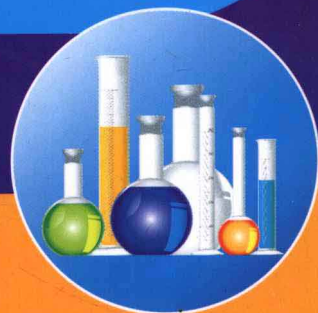


高等学校食品与营养科学教学指导委员会推荐教材
高等教育食品科学与工程类“十二五”规划实验教材

FOOD BIOCHEMISTRY EXPERIMENTS



食品生物化学实验

于国萍◎主编

中国林业出版社

教育部高等学校食品与营养科学教学指导委员会推荐教材
普通高等教育食品科学与工程类“十二五”规划实验教材

食品生物化学实验

于国萍 主编

中国林业出版社

内 容 简 介

《食品生物化学实验》共分8章43个实验,内容设置与即将配套出版的理论教材相一致,包括糖类、脂类、蛋白质类、核酸类、酶类、维生素与色素、物质代谢和生物氧化,还包括综合实验;附录中提供了生物化学实验室安全与防护知识、常用试剂和溶液的配制以及常用数据列表等内容。本书内容全面,并配有一些综合性和较大型的实验,供不同学校、不同专业根据具体情况选定。本书力求结构清晰简洁、表达严谨规范。

《食品生物化学实验》可作为高等院校食品科学或生物相关类各专业的实验教材,也可供相关专业的学生、教师和科技工作者参考,尤其适合作为本科教学的同步教材。

图书在版编目(CIP)数据

食品生物化学实验/于国萍主编. —北京:中国林业出版社, 2012. 8

教育部高等学校食品与营养科学教学指导委员会推荐教材 普通高等教育食品科学与工程类
“十二五”规划实验教材

ISBN 978-7-5038-6685-2

I. ①食… II. ①于… III. ①食品化学-生物化学-化学实验-高等学校-教材
IV. ①TS201. 2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第164838号

中国林业出版社·教材出版中心

策划、责任编辑:高红岩

电话:83221489 83220109

传真:83220109

出版发行 中国林业出版社(100009 北京市西城区德内大街刘海胡同7号)

E-mail: jiaocaipublic@163.com 电话:(010) 83224477

http://lycb. forestry. gov. cn

经 销 新华书店

印 刷 中国农业出版社印刷厂

版 次 2012年8月第1版

印 次 2012年8月第1次印刷

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 9.5

字 数 210千字

定 价 18.00元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有 侵权必究

普通高等教育食品科学与工程类“十二五”规划实验教材

编写指导委员会

主任 罗云波（中国农业大学食品科学与营养工程学院，教授）

委员（按拼音排序）

陈宗道（西南大学食品科学学院，教授）

程建军（东北农业大学食品学院，教授）

迟玉杰（东北农业大学食品学院，教授）

江连洲（东北农业大学食品学院，教授）

李洪军（西南大学食品科学学院，教授）

李里特（中国农业大学食品科学与营养工程学院，教授）

廖小军（中国农业大学食品科学与营养工程学院，教授）

任发政（中国农业大学食品科学与营养工程学院，教授）

赵国华（西南大学食品科学学院，教授）

赵心怀（东北农业大学食品学院，教授）

《食品生物化学实验》编写人员

主 编 于国萍

副主编 袁 芳 邵美丽 蒋丽萍

编 者 (按拼音排序)

贾丽艳 (山西农业大学)

蒋丽萍 (哈尔滨学院)

穆 莹 (东北农业大学)

邵美丽 (东北农业大学)

王金玲 (东北林业大学)

王雪飞 (东北学院)

徐红艳 (延边大学)

许 倩 (塔里木大学)

许 岩 (东北农业大学)

于国萍 (东北农业大学)

袁 芳 (中国农业大学)

主 审 马永强 (哈尔滨商业大学)

前 言

《食品生物化学》是食品、生物工程与技术、医药和农业等专业的重要基础课，不仅具有较强的理论性，而且具有一定的实践性。只有扎实地掌握系统的基础知识、熟练的实验操作技能，才能在相应的专业技术领域真正地有所造诣和建树。目前已出版的生物化学实验教材种类繁多，但大多都是针对各自专业范围而进行编排的，实验内容不够全面、丰富。作为生物化学在食品行业中应用形成的分支食品生物化学，有其自己独特的方面。正是基于以上考虑，我们联合多所院校，结合各校开设实验的实际情况，有了出版本书的意愿。

