

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр биологических систем и
агротехнологий Российской академии наук»
(ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ

ДИСЦИПЛИНЫ
«Б1.О.07 Биохимия животных»

Уровень высшего образования

МАГИСТРАТУРА

Направление подготовки

36.04.02 ЗООТЕХНИЯ

(код и наименование направления подготовки)

Питание сельскохозяйственных животных и кормопроизводство
(наименование направленности (профиля) образовательной программы)

Квалификация

Магистр

Методические указания рассмотрены и утверждены на отделе кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. проф. С.Г. Леушина
Протокол № 1 от «10» января 2020 г.

Зав. отделом, д.б.н.  Г.К. Дускаев

Биохимия животных: метод. указания по выполнению лабораторных работ для магистров
Направления подготовки 36.04.02 Зоотехния /Сост.: С.В. Нотова // ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН. –
Оренбург, 2020 - 8 с.

Содержание

1	ВВЕДЕНИЕ	4
2	ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1	4

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия является одним из важнейших разделов биологической науки. Дисциплина «*Б1.О.07 Биохимия животных*» направление подготовки 36.04.02 **ЗООТЕХНИЯ**, ориентирована на формирование у студентов системы знаний, умений и навыков по вопросам биохимической основы жизнедеятельности и взаимосвязи биохимических показателей с состоянием здоровья животных. А рамках дисциплины изучаются химические закономерности биологически активных веществ; основные физические, химические основы жизнедеятельности организма и процессы, происходящие в организме с точки зрения общебиологической науки. Современная биологическая химия – настолько обширная область естествознания, что многие ее разделы представляют собой самостоятельные, хотя и связанные между собой научные дисциплины. В результате изучения дисциплины студенты должны знать физические и химические основы жизнедеятельности организма; химические закономерности биологически активных веществ. Уметь грамотно объяснять процессы, происходящие в организме с точки зрения общебиологической науки; оценивать химические реакции; использовать результаты в профессиональной деятельности; пользоваться лабораторным оборудованием. Владеть знаниями об основных биохимических законах и их использовании в ветеринарии; навыками работы на лабораторном оборудовании, методами наблюдения и эксперимента. Задачей лабораторной практики является закрепление основных разделов теоретического курса, ознакомление студентов с методикой проведения качественных и количественных анализов биологически активных веществ, конечных продуктов обмена. Конечная цель обучения: сформировать у студентов на базе усвоенной системы знаний, умений и практических навыков в области биологической химии, способности для оценки последствий его профессиональной деятельности при участии в решении практических вопросов в области зоотехнии. По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования и реактивов, пример расчета, необходимые химические реакции, форма записи и список литературы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Определение сухого остатка молока методом высушивания и расчетным методом, расчет энергетической ценности молока. Определение массовой доли жира в молоке кислотным методом

Молоко представляет собой непрозрачную белую жидкость с желтоватым оттенком, сладковатого вкуса и слабого своеобразного запаха. Цвет молока в значительной степени зависит от содержания в молоке провитамина А—каротина, придающего ему желтоватый оттенок.

Удельный вес цельного молока несколько выше воды — 1,028 — 1,034, снятого— 1,032 — 1,038, рН коровьего молока 6,57.

Молоко состоит из мешочной плазмы и жира, взвешенного в виде мельчайшие

шариков, размером 1—5 мк. Состав молока разных животных виден из следующей таблицы:

Состав молока различных животных					
Молоко	Содержание в %				
	вода	белки	жиры	молочный сахар	соли
Коровье	87,3	3,4	3,6	5,0	0,7
Кобылье	90,3	1,7	1,1	6,0	0,4
Ослицы	90,1	1,8	1,4	6,0	0,5
Козье	87,0	3,7	4,0	4,5	0,9
Овечье	84,0	5,1	6,1	4,2	1,0
Верблюжье	86,5	4,0	4,0-	5,6	0,9
Буйволицы	83,0	4,6	7,4	4,2	0,9
Свиньи	82,4	6,1	6,4	4,0	1,1
Кошки	81,5	9,3	3,5	4,9	0,7
Собаки	77,0	9,7	9,3	3,1	0,9
Крольчихи	70,0	15,5	10,4	1,9	2,7
Оленье	65,0	14-20,0	17,0	2,8	1,5

