LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE

Ķīmijas katedra

BIOĶĪMIJA

Metodiskie norādījumi

un laboratorijas darbu apraksti

Pārtikas produktu tehnoloģijas fakultātes
Pārtikas zinību studiju programmas studentiem

LLU

Jelgava, 2017

Sastādīja: doc. Dr.sc. ing. Velga Miķelsone

Mācību līdzeklis paredzēts LLU PTF Pārtikas zinību studiju programmas studentiem.

Recenzente: Dr. biol. Baiba Ozola

Izskatīts un apstiprināts Ķīmijas katedras 2017. gada 17. oktobra sēdē (protokols Nr.5).

Anotācija

Kursa apjoms – 4.5 KP (80 h, t.sk. lekc. 32 h, lab. darbi 48 h).

Obligāts kurss **Pārtikas zinību studiju programmas studentiem 5. semestrī.**

Bioķīmijas kursa apgūšana tiek atļauta, ja ir nokārtots organiskās ķīmijas kurss.

Studiju kursā sasniedzamie studiju rezultāti.

- **Zināšanas**. Spēj parādīt ar bioķīmiju saistītiem jautājumiem raksturīgās pamata un specializētās zināšanas un šo zināšanu kritisku izpratni, kā arī bioķīmijas svarīgāko jēdzienu un likumsakarību izpratni. Izpratne par zinātniski pētnieciskā darba pamatiem.
- **Prasmes.** Spēj izmantot bioķīmijas teorētiskos pamatus, veikt inovatīvu un pētniecisku darbību jaunu pārtikas produktu izstrādē un analīzē, formulēt un analītiski aprakstīt informāciju, problēmas un risinājumus ar pārtikas zinātnes nozares saistītajām profesijām bioķīmijas jomā, tos izskaidrot un argumentēti diskutēt par tiem. Zinātniski pētnieciskā darba iemaņas.
- **Kompetence.** Spēj patstāvīgi iegūt un analizēt informāciju un to izmantot, pieņemt lēmumus un risināt problēmas bioķīmijas jomā pārtikas zinātnes nozares saistītajās profesijās. Izvērtēt savas profesionālās darbības ietekmi uz vidi un sabiedrību un, izmantojot bioķīmijas zināšanas, piedalīties pārtikas zinātnes nozares zinātniski pētnieciskās un profesionālās jomas attīstībā.

Zināšanu kontroles sistēma un veidi.

Zināšanu kontrole tiek veikta laboratorijas darbu laikā ar kontroldarbiem rakstveidā - kopskaitā 11 kontroldarbi par atsevišķām nodaļām un tēmām.

Ja ir 4 neieskaitīti kontroldarbi, students laboratorijas darbos nepiedalās, līdz ir apgūta teorija.

Zinātniskais darbs.

Zinātnisko darbu bioķīmijas kursa ietvaros studenti izpilda nelielās 2-3 studentu grupās. Darba izstrādāšanai ir atvēlētas 12 laboratorijas darbu stundas, bet noformēšanai 20 patstāvīgā darba stundas. Zinātniskais darbs tiek prezentēts Pārtikas produktu tehnoloģijas fakultātes studentu un maģistrantu zinātniskajā konferencē.

Saturs

Anotācija…….....…..3

Aminoskābju kvalitatīva noteikšana hromatogrāfiski …….....…5

Muskuļaudu olbaltumvielu sadalīšana frakcijās.....…7

Rauga nukleoproteīnu hidrolīze.....…9

Oksidēšanās - reducēšanās enzīmu darbība…….....…11

Cietes enzimātiska hidrolīze ar siekalu amilāzi. Enzīmu darbības atkarība no temperatūras. Saharāzes specifiskums…….....….....…17

Laktozes satura noteikšana pienā……..…….....…20

Peroksīdu skaitļa noteikšana taukos…….....…….....…22

Proteīnu enzimātiska hidrolīze. Kuņģa sula. Pankreasa lipāzes un žults īpašības……..….....…..24

Olbaltumvielu kvantitatīva noteikšana pienā ar formaldehīda metodi.....…29

Kazeinogena izdalīšana no piena un tā hidrolītiska sašķelšana….....…..31

Urīnvielas un urīnskābes kvalitatīvās pierādīšanas reakcijas. Urīnvielas hidrolīze ar NaOH un ureāzes iedarbībā. Adrenalīns….....….....33

Askorbīnskābes noteikšana augļos un saknēs…….....…36

Zinātniskā darba titullapas paraugs…….....…37

Zinātniskā darba struktūra…….. …….....…….....…38

Izmantotā literatūra…….39

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

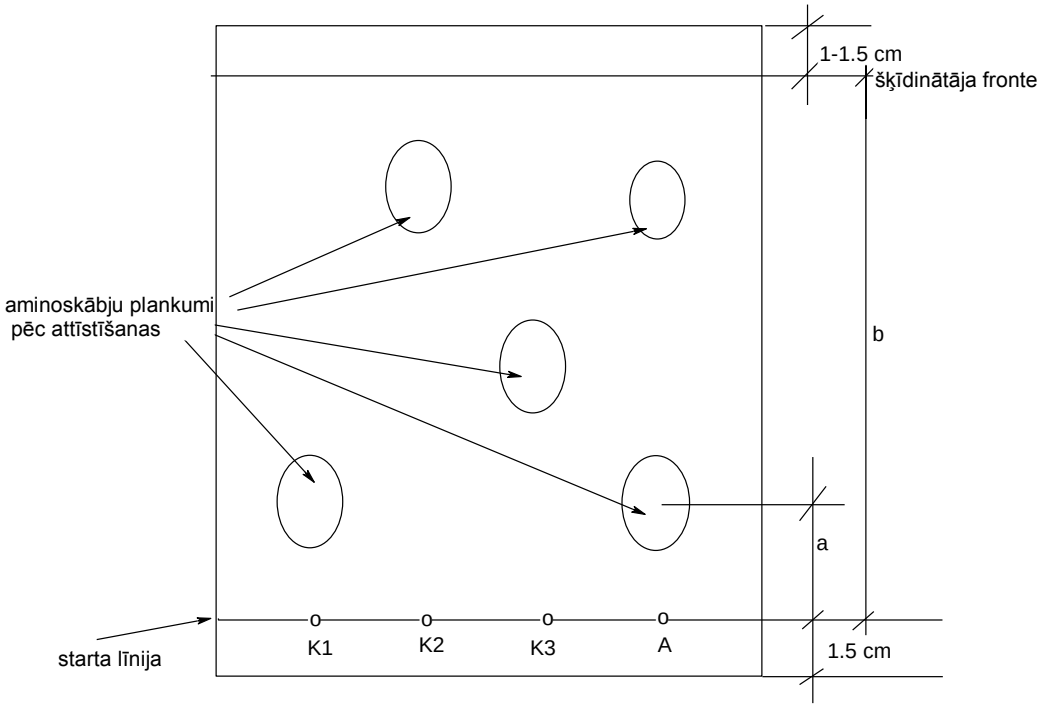
.... laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Aminoskābju kvalitatīva noteikšana hromatogrāfiski

Darba teorētiskais pamatojums. Aminoskābju sadalīšana ar papīra hromatogrāfiju pamatojas uz aminoskābju dažādo absorbcijas spēju uz hromatogrāfijas papīra celulozes šķiedrām un aminoskābju dažādo šķīdību ūdenī un izmantotajā šķīdinātājā. Tas, savukārt, ir atkarīgs no aminoskābes uzbūves un polaritātes.
Hromatogrāfijas laikā šķīdinātājs pa papīra kapilāriem ceļas uz augšu, nesot līdz analizējamās aminoskābes.
Aminoskābes vietas noteikšanai uz papīra pēc hromatogrāfijas izmanto α- aminoskābju reakciju ar ninhidrīnu – paaugstinātā temperatūrā veidojas violetas krāsas savienojums.
Šķīdinātāja un aminoskābes pārvietošanās attālumi pa papīra šķiedrām ir proporcionāli to ātrumam. To attiecība raksturo doto aminoskābi un apzīmē ar R_f (sadalījuma koeficients).

$$R_f = \frac{a}{b} \qquad (1.1.)$$

a– attālums no starta līnijas līdz aminoskābes plankuma centram, mm;
b – attālums no starta līdz šķīdinātāja frontei, mm (1.att.).



1. att. Aminoskābju hromatogramma

Darba uzdevums. Identificēt aminoskābes dotajā analīzē.

Darba gaita.

Hromatogrāfijas papīram nedrīkst pieskarties ar pirkstiem, jo arī sviedri satur aminoskābes!