本书共分8章，包括糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶类、维生素与色素、物质代谢和生物氧化等43个实验，其内容涉及食品生物化学实验的各个方面，既有经典的基本理论验证实验，又有近年广泛应用的各种凝胶电泳、凝胶过滤、核酸提取、纯化、鉴定等实验，更有把物质提取、性质研究，纯化、测定等融合在一起编写的综合实验内容，还有对实验室安全与防护知识、常用试剂和溶液的配制以及常用数据列表等内容的介绍。每一章力求内容系统全面、数据准确无误，同时脉络清晰、语言规范。每个实验包括目的要求、实验原理、试剂与器材、操作步骤及结果处理等部分，同时还附有思考题及注意事项，以期使用者能够掌握实验的背景和原理，在做实验的同时使自己的专业理论水平真正得到提高。因此，本书可以作为一本实用的食品生物化学实验手册使用。

本书实验内容较多，并且还包括较大型的综合实验，其目的是供各个院校根据各自实验室条件选做不同实验，不同专业也有自己的选择余地。

本书可作为高等院校食品科学、发酵工程、动物科学、动物医学、卫生检验、生物技术、化学工程、环境保护等专业的教材，也可供相关专业的学生、教师和科技工作者参考。

本书由东北农业大学于国萍负责全书的统稿工作，并编写内容简介、前言及实验二、二十九和四十二（I~IV）；中国农业大学袁芳编写实验十六、十七、三十三、三十五及附录；东北农业大学邵美丽编写实验二十四、二十五、二十八和四十三（I~III）；哈尔滨学院蒋丽萍编写实验一、十、十三、十八、二十二和三十一；东北林业大学王金玲编写实验九、十一、二十一和三十八；东方学院王雪飞编写实验十五、十二、二十三和三十；东北农业大学许岩编写实验三十七和四十；塔里木大学许倩编写实验

2 前 言

四、七、十四和三十二；延边大学徐红艳编写实验三、五、六、三十七和四十一；山西农业大学贾丽艳编写实验二十、二十六、二十七和三十六；东北农业大学穆莹编写实验八、十九和三十九。哈尔滨商业大学马永强教授对本书进行认真审阅，并提出宝贵意见，在此特致谢意。

虽然编者在本次编写过程中力求严谨和正确，但限于学识水平与能力，书中不足乃至错误仍属难免，殷切希望读者批评指正，以使本书日趋完善。

于国萍
2012.03.08

目 录

前 言

第一章 糖 类	(1)
实验一 糖的颜色反应和还原性的鉴定	(1)
实验二 总糖和还原糖的测定——3, 5 -二硝基水杨酸比色法	(4)
实验三 蔗糖含量的测定	(6)
实验四 总糖含量的测定——蒽酮比色法	(8)
第二章 脂 类	(10)
实验五 油脂酸价的测定	(10)
实验六 油脂过氧化值的测定	(12)
实验七 卵磷脂的提取和鉴定	(14)
实验八 血清胆固醇的测定	(16)
第三章 蛋白质	(18)
实验九 氨基酸的分离鉴定——薄层层析法	(18)
实验十 蛋白质及氨基酸的呈色反应	(21)
实验十一 蛋白质的两性反应和等电点的测定	(24)
实验十二 酪蛋白的制备	(26)
实验十三 蛋白质的沉淀反应	(28)
实验十四 蛋白质的含量测定——双缩脲法	(30)
实验十五 蛋白质含量测定——考马斯亮蓝 G - 250 法	(32)
实验十六 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离蛋白质	(34)
实验十七 SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	(38)
实验十八 凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量	(45)
实验十九 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	(49)
实验二十 IgG 葡聚糖凝胶过滤脱盐实验	(52)

第四章 核 酸	(54)
实验二十一 核酸的定量测定——定磷法	(54)
实验二十二 离子交换柱层析分离核苷酸	(57)
实验二十三 酵母 RNA 的提取——浓盐法	(60)
实验二十四 植物组织 DNA 的快速提取	(62)
实验二十五 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(64)
实验二十六 动物组织中核酸的提取与鉴定	(67)
第五章 酶	(70)
实验二十七 淀粉酶活力的测定	(70)
实验二十八 唾液淀粉酶活性观察	(73)
实验二十九 胰蛋白酶的测定	(76)
实验三十 底物浓度对酶促反应速度的影响—— K_m 值测定	(78)
实验三十一 枯草杆菌蛋白酶活力测定	(81)
实验三十二 碱性磷酸酶分离提取及比活性测定	(83)
实验三十三 过氧化物酶和多酚氧化酶活性的测定	(86)
第六章 维生素与激素	(88)
实验三十四 胡萝卜素的测定——色谱分离法	(88)
实验三十五 核黄素荧光光度定量测定法	(90)
实验三十六 还原性维生素 C 的定量测定	(93)
实验三十七 单宁含量的测定	(96)
实验三十八 叶绿素含量的测定——分光光度法	(98)
第七章 物质代谢与生物氧化	(100)
实验三十九 脂肪酸的 β -氧化	(100)
实验四十 生物组织中丙酮酸含量的测定	(104)
实验四十一 味精中谷氨酸钠的测定	(106)
第八章 综合实验	(108)
实验四十二 酵母蔗糖酶的提取及其性质研究	(108)
I 蔗糖酶的提取及部分纯化	(108)