Важнейшим белком молока является фосфопротеид — казеиноген, имеющий ИЭТ — 4,7. В молоке имеются также лактальбумин и лактоглобулин. Белки молока не свертываются при кипячении. Свертывание казеиногена наступает лишь после подкисления молока. При подкислении степень диссоциации казеиногена значительно понижается. Свободный недиссоциированный казеиноген выпадает в осадок.

Главной составной частью липидов молока являются триглицериды с преобладанием: олеиновой, миристиновой, пальмитиновой, лауриновой и масляной кислот.

Углеводы молока представлены преимущественно лактозой. Это дисахарид, состоящий из галактозы и глюкозы. Имеется небольшое количество глюкозы (0,1 %).

Молоко при полноценном кормлении животных богато каротином и витамином А, а также витаминами: С, Д, В. В молоке содержится ряд ферментов: амилаза, каталаза, ксантиноксидаза, дегидразы и др.

Минеральные вещества молока весьма разнообразны. Молоко богато кальцием (до 140 мг%), фосфором (80—100,0 мг%), калием (140,0 мг%), но сравнительно бедно железом. Как сообщает С. И. Афонский, количество железа в 1 л молока коров определяется на уровне 0,5 мг, у коз — 0,45, у овец — до 1,1, у лошадей — до 0,7, у свиней — до 1,1 и у собак - до 4,1 мг.

Состав молока зависит от индивидуальных особенностей животного, характера кормления и содержания. Физиологическое и патологическое состояние организма также влияет на состав и количество молока.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МОЛОКА

БЕЛКИ МОЛОКА, КАЗЕИНОГЕН

Казеиноген относится к группе фосфопротеидов. Он нерастворим в воде, но легко растворяется в слабых щелочах. При кипячении казеиноген не свертывается, соли казеиногена — казеинаты—со щелочными и щелочноземельными металлами

легко растворимы. При гидролизе казеиногена среди других аминокислот получены в значительном количестве триптофан, тирозин, и метионин. Глицина совсем нет. Казеиноген молока может быть выделен в виде казеина при действии на молоко кислотами, например, уксусной, молочной, соляной и другими или же в виде соли путем насыщения молока средними солями щелочных металлов (сернокислый аммоний, хлористый натрий). При скисании молока казеиноген выпадает в виде осадка (казеин) под влиянием молочной кислоты, образующейся из молочного сахара (лактозы) под влиянием бактерий молочнокислого брожения. Этот же процесс происходит под влиянием сычужного фермента в присутствии солей кальция. После удаления из молока казеиногена получается молочная сыворотка, а которой содержатся молочные альбумин и глобулин, сахар и минеральные соли. Жир захватывается осадком казеина.

Осаждение казеина

Приборы. Колбочки или стаканы. Воронки с фильтром.

Реактивы. Уксусная кислота, 0,1%-ная. Едкий натрий. 1%-ный, сода в растворе.

Ход работы. 25—30 мл молока разбавляют в стакане или колбе 3-4 объемами воды и к жидкости прибавляют по каплям при помешивании 0,1%-ную уксусную кислоту до прекращения выделения хлопьевидного белого осадка казеина, захватывающего с собой также и жиры. Прибавлять кислоту надо очень осторожно, так как в избытке кислоты казеин легко растворяется. Осадок отфильтровывают, тщательно промывают на фильтре 2—3 раза водой. Осадок и фильтрат вместе с промывными водами сохраняют для дальнейшей работы.

Небольшую часть осадка (казеин + жир) обрабатывают 1%-ным едким натрием или раствором соды: казеин растворяется, жир остается во взвешенном состоянии. Жидкость фильтруют через влажный фильтр. Жир задерживается на фильтре. С фильтратом проводят реакции на белки (цветные и по осаждению).

