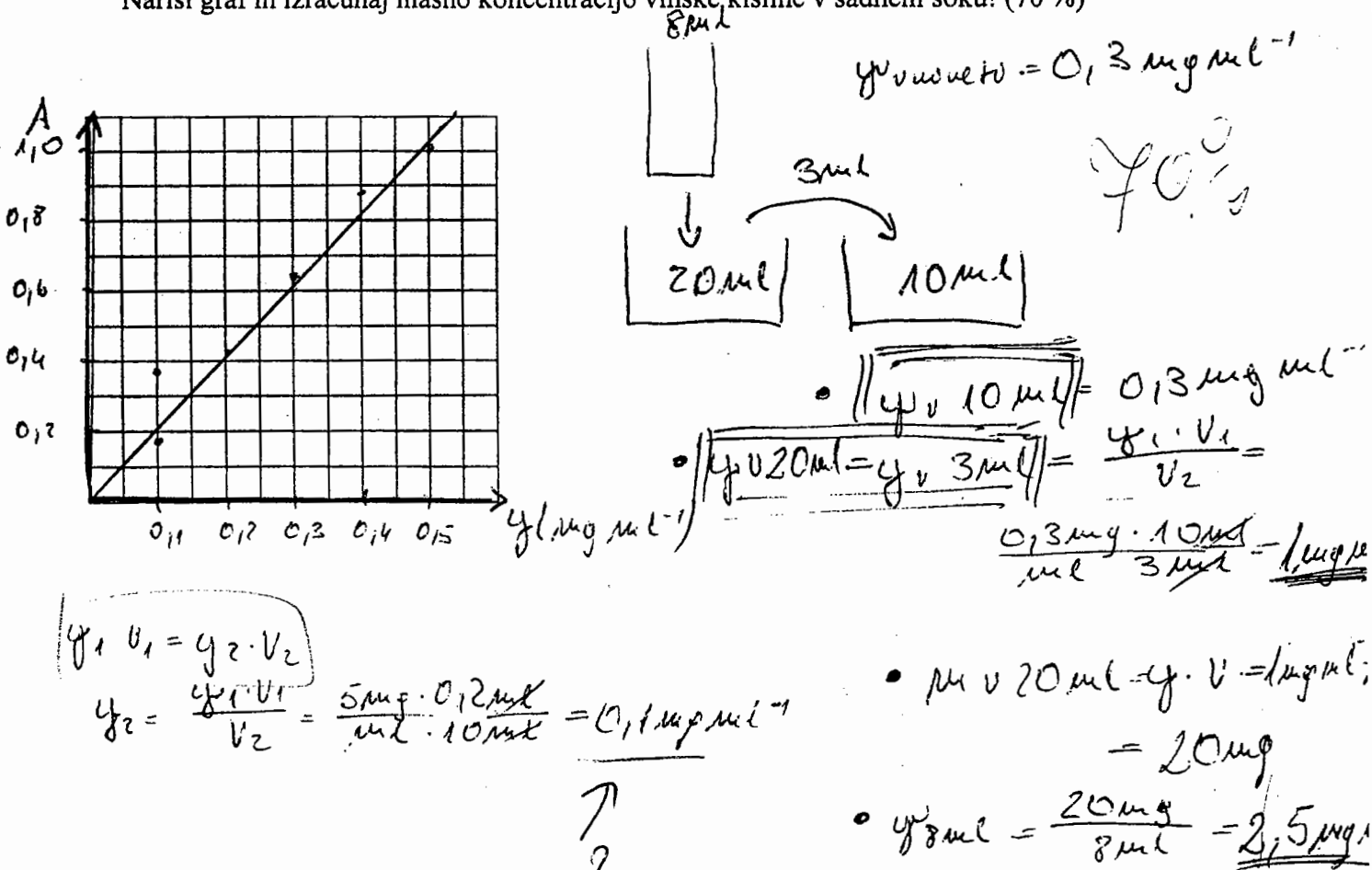
2. Zakaj bomo po dodatku perjodove kisline pri pripravi slepega vzorca dodali še glicerol? (15 %)

Glicerol bo ovrednotil perjodovni kislina, ker bo nevar ob prisotnosti motila. In bo imela metodo podzete s obavrovanjem slepega vzorca. Glicerol pa sego metastor ne nasti in go kolikor bolj uporabno so uvredniti metode perjodove kislina.

8 ml sadnega soka naneseš na kolono napolnjeno z ionskim izmenjevalcem Merck III. Nevezane komponente spreš z očetno kislino in vodo. Vežane kisline pa v 20 ml bučko s 7,1 % natrijevim sulfatom in dopolniš do oznake. Od eluata odvzameš 3 ml in dodaš vse potrebne reagente (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glicerol, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>), tako da je končni volumen 10 ml. Tako pripravljena raztopina ima absorbanco merjeno proti slepi probi 0,6. Vzporedno pripraviš tudi umeritveno krivuljo kjer odmeriš ustrezne volumne vinske kisline s koncentracijo 5 mg/ml (gle tabelo), dopolniš do 3 ml s 7,1 % natrijevim sulfatom in dodaš vse potrebne reagente, da je končni volumen 10 ml.

	0,1 ml	0,2	0,3	0,4	0,5
Dodatek stand. raztopine (5 mg/ml)	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml	1,0 ml
Absorbanca pri 530 nm	0,18	0,41	0,62	0,79	1,0

Nariši graf in izračunaj masno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku! (70 %)

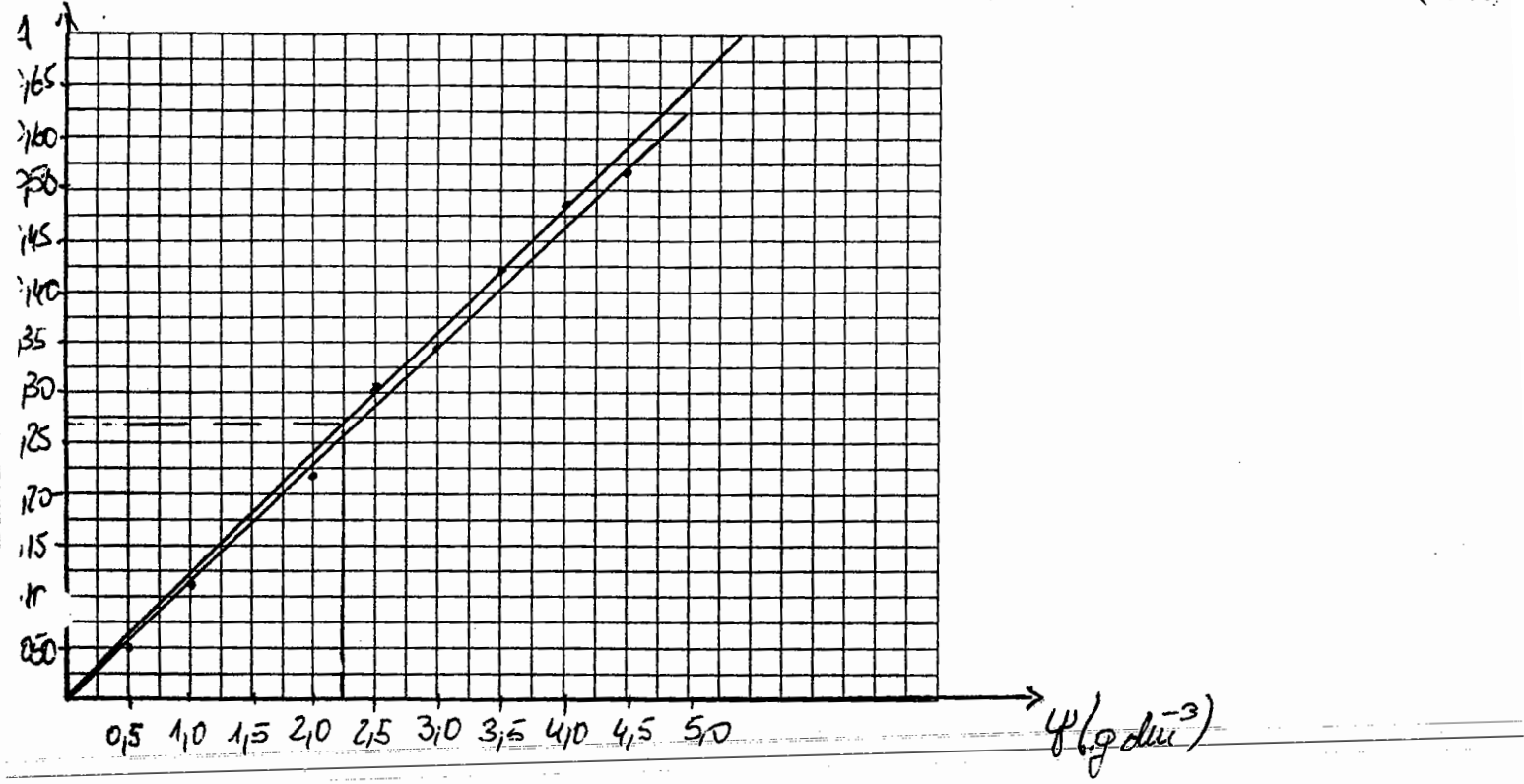


Datum: 8.4. 2004

Ime in priimek: Miha Jelončič

80%

1. Nariši umeritveno krivuljo in odčitaj (izračunaj) masno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku! (70 %)



