	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет»	Приложение к ОПОП ВО
		Методические указания

Кафедра физиологии,
биохимии и кормления животных

Б1.О.12 Биохимия сельскохозяйственной продукции

Методические указания к лабораторным работам

Направление подготовки

35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной
продукции

Профили подготовки

Прогрессивные технологии производства и переработки
продукции животноводства

Технология производства продукции органического
и функционального питания

Квалификация выпускника

Бакалавр

Уфа 2024

Рекомендованы к изданию методической комиссии факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (21 марта 2024 г. протокол № 8.)

Составитель: к.б.н., доцент Андриянова Э. М.

Ответственный за выпуск: зав. кафедрой физиологии, биохимии и кормления животных, к.б.н., доцент Хабиров А.Ф.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Вводное занятие. Правила по технике безопасности.

Тема 1. Качественные реакции на углеводы в с.-х. продукции

Тема 2. Фосфолипиды в сливочном масле, молоке и яйце

Тема 3. Цветные реакции на белки и отдельные аминокислоты в с.-х. продукции

Тема 4. Реакции осаждения белков молока и мяса

Тема 5. Ферментативный гидролиз крахмала

Тема 6. Определение содержания витамина С в растительных источниках и молоке

Тема 7. Определение каталазы и пероксидазы молока

Тема 8. Анализ химического состава молока и сливок

Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ по курсу «Биологическая химия»

При проведении лабораторных занятий по биохимии применяются физические и химические методы исследований состава и свойств растворов, тканей тела, животных и др. При проведении работ используются электрические приборы, спиртовки, химические вещества (кислоты минеральные и органические, щелочи, спирты, органические растворители), легковоспламеняющиеся вещества и др., а также лабораторное оборудование, изготовленное из стекла и электрооборудование. Студенты к работе лаборанта при приготовлении рабочих растворов не привлекаются.

При выполнении лабораторных работ студентам необходимо выполнять основные правила техники безопасности.

1. В лаборатории работать только в застегнутой спецодежде (халатах), без спецодежды студенты на занятие не допускаются.

2. Выполняя лабораторную работу точно руководствоваться методикой, описанной в методических указаниях к данной лабораторной работе.

3. Не пользоваться реактивами без этикеток или неизвестными растворами.

4. Для работы использовать лабораторное оборудование и посуду из стекла не имеющих видимых повреждений.

5. Электроприборы не должны иметь оголенных проводов. Спиртовки должны быть исправны.

6. Для работы с концентрированными кислотами, щелочами и другими агрессивными веществами использовать специальную адаптированную посуду, оборудование. Избегать попадания агрессивных веществ, растворов на кожу тела, одежду, тетради и т.д.

7. На рабочем месте придерживаться чистоты и порядка. Работать внимательно, не мешать друг другу при выполнении отдельных операций.

8. В лаборатории биохимии необходимо соблюдать все правила работы в химических лабораториях.

9. Не пользоваться реактивами без этикеток.

10. Пробирками, пипетками и другими принадлежностями для работы пользоваться только на своем рабочем месте, не брать реактивов и пипеток с другого стола.

11. Осторожно обращаться с концентрированными кислотами, щелочами, а также уксусным ангидридом, перекисью водорода и др. Концентрированные кислоты и щелочи нельзя брать пипетками.

12. Нагревать и кипятить жидкости следует осторожно, чтобы избежать выбрасывания ее из пробирки. Отверстие пробирки отклонить в сторону от себя и других студентов, работающих в лаборатории.

13. При загорании водорастворимых органических веществ (например спиртов) в качестве средства тушения использовать воду. При загорании жидкостей, нерастворимых в воде (бензола, толуола и др.), очаг пожара накрыть асбестовым полотенцем, одеялом, засыпать песком или применить огнетушитель.

14. При ожогах и порезах следует немедленно оказать помощь. При термических ожогах смочить обожженный участок 5%-ным раствором танина в этиловом спирте.

При ожогах кислотами – промыть обожженное место водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной 1%-ным раствором соды. При ожогах щелочами пораженный участок следует обильно промыть водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченной 10%-ным раствором уксусной кислоты.

При ожогах жидким фенолом кожу протирают глицерином до появления нормальной окраски, промывают водой и накладывают компресс из ваты или марли, смоченной глицерином.

При попадании в глаза кислоты следует тщательно промыть их водой, а затем 2%-ным раствором бикарбоната натрия. В случае попадания в глаза щелочи их промывают водой и 2%-ным раствором борной кислоты.

15. После окончания работы отключить аппаратуру от электросети, закрыть водопроводные краны, рабочее место оставить в полном порядке.

16. По всем неясным вопросам. Касающимся работы, правил безопасности и др., обращаться к преподавателю или лаборанту.

17. Студенты, не соблюдающие правил безопасной работы в лаборатории, не допускаются к работе, об их поведении сообщается деканату.