1. Uz hromatogrāfijas papīra 1.5 cm no apakšējās malas ar zīmuli **viegli** novelk līniju. Uz tās vienādā attālumā atzīmē 4 punktus. Malējiem punktiem jābūt vismaz 2 cm no papīra malas.
2. Ar kapilāru 1., 2., 3. punktos uznes kontroles šķīdumus, bet 4. punktā – analīzes šķīdumu. Vispirms kapilārā ļauj iesūkties dotajam šķīdumam, tad uz īsu brīdi ar kapilāra galu pieskaras pie atzīmētā punkta tā, lai iegūtā plankuma diametrs būtu aptuveni **0.5 cm**. Plankumu **virs** elektriskās plītiņas izžāvē un uznes atkārtoti.
3. Hromatogrāfijas papīra loksni sašuj, izveidojot cilindru. **Papīra cilindra malas nedrīkst saskarties!**
4. Stikla traukā uzmanīgi, lai nesaslapinātu trauka sienas, aptuveni 0.5 cm biezā slānī ielej šķīdinātāju (n-butanola, ledus etiķskābes un ūdens maisījums attiecībās 4:1:5).
5. Traukā ar šķīdinātāju ievieto hromatogrāfijas papīra cilindru tā, lai tas neskartos pie trauka sienām. Virsū uzliek vāku un trauku ievieto termostatā 30-40^{0}C temperatūrā aptuveni 30-45 minūtes.
6. Kontrolē šķīdinātāja pacelšanos līdz 1-1.5 cm no papīra augšējās malas.
7. Ar zīmuli atzīmē šķīdinātāja frontes vietu un žāvē termostatā 105^{0}C temperatūrā 6 minūtes.
8. **Izlietoto šķīdinātāju izlej šim nolūkam paredzētā pudelē. Hromatogrāfijas trauku pēc darba ar ūdeni nemazgāt!**
9. Izžāvēto papīru samitrina 0.5% ninhidrīna spirta šķīdumā un vēlreiz izžāvē 105^{0}C temperatūrā 5 minūtes.
10. Aminoskābju novietojums uz papīra parādās krāsainu plankumu veidā. Izmēra katrai aminoskābei attālumu mm no starta līnijas līdz plankuma centram (a) un attālumu no starta līnijas līdz šķīdinātāja frontei (b).
11. Aprēķina sadalījuma koeficientu R_f katrai aminoskābei pēc formulas (1.1.).
12. Salīdzinot R_f vērtības analīzei un kontroles šķīdumiem, nosaka analīzes sastāvu.

Mērījumi:

Aprēķini:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

….laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Muskuļaudu olbaltumvielu sadalīšana frakcijās

Darba teorētiskais pamatojums. Muskuļu audi ir apmēram 42% no dzīvnieku ķermeņa masas**,** satur 75-80% ūdens un 20-25% sausnas. 80% no sausnas ir olbaltumvielas, pārējais – ogļhidrāti, lipīdi, ekstraktvielas, minerālvielas. No muskuļaudiem izdalītas vairākas olbaltumvielu frakcijas: miogens, mioalbumīns, miozīns, aktīns, globulīns X, miostromīns, kolagēns, nukleoproteīni u.c.
Miogens – muskuļu audu plazmas olbaltumviela ar albumīnu īpašībām, izgulsnējas ar piesātināta amonija sulfāta šķīdumu.
Mioglobīns – hromoproteīns ar hemoglobīnam līdzīgu struktūru, saista un transportē O_2 no hemoglobīna uz citohromu sistēmu, šķīst ūdenī.
Miozīns – miofibrillu struktūras olbaltumviela ar ar globulīnu dabu, viegli šķīst atšķaidītu sāļu šķīdumos un izsālās ar amonija sulfātu, kura koncentrācija ir ½ no piesātinātās.
Kolagens – protenoīds, saistaudu olbaltumviela. Ūdenī nešķīst, vārošā ūdenī pārveidojas želatīnā jeb līmē.

Darba gaita

I Albumīnu frakcijas izdalīšana.

1. Muskuļu gabaliņu kopā ar trīskāršu destilētā ūdens tilpumu saberž piestiņā.
2. Iegūto masu filtrē caur trīskārtīgi saliktu marli.
3. Nogulsnes saglabā otrajam mēģinājumam, bet filtrātu sadala 4 daļās:
   1) Olbaltumvielu pierādīšanai izpilda biureta reakciju: pievieno 5 pilienus 10% NaOH un 2 pilienus 1% $CuSO_4$ šķīdumus, novēro krāsu.
   2) Pievieno amonija sulfāta pulveri, līdz jauna sāls porcija vairāk nešķīst, kas norāda, ka šķīdums ir piesātināts. Novēro albumīna nogulsnes.
   3) Pievieno 5 pilienus 5% trihloretiķskābes šķīdumu. Novēro olbaltumvielu izgulsnēšanos.
   4) Izpilda mioglobīna pierādīšanas reakciju ar benzidīna reaģentu: šķīdumam pielej
      2 pilienus 5% benzidīna reaģenta un 3 pilienus 3% H_2O_2 šķīdumu.

Novērojumi: 1)
2)
3)
4)

Secinājumi: 1)
2)
3)
4)

II Globulīnu frakcijas izdalīšana

1. Muskuļaudus, kas palikuši no pirmā mēģinājuma, rūpīgi atbrīvo no albumīnu frakcijas paliekām – atkārtoti skalo ar jaunām ūdens porcijām, līdz skalojamais ūdens neuzrāda pozitīvu biureta reakciju.
2. Skalošanai izmantoto ūdeni izlej, bet izmazgātos audus aplej ar 5 mL 5% KCl šķīdumu un rūpīgi saberž.
3. Šķīdumā pāriet globulīnu frakcija. Šķīdumu atdala filtrējot.
4. Nogulsnes saglabā trešajam mēģinājumam, bet filtrātu sadala 3 daļās.

Lai ekonomētu laiku, vispirms liek vārīties uz marles palikušos muskuļaudus proteonīdu frakcijas iegūšanai (III 1. –III 2. mēģinājumi), un tikai pēc tam veic izdalītās globulīnu frakcijas pierādīšanas reakcijas.

1) Izpilda biureta reakciju olbaltumvielu pierādīšanai (pievieno 5 pilienus 10% NaOH un 2 pilienus 1% $CuSO_4$).
2) Pievieno vienādu tilpumu piesātināta amonija sulfāta šķīdumu un novēro miozīna un aktomiozīna nogulšņu veidošanos.
3) Pielej destilētu ūdeni, līdz parādās ūdenī nešķīstošas miozīna un aktomiozīna nogulsnes.

Novērojumi: 1)
2)
3)

Secinājumi: 1)
2)
3)

III Proteonīdu frakcijas izdalīšana

1. Otrajā mēģinājumā uz marles palikušos muskuļaudus, kas satur proteonīdus – kolagēnu un elastīnu – ievieto mēģenē ar aizbāzni, kurā ievietota stikla caurulīte kā dzesinātājs.
2. Pielej 5 mL destilēta ūdens un vāra 30 min.
3. Vārot kolagens pāriet ūdenī šķīstošajā želatīnā, jo tiek pakļauts hidrolīzei. Karstu šķīdumu filtrē un filtrātu sadala 2 daļās:
   1) Izpilda biureta reakciju: pievieno 5 pilienus 10% NaOH un 2 pilienus 1% $CuSO_4$ šķīdumus, novēro krāsu.
   2) Izgulsnē ar trihloretiķskābi.
4. Uz marles paliek elastīna šķiedras.

Novērojumi: 1)
2)

Secinājumi: 1)
2)

Jautājumi paškontrolei

1. Uz kādām olbaltumvielu īpašībām pamatojas to sadalīšana frakcijās?
2. Kāds ķīmiski mehānismi realizējas, izgulsnējot olbaltumvielas ar piesātinātu amonija sulfāta šķīdumu un izgulsnējot ar trihloretiķskābi?
3. Ko pierāda olbaltumvielās ar biureta reakciju?
4. Kur šķīst albumīni, kur globulīni un kur proteonīdi?

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Rauga nukleoproteīnu hidrolīze

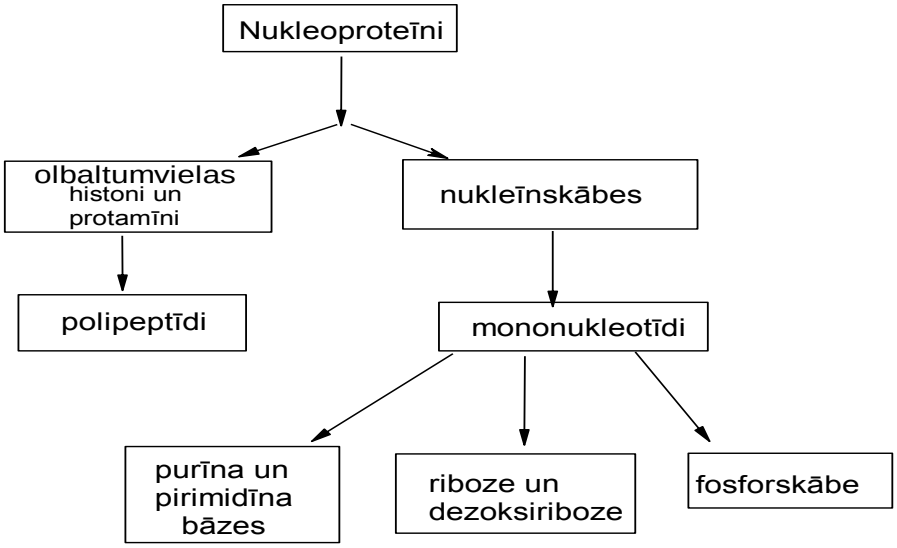
Darba teorētiskais pamatojums

Nukleoproteīni ir saliktas olbaltumvielas, kurās prostētisko grupu veido polinukleotīdi - nukleīnskābes. No šīm olbaltumvielam sastāv galvenā šūnu kodola masa.

Nukleoproteīni ir ne tikai šūnu kodola un citoplazmas struktūras elementi, bet arī izpilda svarīgas specifiskas funkcijas dzīvā organismā. Šūnu dalīšanās, olbaltumvielu biosintēzes, iedzimtības informācijas pārnese un dauzdveidīgās koenzīmu funkcijas cieši saistītas ar nukleoproteīniem, visbiežāk ar to sastāvā esošām nukleīnskābēm. Nukleoproteīnu grupai pieskaitāmas arī vīrusu olbaltumvielas.