$y = 2,25 \text{ g dm}^{-3} = \underline{2,25 \text{ mg ml}^{-1}}$

$A_{0.7} = \underline{0,263}$

70%

TO ŽE  
DELAMO

2. Pod določenimi pogoji bi tudi pri pripravi vzorca lahko dodali perjodovo kislino ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ). To je pogojeno vrstnim redom dodajanja raztopin. Kakšen bi moral biti vrstni red dodajanja, omeji se le na vzorec, perjodovo kislino in glicerol, da bi to lahko storil. Predlagan vrstni red obvezno utemelji! (15 %)

Prvi bi izmerili obzorbovanje vzorca nato pa bi dodali perjodot in glicerol. To bi bilo dobilo prvi obzorbovanje v urah org. kislin (Acid), nato pa bi dodali perjodot, da bi imeli vinski kislin in glicerol, bi imeli perjodot. Nato bi izmerili obzorbovanje ostalih kislin in iz različnih dobili obzorbovanje vinske kisline.  $A_{\text{vinske kisline}} = \text{Acid} - \text{Acid. kislin}$

3. Pred nanosom vzorca na kolono smo le to pomotoma spirali z raztopino natrijevega sulfata in ne s šibko očetno kislino. Pojasni kako bi to dejstvo vplivalo na rezultate analize in določitev koncentracije vinske kisline v sadnem soku, če bi po nanosu vzorca postopali enako kot pri vaji! (15 %)

Če bi to storili se ne bi vezole org. kisline na kolono, ker bi bilo ~~to~~ kisline premešane in če organske kisline (šibke) ne bi mogle izpodrinuti, kot bi se to storilo s šibko očetno kislino, momentu kotere se ne more ~~na~~ vezole na kolono. (Pravilo da, močno kisline izpodrine šibke ne bi bile mogoče izvesti.)

• Natrijev sulfat = sol  
močnejše kisl.

•  $\text{CH}_3\text{COOH}$  = slaba kisl.

• MERCK III = močno bazičen

2.) drugače bi npr. drugih kislin znižal A.  
Isto visoko OKS pri 2. vstopu z dodatkom  
prebitne perjodove

⑥) Pred namozom vzorca na kolono smo le to pomotoma spirali z raztopino  
natrijevega sulfata in ne s slabo acetno kisl. • Pjaskuj, kako bi to dejstvo  
vplivalo na rezultate analize in določitev konc. ninske kisline v  
sodium soku, če bi po namozu vzorca postopali enako kot na vaji!  
Organске kisline se ne bi vezale na kolono. (vinoka in mlečna),  
ker je natrijev sulfat sol močnejše kisl, in bi jih izpodrinil, da se adsorbirajo.  
Natrijev sulfat zaseda prostornike in se slabe kisl gor ne morejo vezati.  
↳ izpodrine natrij, ker je sol močnejše kisl.

⑦) Zakaj smo v postopku določevanja ninske kisl v sodu uporabili ionko  
izmenjevalno kromatografijo? Da, upamo v sodu soka določiti le visoko  
kisl, moramo iz sode soka odstraniti vse ostale sestavine pri določanju:  
sladkorje, fenole, glikole, barvila ter druge org. kisl. (mlečna, citronska, jabolkina)  
↳ zato uporabimo ustrezni bruski izmenjevalec v acetatni obl. MERCK III.  
↳ Acetna je slabšejsa od vinoke in mlečne, ki se adsorbirata na izmenjevalcu,  
reagira pa še vedno bolj kisl kot sladkorji, barvila, ... tako, da je tiste  
i mnogo izpodriniti z ion. izmenj.

↳ z MERCK III v acetat. obl. držimo popolno izp. močnejših spojin z 80 mL  
dest. vode. Na izmenjevalec vezane kisl eluiramo z NATRIJ. SULFATOM (sol močnejše kisl)

⑧) Zakaj smo v postopku določevanja ninske k. dodali perjodovo kisl.?  
Druge org. kisline znižajo A, ki jo daje sama vanadij. kisl. brez ninske kisl,  
čeprav je reakcija z  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  zelo specifična za visoko kisl.

↳ Da se vpliv drugih org. kisl izognemo, moramo visoko k. OKS pri 2. vstopu  
vstopu z dodatkom prebitne kisl. perjodove k. Preizkus te odstr. z jodidom.

\* Produkti reagiranja visoke k. (mlečična in formaldehid) ne dajejo z  
vanadijevo k. bistr. reakcij.

① Nijska kisl., ki smo jo zotekali za pripravo raztopin UK, je bila vlažna. Delež vlage v zatehni je bil 20 masnih %. izrač. dejansko vsebnost nijske kisl. v soku, če tega nijsko upoštevamo in smo predpostavili, da je bila v zatehni le nijska k.

$\mu = 3,22 \text{ mg/ml}$   $(100-20)\% = 80\%$

$$0,8 \cdot 3,22 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = \underline{\underline{2,576 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}}$$

② Predpostavi, da si se pri pripravi vseh tokov UK uotil in namesto 1 ml dodal 5 ml glicerola. Pri pripravi vzorca si postopal pravilno in dodal le 1 ml glicerola. Ali ta napaka vpliva na določeno konc. nijske kisl. v sadnem soku, če vesda glicerol ne daje barve reakcije & vavodjevo kisl. in ne absorbira pri valovi  $\lambda 530 \text{ nm}^2$  Utemelji!

- Pri merjenju A ne vpliva, vpliva pa pri korekcijah, saj moramo upoštevati barv. faktor.
- Konc. ostane nespremenjena, glicerol, ki je dodan vpliva le na vidnost.

③ Karkšen naboj bo imel ionski izmenjevalnik na vaji in zaradi?

Bo močno bazičen v acetatni obliki (MERCK III).

- ↳ ima pozitivni naboj, ker veže kationne ione nijske kisl. terione ostalih org. kislin v sadnem soku.
- ↳ Acetna k. je silnejša od mlečne k. in citronske k., ki se adsorbirata na ion. izmenjevalc., pa še vedno bolj kisl. kot sladkorji, fenolne spojine, barvila ( $\Rightarrow$  moteci elementi).

④ Zadej smo po dodatku periodone kisl. pri pripravi slepega vzorca dodali še glicerol?

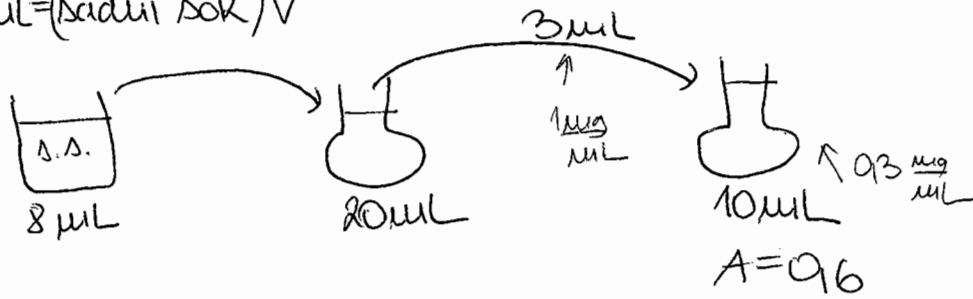
Glicerol odstrani presežek periodone kisl., ki bi sicer motila. Pri merjenju A bi dobili netočen podatek, oslepi probi.

↳ zato uporabimo glicerol, ki ni motec element, za uničevanje periodone kisl.

⑤ Pod določenimi pogoji bi tudi pri pripravi vzorca lahko dodali periodovo kisl. ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ). To je pogosto z nastanim redom dodajanja raztopin. Karkšen bi moral biti vrstni red dodajanja, omyi se le na vzorec, periodovo k. in glicerol. Utemelji!