МОЛОЧНЫЙ САХАР Молочный сахар — дисахарид — при гидролизе распадается на глюкозу и галактозу. Молочный сахар содержит одну свободную альдегидную группу, вследствие чего он даёт реакции восстановления металлов, реагирует с фенилгидразином, образуя озазон, растворяющийся в горячей воде, а при охлаждении выпадающий в виде тонких игл желтого цвета. Для реакций используют безбелковый фильтрат, оставшийся от предыдущего опыта после осаждения альбуминов и глобулинов. С одной частью фильтрата проводят пробу Троммера,

Определение кислотности молока

Определение кислотности молока имеет большое практическое значение для оценки его свежести. Свежее молоко связывает небольшое количество щелочи. Это зависит от наличия в нем белков и однозамещенных фосфорнокислых солей, обладающих слабокислыми свойствами.

В молоке при его хранении происходит молочнокислое брожение, в результате чего накапливается молочная кислота:



$C_6H_{12}O_6 > CH_3CHOH COOH$
Глюкоза Молочная кислота

Кислотность молока выражается в градусах. Под 1 градусом подразумевается количество миллилитров децинормального раствора щелочи, идущее на нейтрализацию 100 мл исследуемого молока. Свежее молоко коровы имеет 15—18°, стоявшее молоко — 20—22°, несвернувшееся, но свертывающееся при кипячении — 24—27°.

Приборы. Коническая колба. Пипетки на 10 и 20 мл. Бюретка. Реактивы. Едкий натр, 0,1 н. раствор. Фенолфталеин, 0,1%-ный спиртовой раствор. Молоко.

Ход работы. В коническую колбу отмеривается 10 мл исследуемого молока, добавляется 20 мл дистиллированной воды и 2—3 капли фенолфталеина. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и титруют из бюретки 0,1 н. раствором щелочи до появления исчезающего в течение двух минут слабого розового окрашивания.

Количество пошедшей на титрование щелочи, умноженное на 10 (пересчет на 100) и будет показывать кислотность данного молока в градусах.

Например: на титрование 10 мл молока пошло 2,2 мл щелочи. Кислотность молока в градусах $= 2,2 \cdot 10 = 22,0^\circ$.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЛОКА

Определение белков в молоке

Определение белка в молоке производят по той же схеме, что и белков других тканей. Взятую навеску молока озоляют в колбе Кьельдаля с помощью серной кислоты в присутствии катализатора пергидроля. Прозрачный минерализат исследуют на содержание азота. Полученную цифру общего азота умножают на коэффициент — 6,45, принимается во внимание содержание азота в белках молока, равное 15,5%; $100 \cdot 15,5 = 6,45$. Найденная величина и будет показывать количество белка в молоке.

Определение кальция

Из общего количества минеральных веществ молока до 20% падает на долю кальция. Количество кальция в молоке различных животных зависит от вида животных, характера кормления, сезона года и других факторов.

Среднее содержание кальция в молоке сельскохозяйственных животных в мг%

Корова.....	140
Коза.....	142
Кобыла.....	83

Нормальное развитие молодняка и в первую очередь их рост и развитие костяка в значительной степени обусловлено поступлением кальция с молоком. В молоке кальций находится в оптимальных соотношениях с фосфором (1,5: 1) и поэтому хорошо усваивается организмом.

Определение кальция в молоке проводят по методу де-Ваарда. Ранее метод-Ваарда был изложен применительно к исследованию сыворотки крови. Исследование молока имеет некоторые особенности.

Приборы. Измерительный цилиндр, емкостью 10 мл. Центрифуга. Центрифужные весы. Центрифужные пробирки. Пипетки в 1 и 2 мл. Пипетка на 10 мл с делениями. Стеклянные палочки. Микробюретка. Водяная баня. *Реактивы.* Щавелевокислый аммоний, 4%-ный раствор. Аммиак, 2%-ный раствор. Серная кислота, 1 н. раствор. Марганцевокислый калий, 0,01 н. раствор. Молоко.