Nukleīnskābes ir lielmolekulāri savienojumi, veidoti no liela daudzuma mononukleotīdiem. Mononukleotīdi hidrolizējoties veido purīna un pirimidīna bāzes, ogļhidrātus (ribozi vai dezoksiribozi) un fosforskābi

Dzīvajos organismos ir divu veidu nukleīnskābes – ribonukleīnskābes (RNS) un dezoksiribonukleīnskābes (DNS). Atškirīgs ir ķīmiskais sastāvs. RNS kā ogļhidrātu komponente ir riboze bet DNS- dezoksiriboze. Bez tam RNS sastāvā ietilpst uracils, DNS- uracila vieta ir timīns. Daļējā hidrolīzē nukleoproteīni sašķeļas olbaltumvielās (pārsvarā bāziska rakstura protamīnos un histonos) un nukleīnskābēs. Pilnīgi hidrolizējoties, olbaltumvielas un nukleīnskābes sašķeļas savās pamata sastāvdaļās, kuras redzamas 1.att.



1. att. Nukleoproteīnu hidrolīzes shēma

Lai noskaidrotu rauga nukleoproteīnu ķīmisko sastāvu, raugu hidrolizē ar skābi un nosaka hidrolīzes produktus: polipeptīdus, purīna bāzes, ogļhidrātus un fosforskābi ar katrai vielai specifiskām reakcijām.

Darba gaita

1.Rauga hidrolīze.

1) Lielā mēģenē ievieto gabaliņu svaiga vai kaltēta maizes rauga, pielej 10 mL 10% sērskābes šķīdumu, mēģeni aiztaisa ar aizbāzni, kurā kā dzesinātājs ievietota stikla caurulīte.
2) Karsē ūdens vannā 40- 45 min.
3) Mēģeni atdzesē zem ūdens strūklas.
4) Hidrolizātu filtrē.
5) Filtrātu sadala 4 mēģenēs un nosaka nukleoproteīnu hidrolīzes produktus.

Novērojumi:

Secinājumi:

1. **Polipeptīdu pierādīšana ar biureta reakciju.**
   1) Pie 5 pilieniem hidrolizāta pielej 10 pilienus 10% NaOH šķīdumu un 1 pilienu 1% $CuSO_4$ šķīduma.
   2) Iegūtais šķīdums nokrāsojas violetā krāsā (radies biureta komplekss peptīdu saitei ar vara joniem).

Novērojumi:

Secinājumi:

2. **Purīna bāzu pierādīšana ar sudraba nitrātu.**

1) 10 pilienus hidrolizāta neitralizē ar 3 pilieniem koncentrētu amonjaka šķīdumu.
2) Pievieno 5 pilienus 1% sudraba nitrāta šķīdumu.
3) Sildot ūdens vannā, rodas gaiši brūnas nogulsnes.

Novērojumi:

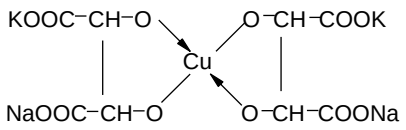
Secinājumi:

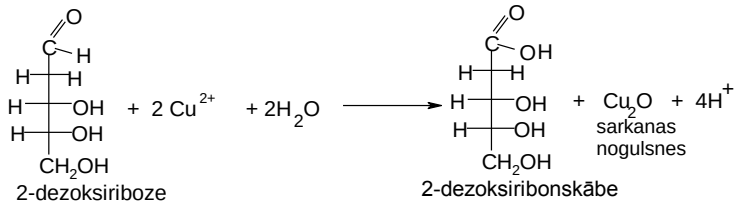
3. **Ogļhidrātu pierādīšanas reakcijas.**

Šīs reakcijas pamatojas uz ribozes un dezoksiribozes spēju reducēt metālus (varu, bismutu, dzelzi) sārmainā vidē. Metāli reducējas no divvērtīga par vienvērtīgu, savukārt, monosaharīdu aldehīdgrupa oksidējas par skābes grupu.

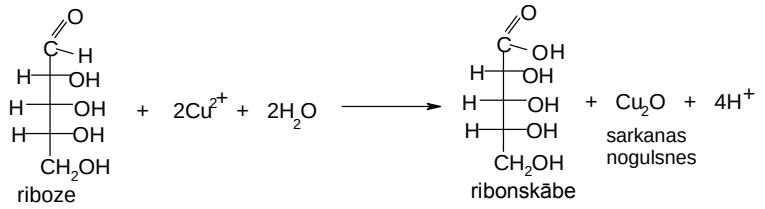
Fēlinga reakcija.

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums. Fēlinga šķīdums I ir $CuSO_4$ šķīdums ūdenī. Fēlinga šķīdums II ir vīnskābes kālija nātrija sāls un sārma šķīdums ūdenī. Fēlinga šķīdumu gatavo tieši pirms lietošanas un tajā divvērtīgā vara jons atrodas vīnskābes sāls kompleksa savienojuma veidā. Fēlinga reakcija pamatojas uz divvērtīgā vara reducēšanos par vienvērtīgo ribozes vai dezoksiribozes ietekmē, kas ir rauga hidrolizāta sastāvā. Reakcija norit sārmainā vidē saskaņā ar shēmu:





vai



Darba gaita.

1) Vispirms hidrolizātu neitralizē ar sārmu - 5 pilieniem hidrolizāta pievieno 5 pilienus 10% NaOH.
2) Pievieno 5 pilienus Fēlinga I un 5 pilienus Fēlinga II šķīdumus.
3) Veidojas intensīvi zils šķīdums. Ja tā krāsa ir zilganzaļa, tad pievieno dažus pilienus 30% NaOH, līdz veidojas zila šķīduma krāsa.
4) Silda ūdens vannā līdz nemainīgai krāsai.
5) Pēc nogulšņu krāsas secina par reakcijas gaitu un monosaharīdu esamību hidrolizātā.

Novērojumi:

Secinājumi:

5.Fosforskābes pierādīšana ar molibdena reaģentu.

Reakcijas vienādojums:

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21\ HNO_3 \rightarrow (NH_4)_3PO_4 \cdot 12MoO_3 + 21\ NH_4NO_3$$

Darba gaita.

1) Pie 10 pilieniem molibdena reaģenta - amonija molibdāta šķīduma - pievieno 4 pilienus koncentrētas HNO_3 un 5 pilienus hidrolizāta šķīdumu.
2) Karsē ūdens vannā 5-10 minūtes.
3) Mēģeni atdzesē zem auksta ūdens.
4) Novēro citrondzeltenas nogulsnes un izdara secinājumus

Novērojumi:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Oksidēšanās –reducēšanās enzīmu darbība

Oksireduktāzes piedalās rūgšanas vai elpošanas procesos un katalizē organisko vielu noārdīšanos, saistītu ar dzīvības procesiem nepieciešamās enerģijas iegūšanu. Šie enzīmi pārnes ūdeņradi vai elektronus, tādēļ pieskaitāmi oksireduktāzēm.

Elpojošo organismu audos pēdējais ūdeņraža akceptors ir skābeklis. Enzimātiskās ūdeņraža un skābekļa saistīšanās rezultātā veidojas gala produkts - ūdens.

1. Dehidrogenāzes pierādīšana pienā.

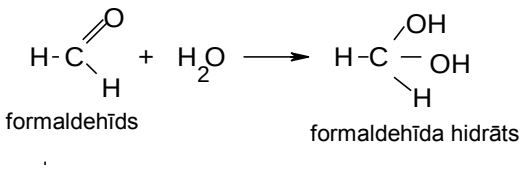
Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

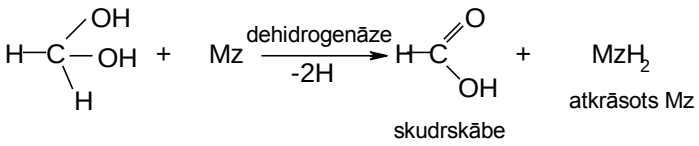
Dehidrogenāzes ir oksidējoši - reducējošo enzīmu grupa, kas pārnes ūdeņradi un elektronus no substrāta (oksidējamās organiskā vielas) uz citohromiem vai citiem akceptoriem.

Dehidrogenāžu koenzīmu sastāvā ir vitamīni niacīns (PP), B_2. Krāsviela metilēnzilais (Mz) spēj aizstāt dabiskos ūdeņraža akceptorus. Mz, saistot ūdeņradi, reducējas bezkrāsainā savienojumā. Šo krāsvielu izmanto eksperimentos ar dehidrogenāzēm.

Pienā, kā arī dzīvnieku audos, atrodas dehidrogenāze, kura oksidē aldehīdus attiecīgās skābēs, arī purīnus - hipoksantīnu un ksantīnu - urīnskābē. Šis enzīms koenzīma sastāvā satur riboflavīnu *(B_2* vitamīnu) un ieguvis nosaukumu aldehīddehidrogenāze vai ksantīnoksidāze.

Mz atkrāsošanās pienā enzīma klātienē notiek pēc sekojošas shematiskas reakcijas:





Mēģinājuma gaita.