1. vzorec
2. periodova (pred merjenjem A  $\rightarrow$ )
3. glicerol (za spiranje presežka periodove, ki bi sicer motila pri merjenju A)

②  $8 \text{ mL} = (\text{radni sok}) / V$



UK:  $\rho = 5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$   
 $V_K = 10 \text{ mL}$

UK:

$\rho_1 V_1 = \rho_2 V_2$

$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 0.2}{10} = 0.1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\rho_{UK} (A=0.6) = 0.3 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{0.3 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 10}{3} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$\rho(3 \text{ mL}) = \rho(20 \text{ mL})$

$m = \rho \cdot V = 1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 20 \text{ mL} = 20 \text{ mg}$

$\rho(8 \text{ mL}) = \frac{m}{V} = \frac{20 \text{ mg}}{8 \text{ mL}} = 2.5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

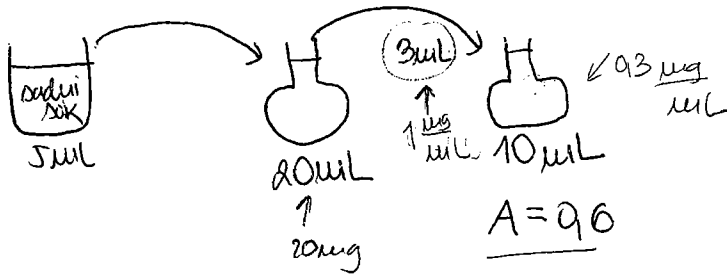
②

$5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	← mL
A	0.18	0.41	0.62	0.79	1.0	



## 2. Dodavanje niske konc. u sadrnu soju:

①  $5 \text{ mL} = (\text{sadni sok}) V$   
 $V = 20 \text{ mL}$



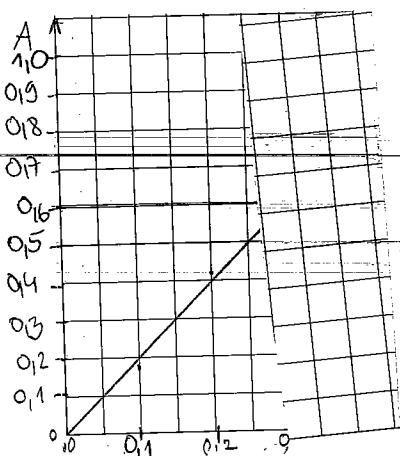
UK:  $5 \text{ µg/mL}$   
 $V = 10 \text{ mL}$

- ①    ②    ③    ④    ⑤

DODATEK STAND. RAZ. ( $5 \text{ µg/mL}$ )	0,2 mL	0,4 mL	0,6 mL	0,8 mL	1,0 mL
A 530	0,18	0,41	0,62	0,79	1,10

• Graf u konc. u sadrnu soju niske konc!

$\rho_1 = 5 \text{ µg/mL}$   
 $V_1 = ①②③④⑤$   
 $V_2 = 10 \text{ mL}$



$\rho = \frac{m}{V}$   
 $\rho_1 \cdot V_1 = \rho_2 \cdot V_2$   
 $\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{5 \text{ µg/mL} \cdot 0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} =$

$\rho(\text{UK}) = 0,3 \frac{\text{µg}}{\text{mL}}$

	$\rho \left( \frac{\text{µg}}{\text{mL}} \right)$	A
①	0,1	0,18
②	0,2	0,41
③	0,3	0,62
④	0,4	0,79
⑤	0,5	1,10

$(\text{u } 10 \text{ mL}) \Rightarrow 0,3 \frac{\text{µg}}{\text{mL}} \quad \rho_1 V_1 = \rho_2 V_2$

$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{0,3 \frac{\text{µg}}{\text{mL}} \cdot 10 \text{ mL}}{3 \text{ mL}} = 1 \frac{\text{µg}}{\text{mL}}$

$\rho(3 \text{ mL}) = \rho(20 \text{ mL})$

$m_{(20 \text{ mL})} = \rho \cdot V = 1 \frac{\text{µg}}{\text{mL}} \cdot 20 \text{ mL} = 20 \text{ µg}$

$\rho(5 \text{ mL}) = \frac{m}{V} = \frac{20 \text{ µg}}{5 \text{ mL}} = 4 \frac{\text{µg}}{\text{mL}}$



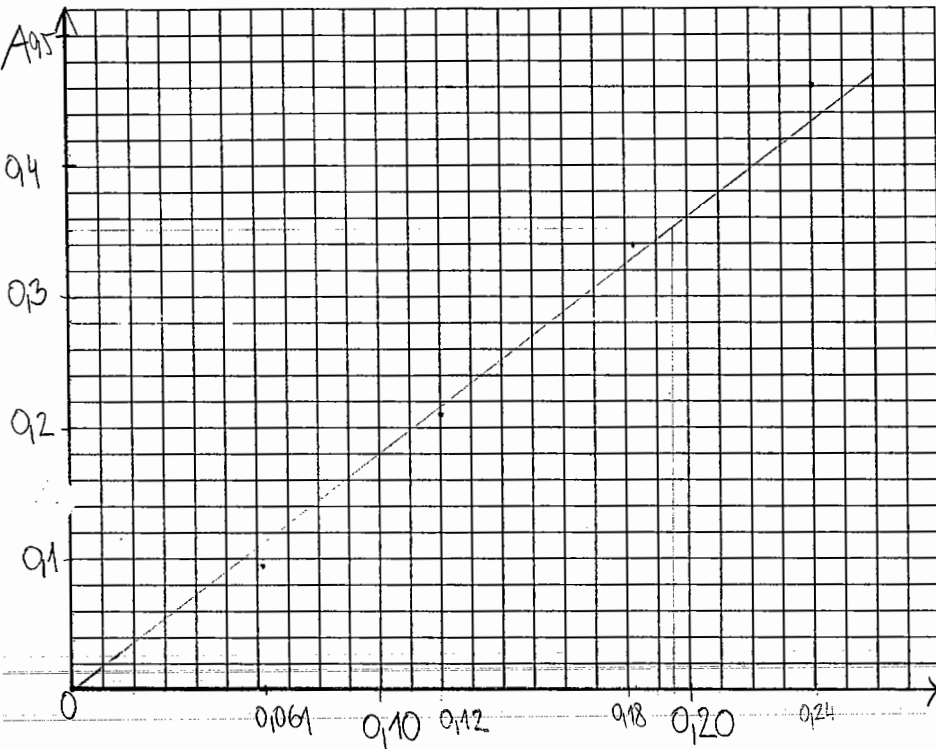
# Poročilo (Določanje vinske kisline v sadnem soku)

Datum: 11.4.2005

Ime in priimek: VESNA KUHAR

100%

- ✓ 1. Nariši umeritveno krivuljo in iz umeritvene odčitaj masno koncentracijo vinske kisline v kivetu. Ob upoštevanju razredčitev izračunaj masno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku! (70%)



$$A(12.8) = 0,349$$

$$N(12.8) = 0,195 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$0,195 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot \frac{33}{20} = 0,3218 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$0,32 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 = 32,18 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$32,18 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 10 = 3,22 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

NATANČNOST  
↳ v sadnem soku

70% (3,22  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ )  
↳ iz grafu  
ne moreš  
tudi natančno.

- ✓ 2. Vinska kislina, ki smo jo zatehtali za pripravo raztopin za umeritveno krivuljo, je bila vlažna. Delež vlage v zatehti je bil dvajset masnih procentov. Izračunaj kakšna je dejanska vsebnost vinske kisline v soku, če tega nismo upoštevali in smo predpostavili, da je bila v zatehti le vinska kislina! (15%)

20%

$$0,18 \cdot 3,22 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 2,58 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (2,16 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})$$

15%

↳ dejanska vsebnost

- ✓ 3. Predpostavi, da si se pri pripravi vseh točk umeritvene krivulje zmotil ter si namesto 1 ml dodal 5 ml glicerola. Pri pripravi vzorca si postopal pravilno in dodal le 1 ml glicerola. Ali ta napaka vpliva na določeno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku, če veš, da glicerol ne daje barve reakcije z vandijevo kislino in ne absorbira pri valovni dolžini 530 nm? Odgovor obvezno utemelji! (15%)

Pri manjši absorpciji ne vpliva, vpliva pa pri razreditvah, saj moramo upoštevati razredilni faktor.

• koncentracija ostane nespremenjena, glicerol, ki je dodan vpliva le na volumen.