Тема 1. Качественные реакции на углеводы в с.-х. продукции

1. Цель и задачи работы. Закрепить представления о химическом строении, некоторых свойствах, классификации и биологической роли углеводов в организме животных. Изучить некоторые экспресс методы определения сахаров, основанные на цветных реакциях и использования этих знаний в работе специалистов пищевых технологий. С применением химических методов определить состав крахмала и клетчатки. Изучить, что у них общего и что различает эти вещества, где в практике можно применить эти знания.

2. Материалы и оборудование. 1% раствор глюкозы, лактозы, сахарозы, крахмала, 10% раствор NaOH, 5% раствор CuSO₄, реактив Селиванова, концентрированная HCl, раствор Люголя, дистиллированная вода, 72%-ный раствор H₂SO₄, 40%-ный раствор NaOH, 1%-ный раствор CuSO₄, концентрированная серная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга, универсальная индикаторная бумага; мелко нарезанная фильтровальная бумага, стеклянные палочки, водяные бани, пробирки. Пробирки, пипетки на 1-5 мл., пипетки глазные, электроплитки, спиртовки, колбы на 50 мл, лакмусовая бумага, вата, колбы на 100 мл.

3. Общие сведения.

Углеводы – класс органических веществ являющихся альдегидо- и кето-производными многоатомных спиртов, что и определяет их свойства. Основой питания сельскохозяйственных животных являются углеводы. В рационе крупного рогатого скота их доля достигает до 70%.

Углеводы не накапливаются в организме, хотя определенный их резерв обнаруживается в печени и мышцах в виде гликогена.

Для травоядных моногастричных и полигастричных сельскохозяйственных животных в питании большую роль играют углеводы: крахмал и целлюлоза, отличающиеся друг от друга строением и усвояемостью.

В органах пищеварения сельскохозяйственных животных не вырабатываются ферменты способные гидролизовать клетчатку (целлюлозу), а ткани тела не могут окислять ее моносахарид β-глюкозу, тогда как крахмал и его структурный мономер α-глюкоза усваиваются и используются в организме.

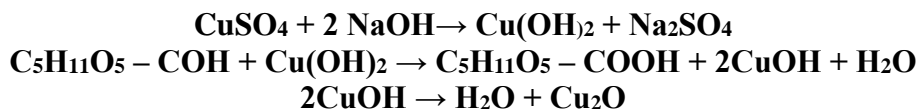
4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Реакция Троммера на восстанавливающие свойства сахаров.

Реакция обоснована на способности свободных карбонильных групп сахаров легко окисляться за счет восстановления тяжелых металлов.



Сульфат меди в щелочной среде превращается в гидрат окиси меди Cu(OH)_2 , имеющий голубой цвет. При нагревании с раствором "сахарида" он переходит в закись меди Cu_2O кирпично-красного цвета.

В пробирку налить 1-2 мл раствора глюкозы, добавить равный объем 10% раствора NaOH , несколько капель 5% раствора CuSO_4 и осторожно нагреть. В пробирке появляется желтое окрашивание, переходящее в кирпично-красный цвет.

Сделать аналогичный опыт с раствором лактозы, крахмала, сахарозы наблюдая за изменениями их окрашивания. Результаты занести в таблицу, сделать выводы.

Таблица 1. Реакция Троммера на углеводы

Виды углеводов	Результаты реакции + положит. – отрицат.	Выводы

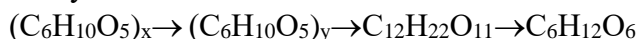
2. Реакция Селиванова на кетоны и кетозы. Кетогексозы и кетоновые тела при нагревании с соляной кислотой и резорцином (реактив Селиванова) дают вишнево-розовое окрашивание.

В пробирку налить 1 мл реактива Селиванова и 2-4 капли 1% раствора сахара, осторожно нагреть до красного окрашивания.

3. Гидролиз крахмала.

В химическом стакане растворяют 1,5 г крахмала в 25 мл дистиллированной воды и доводят до кипения при интенсивном перемешивании стеклянной палочкой.

При нагревании крахмала с разбавленными кислотами происходит его гидролиз по следующей схеме:



крахмал → декстрины → мальтоза → глюкоза

В мерную пробирку помещают 2 мл крахмального клейстера и 6 капель раствора серной кислоты. Содержимое пробирки встряхивают и ставят в стакан на 50 мл с кипящей водой. Каждые 2 минуты отбирают пипеткой каплю раствора и переносят в пробирку с раствором йода. Для этого предварительно в 8 пробирок помещают по одной капле раствора йода и 5 капель воды.

Последовательные пробы обнаруживают постепенное изменение окраски при реакции с йодом (синюю, сине-фиолетовую, красно-фиолетовую, красновато-оранжевую, оранжевую и желтую).

Крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины, в зависимости от величины цепочки, с йодом окрашиваются в фиолетовые, красные и оранжевые цвета. Мальтоза и глюкоза не изменяют окраски йода.

Гидролиз крахмала заканчивают, когда крахмальный клейстер не будет давать цветной реакции с йодом. Отмечают общую продолжительность гидролиза.

6. Контрольные вопросы

1. Классификация углеводов.
2. Строение и характеристика моносахаридов в организме животных.
3. Строение и характеристика дисахаридов.
4. Характеристика гемо- и гетерополисахаридов.
5. В чем общность и различие веществ: гликоген, крахмал, целлюлоза.
6. Чем α -глюкоза отличается от β -глюкозы.
7. Почему амилазные ферменты организма с.-х. животных не могут гидролизовать клетчатку.
8. Биологическая роль углеводов.
9. Источники углеводов для с.-х. животных и птицы.
10. Строение и роль производных моносахаридов в организме.
11. Биологическая роль углеводов.

Тема 2. Фосфолипиды в сливочном масле, молоке и яйце

1. Цель и задачи работы. При изучении некоторых свойств лецитина разобрать вопрос о химической природе, биологической роли и содержания в организме сложных липидов.

2. Материалы и оборудование. Сухой порошок яичного желтка, молоко, яйцо куриное, 96% этиловый спирт, насыщенный спиртовой раствор хлористого кадмия, ацетон, дистиллированная вода, 10% раствор NaOH, 10% раствор HCl. Штатив с пробирками, воронки стеклянные, палочки стеклянные, фильтры бумажные, электроплитка, спиртовки.

3. Общие сведения.

Фосфолипиды – одна из важных групп жироподобных веществ, широко распространенных в клетках тканей животного организма. Они представляют собой высокомолекулярные сложные жиры, в состав которых входят спирты (глицерин, сфингозин, инозит), предельные и непредельные жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистые основания. Фосфолипиды в организме представлены в основном соединениями: холинфосфолипиды, ацетальфосфолипиды, сфингомиелины, инозитфосфолипиды. Больше всего фосфолипидов, образованных на основе спирта глицерина. Фосфолипиды наряду с белками являются главными компонентами клеточных мембран (клеточной оболочки органелл). То есть они принимают участие в регуляции обмена веществ и энергии в клетке. Фосфолипиды выделяются из нервной ткани, тканей печени, яичного желтка, молока, в которых присутствуют в значительном количестве.

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Выделение лецитинов из яичного желтка.

Для опыта используется сухой порошок яичного желтка. В пробирку взять 3-4 мл (по объему) сухого яичного желтка, залить 10-12 мл горячего спирта и тщательно перемешать стеклянной палочкой. Смесь охладить и отфильтровать в сухую пробирку.

2. Качественные реакции на лецитины.

Провести реакции на обнаружение лецитина в масле и молоке, яйце

- в сухую пробирку налить 3 мл ацетона и по каплям добавить фильтрат.

Появление мути свидетельствует об осаждении лецитина:

- в сухую пробирку налить 3 мл фильтрата и добавить к нему каплями воду. Образование стойкой эмульсии свидетельствует о наличии в ней лецитина;

- в сухую пробирку внести 2 мл фильтрата и добавить 1 мл раствора хлористого кадмия. При наличии лецитина выпадает белый хлопьевидный осадок его соединения с кадмием.

3. Гидролиз лецитина и определение продуктов гидролиза:

- в пробирку налить 5 мл спиртового раствора лецитина, 3 мл 10%

раствора NaOH и кипятить смесь в течение 5 минут. Азотистое основание

«холин» отщепившись при гидролизе, распадается до триметиламина, который обладает запахом селедочного рассола;

- полученный гидролизат разбавить 2 мл воды и по каплям добавлять 10% раствор HCl до появления на поверхности раствора маслянистого слоя (свободных жирных кислот).

6. Контрольные вопросы.

1. Основные представители сложных липидов в организме и их биологическая роль;
2. Содержание и распространение фосфолипидов в организме;
3. Химический состав, строение и функции фосфолипидов мембранных структур клеток.

Тема 3. Цветные реакции на белки и отдельные аминокислоты в с.-х. продукции

1. Цель и задачи работы. Ознакомиться с методами выявления белков и отдельных аминокислот в растворах, изучить аминокислотный состав белка, структуру белковой молекулы.

2. Материалы и оборудование. 10% раствор едкого натрия, 1% раствор сернокислой меди, раствор белка, сыворотка крови, концентрированная азотная кислота, 5% раствор ацетата свинца. Штатив с пробирками, электроплитки, спиртовки.