1) Vienā mēģenē ielej 5 mL nepasterizētu pienu, bet otrā mēģenē 5 mL vārītu pienu.
2) Pēc tam abās mēģenēs pievieno pa 1 mL 0,4% formalīna šķīdumu un 2 pilienus metilēnzilo.
3) Mēģeņu saturu rūpīgi sajauc un ievieto termostatā 38 °C uz pusstundu.
4) Pēc pusstundas novēro, kurā mēģenē notiek atkrāsošanās un paskaidro iemeslu.

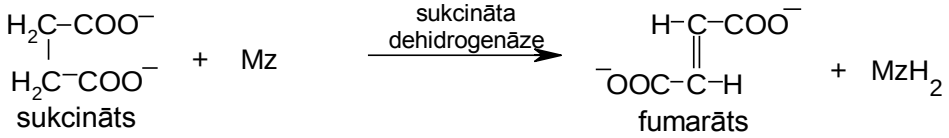
Novērojumi:

Secinājumi:

2. Sukcīndehidrogenāzes pierādīšana muskuļu šķiedrās.

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Dzīvnieku muskuļos ir dehidrogenāze, kura oksidē sukcinātus (dzintarskābes sāļi) par fumarātiem (fumārskābes sāļi). Šī reakcija ir viena no citronskābes cikla reakcijām. Sukcīndehidrogenāzes pierādīšanai izmanto Mz un novēro tā atkrāsošanos:



Mēģinājuma gaita.

1) Divās mēģenēs ievieto pa gabaliņam muskuļu šķiedras.
2) Katrā mēģenē ielej pa 2 mL fizioloģiskā šķīduma.
3) Tad pirmajā mēģenē ielej 0.5 mL Na sukcināta šķīdumu, bet otrajā - 0.5 mL ūdens.
4) Abās mēģenēs pielej pa 2 pilieniem Mz.
5) Mēģeņu saturu rūpīgi sajauc un ievieto termostatā 38 °C uz pusstundu.
6) Pēc pusstundas konstatē krāsu izmaiņu un to, kurā mēģenē reakcija notiek.

Novērojumi:

Secinājumi:

3. Citohromu un citohromoksidāzes pierādīšana

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Citohromi – oksidējoši – reducējošo enzīmu grupa kā koenzīmu satur hemīnu ar aktīvo Fe atomu un audu elpošanas ķēdē pārnes elektronus no reducētā koenzīma Q uz gaisa skābekli.

$$KoQH_2 + 2\,CytFe^{3+} \rightarrow KoQ + 2\,CytFe^{2+} + 2H^+$$

$$2\,CytFe^{2+} + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow 2\,CytFe^{3+} + O^{2-}$$

$$O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O$$

Pēdējais no citohromu rindas, kas pārnes elektronus, ir citohromoksidāze. Mēģinājumā KoQ funkcijas veic mākslīgs aizvietotājs **„NADI" reaģents (sastāv no 1% dimetilparafenilēndiamīna, 1% naftola un 1.5% sodas šķīduma vienādās attiecībās**). Ja muskuļu šķiedras saslapina ar NADI reaģentu, tad gaisa skābekļa klātbūtnē veidojas zils krāsojums.

$$O_2 + 2NADIH_2 \xrightarrow[\text{citohromoksidāze}]{\text{citohromi}} \underset{\substack{\text{oksidētā forma} \\ \text{zilā krāsā}}}{2NADI^+} + 2H_2O$$

Mēģinājuma gaita.

1) Svaigu un vārītu muskuļu gabaliņu novieto uz filtrpapīra.
2) Abiem gabaliņiem uzpilina „NADI" reaģentu.
3) Novēro, kur attīstās zils krāsojums.

Novērojumi:

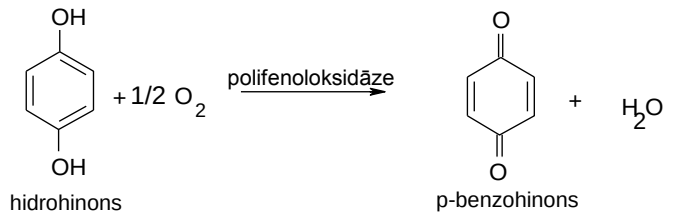
Secinājumi:

4. Polifenoloksidāzes pierādīšana kartupeļos

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Polifenoloksidāze jeb tirozināze ir Cu saturošs proteīds, plaši izplatīts augos – kartupeļos, cukurbietēs, sēnēs u.c. Sastopama arī dzīvnieku organismā. Šo enzīmu sauc arī par tirozināzi, jo tas oksidē aminoskābi tirozīnu melanīnos – ādas, matu un spalvu pigmentos. Polifenoloksidāze spēj oksidēt dažādus fenolus – hidrohinonu, pirogallolu, gvajakolu, tirozīnu. Šīs vielas izmanto polifenoloksidāzes pierādīšanai.

Gaisa skābekļa klātienē hidrohinons, kurš mēģinājumā aizvieto tirozīnu, uz svaigi nogrieztas kartupeļu šķēlītes oksidējas par hinonu, kas tālāk kondensācijas reakciju rezultātā veido brūnus pigmentus:



Mēģinājuma gaita.

1) No svaiga un no vārīta kartupeļa nogriež pa šķēlītei un novieto uz filtrpapīra.
2) Uz katras uzpilina pa 1 pilienam hidrohinona.
3) Pēc kāda laika uz nevārītā kartupeļa šķēlītes parādās izmaiņas.

Novērojumi:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Cietes enzimātiska hidrolīze ar siekalu amilāzi. Enzīmu darbības atkarība no temperatūras. Saharāzes specifiskums

I Siekalu amilāzes pakāpeniska iedarbība uz cieti

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Siekalu amilāze hidrolizē cieti, veidojot starpproduktus – polisaharīdus dekstrīnus, kuriem pakāpeniski hidrolizējoties, rodas disaharīds maltoze.

$$(C_6H_{10}O_5)_n + n/2\ (H_2O) \rightarrow n\ (2\ C_{12}H_{22}O_{11})$$

ciete maltoze

Dažādi dekstrīni (amilodekstrīni, eritrodekstrīni, maltodekstrīni) atkarībā no hidrolīzes pakāpes ar jodu veido dažādu toņu krāsojumu, sākot ar zilu (amilodekstrīni), sarkanbrūnu (eritrodekstrīni), bezkrāsainu (maltodekstrīni). Līdzīga reakcija notiek, cietei hidrolizējoties minerālskābju ietekmē. Šajā gadījumā hidrolīzes galaprodukts ir glikoze:

$$(C_6H_{10}O_5)_n + n\ H_2O \rightarrow n\ C_6H_{12}O_6$$

ciete glikoze

Darba gaita

1. Pagatavo siekalu šķīdumu: izskalo muti ar destilētu ūdeni, tad ieņem mutē jaunu ūdens porciju, patur apmēram 1 minūti un izspļauj vārglāzītē.

2. 100 mL vārglāzē ielej 50 mL destilēta ūdens, pievieno I_2 šķīdumu, līdz šķīdums kļūst izteikti dzeltens.

3. Sagatavoto joda šķīdumu sadala 8 mēģenēs pa 3 mL katrā, pārējo saglabā II mēģinājumam.

4. Pēc tam izdara cietes hidrolīzi ar amilāzi (siekalu šķīdumu):

1) Citā mēģenē iemēra 10 mL 0.5 % cietes šķīdumu un pievieno 0.5 mL siekalu šķīdumu.
2) Sajauc un tūlīt ar pipeti paņem no reaģējošā parauga 3 pilienus un iepilina pirmajā mēģenē ar sagatavoto joda šķīdumu.
3) Mēģenes saturu sajauc un novēro krāsojumu.
4) Turpmāk parauga ņemšanu atkārto ik pēc 2 min, tādējādi iegūstot mēģeņu sēriju ar krāsu gammu, kas sākas ar zilu, pāriet caur violetu, violeti-sarkanu, sarkani-brūnu, sarkani-oranžu un beidzas ar dzeltenu (*I_2* krāsa).

Ja darba gaitā 3. mēģenē, salīdzinot ar 1. mēģeni, krāsa nemainās, cietes hidrolīzi veic ar koncentrētāku siekalu amilāzes šķīdumu, vai arī nākošos paraugus ņem ar lielāku laika intervālu.

Ja jau 2. vai 3. mēģenē ir tikai joda krāsa (dzeltens), tad cietes hidrolīzi atkārto ar atšķaidītāku siekalu šķīdumu.

5) Atlikušo cietes hidrolizātu pārbauda ar Fēlinga reakciju uz reducējošo cukuru (maltozes) klātieni: mēģenē ielej pa 1 mL Fēlinga I un Fēlinga II šķīdumus, sajauc un uzkarsē ūdens vannā līdz nemainīgai krāsai. Sarkano nogulšņu *(Cu_2O)* rašanās norāda uz reducējošā cukura klātbūtni.

Novērojumi:

Secinājumi:

II Temperatūras ietekme uz enzīmu aktivitāti

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Optimālā temperatūra lielākai da|ai dzīvnieku ķermenī esošajiem enzīmiem ir 38-40 °C. Virs un zem šīs temperatūras enzīmu katalītiskā aktivitāte stipri samazinās. Zemas temperatūras neizsauc enzīmu bojāšanos. Vārīšanās temperatūra noved enzīmus pie neatgriezeniskas, olbaltumvielām raksturīgas denaturācijas.