Datum: 7.4. 2005

Ime in priimek: Nesna Kuhar

85%

je me malo spodinj

1. Kakšen naboj bo imel ionski izmenjevalec, ki ga bomo uporabili pri vaji in zakaj? (15 %)

Ionski izmenjevalec bo močno bazični N acetatni obliki (MERCK III) ker bo pozitiven naboj, da bo vezal tritratne ione vinske kisl. ter ione ostalih organskih kislin v sadnem soku. <sup>15%</sup>  
 Oetna k. je slabšeja od mlečne in citronske k. ki se adsorbirata na ion. izmenjeval. Vse vedno bolj kisl. kot sladkorji, tebelne spojine, barvila (=moteri elementi)

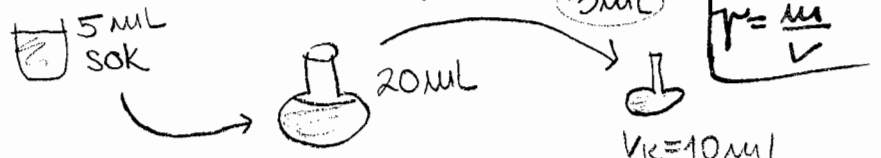
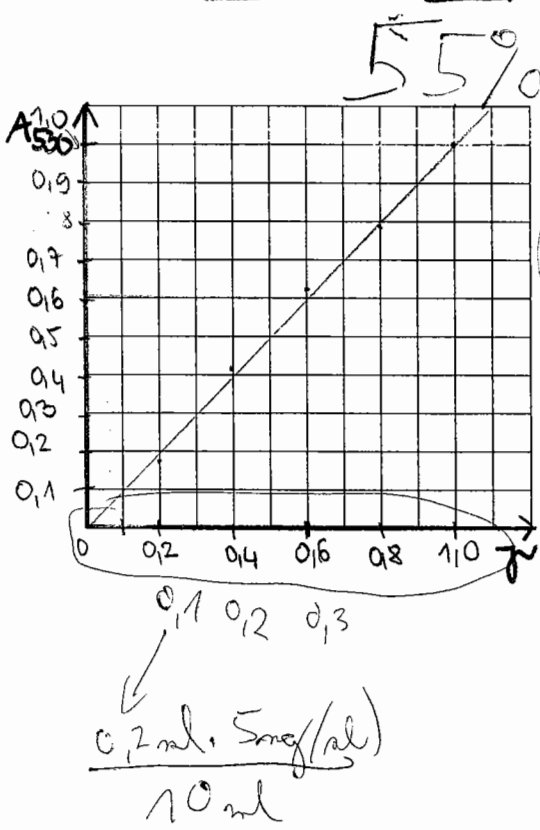
2. Zakaj bomo po dodatku perjodove kisline pri pripravi slepega vzorca dodali še glicerol? (15 %)

Glicerol odstrani presežek perjodove kisline, ki bi sicer motila. Pri merjenju absorbance (530nm) bi dobili neto čem podatek o slepi probi. Zato uporabimo glicerol, ki mi motec element, za učičevanje perjodove kisline. <sup>15%</sup>

3. 5 ml sadnega soka naneseš na kolono napolnjeno z ionskim izmenjevalcem Merck III. Nevezane komponente spreš z oetno kislino in vodo. Vezane kisline pa v 20 ml bučko s 7,1 % natrijevim sulfatom in dopolniš do oznake. Od eluata odvzameš 3 ml in dodaš vse potrebne reagente (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, glicerol, NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>), tako, da je končni volumen 10 ml. Tako pripravljena raztopina ima absorbanco merjeno proti slepi probi 0,6. Vzporedno pripraviš tudi umeritveno krivuljo kjer odmeriš ustrezne volumne vinske kisline s koncentracijo 5 mg/ml (glej tabelo), dopolniš do 3 ml s 7,1 % natrijevim sulfatom in dodaš vse potrebne reagente, da je končni volumen 10 ml.

⊗ Dodatek stand. raztopine (5 mg/ml)	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml	1,0 ml
⊙ Absorbanca pri 530 nm	0,18	0,41	0,62	0,79	1,0

Nariši graf in izračunaj masno koncentracijo vinske kisline v sadnem soku! (70 %)



$n 10 \text{ mL } (A=0.6) \Rightarrow c = 0.6 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$   
 $n 3 \text{ mL}: c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$   
 $c_2 = \frac{c_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{0.6 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 10 \text{ mL}}{3 \text{ mL}} = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$c(3 \text{ mL}) = c(20 \text{ mL})$   
 $(20 \text{ mL}): m = c \cdot V = 2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 20 \text{ mL} = 40 \text{ mg}$   
 $(5 \text{ mL sok}): c = \frac{m}{V} = \frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} = 8 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

O: V sadnem soku je konc. vinske kisl. takaka 8 mg/ml.



Pri Schoone -luffari metodi dobočevanja glu si pred titracijo z  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dodal škrobnico in opazil, da se raztopina ni obarvala temno

① modro, kar pomeni, da ni zmisla titracije. Pjasni kaj je lahko razlog, da se raztopina ni obarvala temno modro ni kaj je narediti, da bi bila dobočena vsebnost glu v vzorcu realna!

- Dodali smo premalo  $\text{I}_2$  (oksidant), zato ni prišlo do preskoka barve. v evr. točki. Morali bi dodati prebitok joda, kajti konc. glu v vzorcu je prenosovzajemna konc. porabljenega joda pri titraciji. Ni obratno koncentracija s prabo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (reducenta).
- Karšur pa ni pozabili dodati indikator (škrobnico).

②

• škrob = indikator	• glu = reducent
• $\text{Cu}_2\text{O}$ = reducent	
• $\text{Cu}^{2+}$ = oksidant	
• $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = reducent	
• $\text{I}_2$ = oksidant	
• sah = disaharid	• fru, glu = reducenta

$\text{sah} = \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$   
 $\text{glu} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

③ Točno / približno?

① LUFFOVA RAZTOPINA:

- Ni hujšo točno kol. (približno)
- ↳ dodamo, da potече reakcija z glu, ki je reducent.
- ↳ da iz bakrovega (II) iona dobimo bakrov(I) ion.
- ↳ bakrni ioni so v prebitku

② HCL ZA NEUTRALIZACIJO:

- Približno +-.
- ↳ dodamo, da neutraliziramo bazo; potrebnemu približno kol. dodamo kisline.

③ JODOVICA:

- Točno kol.!
- ↳ mora biti v prebitku, da lahko reaktiviramo.

④ ALIKVOT RAZREDČ. VZORCA:

- Točno kol.!
- ↳ upoštevati moramo razredčitveni faktor, saj se konc. z razredčevanjem vzorca spreminja.

⑤ ŠKROBNICA:

- Približno kol.
- ↳ je samo indikator pri titraciji.
- ↳ pokazatelj spremembe barve.

2). Mglu ni mrah v venci!

b)  $V_{\text{prava}} = 14,5 \text{ mL}$

c)  $V = 16,1 \text{ mL}$

a)  $V_{\text{lepa}} = 20,45 \text{ mL}$

$V_b$ ... vzorec

$V_a$ ... slepi vz.

$V_c$ ... celotni vz.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,108 \text{ M}$

1)  $n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (V_a - V_b) \cdot c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$  [mmol]

DOLOČITEV GLU:

2)  $n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (V_a - V_c) \cdot c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$

INVERZIJA + DOL. CELOT. SLADKORJA:

ZAKAV  $\times 10^2$   
 $\times 20$

A)  $n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (20,45 - 14,5) \text{ mL} \cdot 0,108 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} = 0$

B)  $n(\text{---}) = (20,45 - 16,1) \text{ mL} \cdot 0,108 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} = 0,470 \text{ mmol}$

A)  $m_{\text{glu}} = m(\text{red. sladk.}) \cdot 10 = 15,8 \text{ mg} \cdot 10 = \underline{\underline{158 \text{ mg}}}$

0,6 ... 14,7 mg  
0,7 ... 17,2 mg

$2,5 : 0,1 = 25$

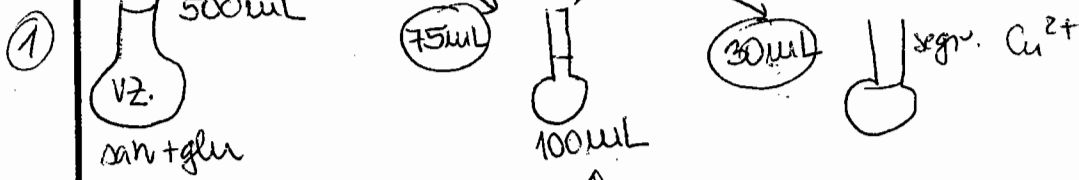
$\rightarrow 15,8 \text{ mg}$

B)  $m_{\text{rel.}} = m(\text{red. sl.}) \cdot 20 = 11,45 \text{ mg} \cdot 20 = \underline{\underline{229 \text{ mg}}}$

0,4 ... 9,7 mg  
0,5 ... 12 mg

$2,5 : 0,1 = 25 \Rightarrow 11,45 \text{ mg}$

# 1. Delovanje glu in sah v skupnem vzorcu:



M<sub>sah</sub> v 500 mL bučki?  
 M<sub>glu</sub> (vzorec) = 170 mg

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,102 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$V(-11-) = 515 \text{ mL}$$