3. Общие сведения. Цветные реакции дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие некоторых аминокислот в различных природных белках. На основе цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Биуретовая реакция. Обусловлена пептидными связями в молекуле белка, который в щелочной среде с солями меди образует цветную комплексную соль. К 1-2 мл раствора яичного белка добавить равное количество гидроксида натрия и 1-2 капли 1% раствора сульфата меди. Появление фиолетового окрашивания свидетельствует о наличии в растворе белка. Провести аналогичный опыт с сывороткой крови, сделать выводы.

2. Ксантопротеиновая реакция. Основана на способности ароматических аминокислот при нагревании (фенилаланин, тирозин, триптофан) образовывать с концентрированной азотной кислотой желтоокрашенные нитросоединения. К 2-3 мл яичного белка прилить 1 мл концентрированной азотной кислоты. Выпадет осадок, который при нагревании приобретает желтую окраску.

3. Реакция Фоля. Серосодержащие аминокислоты со свинцом образуют соединения сернокислого свинца темно-бурого цвета, которые выпадают в осадок. В пробирку налить 1-2 мл уксуснокислого свинца и добавлять по каплям 10% раствор гидроокиси натрия до растворения образующегося осадка гидрата окиси свинца. Добавить в пробирку 3-5 капель неразбавленного белка куриного яйца и нагреть до появления темно-бурого цвета.

По результатам опытов заполнить таблицу.

Контрольные вопросы

1. Классификация аминокислот.
2. Аминокислоты заменимые и незаменимые.
3. Понятие о структуре белковой молекулы, соотношение структуры и функции.
4. Содержание белков в организме сельскохозяйственных животных и их биологическая роль.

Тема 4. Реакции осаждения белков молока и мяса

1. Цель и задачи работы. Изучить методы выделения белков из растворов, механизм обратимого и необратимого осаждения, разобрать вопрос об использовании этих методов при биохимических исследованиях, в процессах переработки продукции животноводства и др.

2. Материалы и оборудование. Раствор яичного белка, сыворотка крови, мышечная ткань, 10% раствор NaCl, насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% раствор уксусной кислоты, 10% раствор NaOH, 1% раствор Na_2SO_4 , 5% раствор Na_2SO_4 , концентрированная серная кислота, концентрированная азотная кислота, 10% раствор ТХУ, 20% раствор сульфосалициловой кислоты, 1% раствор пикриновой кислоты, этиловый спирт, насыщенный раствор NaCl. Штатив с пробирками, воронки, фильтры, ступки, марля, пипетки глазные, спиртовки.

3. Общие сведения.

Высаливание белков. Осаждение белков без денатурации молекулы наблюдается под действием нейтральных солей щелочных металлов Na_2SO_4 , NH_4Cl . При этом происходит снятие электрического заряда молекулы и белковая частица становится электронеutralной, одновременно она лишается гидратационной оболочки, в результате белки выпадают в осадок не изменяя структуры. Они могут быть вновь растворены при нормализации осмотических факторов. Этот способ осаждения называется высаливанием.

Необратимое осаждение.

Осаждение белков с нарушением структуры белковой молекулы и утратой ею всех функциональных свойств происходит под действием различных факторов. Соли тяжелых металлов (свинца, меди, ртути и т.д.) адсорбируются на поверхности белковой молекулы, образуя нерастворимый комплекс. Это свойство использу-

ется в клинике, при отравлениях солями тяжелых металлов применяют внутрь молоко или сырое яйцо. Белки адсорбируют металлы, уменьшая их всасывание и снижая степень действия на организм.

Действие высокой температуры вызывает свертывание. Для разных белков она различна, что следует учитывать в работе. например для полной стерилизации необходимо кипятить 30 минут. Механизм температурной коагуляции связан с перестройкой макромолекул. Частицы белка утрачивают гидрофильность, нарушается вторичная и третичная структуры, особенно быстро это происходит в изоэлектрической точке.

Быстрое разрушение белка вызывают концентрированные минеральные кислоты (HCl , H_2SO_4 , HNO_3 и др.). Кислоты вызывают гидролиз белков до аминокислот. Несколько отличается действие азотной кислоты, не приводящая к растворению белков.

В различных исследованиях, аналитических работах, клинической практике большое применение получили органические кислоты: ТХУ, сульфосалициловая, пикриновая. Так сульфосалициловая используется в клинике для обнаружения очень малых количеств белка в биологических жидкостях (например в моче). Она способна осаждать и продукты распада белков – пептиды и полипептиды. ТХУ осаждает только белки.

Многие органические растворители осаждают белок путем отнятия у него молекулы воды. Необратимые изменения наступают при длительном действии спирта, ацетона и других веществ на белки.

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Высаливание белков.

а) Осаждение белков сернокислым аммонием. В пробирку налить 3-4 мл разбавленного яичного белка, прибавить равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и взболтать. В осадок выпадают белки глобулины. Через 5-7 минут содержимое отфильтровать. В фильтрате остаются альбумины. Для того, чтобы убедиться в наличии этих белков, взять несколько капель фильтрата и проделать с ней биуретовую реакцию, положительная реакция (фиолетовое окрашивание) указывает на присутствие в растворе альбуминов.