Darba gaita

1. 3 mēģenēs ar pipeti ielej pa 2 mL 0,1 % cietes šķīdumu.
2. Pirmo mēģeni ievieto vāroša ūdens vannā, otro - termostatā 40 °C temperatūrā, trešo - ledusskapī.
3. Pēc 10 minūtēm, kad temperatūra izlīdzinājusies, visās mēģenēs pievieno pa 0.5 mL siekalu amilāzes šķīdumu.
4. Mēģenes tādos pašos apstākļos iztur vēl 10 minūtes.
5. Pēc norādītā laika mēģenes izņem, atdzesē un to saturam pievieno pa 3 mL I_2 *(pagatavotu I mēģinājumā)* šķīdumu.
6. Iegūtos rezultātus ieraksta tabulā un izdara secinājumus par enzīmu darbības atkarību no temperatūras.

Mēģenes Nr.	Cietes šķīdums, mL	Amilāzes šķīdums, mL	t°C	Krāsojums ar jodu
1.	2	0.5	100	
2.	2	0.5	40	
3.	2	0.5	0	

Novērojumi:

Secinājumi:

III Substrātspecifiska enzīmu iedarbība

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums. Saharoze līdzīgi cietei uzrāda negatīvu Fēlinga reakciju, bet pēc saharozes hidrolīzes

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_20 \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$$

Saharoze glikoze fruktoze

radusies glikoze uzrāda pozitīvu Fēlinga reakciju. Reakcijas katalīze ar enzīmu var notikt tikai tad, ja substrāts var saistīties ar enzīmu.

Darba gaita

1. Vienā mēģenē ielej 4-5 mL 0,1 % cietes šķīdumu, otrā - 4-5 mL 2 % saharozes šķīdumu.
2. Abās mēģenēs pielej pa 1 mL saharāzes šķīdumu.
3. Sajauc un uz 15 min. mēģenes ievieto termostatā 40 °C temperatūrā.
4. Pēc tam abās mēģenēs izpilda Fēlinga reakciju: pievieno pa 1 mL Fēlinga I un Fēlinga II šķīdumus, sajauc, uzkarsē līdz viršanai ūdens vannā līdz nemainīgai krāsai.
5. Novēro pārmaiņas un izdara secinājumus.

Novērojumi:

Secinājumi:

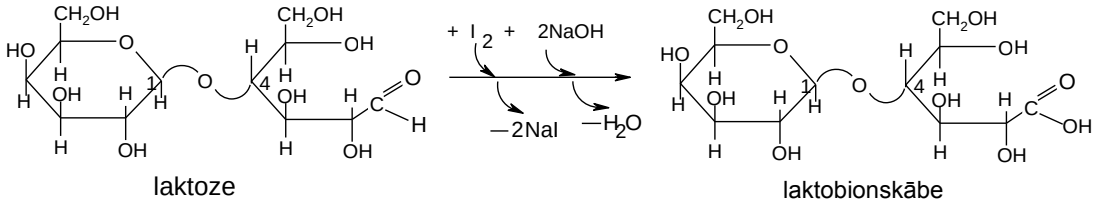
PTF .kursa .grupas
student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Laktozes satura noteikšana pienā

Metode pamatojas uz laktozes (aldehīdgrupas) spēju sārmainā vidē oksidēties ar jodu. Joda pārākumu attitrē.



$$I_2 + 2\,Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

Piena olbaltumvielu atdalīšana.

1. Divās 50 mL mērkolbās ielej pa 5 mL 7% $CuSO_4$ šķīduma, 5 mL NaOH šķīdumu un
   2.5 mL 5% NaF šķīdumu.
2. Tad vienā kolbiņā ielej 5 mL pienu.
3. Abu kolbiņu saturu uzpilda ar destilētu ūdeni līdz zīmei, šķīdumus sajauc un atstāj uz
   30 minūtēm.
4. Pēc 30 minūtēm **dekantējot** filtrē caur kroku filtru.
5. Kamēr analīzes un kontroles šķīdumi reaģē, **nosaka faktoru**:

Faktoru nosaka, 10 mL 0.1M I_2 šķīdumu titrējot cietes klātienē (daži pilieni) ar 0.1M $Na_2S_2O_3$ šķīdumu un pēc tam skaitli 10 dalot ar titrēšanai izlietoto tiosulfāta šķīduma mL skaitu.

Laktozes titrēšana.

1. Kontroles un analīzes filtrātus apstrādā vienādi. 10 mL filtrāta ielej kolbiņā, pielej
   10 mL 0.1M I_2 šķīduma, tad, nepārtraukti maisot, pielej 5 mL 2% NaOH šķīdumu.
2. Pēc 20 minūtēm pielej 5 mL 5% HCl šķīdumu un titrē ar 0.1M $Na_2S_2O_3$ šķīdumu līdz dzeltenai krāsai.
3. Tad pievieno dažus pilienus 1% cietes šķīdumu un turpina titrēt, līdz zilais krāsojums izzūd.
4. Aprēķina laktozes saturu 100 mL piena:
   2 mL 0.1M $Na_2S_2O_3$ (atbilstoši 0.1M I_2) šķīduma atbilst 0.018 g laktozes.
   Piena cukura daudzumu 100 mL aprēķina:

$$M = \frac{(A-B) \cdot f \cdot 0.018 \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot 5 \cdot 2}, \text{ kur}$$

A - 0.1 M $Na_2S_2O_3$ šķīduma mL skaits, kas patērēts kontroles titrēšanai;

B - 0.1 M $Na_2S_2O_3$ šķīduma mL skaits, kas patērēts analīzes titrēšanai;

f - 0.1 M $Na_2S_2O_3$ šķīduma faktors.

Aprēķini:

Secinājumi (iegūto rezultātu salīdzina ar ražotāja norādīto un teorētiski iespējamo laktozes saturu pienā)**:**

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

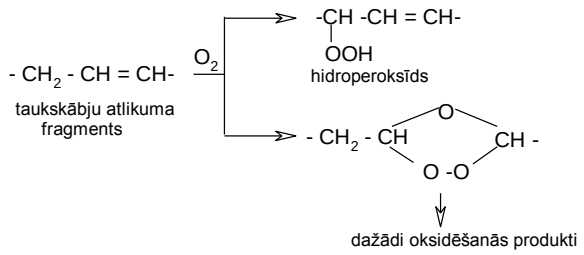
…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Peroksīdu skaitļa noteikšana taukos

<u>Darba teorētiskais pamatojums.</u> Par peroksīdskaitli sauc aktīvā skābekļa ekvivalentu (puse no skābekļa atoma molmasas) daudzumu 1 kg parauga, kas izteikts mmol·kg^{-1}. Ja peroksīdskaitli reizina ar skābekļa ekvivalenta molmasu, (8 g·mol^{-1}), iegūst aktīvā skābekļa masu mg 1 kg parauga.

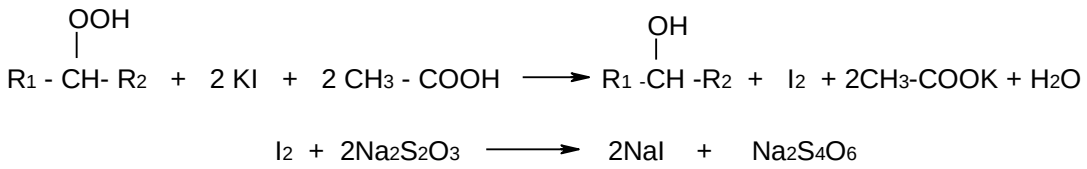
Jāievēro, ka peroksīdu skaitļa palielināšanās liecina par tauku oksidēšanos, taču oksidācijas procesiem turpinoties, atsevišķos gadījumos pieaug arī peroksīdu sadalīšana un tādējādi peroksīdu skaitlis samazinās.

Nepiesātinātās taukskābes saturošie tauki ar lielu dubultsaišu skaitu viegli oksidējas, nepiesātināto taukskābju atlikumiem reaģējot ar gaisa skābekli. Notiek oksidēšana dubultsaišu vietās pie blakus oglekļa atoma – *alilstāvoklī*. Bez tam nepiesātināto taukskābju atlikumos pārtrūkst dubultsaites un pievienojas skābeklis. Rodas dažādi oksidēšanas produkti: peroksīdi, hidroperoksīdi, alkanoli, aldehīdi, karbonskābes u.c. savienojumi, kas piešķir taukiem rūgtu garšu un nepatīkamu, asu smaku.



Metodes princips.

Paraugu izšķīdina hloroforma un ledus etiķskābes maisījumā un sajauc ar kālija jodīda šķīdumu. Reakcijā ar peroksīdgrupām izdalās jods, kuru nosaka, titrējot ar nātrija tiosulfāta šķīdumu.