\* TABELA

$$m = c \cdot V \quad c = m/V$$

$$m(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = c \cdot V$$

$$m = 0,102 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 515 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$m = 51,61 \cdot 10^{-4} \text{ mol} = \underline{0,5161} \text{ mmol} \Rightarrow \text{TAB.} \Rightarrow \boxed{13,17 \text{ mg red. sladk.}}$$

$$\left. \begin{array}{l} 0,15 \dots 12,12 \text{ mg} \\ 0,6 \dots 14,17 \text{ mg} \end{array} \right\} \text{ 2,5 : 0,1 = 25 / } \cdot 0,061 = 1,525 \text{ / } + 12,12 = \underline{13,725 \text{ mg}}$$

$$\left[ \left( \text{CELKUPNA GLU + INVERT. SLAKOR PRED INVERZIJO} \right) - \left( \text{PROSTA GLU PRED INVERZIJO} \right) \right] \cdot 0,95 = \underline{\underline{\text{KOL. SAHAROZE}}}$$

$$\left( 13,7 \text{ mg} \cdot \frac{100}{30} \cdot \frac{500}{75} - 170 \text{ mg} \right) \cdot 0,95 =$$

$$= (304,44 \text{ mg} - 170 \text{ mg}) \cdot 0,95 =$$

$$= \underline{\underline{127,172 \text{ mg sah v 500 mL}}}$$



$$\rho = \frac{m}{V} \quad \rho_1 V_1 = \rho_2 V_2$$

$$\rho_1 = \rho_2$$

$$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2}$$

$$\rho(30 \text{ mL}) = \rho(100 \text{ mL})$$

$$m = \rho \cdot V = 0,46 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 100 \text{ mL} = 45,67 \text{ mg}$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{45,67 \text{ mg}}{75 \text{ mL}} = 0,609 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

$$\rho(75 \text{ mL}) = \rho(500 \text{ mL})$$

$$m = \rho \cdot V = 0,609 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 500 \text{ mL} =$$

$$m = 304,4 \text{ mg}$$

Datum: 13.5.2004

Ime in priimek: Miha Jovančič

100%

1. Izračunaj maso glukoze in maso saharoze v neznanem vzorcu (obvezno napiši številko vzorca)! (100 %)  
 Če bo povprečna napaka pri določitvi glukoze in saharoze  
 večja od 10 % bom odštel 20 % točk  
 večja od 20 % bom odštel 40 % točk

8/0 VAF

Vzorec št. 1:

Določanje glukoze:

$$V_1 = 11,5 \text{ ml}$$

$$V_2 = 16,9 \text{ ml}$$

$$n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (V_2 - V_1) \cdot c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$$

$$n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (16,9 - 11,5) \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \text{ mol l}^{-1} = \underline{0,54 \text{ mmol}}$$

$$m_{\text{gluko}} = \underline{270,8 \text{ mg}} \quad 280 \text{ mg} \quad 3\% \text{ VAF}$$

Vse sladkorji:

$$V_3 = 11,6 \text{ ml}$$

$$V_4 = 16,9 \text{ ml}$$

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ M}$$

$$n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (16,9 - 11,6) \text{ ml} \cdot 0,1 \text{ mol l}^{-1} = \underline{0,53 \text{ mmol}}$$

$$m_{\text{cel}} = 531,2 \text{ mg}$$

$$m_{\text{sah}} = (m_{\text{cel}} - m_{\text{gluko}}) \cdot 0,95 = (531,2 - 270,8) \text{ mg} \cdot 0,95$$

$$m_{\text{sah}} = \underline{247,4 \text{ mg}}$$

220 mg  
- 10 VAF



1. določanje glukoze in saharoze v skupnem vzorcu

Datum: 13.5.2004

Ime in priimek: Mitja Jovančič

28/0

1. Pojme na desni poveži z ustreznimi spojinami in ioni na levi strani glede na njihove lastnosti in uporabo pri vaji določanja glukoze in saharoze v skupnem vzorcu! Ni nujno, da so vsi pojmi povezani! (35 %)

škrob	indikator	aktivator
$Cu_2O$	reducent	reducent
saharaza	reducent	oksidant
$I_2$	oksidant	indikator
$Na_2S_2O_3$	reducent	reducent
$Mg^{2+}$	aktivator	oksidant
$Cu^{2+}$	oksidant	reducent

27/0

2. Primerjaj metodi – določanje saharoze po Schoorl-Luffu z metodo določanja škroba s 3,5-dinitrosalicilno kislino glede na naslednje kriterije: (45 %)

- Način priprave monosaharida
- Korekcijski faktor (ni vezan na razredčitev), ki ga moraš upoštevati, ko iz mase glukoze preračunaš maso disaharida oziroma polisaharida.
- Samo meritev s pomočjo katere določimo maso ogljikovega hidrata v vzorcu!

b) korekcijski faktor je pri določevanju škraba s 3,5 dinitrosalicilno kislino enak 0,9. Pri določevanju glukoze pa 0,75. Ta faktor upoštevamo, ker imajo polisaharidi več podskupin, ki jih določimo manj glukoze kot pri določevanju glukoze.

a) škrob se določuje na podoben način, medtem ko saharozo s kislino vzrejo na podoben način. Saharozo moramo najprej kvantitativen preložit v glukozo. V glukozi pa tega ne moremo določiti s titracijo, SPEKTROFOTOM.

3. Pri Schoorl-Luffovi metodi določanja glukoze si pri titraciji vzorca z 0,1 M  $Na_2S_2O_3$  opazil, da je poraba enaka 0. Pojasni kaj se je zgodilo!

Kaj bi moral narediti-nanaša se na prejšnje vprašanje, da bi bila določena vsebnost glukoze v vzorcu realna (napiši eno od možnosti)? (20 %)

~~V tem primeru pomeni, da maso določimo s saharozo. Morala v vzorcu maso določiti s saharozo. V tem primeru se je zgodilo, da je pri porabi in zato ne moremo določiti vsebnosti saharoze. Morala bi dodati še dodatek (preoblik).~~

28/0

# ✓ Poročilo (Določanje glukoze in saharoze v skupnem vzorcu)

Datum: 4.4. 2005

Ime in priimek: Nevena Kuhar

84%

1. Izračunaj maso glukoze in maso saharoze v neznanem vzorcu (obvezno napiši številko vzorca)! (70 %)

VRONEC št. 3-4:

(b)  $V_{poraba} = 14,5 \text{ mL}$

(c)  $V_{poraba} = 16,1 \text{ mL}$

(a)  $V_{poraba \text{ SLEPA}} = 20,45 \text{ mL}$

60%

①

$$M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (V_a - V_b) \cdot C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = \frac{(20,45 - 14,5) \text{ mL} \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 0,108 \frac{\text{mol}}{\text{L}}}{1} = 5,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot 10^3 \frac{\text{mmol}}{\text{mol}} = 0,643 \text{ mmol}$$

②

$$M(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (V_a - V_c) \cdot C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = (20,45 - 16,1) \text{ mL} \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 0,108 \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0,470 \text{ mmol}$$

①  $m_{\text{glu}} = m(\text{red. sl.}) \cdot 10 = 15,775 \text{ } \mu\text{g} \cdot 10 = \underline{157,75 \text{ } \mu\text{g}}$  (150 mg) 5% NAP

②  $m_{\text{sah}} = m(\text{red. sl.}) \cdot 20 = 11,45 \text{ } \mu\text{g} \cdot 20 = \underline{229,0 \text{ } \mu\text{g}}$

$$m_{\text{sah}} = (m_{\text{sah}} - m_{\text{glu}}) \cdot 0,95 = (229 - 157,75) \text{ } \mu\text{g} \cdot 0,95 = \underline{67,69 \text{ } \mu\text{g}} = \underline{67,7 \text{ } \mu\text{g}}$$

(100 mg) 32% NAP

② Spodaj so naštetih določeni reagenti, oziroma spojine, ki jih boš uporabljal na vaji. Pri dodajanju nekaterih moraš biti zelo pazljiv in delati zelo natančno, saj bo količina dodatka neposredno odvisna določena vsebnost sladkorjev, pri drugih pa si lahko manj natančen, saj je za pravilnost meritve dovolj že približno točna količina. Za posamezen reagent oziroma raztopino napiši ali ga moraš dodati zelo točno ali le približno točno količino! Odločitev obvezno podkrepiti s komentarjem! (30 %)

24%

a) Luffova raztopina

Ni nujno točno: da poteka reakcija z glukozo, ki je reducent, da iz bakriregulidom  
b) HCl za nevtralizacijo dodamo bakriregulidom. => bakriregulidom ni v prebitku

PRIBLIŽNO VALS  
Točen: da nevtraliziramo bazo, potrebujemo točno kol. dodamo, kisline (če jo  
c) jodovica je preveč, ne nevtraliziramo ampak zakisamo)

VENDAR MORAMO DODATI TOČNO ZNANO  
Ni nujno točno: ker mora biti v prebitku, da lahko reaktiviramo! KOLIČINA  
d) alikvot razredčena vzorca

Nujno točen. opazovati moramo naredostveni faktor, saj se koncentracija z  
e) škrobica medtitracijem merca spreminja!