Ход работы. В цилиндр емкостью 10 мл берут 1 мл молока и 9 мл дистиллированной воды. Содержимое тщательно перемешивают. 1 мл разведенного молока переносят в центрифужную пробирку. Во вторую пробирку (слепой опыт) наливают 1 мл воды. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл щавелевокислого аммония.

Дальнейшие исследования производятся также, как и при определении кальция в сыворотке крови.

Расчёт. Для исследования берут 1 мл разведенного молока (фактически в 1 мл смеси содержится 0,1 мл молока). Допустим, что а условиях нашего опыта на титрование исследуемых проб пошло 0,81 мл перманганата, а на контроль (слепой опыт)— 0,20, тогда:

$$\text{Содержание Ca} = \frac{0,2(0,81) - 0,20}{0,1} \cdot 100 = 122,0 \text{ мг\%}.$$

Определение общего фосфора

Фосфор входит в состав казеиногена в виде серинфосфорной кислоты. Фосфор играет важную роль в обмене веществ и формировании костяка. Единственным источником этого элемента у молодых (сосунов) животных является фосфор молока.

Среднее содержание фосфора в молоке животных в мг%

Корова	80
Коза	110
Кобыла	54

Приборы. Колба Кьельдаля. Измерительные колбочки емкостью 50 мл. Пипетки емкостью 1, 2 и 10 мл. Песочная баня. Колориметр. Капельница.

Реактивы. Серная кислота. Молибденовокислый аммоний, 2,5%-ный раствор в 5 н, растворе серной кислоты (см. стр. 198). Эйконоген, Фосфорнокислый калий, стандартный раствор, содержащий 0,04 мг в 1 мл.

Ход работы. В колбу Кьельдаля наливают 0.6 мл молока и 2 мл концентрированной серной кислоты. Во вторую колбу (слепой опыт) наливают 2 мл серной кислоты и 0,5 мл воды. Колбы ставятся на песочную баню. При кипячении раствор темнеет, а затем начинают выделяться белые тяжёлые пары серной кислоты. В это время колбы накрывают насадками. Дальнейшая минерализация производится обычным путем.

Прозрачный бесцветный фильтрат из каждой колбы переносят в измерительные колбы, емкостью в 100 мл, объем доводят водой до метки. 5 мл раствора из колбы переносят в другую измерительную колбу, емкостью 50 мл. Аналогичным образом поступают и со слепым опытом, при котором в колбу вносят 1 мл стандартного раствора (KNaPO₄).

В обе колбы добавляют по 1 мл молибденовокислого аммония и 0,5 мл аэкокогена. Объём колб доводят до метки и содержимое спустя 15 мин колориметрируют. Расчет производят по формуле:

$$x = \frac{0.04 \cdot H_1 \cdot 100}{H_2 \cdot a}$$

где x — содержание Р в исследуемом растворе в мг%, 0,04 — содержание Р в мг в 1 мл, H_1 — высота столба жидкости стандартного раствора, H_2 — высота столба опыта, a — навеска, 100—пересчёт на мг%.

Например, в данных условиях величина /71 равнялась 10,0, H_2 —10,8, a —0,05. (Для исследования брались 0,5 мл молока, после минерализации объём раствора доводился до 50 мл. В 1 мл разведенного молока фактическая навеска молока составляет 0,01 мл. Количество молока в 5 мл, взятого для исследования раствора, составляло 0,05 мл.)

$$P = \frac{0.04 \cdot 10 \cdot 100}{10.8 \cdot 0.05} = 74.0 \text{ мг\%}.$$

Список литературы

1. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия : учебное пособие / С. В. Лелевич. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

2. Кошаев, А. Г. Биохимия сельскохозяйственной продукции / А. Г. Кошаев, С. Н. Дмитренко, И. С. Жолобова. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 388 с. — ISBN 978-5-8114-2946-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/102595>

3. Конопатов, Ю. В. Основы экологической биохимии : учебное пособие / Ю. В. Конопатов, С. В. Васильева. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2018. — 136 с. — ISBN 978-5-8114-2489-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/107942>