Darba gaita

1. Koniskā kolbā iesver 1,00±0.10 g tauku un izšķīdina tos 30 mL šķīduma, kas pagatavots no 2 daļām etiķskābes un 1 daļas hloroforma.
2. Iegūtajam šķīdumam pievieno 0.5 mL piesātināta KI šķīduma un skalinot izšķīdina.
3. Kolbu noslēdz ar aizbāzni un novieto uz 20 minūtēm tumšā vietā.
4. Pēc 20 minūtēm pielej 30 mL destilēta ūdens, un izdalījušos jodu titrē ar 0.001 M $Na_2S_2O_3$ šķīdumu:.
   - īsi pirms titrēšanas beigu punkta (sāk izzust dzeltenais krāsojums – **uzmanīgi, nenotitrēt par daudz!**) pievieno apmēram 1 mL 1 % cietes šķīdumu.
   - titrē tik ilgi, kamēr izzūd zilais krāsojums.
5. **Tukšā analīze.** Analogu reaktīvu pārbaudes mēģinājumu izpilda bez tauku piedevas.
6. Peroksīdu skaitli aprēķina:

$$POS = \frac{(v_1 - v_2) \cdot C_{Na_2S_2O_3}}{m_p} \cdot 1000,$$

kur V_1 - $Na_2S_2O_3$ standartšķīduma daudzums, kas patērēts titrējot izdalīto I_2 daudzumu taukvielu šķīdumā, mL;

V_2 - $Na_2S_2O_3$ standartšķīduma daudzums, kas patērēts titrējot izdalīto I_2 daudzumu reaktīvu kontroles mēģinājumā, mL;

$C_{Na_2S_2O_3}$ - $Na_2S_2O_3$ standartšķīduma koncentrācija, $mol \cdot L^{-1}$,

m_p - tauku iesvars gramos;

Aprēķini:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student…

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Proteīnu enzimātiska hidrolīze. Kuņģa sula. Pankreasa lipāzes un žults īpašības.

I Proteīnu enzimātiska hidrolīze.

Darba teorētiskais pamatojums

Kuņģa sulas enzīms pepsīns pieskaitāms hidrolāžu klasei, peptidāžu apakšklasei un endopeptidāžu apakšapakšklasei. Enzīms pH intervālā 1.5-2.5 hidrolizē olbaltumvielas ūdenī šķīstošos peptonos. Hidrolīzes rezultātā pepsīna ietekmē sadalās dažu olbaltumvielu molekulu iekšējās peptīdu saites pēc shēmas:

$$R_1\text{- CO-NH-}R_2 \;+\; H_2O \;\rightarrow\; R_1\text{-COOH} \;+\; R_2\text{-}NH_2$$

Pepsīna darbības pierādīšanai izmanto biureta reakciju, kura ar olbaltumvielām dod zili violetu krāsojumu, bet ar peptoniem – violeti sārtu krāsojumu, kā arī olas baltuma šķīduma opalescences (spēju izkliedēt gaismu) samazināšanos.

Tripsīns ir pankreasa dziedzera enzīms, kas izdalās proenzīma tripsinogēna veidā, pieder endopeptidāzēm. Vāji bāziskā vidē (pH8-9) veicina proteīnu bāzisko aminoskābju arginīna un lizīna karboksilgrupu veidoto peptīdu saišu hidrolīzi, veidojot peptīdus un dažas aminoskābes.

1. Peptīdu saites pierādīšana ar biureta reakciju.

Darba gaita.

1) Vienā mēģenē ielej 1mL olbaltumvielu sķīdumu, otrā – 1mL peptona šķīdumu.
2) Pēc tam abās mēģenēs pielej pa 4-5 pilieniem 10% NaOH un 1 pilienu 2% $CuSO_4$ šķīdumus.
3) Salīdzina krāsojumu abās mēģenēs.

Novērojumi:

Secinājumi:

2. Pepsīna darbības pierādīšana pēc spējas sašķidrināt denaturētu olas baltumu.

Darba gaita.

1) Divās mēģenēs ielej pa 2 mL olbaltumvielu suspensiju.
2) Pēc tam pirmajā ielej 0.5 mL 0.5% pepsīna šķīdumu un 1mL ūdens, bet otrajā – 0.5 mL 0.5% pepsīna šķīdumu un 1mL 0.4% HCl šķīdumu.
3) Novērtē pH abās mēģenēs ar universālindikatoru.
4) Tad abas mēģenes ievieto termostatā 38° C temperatūrā uz stundu.
5) Pēc stundas izņem, novēro izmaiņas un izdara secinājumus par pepsīna darbības īpatnībām.

Novērojumi:

Secinājumi:

3. Tripsīna darbības pierādīšana pēc spējas sašķidrināt denaturētu olas baltumu.

Darba gaita.

1) Divās mēģenēs ielej pa 2mL olbaltumvielas suspensiju un pa 1mL tripsīna (pankreatīna) šķīdumu.
2) Pirmajā mēģenē ielej 1mL 1% $NaHCO_3$ šķīdumu, bet otrajā – 1mL ūdens.
3) Mēģeņu saturu sajauc un ar universālindikatoru novērtē vides pH.
4) Pēc tam mēģenes ievieto termostatā 38°C temperatūrā uz pusstundu.
5) Pēc pusstundas atzīmē, kurā mēģenes saturs kļuvis dzidrāks.
6) Izdara secinājumus par tripsīna darbības optimālo vidi.

Novērojumi:

Secinājumi:

II Kuņģa sula

Darba teorētiskais pamatojums

Kuņģa sulas sastāvā ietilpst enzīms pepsīns, sālsskābe, fosfāti un citi sāļi. Kuņģa lipāze ir mazaktīva un sašķeļ tikai emulģētos taukus, piemēram, piena taukus. Kuņģa sekrētā ir sālsskābe, kuras ietekmē no kuņģa sieniņām izdalītais mazaktīvais pepsinogens pārvēršas aktīvā enzīmā - pepsīnā. Pepsīna darbības optimums ir skābā vidē pH 1.5-2.5. Daļa sālsskābes kuņģa sulā ir jonizētā stāvoklī, daļa - saistīta ar uztura olbaltumvielām sālsveidīgos savienojumos, kuri saista ūdeni un uzbriest. Uzbriedušās olbaltumvielas vieglāk hidrolizējas enzīmu ietekmē.

Kopējo kuņģa sulas skābumu veido visas ar bāzi reaģējošas vielas: brīvā sālsskābe, saistītā sālsskābe, organiskās skābes (pienskābe) un hidrogenfosfāti. Kuņģa sulas kopējo skābumu izsaka ar 0.1 M *NaOH* šķīduma mL skaitu, ko patērē, notitrējot 100 mL kuņģa sulas indikatora fenolftaleīna klātienē. Normāli cilvēkam tas ir 40 - 60 mL. Fenolftaleīnu, kura krāsas izmaiņas ir pH 8.2-10 robežās, kā indikatoru lieto tāpēc, ka, titrējot vājas skābes, arī skābos sāļus, ekvivalences punkts sasniedzams vāji sārmainā vidē.

Brīvās sālsskābes noteikšanai, lai nenotitrētu arī vājas skābes, jāņem indikators metiloranžs, kura krāsas izmaiņas zona ir pH 2.9-4.0. Šajā gadījumā neitralizējas tikai stipra skābe – brīvā HCl, bet organiskās skābes un citas vāji skābās vielas nav neitralizētas.

1. Kuņģa sulas kopējā skābuma kvantitatīva noteikšana.
Noteikšanas gaita.

1) Vārglāzē iemēra 5 mL kuņģa sulas.
2) Pielej 1-2 pilienus fenolftaleīna un titrē ar 0.1 M NaOH šķīdumu līdz vāji rozā krāsai, kas neizzūd 1 minūtes laikā.
3) Aprēķina pēc vienādojuma:

$$K = a \cdot 20, \quad \text{kur}$$

K - kopējais kuņģa sulas skābums (0.1 M NaOH šķīduma mL skaits uz 100 mL),

a - *5* mL kuņģa sulas titrēšanai patērētais 0.1 M NaOH šķīduma mL skaits.

Aprēķini:

Secinājumi:

2. Brīvās sālsskābes noteikšana.

Noteikšanas gaita.

1) Vārglāzē iemēra 5 mL kuņģa sulas, pievieno 2-3 pilienus metiloranža.
2) Šķīdums nokrāsojas ķiršu sarkanā krāsā.
3) Titrē ar 0.1 M NaOH šķīdumu līdz ķiršu sarkanā krāsa pāriet dzeltenīgi sarkanā (lašu krāsa).
4) Nepārtitrēt, jo tālāka titrēšana dod paaugstinātu rezultātu.
5) Aprēķina pēc vienādojuma:

$$B = a \cdot 20, \quad \text{kur}$$

B –kuņģa sulas brīvā sālsskābe (kuņģa sulas neitralizēšanai izlietotais 0.1 M NaOH šķīduma mL skaits uz 100 mL),

a - 5 mL kuņģa sulas titrēšanai patērētais 0.1 M NaOH šķīduma mL skaits.

Aprēķini:

Secinājumi:

3. Kuņģa sulas reakcija ar universālindikatoru.

Darba gaita:

1) Ar stikla irbulīti uz universālindikatora papīra uznes pilienu kuņģa sulas.
2) Novēro krāsojumu un salīdzina to ar pievienoto skalu.

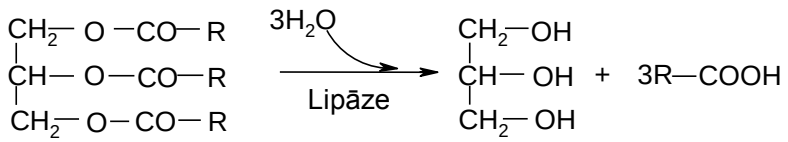
Novērojumi:

Secinājumi:

III Pankreasa lipāzes u žults īpašības

Darba teorētiskais pamatojums

Lipāze hidrolizē taukus pēc sekojošas reakcijas, sadalot triglicerīdus glicerolā un taukskābēs:



Lipāze ir ūdenī šķīstoša, bet tauki ūdenī nešķīst, tāpēc lipāzes un tauku mijiedarbība var notikt tikai uz divu fāzu robežvirsmas. Žults satur žultsskābes un to sāļus, kuras tauku gremošanas procesā piedalās kā virsmas aktīvas vielas - adsorbējoties uz tauklodīšu virsmas, veicina lielāku tauklodīšu sadalīšanos mazākās, tādējādi palielinot tauku virsmu un sekmējot to hidrolīzi. Liela daļa uztura tauku (izņemot piena taukus, kuri ir emulsijas stāvoklī) emuļģējas zarnās žults iedarbībā.