Ni nujno točno: je samo indikator pri titraciji (fotometrijski spremljevalnik)

# Pristopni kolokvij (Določanje glukoze in saharoze v skupnem vzorcu)

Datum: 31.3.2005

Ime in priimek: Vesna Kuhar

70%

1. Vzorec v katerem sta saharoza in glukoza, raztopiš z vodo v 500 ml bučki. Za določitev celotnih sladkorjev odpipetiraš 75 ml te raztopine v 100 ml bučko, dodaš kislino in segrevaš, da poteče hidroliza saharoze. Raztopino po koncu hidrolize nevtraliziraš in dopolniš do 100 ml. Odvzameš 30 ml te raztopine, segrevaš v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, ohladiš ter dodaš prebitek jodovice in titriraš z raztopino  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  s koncentracijo 0,102 mol/l. Razlika med porabo tiosulfata za vzorec in slepi vzorec, v katerem je le voda je 5,5 ml.

Izračunaj maso saharoze v vzorcu (500 ml bučka), če je masa glukoze v vzorcu 170 mg. (50%)

n ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (mmol)	m-reducirajočih sladkorjev (mg)
0,1	2,4
0,2	4,8
0,3	7,2
0,4	9,7
0,5	12,2
0,6	14,7
0,7	17,2
0,8	19,8
0,9	22,4
1,0	25

$$\left(\frac{M_{\text{sah}}}{M_{\text{glu}}}\right) \cdot 0,95 = 20\%$$

Celokupna (~~glu~~ + inertni sladkor pred inverzijo) - (prosta glu<sup>pred inv</sup>) = 0,95 =

$$\uparrow 13,7 \times \frac{100}{30} \times \frac{500}{75}$$

Kol. sah

$$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = c \cdot V$$

$$n = 0,102 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 5,5 \cdot 10^{-3} \text{L} = 5,61 \cdot 10^{-4} \text{mol}$$

$$M_{\text{glu}} (re.) = 170 \text{ mg} \quad (v \ 500 \text{ mL} \Rightarrow M_{\text{sah}} = ?)$$

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,102 \text{ mol/L}$$

$$V = 5,5 \text{ mL}$$

$$M_{\text{red sladk.}} = 14,7 \text{ mg}$$

$$(170 \text{ mg} - 14,7 \text{ mg}) \cdot 0,95 =$$

$$= 147,54 \text{ mg sah}$$

$$\frac{147,54}{147,22} = 0,16 \text{ mmol}$$

2. Pri Schoorl-Luffovi metodi določevanja glukoze si pred titracijo z  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dodal škrobovico in opazil, da se raztopina ni obarvala temno modro, kar pomeni, da nima smisla titrirati! Pojasni kaj je lahko razlog, da se raztopina ni obarvala temno modro in kaj bi moral narediti, da bi bila določena vsebnost glukoze v vzorcu realna (napiši eno od možnosti)? (20%)

preveliko  $\text{I}_2$  (=oksidant) smo dodali, in ni prišlo do preszoka barve v ekvivalentni točki. Morali bi dodati prebitek joda, kajti koncentracija glukoze v vzorcu je prevelikokrat večja kot je joda (porabljenega) pri titraciji in obratno sorazmerna z porabo  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (reducenta)

\* lahko pa bi pozabili dodati indikator (škrobovico)

3. Pojme na desni poveži z ustreznimi spojini in ioni na levi strani glede na njihove lastnosti in uporabo pri vaji določevanja glukoze in saharoze v skupnem vzorcu! Za nepravilno povezavo se odbije 5% (le v okviru naloge)! Ni nujno, da so vsi pojmi povezani! (30%)

- |   |                      |
|---|----------------------|
| škrob   | reducent             |
| <del><math>\text{Cu}_2\text{O}</math></del>             | <del>reducent</del>  |
| saharoza  | oksidant             |
| <del><math>\text{I}_2</math></del>                      | <del>indikator</del> |
| <del><math>\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3</math></del> | <del>reducent</del>  |
| <del><math>\text{Cu}^{2+}</math></del>                  | <del>oksidant</del>  |

30%

D- glu = grozdi sladkor ali dekstroza  
= aldohexoza (kem.)  
=  $C_6H_{12}O_6$

Sah = troni sladkor / pemi  
=  $C_{12}H_{22}O_{11}$   
= v rastlinah (v vakvaciji je gl. transportno sredstvo za prenos C-atomov)

\* Fehlingova raztopina iz :  
- bakrov (II) sulfat  
- natrijev hidroksid  
- kalij-natrijev tartrat

↳ Tartrati ion tvori z bakrovimi kompleksu ion

↓  
z njimi preprečuje izločanje težko topne oborine bakrovega hidroksida

↳ Po Schoorle Luffu dodamo bakrov. sulfatu natrij. karbokat + citrati = > bakrov citratni kompleks

VINJAT KISL.  
V SOKU

- soli vinske kisl. : TARTRATI  
- estri : - II -

- v treh izomerih : - L  
- D  
- opt. neakt. mezo-oblika

\* L-jabolčna in L-citronska : 2 gl. org. kisl. v sadju  
(intermediata citrat. cikla)

x ostale kisl. so v sadju v manjših kisl.

• vinsko k. najdemo v grozdju  
• v 10. se vinska k. razgradi v : GLIOKSILATNI in HIDROKSIPIRUVATNI ION.

• DOLOČITEV : (tudi HPLC)

= barva reakcija : vinska kisl. + amonijev / natrijev vanadat  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  /  $\text{NaVO}_3$

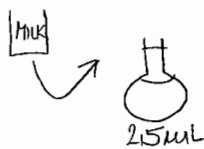
↳ kolorimetrična metoda po Rebeleinu

- preden dodamo manganovodat moramo iz vzorca odstraniti vse  
možne anioni, ki motijo pri določanju :

- ↳ Sulfidni, fenolne spojine, druge org. kisline (mlečna, jabolčna, citronska), barvila

↳ zato uporabimo ustrezno ionsko izmenjavalno kromatografijo.

4)  $V = 25 \text{ mL mleka}$



+ 3 mL vode  
+ 7 mL nekvasu

2 mL  
145 µg HOL.

a) v 100 mL mleka = ?

$r = \frac{m}{V}$

$$\left. \begin{array}{l} 2 \text{ mL} \dots 145 \mu\text{g HOL.} \\ 7 \text{ mL} \dots X \end{array} \right\} X = 50715 \mu\text{g HOL.} \\ \text{(v 7 mL.)}$$

$$\left. \begin{array}{l} 25 \text{ mL ml.} \dots 50715 \mu\text{g HOL.} \\ 100 \text{ mL ml.} \dots X \end{array} \right\} X = \underline{\underline{203 \mu\text{g HOL.}}}$$

0: v 100 mL mleka je 203 µg holeja.

b) hol. vsebuje 15 % nečistoč  
Nečistoče ne dajejo obarv. prod.

↳ spektrofotometer jih ni  
#02 mL.

$0,15 \cdot 203 \mu\text{g} = \underline{\underline{3,045 \mu\text{g}}}$

↳ nečistoče

$203 \mu\text{g} - 3,045 \mu\text{g} = \underline{\underline{171,26 \mu\text{g}}}$

↳ čist. holesterol

100 % ... 203 µg

85 % ... X

$X = \underline{\underline{47,255 \mu\text{g}}}$

c)  $A_{0,9} \Rightarrow t = 20 \text{ min}$      $A = 0,9$   
 $A_{0,7} \Rightarrow t = 10 \text{ min}$      $A = 0,7$

$\frac{203 \mu\text{g}}{100 \text{ mL}} \cdot \frac{0,9}{0,7} = \underline{\underline{26,1 \mu\text{g}}}$

↳ dyausko  
(glede na a)

$171,26 \mu\text{g} \cdot \frac{0,9}{0,7} = \underline{\underline{22,19 \mu\text{g}}}$   
(glede na b)

- V člo. je holesterol sest. del: lipoproteini,  
 cel. membrani,  
 žolčnih kamnov

- Iz njega nastajajo: steroidni hormoni,  
 vitamin D<sub>3</sub>,  
 žolčne kisline

- prevelike količine v krvi škodljive, saj pospešujejo nastanek  
 ateroskleroze.

- različne METODE za določanje kvantit: x. kolorimetrična  
 x. kromatografska  
 x. encimska

PRINCIP:

L v holesterolu 2 reakt. mesti (= vez in OH-sk.)

L v vzorcu mleka najprej saponifikacija razgradijo trigliceride  
 ter razcepimo vez Holi-protein

L prost holi ekstrahiramo v org. fazo (heksan)

L v alikvotnem delu ga kvantit določimo z O-FTHALDEHIDOM v  
 prisotnosti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

L produkt je vijoličen.