Для осаждения альбуминов к остывшему фильтрату добавить кристаллический сульфат аммония до полного насыщения. Осадок альбуминов отфильтровать. Со вторым фильтратом провести биуретовую реакцию.

б) Осаждение хлоридом натрия. В пробирку налить 2-3 мл сыворотки крови и прибавить до полного насыщения кристаллический хлористый натрий. Через 2-3 минуты появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирки отфильтровать. В фильтрате остаются альбумины. Для их осаждения к фильтрату добавить несколько капель уксусной кислоты – появляется муть.

Через 5 минут альбумины отфильтровать. Проверить второй фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

в) Высаливание мышечных белков. Измельченную мышечную ткань растереть в ступке с 25-30 мл 10% хлорида натрия. Образовавшуюся полужидкую массу отфильтровать через двойной слой марли. Первые мутные капли фильтрата слить снова на фильтр и повторно отфильтровать для получения розовато-красного раствора без взвешенных в нем частиц. В полученной солевой вытяжке содержатся глобулины и альбумины. Их разделить сульфатом аммония или хлоридом аммония. Полноту оса-

ждения в конце опытов проверить биуретовой реакцией. Результаты опытов занести в таблицу 1.

Таблица 1. Осаждение белков высаливанием

№ п/п	Опытные жидкости	Что осаждается насыщенным раствором NaCl	Что осаждается в слабокислой среде после высаливания NaCl	Что осаждается в полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Что осаждается в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

В 2 пробирки взять по 1-2 мл раствора яичного белка. В одну добавить по каплям раствор уксуснокислого свинца, в другую - сернокислой меди.

Отметить характер изменений в пробирках, результаты занести в таблицу.

3. Осаждение белков кипячением.

Взять 2 пробирки, налить 1-2 мл раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагреть до кипения. Во вторую пробирку добавить 1 каплю 1% раствора CH_3COOH и также нагреть. Отметить в какой пробирке осаждение наступает быстрее. Результаты занести в таблицу.

4. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами.

Взять 2 пробирки, осторожно налить в них по 1 мл кислот, в первую – серной, во вторую – азотной. В обе пробирки осторожно по стенке прилить по 1 мл раствора яичного белка. На границе жидкостей появляется осадок в виде белого кольца. При встряхивании осадок в пробирке с серной кислотой растворяется, с азотной - сохраняется. Результаты занести в таблицу.

5. Осаждение белка органическими кислотами.

В 3 пробирки взять по 1-2 мл раствора яичного белка и добавить несколько капель: в одну – ТХУ, другую – сульфосалициловой кислот, в третью – пикриновую кислоту. Пробирки встряхнуть, отметить характер осаждения белков, результаты занести в таблицу.

6. Осаждение белка органическими растворителями.

К 1 мл раствора белка в пробирке прилить 15-20 капель этилового спирта.

Таблица 2. Реакция необратимого осаждения белков

Факторы Осаждения белка	Реактивы	Цвет и вид осадка	Механизм осаждения

Контрольные вопросы.

1. Классификация белков.
2. Обратимое и необратимое осаждение белков.
3. Изменения в белковых структурах при денатурации.
4. Использование реакций осаждения белков в зоотехнии, медицине, ветеринарии, переработке молока и мяса.

Тема 5. Ферментативный гидролиз крахмала

1. Цель и задачи работы. Выяснить химическую природу, отдельные свойства

ферментов. Изучить основные факторы определяющие ферментативную активность. Закрепить знания по гидролизу крахмала в пищеварительном тракте животных.

2. Материалы и оборудование. 0,85% раствор NaCl, 1% раствор CuSO₄., 2% раствор HCl, 1% раствор Люголя, 10% раствор NaOH. 1% раствор крахмала, 1% раствор сахарозы, 1% раствор соды, слюна. Штатив с пробирками, водяная баня, термометр, электроплитка.

3. Общие сведения.

Крахмал является одним из главных компонентов кормов животных. По строению он является полисахаридом, состоящим из двух полисахаридов – амилопектина (80-90%) и амилозы (10-20%). Гидролиз крахмала происходит в результате воздействия на него ферменты слюны и поджелудочной железы – альфа-амилазы.

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. В пробирку собрать 2 – 3 мл. слюны, разбавить ее водой в 5 – 6 раз. Взять 7 пробирок, пронумеровать и налить в каждую примерно 1 мл. раствора слюны.

Раствор слюны в первой пробирке прокипятить, во вторую пробирку добавить 1 мл. физиологического раствора, в третью 1 мл. раствора CuSO₄, в четвертую 1 мл. раствора HCl, в пятую 1 мл. раствора соды. В первые шесть пробирок прилить по 5 мл. раствора крахмала, а в седьмую раствора сахарозы.