II	离子交换层析纯化蔗糖酶	(110)
III	蔗糖酶各级分活性及蛋白质含量的测定	(113)
IV	米氏常数 (K_m) 及最大反应速度 (V_{max}) 的测定	(117)
实验四十三	植物中原花色素的提取、纯化与测定	(119)
I	植物中原花色素的提取与纯化	(119)
II	植物中原花色素的测定 (1)	(120)
III	植物中原花色素的测定 (2)	(122)
参考文献		(125)
附 录		(126)

第一章 糖 类

实验一 糖的颜色反应和还原性的鉴定

一、实验目的

1. 掌握某些糖的颜色反应原理，学习应用糖的颜色反应鉴别糖类的方法。
2. 学习几种常用的鉴定糖类还原性的方法及其原理。

二、实验原理

1. 颜色反应

(1) α -萘酚反应(Molisch 反应) 糖在浓无机酸(硫酸、盐酸)作用下，脱水生成糠醛及糠醛衍生物，后者能与 α -萘酚生成紫红色物质。因糠醛及糠醛衍生物对此反应均呈阳性，故此反应不是糖类的特异反应。

(2) 间苯二酚反应(Seliwanoff 反应) 在酸作用下，酮糖脱水生成羟甲基糠醛，后者再与间苯二酚作用生成红色物质。此反应是酮糖的特异反应。醛糖在同样条件下呈色反应缓慢，只有在糖浓度较高或煮沸时间较长时，才呈微弱的阳性反应。在实验条件下，蔗糖有可能水解而呈阳性反应。

2. 还原反应

福林试剂和班氏试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液，能使具有自由醛基或酮基的糖氧化，其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ，此法常用做还原糖的定性或定量测定。

三、试剂与器材

1. 仪器

水浴锅，试管及试管架，滴管，竹试管夹，电炉。

2. 材料

棉花或滤纸。

3. 试剂

- (1) 浓硫酸。
- (2) 1% 蔗糖溶液。
- (3) 1% 葡萄糖溶液。
- (4) 1% 淀粉溶液。



(5) 1% 果糖溶液。

(6) 1% 麦芽糖溶液。

(7) 蒸馏水。

(8) 莫氏试剂(5% α -萘酚的酒精溶液) 称取 α -萘酚 5g, 溶于 95% 酒精中, 总体积达 100mL, 贮于棕色瓶内, 用前配置。

(9) 塞氏试剂(0.05% 间苯二酚-盐酸溶液) 称取间苯二酚 0.05g 溶于 30mL 浓盐酸中, 再用蒸馏水稀释至 100mL。

(10) 福林试剂

甲液(硫酸铜溶液): 称取 34.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 500mL 蒸馏水中。

乙液(碱性酒石酸盐溶液): 称取 125g NaOH 和 137g 酒石酸钾钠溶于 500mL 蒸馏水中。

(11) 班氏试剂 称取柠檬酸钠 173g 及碳酸钠($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 100g 加入 600mL 蒸馏水中, 加热使其溶解, 冷却, 稀释至 850mL。另称取 17.4g CuSO_4 溶解于 100mL 热蒸馏水中, 冷却, 稀释至 150mL。最后, 将 CuSO_4 溶液徐徐加入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中, 边加边搅拌, 混匀, 如有沉淀, 过滤后贮存于试剂瓶中可长期使用。

四、操作步骤

1. 颜色反应

(1) α -萘酚反应 取 5 支试管对应做好标记, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 果糖溶液、1% 蔗糖溶液、1% 淀粉溶液各 1mL 和少量纤维素(滤纸或棉花浸于 1mL 水中), 然后各加入莫氏试剂 2 滴, 勿使试剂接触试管壁, 摇匀后将试管倾斜, 沿试管壁慢慢加入 1.5mL 浓硫酸(切勿振摇), 慢慢立起试管。浓硫酸在试液下形成两层。观察硫酸与糖溶液的液面交界处, 有无紫红色环出现。