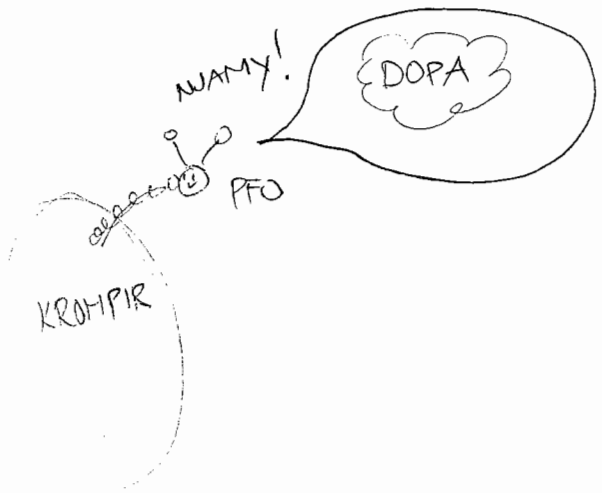
POLIFENOL Oksidaza  
V KROMPIRU

- Polifenol oksidaze se nahajajo v rastl. in žival. celicah
- krompir vsebuje TIROZINAZO
- ↳ ta katalizira: hidroksilacijo monofenolov ter avtonomo oksidacijo nastalih difenolov v O-KINONE
- nastali O-KINONI stopajo v druge reakcije in povzročijo njavo obarvanje sadja in zelenjave
- luscusko pojavenje nastopi, kadar prežemo sadje in zel.
- med polifenol oksidaze spada tudi TIROZINAZA v živalih:
- ↳ pomembna pri metabolizmu tirozina za nastanek koen. pigmentov (melanina)
- V katalitično aktivnost polif. oksidaz vključeni tudi BAKROVI IONI
- ↳ v reakciji se nev. oksidirajo in reducirajo
- Ti encimi niso strogo specifični
- ↳ katalizirajo lahko reakcije z vel. FENOL. SPOJINAMI kot substrati

### ? FENOLNE SPOJINE: (flavonoidi)

- imajo aromatski obroč in gov. večine OH-sk. + njihove derivate

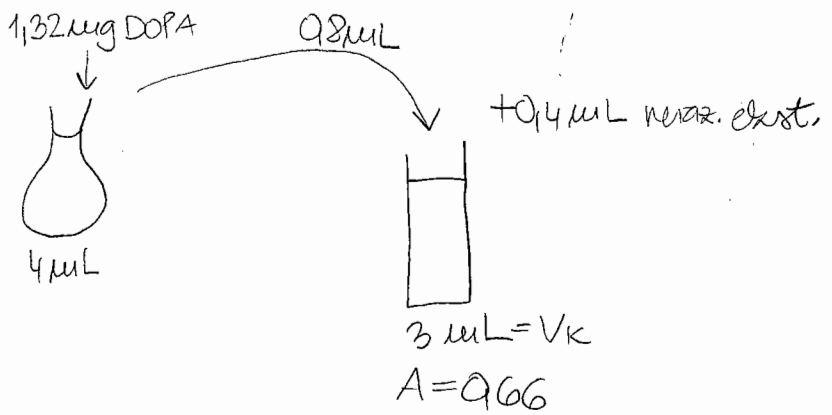
3 PRINCIP: Polifenol oksidaza (PFO) katalizira OKS substanc  
3,4- dihidroksifenilalanina (DOPA) v O-KINON.





L)  $m_{\text{DOPA}} = 1,132 \text{ mg}$   
 $M_{\text{DOPA}} = 19712 \text{ g/mol}$   
 $V_K = 3 \text{ mL}$

$l = 1 \text{ cm}$   
 $t = 5 \text{ min}$   
 $\epsilon = 5012 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$   
 $A = 0,66$



a)  $v/\text{mL} = ?$  (konz. ekst.)

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l} = \frac{0,66 \text{ mol}\cdot\text{cm}}{5012 \text{ L}\cdot 1 \text{ cm}} = 1,317 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$v = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$= \frac{0,3951 \mu\text{mol}}{5 \text{ min}} = \underline{\underline{0,079 \text{ U}}}$$

$$c = \frac{m}{V} \Rightarrow m = c \cdot V$$

$$= 1,317 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 3 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 3,951 \cdot 10^{-7} \text{ mol} = \underline{\underline{0,3951 \mu\text{mol}}}$$

$$\frac{v}{\text{mL}} = \frac{0,079 \text{ U}}{0,4 \text{ mL}} = \underline{\underline{0,198 \frac{\text{U}}{\text{mL}}}}$$

b)  $M_{\text{preostala DOPA v KIV}} (t=5 \text{ min}) = ?$

$$m = \frac{m}{M} = \frac{1,132 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{19712 \text{ g}} = \underline{\underline{6,694 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}} \quad (\text{celoten subst.})$$

$$M_{\text{preost.}} = M_{\text{rad.}} - M_{\text{kom.}} =$$

$$= (6,694 \cdot 10^{-6} - 3,951 \cdot 10^{-7}) \text{ mol} = 6,299 \cdot 10^{-6} \text{ mol} = \underline{\underline{6,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}}$$

Datum: 30.5. 2003

Priimek in ime: Vesna Kuhar

Vpisna številka: \_\_\_\_\_

1. Umeritveno krivuljo za določitev škroba v moki pripraviš tako kot je razvidno iz tabele. Izračunaj kakšen je delež škroba v moki, če si z vzorcem postopal takole:

Zatehtali smo 0,47 g vzorca, dodali ustrezno količino vode in HCl ter hidrolizirali pri temperaturi vrelišča 20 minut. Hidrolizat smo ohladili in nevtralizirali ter razredčili z vodo do 100 ml. Nato smo od te raztopine odvzeli 0,3 ml. izvedli encimsko hidrolizo, dodali 3,5 dinitrosalicilno kislino, nekaj časa segrevali in razredčili z vodo do 50 ml ter pomerili, da je absorbanca tako pripravljene raztopine pri 540 nm 0,145. (20 %)

V <sub>raztopine glukoze z γ = 4mg/ml</sub> (ml)	A <sup>540</sup> po dodatku 3,5 dinitrosalicilne kisline in redčenju z vodo do 25 ml
0,1	0,094
0,2	0,214
0,3	0,302
0,4	0,388
0,5	0,511

*W = 39,9%*

2. Pred merjenjem aktivnosti polifenol oksidaze iz krompirja pripraviš standardno raztopino substrata, tako, da raztopiš 1,32 mg DOPA (molska masa 197,2 g mol<sup>-1</sup>) v 4 ml pufr. Za test encimske aktivnosti odpipetiraš v kiveto z dolžino optične poti 1 cm, 0,8 ml standardne raztopine substrata ter 0,4 ml nerazredčenega krompirjevega ekstrakta in dopolniš do 3 ml z ustreznim pufr. Po petih minutah naraste absorbanca pri 475 nm zaradi nastalega o-kinona (molski absorpcijski koeficient je 5012 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) na vrednost 0,66.

- a) Izračunaj specifično aktivnost polifenol oksidaze (U/ml ekstrakta) v nerazredčenem ekstraktu! (10 %) *0,138 U/ml*  
 b) Izračunaj tudi preostalo množino substrata v kiveti po 5 minutah, delovanja encima na substrat! (10 %) *6,3 · 10<sup>-6</sup> mol*

1 U (enota encimske aktivnosti) je tista količina encima, ki pri izbranih pogojih reakcije pretvori 10<sup>-6</sup> mol substrata v produkt v eni minuti

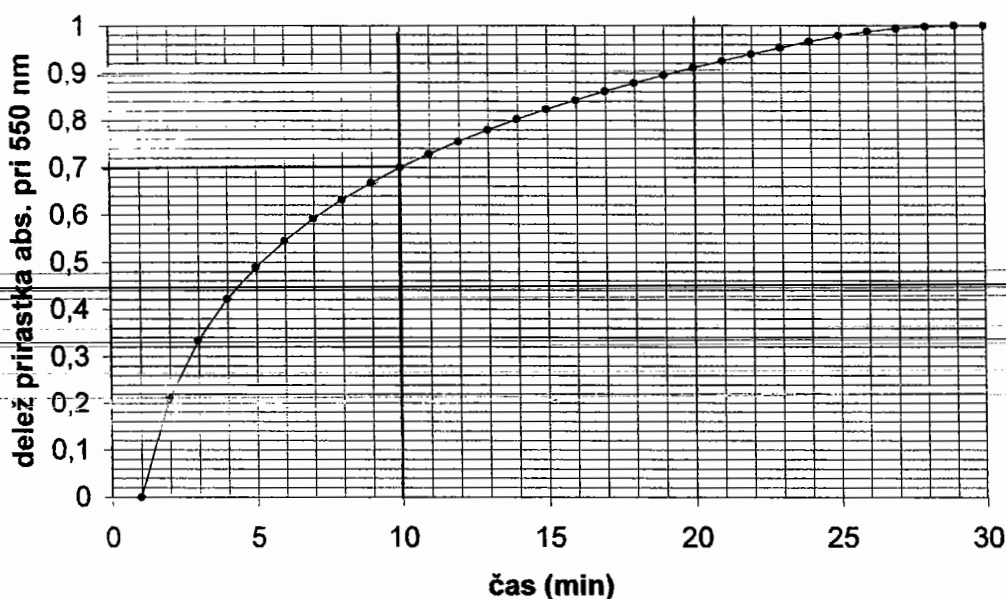
3. Odgovori na naslednja vprašanja (36 %)