Поставить все семь пробирок в водяную баню (39 – 41°C) на 15 минут и затем достать, охладить до комнатной температуры, добавить в первые шесть пробирок по одной капле раствора Люголя. В тех пробирках, где нет синего (синее – фиолетового) окрашивания и с раствором седьмой пробирки проделать реакцию Троммера.

Полученные результаты занести в таблицу 9.

Таблица 1. Особенности действия ферментов слюны.

№ п/п	Субстрат	Ферменты	Дополнительный фактор	Результаты опыта		Выводы
				Реакция с йодом	Реакция Троммера	
1	крахмал	амилаза, мальтаза	кипячение			
2			физ. раствор			
3			CuSO ₄			
4			HCl			
5			Na ₂ CO ₃			
6			-			
7			-			

Полученные результаты объяснить. Написать схему гидролиза крахмала.

6. Контрольные вопросы

1. Природа ферментов.
2. Свойства ферментов.

3. Особенности ферментативных реакции.
4. Механизм действия ферментов.
5. Применение ферментных препаратов в практике.
6. Написать перечень ферментов органов пищеварения с. х. животных, указать оптимум их pH, на что они действуют и продукты гидролиза.

Тема 6. Определение содержания витамина «С» в растительных источниках и молоке

1. Цель и задачи работы. Ознакомиться с физическими, отдельными химическими свойствами витамина С. Научиться определять витамин С методом титрования.

2. Материалы и оборудование. 10% раствор HCl, 2% раствор HCl, 0,001н 2,6 – дихлорфенолиндофенол, уксусная кислота концентрированная, капуста, картофель, плоды шиповника, молоко. Ступки фарфоровые, мерные цилиндры, бюретки, пипетки мерные на 2 и 5 мл., воронки, весы лабораторные, фильтры бумажные.

3. Общие сведения.

Цинга – неинфекционное заболевание, вызванное недостаточностью витамина «С», имело широкое распространение среди людей питающихся консервированными продуктами при отсутствии овощей и фруктов.

В животноводстве, сегодня, в зимний стойловый период имеют место проявления отдельных симптомов гипоавитаминоза «С».

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Определение содержания витамина «С» в капусте.

Отвесить 1 гр. капусты, растереть в ступки с 2 мл. 10% раствора HCl, прилить 8 мл. дистиллированной воды, хорошо перемешать. Гомогенат отфильтровать. В колбочку для титрования внести 2 мл. фильтрата, добавить 10 капель 10% раствора HCl, и титровать 0,001н раствора 2,6 дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания, сохраняющегося в течение 30 секунд.

Расчет содержания витамина «С» в 100 гр. продукта производится по формуле:

$$X = \frac{0.088 \cdot A \cdot 10 \cdot 100}{B \cdot C},$$

где А – расход 2,6 – дихлорфенолиндофенола, мл.;

В – количество фильтрата взятого для титрования, мл.;

С – количество продукта взятого для анализа, гр.;

10 – общее количество экстракта, мл.;

0,088 – коэффициент перерасчета для витамина «С».

2. Определение содержания витамина «С» в картофеле.

Отвесить 5 гр картофеля (без кожуры), растереть в ступке с 20 каплями 10% раствора HCl, постепенно прилить 15 мл. дистиллированной воды, перемешать до однородной массы. Полученную массу слить в колбочку для титрования, ступку ополоснуть водой и добавить смыв в ту же колбочку для титрования. Титровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до слабо розового окрашивания. Расчет содержания витамина «С» произвести по формуле приведенной выше.

3. Определение содержания витамина «С» в плодах шиповника.

Растереть в ступке 1 плод шиповника, добавляя постепенно 9 мл. 2% раствора HCl. Раствор отфильтровать в сухую пробирку. 3 мл. фильтрата перенести в колбу и оттитровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до слабо-розового окрашивания не исчезающего 30 секунд. Расчет содержания витаминов «С» произвести по формуле приведенной выше.

4. Количественное определение витамина «С» в молоке.

10 мл. молока развести дистиллированной водой в три раза. В коническую колбу внести 1 мл. 2% раствора HCl, 5 мл. разбавленного молока и 9 мл. дистиллированной воды (общий объем 15 мл.). Полученную смесь оттитровать 0,001н раствором 2,6 – дихлорфенолиндофенола до появления слабо розового окрашивания.

5. Слепой опыт. В колбу внести 1 мл. 2% раствора HCl, 14 мл. дистиллированной воды и оттитровать 2,6 – дихлорфенолиндофенолом до слабо розового окрашивания.