(2) 间苯二酚反应 取 3 支试管, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 果糖溶液、1% 蔗糖溶液各 0.5mL。再向各试管分别加入塞氏试剂 5mL, 混匀。将 3 支试管同时放入沸水浴中, 注意观察, 记录各试管颜色的变化及变化时间。

2. 还原反应

于 5 支试管中分别加入福林试剂 A 和 B 各 1mL, 混匀后, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 蔗糖溶液、1% 果糖溶液、1% 麦芽糖溶液和 1% 淀粉溶液各 1mL, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 观察各试管的变化。

另取 5 支试管, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 蔗糖溶液、1% 果糖溶液、1% 麦芽糖溶液和 1% 淀粉溶液 1mL, 然后每支试管加班氏试剂 2mL, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 和上面结果比较。

五、结果处理

实验结果列于表 1-1 中。



表 1-1 糖的颜色反应和还原性的鉴定

	1% 葡萄糖溶液	1% 果糖溶液	1% 淀粉溶液	1% 蔗糖溶液	1% 麦芽糖(或纤维素)溶液
莫氏试剂					
塞氏试剂					
班氏试剂					
福林试剂					

【注意事项】

- 1. 取每种糖溶液时，用不同的吸管。
- 2. 试管中加入各种糖后，做好标记，并按顺序放到水浴锅中。

【思考题】

- 1. 观察每支试管中物质反应结果是否存在差异？为什么？
- 2. 结合实验现象，试对班氏试剂和福林试剂法进行比较。

实验二 总糖和还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法

一、实验目的

1. 掌握 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的原理和方法。
2. 熟练分光光度计的使用。

二、实验原理

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法，还原糖就是指含有自由醛基或酮基的糖类。单糖都是还原糖，寡糖有一部分为还原糖，多糖都是非还原糖。利用不同糖类在水中溶解性不同可以把它们分开，并且可以用酸水解法使寡糖和多糖彻底水解成具有还原性的单糖，再进行测定，这样就可以分别求样品中总糖和还原糖的量。

本实验是利用 3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物，在一定浓度范围内，还原糖的量和棕红色物质颜色的深浅程度成一定比例关系，可以用分光光度计进行测定。

三、试剂与器材

1. 仪器

试管、试管架及试管夹，吸量管(1mL, 5mL, 10mL)，水浴锅，容量瓶(100mL)，玻璃漏斗(6cm)，量筒(10mL, 100mL)，分光光度计，三角瓶(250mL)，台秤(感量 0.01g)。

2. 材料

土豆粉。

3. 试剂

(1) 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS) 量取 6.3g DNS 和 262mL 2mol/L NaOH 溶液，加到 500mL 含有 182g 酒石酸钾钠的热水溶液中，再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加水定容到 1000mL 贮于棕色瓶中。

(2) 1 000 μ g/mL 葡萄糖标准溶液 准确称取干燥恒重的葡萄糖 1g，加少许蒸馏水溶解后再加 3mL 12mol/L 盐酸溶液(防止微生物生长)，以蒸馏水定容至 1 000mL。

(3) 6mol/L NaOH 溶液。

(4) 6mol/L HCl 溶液。

(5) 酚酞指示剂。

四、操作步骤

1. 标准曲线的制作

取试管 6 支，按表 1-2 顺序加入各种试剂，得到浓度为 200~1 000μg/mL 标准葡萄糖溶液。

表 1-2 标准曲线的制作

管号	1 000μg/mL 葡萄糖标准液/mL	H ₂ O/mL	葡萄糖最终浓度/(μg/mL)
1	0	0.5	0
2	0.1	0.4	200
3	0.2	0.3	400
4	0.3	0.2	600
5	0.4	0.1	800
6	0.5	0	1 000

分别向各试管中加入 DNS 试剂 0.5mL，混合均匀，在沸水浴上加热 5min，取出后用冷水冷却，每管再加入 4mL 蒸馏水稀释，最后用空白管(1 号管)溶液调零点，在分光光度计上以 540nm 波长比色测出光密度值(OD)。

以葡萄糖浓度(μg/mL)为横坐标，以 OD 值为纵坐标，作出葡萄糖的标准曲线。

2. 土豆粉中还原糖和总糖的测定

(1)样品中还原糖的提取 称取土豆粉 0.50g，于三角瓶中，先以少量水调成糊状，再加 50~60mL 水摇匀后，50℃ 保温 20min，使还原糖浸出，定容到 100mL 容量瓶，过滤取滤液测还原糖。