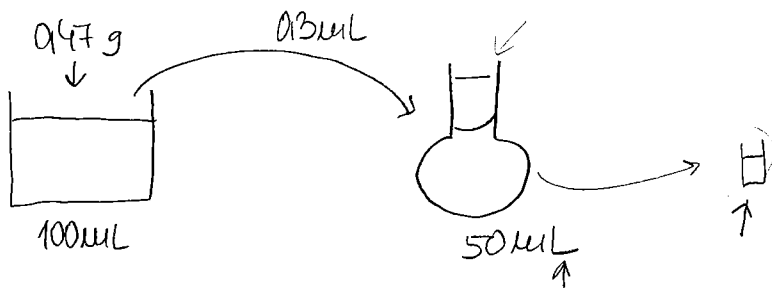
- a) Zakaj smo v postopku določevanja vinske kisline v soku uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo?
- b) Zakaj smo v postopku določevanja vinske kisline dodali perjodovo kislino?
- c) Pri Schoorl-Luffovi metodi določevanja glukoze si pri titraciji vzorca z 0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> opazil, da je poraba enaka 0. Pojasni kaj se je zgodilo!
- d) Kaj bi moral narediti-nanaša se na prejšnje vprašanje, da bi bila določena vsebnost glukoze v vzorcu realna (napiši eno od možnosti)?
- V soji določamo aktivnost tripsinskega inhibitorja na način, ki je opisan v skriptu. Ali se izmerjena aktivnost tripsinskega inhibitorja razlikuje od prave vrednosti (večja, manjša, enaka)
  - e) če sojin ekstrakt poleg tripsinskih inhibitorjev vsebuje tudi encime, ki razgrajujejo substrat BAPNA s katerim merimo encimsko aktivnost tripsina (ti encimi niso inhibirani s tripsinskimi inhibitorji)? Utemelji!
  - f) če so v sojinem ekstraktu prisotni proteini, ki so dober substrat za tripsin? Utemelji!

4. V analizo dobiš vzorec mleka. Vzameš 2,5 ml mleka, dodaš ustrezno količino KOH in etanola ter hidroliziraš. Nato dodaš 3 ml vode ter 7 ml heksana. Od heksanske faze odvzameš 2 ml in z uporabo standardnih raztopin določiš, da je v 2 ml heksanske faze 145  $\mu\text{g}$  holesterola.

**Izračunaj:**

- a) Na osnovi podatkov v nalogi izračunaj kakšna je vsebnost holesterola v 100 ml mleka? (8 %)
- b) Pri računanju predpostavi, da holesterol, ki si ga uporabil za pripravo standardnih raztopin ni bil čist, ampak je vseboval 15 % nečistoč (tega nismo vedeli-kar pomeni da je bilo pri npr. zatehti 1g le 0,85 g holesterola). Nečistoče z orto-ftalaldehidom ne dajo obarvanega produkta! (8 %)
- c) Med vajo se nam je tako kot ponavadi mudilo, zato nismo počakli predpisanih 30 minut, da se razvije barva, ampak smo merili absorbcio nastalega kompleksa ( $A^{550}$ ) že po 10 minutah. Tudi pri pripravi umeritvene »točke« nismo bili najbolj načelni. Tu smo absorbcio določali po 20 minutah. Kakšna je dejanska vsebnost holesterola v mleku, če je prirast absorbance takšna funkcija časa kot je razvidno iz grafa? (8 %)





$$\rho_{uk} = 12.5 \cdot 10^3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\rho_{(KIV)} = \rho(50 \text{ mL})$$

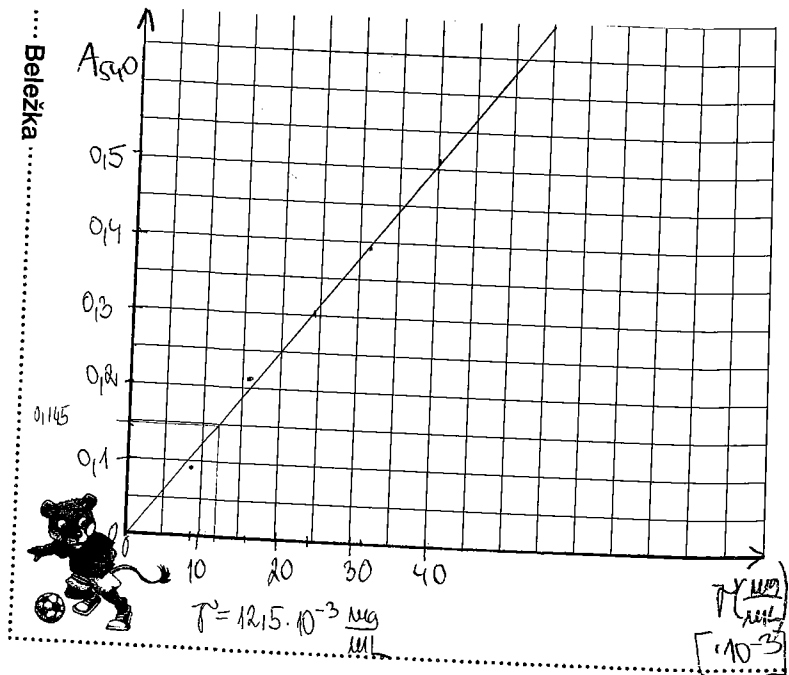
$$m = \rho \cdot V = 12.5 \cdot 10^3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 50 \text{ mL} = 0.625 \mu\text{g}$$

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{0.625}{0.3} = 2.1083 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\rho(0.3 \text{ mL}) = \rho(100 \text{ mL})$$

$$m = \rho \cdot V = 2.1083 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 100 \text{ mL} = \underline{\underline{208.33 \mu\text{g}}}$$

$$w(\text{sklado u medki}) = \frac{208.33 \mu\text{g} \cdot 0.19 \cdot 100\%}{0.47 \cdot 10^3 \mu\text{g}} = \underline{\underline{39.9\%}}$$



# KOLOKVIJ

ŠKROB V MOXI

- škrob: rezerva hrana v rastlinah (mestaja v kromoplastih)
- odveča kol. glu se pretvori v glikogen, primarno za transport ali v polim. M<sub>r</sub>, namenjenu za shranjevanje.
- nahaja se v suhih koreninah

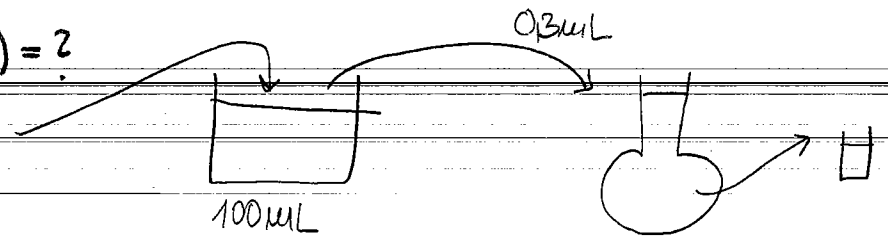
## SESTAVA:

- amilopektin (80%)
  - N vodi netopen
  - njegove molekule so razvejane
  - sestaj. 100 kratkih linearnih
  - 4% razvejanih verig (M<sub>r</sub> = 1 · 10<sup>6</sup>)
- amiloz (20%)
  - N vodi topna
  - iz linearne verige (500-2000 glu enot)
  - M<sub>r</sub> = 80000

1.

W(škrob v moki) = ?

M<sub>v2</sub> = 0,147g



UK:  $\rho_1 = 4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$

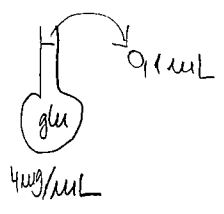
- V<sub>1</sub> = 0,1 mL
- V<sub>2</sub> = 0,2
- V<sub>3</sub> = 0,3
- V<sub>4</sub> = 0,4
- V<sub>5</sub> = 0,5

$\rho = \frac{m}{V} \Rightarrow m = \rho \cdot V$

①  $\rho_1 \cdot V_1 = \rho_2 \cdot V_2$

$\rho_2 = \frac{\rho_1 V_1}{V_2} = \frac{4 \cdot 0,1}{50} = 8 \cdot 10^{-3} \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$

V<sub>2</sub> = 50 mL



④

	$\rho \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \cdot 10^3$	A <sub>540</sub>
①	8	0,094
②	16	0,214
③	24	0,302
④	32	0,388
⑤	40	0,511