Žultsskābes aktivē lipāzi, kas izdalās mazaktīva jeb proenzīma veidā.

Žultsskābes sekmē taukskābju uzsūkšanos. Lipīdu hidrolīzes produkti ar žultsskābēm veido *micellas,* kas ieslēdz arī taukos šķīstošos vitamīnus, un uzsūcas caur tievās zarnas sienas bārkstiņām. Taukskābes ar žultsskābēm veido kompleksus – holeīnskābes, kas labi šķīst ūdenī. Zarnu šūnās šis komplekss sašķeļas, taukskābes nokļūst limfas sistēmā, bet žultsskābes ar asinīm aizplūst atpakaļ uz aknām.

Par lipāzes aktivitāti var spriest, nosakot taukskābju daudzuma palielinājumu reakcijas laikā, notitrējot tās ar 0.1 M NaOH šķīdumu fenolftaleīna klātienē. Pankreasa lipāzes darbības optimums ir pH 7-8.5 intervālā, tāpēc pirms reakcijas jārada attiecīgā vides pH.

1. **Pankreasa lipāzes aktivācija ar žultskābēm.**
   1) Trīs kolbiņas sagatavo kā parādīts tabulā:

Nr.	Piens, mL	Pankreatīna šķīdums, mL	Konc.Žults, mL	Iztērētais NaOH šķīdums, mL
1.	5	1	1	
2.	5	1	-	
3.	5	-	1	

   2) Pēc tam katrā kolbiņā pievieno pa 3 pilieniem fenolftaleīna šķīdumu.
   3) Saskalo un piepilina 0.1 M NaOH šķīdumu līdz tikko jaušamai rozā krāsai
   4) Visas kolbiņas ievieto termostatā 38°C temperatūrā uz pusstundu.
   5) Pēc 30 min. izņem un titrē ar 0.1 M NaOH šķīdumu līdz rozā krāsai.
   6) Izlietotā NaOH daudzumu mL ieraksta tabulā un izdara secinājumus.

Novērojumi:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student…

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Olbaltumvielu kvantitatīva noteikšana pienā ar formaldehīda metodi

Darba teorētiskais pamatojums

Metodes pamatā ir formaldehīda reakcija ar olbaltumvielu aminogrupām. Rezultātā atbrīvojas olbaltumvielas karboksilgrupas un palielinās piena titrējamais skābums, pēc kura pieauguma nosaka olbaltumvielas masas daļu pienā.

Darba gaita

Formalīns ir ļoti kodīgs šķidrums, tāpēc tā iesūkšanai pipetē obligāti jāizmanto gumijas baloniņš!

1. Ja formalīna šķīdums ir duļķains, to pirms lietošanas filtrē.
2. Formalīnu pirms lietošanas *neitralizē*:
   1) 50 mL formalīna pievieno 3-4 pil. fenolftaleīnu,
   2) pēc tam pa pilienam pievieno 0.1M NaOH šķīdumu līdz vāji rozā krāsai.

3. **0.1M NaOH šķīduma precīzas koncentrācijas noteikšana**
   10 mL pagatavoto NaOH šķīdumu titrē ar zināmas konc. HCl šķīdumu un izrēķina C_M NaOH. Indikators metilsarkanais.

$$C_{M\ NaOH} = \frac{C_{M\ HCl} \cdot V_{HCl}}{10\ mL_{\ NaOH}}$$

4. **Krāsas etalona pagatavošana**

1) 200 mL kolbā ar pipeti iemēra 20 mL pienu un pievieno 0.5 mL 2.5 % $CoSO_4$ šķīdumu.
2) Lai neveidotos krējuma slānis, etalonu periodiski saskalo.

5. **Analīzes gaita**

1) 200 mL kolbā ar pipeti iemēra 20 mL pienu,
2) pievieno 3-4 pil. fenolftaleīnu,
3) titrē ar 0.1000 M NaOH šķīd. līdz vāji rozā krāsai (salīdzina ar etalonu),
4) pievieno 4 mL neitralizētā formalīna šķīdumu, saskalo un pēc 1 min. atkārtoti titrē līdz vāji rozā krāsai,
5) nolasa **pēc formalīna pievienošanas** titrēšanai izlietoto 0.1000 M NaOH daudzumu.

Aprēķini

Kopējo olbaltumvielu masas daļu % pienā rēķina *formalīna klātienē* neitralizācijai patērēto 0.1000 M NaOH šķīduma mL skaitu reizinot ar 0.959, ņemot vērā noteikto precīzo $C_{M\ NaOH}$.

$$X = 0.959 \cdot \frac{V_{NaOH} \cdot C_{M\ NaOH}}{0.1000}, \quad \text{kur}$$

V_{NaOH} - **pēc formalīna pievienošanas** titrēšanai patērētais 0.1000 M NaOH daudzums, mL

$C_{M\ NaOH}$ - 0.1M NaOH šķīduma precīza koncentrācija.

Secinājumi (iegūto rezultātu salīdziniet ar literatūras datiem un ražotāja norādīto)**:**

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Kazeinogena izdalīšana no piena un tā hidrolītiska sašķelšana.

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Kazeinogenam ir skābes īpašības, pienā tas ir anjonu veidā, šķīstošs ūdenī (kazeinogena kalcināts). Nedisociētas kazeinogena molekulas ūdenī ir mazšķīstošas. Kazeinogena izoelektriskajā punktā- pH 4.7 - piens sarec, veidojot kazeinogena nogulsnes.

Kazeinogenu izgulsnējot, pienam nedrīkst pievienot skābes pārākumu, jo kazeinogena molekulas maina lādiņu un no jauna pāriet šķīdumā, kas kavē izgulsnēšanu.

Piena sarecēšanu izraisa arī pienskābe, kas veidojas no laktozes pienskābās rūgšanas baktēriju iedarbībā.

Enzimātiskā piena sarecināšanā (pepsīna iedarbībā) kazeinogens ķīmiski pārveidojas kazeīnā. Kazeīna Ca sāļi, pretēji kazeinogena Ca sāļiem, ūdenī nešķīst.

Sārmainā hidrolīzē kazeinogens sadalās par proteīnu un fosfātu.

1. **Kazeinogena izdalīšana.**

Darba gaita:

1) 4 mL piena pielej 4 mL ūdens.
2) Kazeinogenu izgulsnē, ievienojot 2 pilienus koncentrētas etiķskābes šķīdumu.
3) Ar universālindikatoru pārbauda vides *pH.*
4) Izkritušās kazeinogena nogulsnes nofiltrē
5) un uz filtra 2 reizes mazgā ar destilētu ūdeni.

Novērojumi:

Secinājumi:

2. **Kazeinogena hidrolīze.**

Darba gaita:

1) Pēc piena kazeinogena izgulsnēšanas visas nogulsnes no filtra pārnes mēģenē, lai veiktu hidrolīzi.
2) Pēc tam filtru skalo ar 2 mL 0.1 % Na_2CO_3 šķīdumu
3) un pievieno 4 mL 10 % *NaOH* šķīdumu.

4) Karsē ūdens vannā 15 min, skaitot no vārīšanās sākuma.
5) Pēc atdzišanas hidrolizātam pievieno tādu pašu daudzumu 0.1 % Na_2CO_3 šķīdumu
6) un veic radušos hidrolīzes produktu pierādīšanu:
   a) ar biureta reakciju (5 pil. hidrolizāts + 10 pil. NaOH + 1 pil. 1% $CuSO_4$),
   b) pierāda radušos fosfātus ar molibdena reaģentu:
      - 10 pilieniem atšķaidītā kazeinogena hidrolizāta šķīduma pievieno 1 pilienu fenolftaleīna un 1 pilienu koncentrētas HNO_3 šķīdumu,
      - un tikai pēc atkrāsošanās pievieno 20 pilienus molibdena reaģenta – $(NH_4)_2MoO_4$.
      - Pēc tam šķīdumu uzvāra un mēģeni atdzesē ar aukstu krāna ūdeni.
      - Mēģenē novēro nogulšņu rašanos.

Novērojumi:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

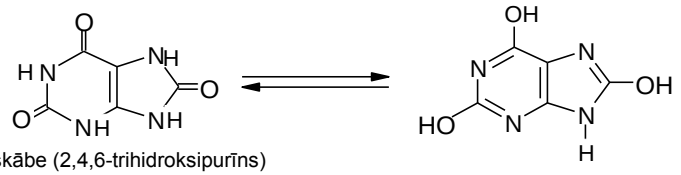
Urīnvielas un urīnskābes kvalitatīvās pierādīšanas reakcijas. Urīnvielas hidrolīze ar NaOH un ureāzes iedarbībā. Adrenalīns.

<u>Urīnskābe</u>

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Urīnskābe cilvēka organismā veidojas oksidējoties purīniem, bet putniem arī kā olbaltumvielu noārdīšanās galvenais produkts.