(2)样品中总糖的水解和提取 称取土豆粉 0.50g，于三角瓶中，加入 6mol/L HCl 10mL，水 15mL，于沸水浴加热水解 30min，冷却后加入 6mol/L NaOH 调 pH 值至中性，并定容至 100mL，过滤，取滤液 10mL，稀释至 100mL，待用。

(3)样品中含糖量的测定 取上述还原糖和总糖的提取液 0.5mL，加入 DNS 试剂 0.5mL，混匀，与标准曲线制作同样处理。根据样品所测得的 OD 值，在标准曲线上查出还原糖浓度，并按下式计算出土豆粉中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖}(\%) = \frac{\text{还原糖的微克浓度}}{\text{样品质量(g)}} \times 10^{-2}$$

$$\text{总糖}(\%) = \frac{\text{水解后还原糖的微克浓度}}{\text{样品质量(g)}} \times 10^{-1} \times 0.9$$

【思考题】

1. DNS 方法测定原理是什么？
2. 总糖与还原糖的计算公式是如何推导出来的？

实验三 蔗糖含量的测定

一、实验目的

1. 掌握测定食品中蔗糖含量的原理和方法。
2. 了解测定食品中蔗糖含量的意义。

二、实验原理

蔗糖是由葡萄糖和果糖通过 1,2-糖苷键缩合而成的非还原糖,不能用糖试剂直接测定,通常采用酸或酶水解的方法,测定转化糖的含量或水解过程中旋光值的变化,也有采用葡萄糖氧化酶和显色剂的方法。此外,蔗糖还可用于气相色谱法和高效液相色谱法测定。

使用显色剂是一种较简便、迅速的方法,常用的显色剂有酚类、蒽酮的芳香族胺等。本实验用间苯二酚作为显色剂,利用蔗糖在强酸加热条件下,可与之形成一种紫红色物质,在分光光度计 500nm 波长处测其吸光值,即可求出蔗糖含量。

三、试剂与器材

1. 仪器

分光光度计,水浴锅,移液管(1mL, 5mL),比色管(12 支),烧杯(200mL),研钵(或组织的捣碎机),容量瓶(100mL),琉璃棒,天平,滤纸,漏斗,离心机,刀,温度计。

2. 试剂

(1)间苯二酚溶液 称取 0.500g 间苯二酚,用 6mol/L HCl 溶液溶解,并定容至 500mL。

(2)蔗糖标准溶液(1mg/mL) 精确称取 0.250g 恒重蔗糖,用蒸馏水溶解,并定容至 250mL。

(3)10mol/L HCl 溶液 将 1 000mL 的 12mol/L HCl 加蒸馏水 200mL 混匀即成。

(4)2mol/L NaOH 溶液 称取 16.00g NaOH,加蒸馏水溶解,并定容至 200mL。

四、操作步骤

1. 标准曲线制作

取 7 支干燥洁净比色管,编号后,按表 1-3 加各试剂量。

表 1-3 蔗糖标准曲线的制作

比色管编号	1	2	3	4	5	6	7
蔗糖标准溶液/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	1	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蔗糖含量/(mg/mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

分别在已加好蔗糖标准溶液和蒸馏水的各比色管中加入 2 mol/L NaOH 溶液 0.1mL，混合后在 100℃ 水浴中加热 10min，取出后立即在冷水中冷却。再加入间苯二酚溶液 1mL 和 3mL 的 10 mol/L HCl，摇匀后放入 100℃ 水浴中保温 10min。冷却后在 500nm 波长处测吸光值，以蔗糖含量为横坐标，相对应的吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品的测定

取均匀磨碎的鲜苹果样品 2g，用蒸馏水稀释后定容至 100mL，混匀，过滤。取滤液 0.5mL 于比色管中，加蒸馏水至 1.0mL，加入 2mol/L NaOH 溶液 0.1mL，以下操作同标准曲线，在比色前 2 000r/min 离心 5min，根据所测的吸光值在标准曲线上查出样品中蔗糖含量。

五、结果处理

样品中蔗糖含量(%) =
$$\frac{\text{查标准曲线所得蔗糖含量}(\text{mg/mL}) \times 2 \times 100\text{mL} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}(\text{g})} \times 100\%$$

【思考题】

- 1. 试验中为什么要先加 2mol/L NaOH 溶液？
- 2. 绘制蔗糖标准曲线依据的是什么定律？