Расчет содержания витамина «С» в молоке произвести по формуле:

$$X = \frac{V \cdot C \cdot 0,088 \cdot 100}{5},$$

где V – количество индикатора

2,6 – дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование молока, за вычетом его расхода в слепом опыте, мл.;

C - разведение молока (в опыте оно равно числу 3);

5 – количество молока взятого для титрования, мл.;

100 – перерасчет в мг./%.

Содержание витамина «С» в различных источниках.

В 100 г: капусты 25 – 60 мг.

картофеля 1 – 5 мг.

шиповника 500 – 1500 мг.

хвой 200 – 400 мг.

молоко коровье 1 – 2 мг.

молоко кобылье до 33 мг.

6. Контрольные вопросы.

1. Написать окисленную и восстановленные формы витамина «С».
2. Биологическая роль витамина «С» в организме.
3. Источники витамина «С» для с. х. животных и птицы.
4. Проявления авитаминоза и гиповитаминоза «С» в животноводстве и птицеводстве.

Тема 7. Определение активности каталазы и пероксидазы молока

1. Цель и задачи работы. Определить активность каталазы крови и рассмотреть характер действия пероксидазы молока. На основе этих исследований рассмотреть главную и короткие дыхательные цепи клетки, их роль в организме.

2. Материалы и оборудование. 1% р-р перекиси водорода, 10% раствор серной кислоты, 0,1н раствор KMnO_4 . Дистиллированная вода, кровь. Мерные колбы на 20 мл., конические колбы на 100мл., пипетки, бюретка, спиртовки или электроплитка.

3. Общие сведения.

Часть окислительных процессов происходящих в клетке протекают без участия убихинона и цитохромной системы, когда флавиновый фермент напрямую переносит, водород на кислород. Данный путь получил название «короткая дыхательная цепь». В этих реакциях не образуются молекулы АТФ, но образуется перекись водорода. Это вещество чрезвычайно опасно для многих соединений, более всего для хромопротеидов (гемоглобин). Он превращает Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это значит, что гемоглобин утрачивает свои свойства для транспорта кислорода. В эритроцитах, в клетках печени и др. содержатся ферменты способные разрушать H_2O_2 .

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

В мерную колбу на 20мл. налить 10 – 15 мл дистиллированной воды, внести 0,02 мл. крови и довести водой до метки (разбавление 1:10000 – момент разведения отметить на часах). Половину приготовленного раствора крови прокипятить в течение 2 минут. В две колбочки отмерить по 7 мл. дистиллированной воды, внести в первую 1 мл. основного раствора крови (опыт), во вторую – 1 мл. прокипяченной крови (контроль). Через 30 минут после первого разведения крови прилить в каждую колбу точно по 2 мл. 1% раствора перекиси водорода и снова оставить на 30 минут. По истечении указанного времени внести в каждую колбу по 5 мл. 10% раствора серной кислоты для прекращения действия фермента и оттитровать 0,1н раствором марганцевокислого калия до появления стойкого розового окрашивания.

Расчет каталазного числа провести по формуле:

$$X = (A - B) \cdot 1,7,$$

где (A – B) – разность в количестве мл. 0,1н раствора марганцевокислого калия, израсходованного на титрование контрольной и опытной колб;

1,7 – мл. перекиси соответствует 1 мл. 0,1н раствора марганцевокислого калия.

Каталазное число показывает количество мг. перекиси водорода, разрушенной 1 мл. крови.

Сравнить полученные результаты и внести их в таблицу.

Таблица 1. Каталазная активность крови

№ пробирки	Израсходовано, мл KMnO_4	Каталазное число
------------	--------------------------------------	------------------

	Контроль А	Опыт В	

6. Контрольные вопросы.

1. Главная дыхательная цепь клетки и ее ферменты.
2. Характеристика других путей клеточного дыхания.
3. Химическая природа и биологическая роль каталазы.
4. Энергетический эффект биологического окисления.

Тема 8. Анализ химического состава молока и сливок

1. Цель и задачи работы. Ознакомиться с некоторыми лабораторными методами, позволяющими оценить качественный состав молока и определить количественное содержание его основных компонентов.

2. Материалы и оборудование. Молоко, 1%ный раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор едкого натрия, нейтральный формалин, 5% ный раствор щавелевокислого аммония, 5%ный раствор гидрата аммония, 10%ный раствор уксусной кислоты, 4% ный раствор хлористого кальция. Колбы конические, бюретки, мерные пипетки, стекла предметные и покровные, пробирки, воронки, фильтры, микроскоп, рефрактометр, водяная баня, спиртовка, электрическая плита.

3. Общие сведения.

Молоко – многокомпонентная система, в состав которой входят белки, липиды, углеводы, минеральные вещества, витамины, гормоны и ряд других компонентов.

4. Порядок выполнения работы.

В тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов. Тетрадь с записями и выводами сдается на проверку преподавателю.

5. Задания

1. Изучение липидной фракции молока.

Шарики молочного жира можно увидеть при увеличении в 280-400 раз.