Urīnskābe ir 2,6,8-trihidroksipurīns un pastāv divās tautomērās formās:



urīnskābe (2,4,6-trihidroksipurīns)
ketoforma

enolforma

Urīnskābe ir vāja divvērtīga skābe, ļoti vāji šķīst ūdenī, veido vien- un divaizvietotus sāļus. Monourāti slikti šķīst ūdenī, diurāti - labi.

Urīnskābes sāļu šķīdība.

Darba gaita:

1) Mēģenē dažiem kristāliņiem urīnskābes uzlej 2-3 mL ūdens un uzsilda.
2) Novēro urīnskābes šķīdību.
3) Pēc tam šajā mēģenē pielej 1mL 10% NaOH šķīdumu.
4) Novēro divaizvietotā Na diurāta šķīdību.
5) Iegūtam šķīdumam pielej 1mL piesātinātu NH_4Cl šķīdumu.
6) Novēro vienaizvietotā amonija ureāta šķīdību.

Novērojumi:

Secinājumi:

Urīnviela

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Urīnviela - ogļskābes diamīds NH_2-CO-NH_2 ir zīdītāju galvenais olbaltumvielu maiņas produkts. Neitrāla viela, labi šķīst ūdenī, ar skābēm veido sāļus, veidojas aknās un izdalās ar urīnu. Daži no tiem, piemēram, $(NH_2)_2CO \cdot HNO_3$ (nitrāti) un $(NH_2)_2CO \cdot H_2C_2O_4$ (oksalāti) ir grūti šķīstoši. Urīnvielas hidrolīzi sārma iedarbībā un enzimātiski attēlo reakcija:

$$NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 + H_2O \rightarrow 2\,NH_3 + CO_2$$

Enzīms ureāze, kas hidrolizē urīnvielu, atrodas dažās baktērijās un augos, sevišķi sojā un arbūzu sēklās.

1. **Urīnvielas sāļu pagatavošana.**

Darba gaita:

1) Divās mēģenēs ielej pa 1mL 20% urīnvielas šķīdumu,
2) pēc tam vienā ielej 1mL koncentrētas HNO_3 šķīdumu,
3) bet otrā – piesātinātu $H_2C_2O_4$ šķīdumu.
4) Novēro kristālu rašanos.

Novērojumi:

Secinājumi:

2. **Urīnvielas hidrolīze ar sārmu.**

Darba gaita:

1) Mēģenē ielej 1mL 20% urīnsvielas šķīdumu,
2) pielej 1ml 10%NaOH šķīdumu,
3) uzmanīgi silda ūdens vannā un konstatē NH_3 rašanos pēc smakas un ar sarkanā lakmusa papīru, kas samitrināts ūdenī un novietots uz mēģenes.

Novērojumi:

Secinājumi:

Urīnvielas hidrolīze ar enzīmu ureāzi.

Darba gaita:

1) Mēģenē saberztām arbūza sēklām pielej 10 mL ūdens.
2) Iegūto šķīdumu sadala divās daļās.
3) Vienā mēģenē pielej 2 pilienus 2% $CuSO_4$ šķīdumu.
4) Pēc tam abās mēģenēs pielej pa 0.5 mL 0.5% urīnvielas šķīdumu.
5) Sakrata un uz 30 min ievieto termostatā 40°C temperatūrā.
6) Tad izņem, katrā mēģenē pievieno pa pilienam fenolftaleīna.
7) Novēro un izskaidro izmaiņas mēģenēs.

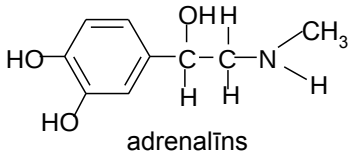
Novērojumi:

Secinājumi:

Adrenalīns

Mēģinājuma teorētiskais pamatojums

Adrenalīns ir virsnieru dziedzera serdes daļas hormons - palielina asinsspiedienu, sašaurina asinsvadu kapilārus un ietekmē vielu maiņu, palielinot cukura saturu asinīs.



adrenalīns

Adrenalīna ķīmiskās īpašības nosaka galvenokārt pirokatehīna grupa. Gaisā adrenalīns viegli oksidējas un krāsojas sarkans. Ar dzelzs trihlorīdu, līdzīgi pirokatehīnam, dod zaļus savienojumus. Ar diazoreaģentu veido kompleksus sarkanā krāsā.

1. **Adrenalīna oksidēšana ar kālija jodātu.**

Darba gaita:

1) Mēģenē ielej 2-3 pilienus adrenalīna šķīdumu,
2) 2 pilienus 10% KIO_3 šķīdumu
3) un 2 pilienus 10% etiķskābes šķīdumu.
4) Maisījumu viegli uzsilda.
5) Izveidojas sarkani-violeta krāsa.

Novērojumi:

Secinājumi:

2. **Diazoreakcija ar adrenalīnu.**

Darba gaita:

1) Mēģenē ielej 3 pilienus 1% sulfanilskābes šķīdumu,
2) 3 pilienus 5% $NaNO_2$ šķīdumu,
3) 5 pilienus adrenalīna šķīdumu
4) un 3 pilienus 10% Na_2CO_3 šķīdumu.
5) Iegūtais šķīdums krāsojas sarkanā krāsa.

Novērojumi:

Secinājumi:

PTF .kursa .grupas student...

(datums)

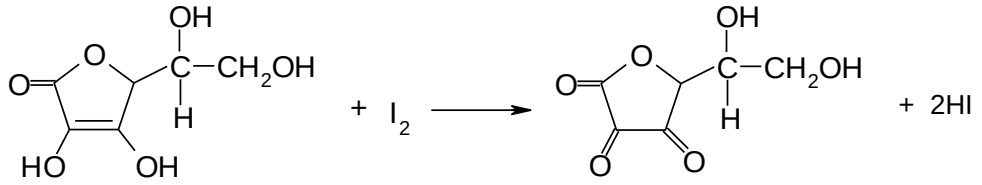
…. laboratorijas darba protokols bioķīmijā

Askorbīnskābes noteikšana augļos un saknēs

Darba uzdevums:

Noteikt askorbīnskābes saturu .....

Darba teorētiskais pamatojums. Metode pamatojas uz to, ka askorbīnskābe reducē joda šķīdumu, oksidējoties par dehidroaskorbīnskābi.



L-askorbīnskābe L-dehidroaskorbīnskābe

1. Parauga sagatavošana

2. Ja nepieciešams, pirms svēršanas paraugu sarīvē vai saberž piestiņā.
3. Nosver 25,0 g analizējamā materiāla.
4. Ar 6% skābeņskābes šķīdumu kvantitatīvi pārnes 100 mL mērkolbā, uzpilda līdz zīmei, rūpīgi saskalo.
5. Filtrē caur kroku filtru.

2. Darba gaita

1. 25 mL standartšķīdumu pārnes 100 mL koniskā kolbā.
2. Pievieno 2 mL 1% cietes šķīdumu un rūpīgi saskalo.
3. Titrē ar 0.01 M I_2 šķīdumu līdz krāsas maiņai, kas neizzūd 30 s laikā.
4. Pieraksta izlietotā I_2 šķīduma tilpumu.
5. 10 mL paraugu titrē analoģiski.

Askorbīnskābes daudzumu mg/100 g produkta aprēķina:

$$X = \frac{V_{par.} \cdot 5000}{V_{stand.} \cdot g}$$, kur

$V_{par.}$ – izlietotais joda daudzums parauga titrēšanai, mL,

$V_{stand.}$ – izlietotais joda daudzums C vitamīna standartšķīduma titrēšanai, mL,

g – parauga iesvars, gramos.

3. Aprēķini.

Secinājumi (iegūto rezultātu salīdziniet ar literatūras datiem):

Zinātniskā darba titullapas paraugs

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE

PĀRTIKAS TEHNOLOĢIJAS FAKULTĀTE

ĶĪMIJAS KATEDRA

Zinātniski pētnieciskais darbs bioķīmijā

DARBA NOSAUKUMS

PTF 3. kursa studente	Anna Ābola Matr.Nr.
PTF 3. kursa students	Jānis Bērziņš Matr. Nr.
Darba vadītāja	.....

Jelgava, 2017

Zinātniskā darba struktūra

SATURS

Referāts .....

Ievads

1. LITERATŪRAS APSKATS.....

1.1. .....

1.1.1. .....

1.1.2. .....

1.1.3. .....

1.2. .....

1.2.1.

1.2.2

1.3. .....

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....

2.1. Materiāli un metodes .....

2.1.1. Parauga sagatavošana .....

2.2.2. Darba gaita.....

2.2. Pētījumu rezultāti un to analīze .....

SECINĀJUMI.....
LITERATŪRAS SARAKSTS .....
PIELIKUMS

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Andersons P., Vecmuktāne L.(1995) Bioķīmija: Metodiskie norādījumi un laboratorijas darbu apraksti/LLU; 51 lpp.
2. Matiseks R., Šnēpels F.,Šteinere G.(1998) Pārtikas analītiskā ķīmija. Rīga,, Latvija Universitāte, -456 lpp.
3. Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2004) Food Chemistry, 3 rd Edition. Berlin, Heidelberg: Springer, 1070 S.
4. Matissek R., Steiner G. (2006) Lebensmittelanalytik, 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 408 S.
5. Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 6. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 1118 S
6. Baltes W. (2007) Lebensmittelchemie, 6. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 497 S.
7. Eckhardt S., Gottwald W., Stieglitz B. (2007) 1×1 der Laborpraxis: Prozessorientierte Labortechnik für Studium und Berufsausbildung, 2. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH, 435 S.