На предметное стекло наносят маленькую каплю молока (можно предварительно разбавить его водой в 5 раз) и покрывают покровным стеклом. Затем предметное стекло помещают на столик микроскопа и рассматривают каплю молока при окуляре 7 и объективе 40, что соответствует увеличению в 280 раз.

2. Определение содержания белков в молоке.

В колбу отмеряют 10 мл молока, 10-12 капель 1%-ного раствора фенолфталеина и по каплям добавляют 0,1н раствор едкого натрия до появления бледно-розовой окраски молока, не исчезающей при взбалтывании. Затем вносят 2 мл нейтрального по фенолфталеину формалина и титруют 0,1 н раствором едкого натрия до появления стойкой бело-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 минуты.

Количество щелочи, израсходованной на титрование после добавления формалина, умножают на коэффициент 1,92 и получают общее содержание белков в молоке.

Умножение количества щелочи на коэффициент 1,51 дает в результате содержание казеина.

3. Открытие кальция в молоке.

1-2 мл молока разбавить 3-4 мл воды и прибавить по каплям при встряхивании 0,5 мл 10% -ного раствора уксусной кислоты до полного осаждения казеина. После этого содержимое пробирки отфильтровать и фильтрат использовать для открытия минеральных веществ.

В пробирку наливают 5 мл фильтрата и добавляют 2-3 мл 5%-ного раствора щавелевокислого аммония, встряхивают и наблюдают за образованием белого осадка щавелевокислого кальция.

Открытие кальция основано на нерастворимости щавелевокислого кальция, образующегося при воздействии на растворимые соли кальция щавелевокислым аммонием. В молоке кальция частично находится в виде хлористого кальция.

4. Открытие магния в молоке.

Молочную сыворотку (фильтрат) с образовавшимся в предыдущем опыте с осадком щавелевокислого кальция, еще раз отфильтровывают. К 3-4 мл фильтрата приливают 2 мл 5%-ного раствора гидрата аммония и наблюдают за образованием белого осадка фосфорно-аммонийной магниевой соли.

5. Определение казеина и альбумина (качественная проба).

В пробирку отмеривают пипеткой 5 мл молока, нагревают его примерно до 40-50⁰С и второй пипеткой вносят несколько капель уксусной кислоты, слегка взбалтывая молоко до прекращения выпадения хлопьев. Выпавшие хлопья представляют собой казеин молока. После этого жидкость фильтруют в другую пробирку. Отфильтрованную сыворотку в пробирке нагревают до кипения. В жидкости появляются мелкие хлопья - молочный альбумин.

Казеин в молоке находится в виде коллоидной кальциевой соли. уксусная кислота отнимает кальций от казеина, и освобожденный казеин выпадает в осадок в виде хлопьев. В свободном состоянии альбумин растворим, но он легко освобождается при нагревании выше 75⁰С (при кипячении). Свойство альбумина образовывать хлопья при нагревании используют для доказательства пастеризации молока выше 75⁰С.

Оформить результаты и сделать выводы.

6. Контрольные вопросы.

1. Классификация и биологические функции белков молока.
2. Молочный жир – природная эмульсия
3. Минеральный состав молока.
4. Состав и свойства казеина.
5. Сывороточные белки, их биологическая роль.
6. Молочный сахар, лактоза.

Библиографический список

1. Щербаков, В. Г. Биохимия [Текст] / [В. Г. Щербаков и др.]; под ред. В. Г. Щербакова. - 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: Гиорд, 2009. - 465 с.
2. Рогожин, В. В. Биохимия животных [Текст] : учебник для студ., обуч. по спец. 110305 "Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции" / В. В. Рогожин. – СПб.: Гиорд, 2009. - 552 с.
3. Зайцев, С. Ю. Биохимия животных: фундаментальные и клинические аспекты [Текст] : учебник для студ. вузов, обуч. по спец. 310800-Ветеринария / С. Ю. Зайцев, Ю. В. Конопатов. – СПб. [и др.]: Лань, 2004. - 383 с.
4. Горбатова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов [Текст] : учебное изд. / К. К. Горбатова. - 3-е изд., перераб. и доп. – СПб. : ГИОРД, 2001. - 320 с.
5. Нурмухаметова, Н. Л. Практикум по биохимии молока и мяса [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. Л. Нурмухаметова - Уфа : БашГАУ, 2010. - 88 с. – Режим доступа: <http://biblio.bsau.ru/metodic/16802.pdf>
6. Румянцева, Э. Р. Биохимия молока и мяса [Текст] : учеб. пособие для студ. вузов по спец. 271100 «Технология перераб. молока и молочных продуктов» и 270900 «Технология перераб. мяса и мясопродуктов» / Э. Р. Румянцева, И. Ю. Долматова. - Уфа : БГАУ. -2002. - 162 с.

