



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską

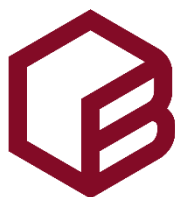


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

*Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00*

# INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

*dla kierunku lekarskiego  
Politechniki Bydgoskiej  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



**POLITECHNIKA  
BYDGOSKA**  
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



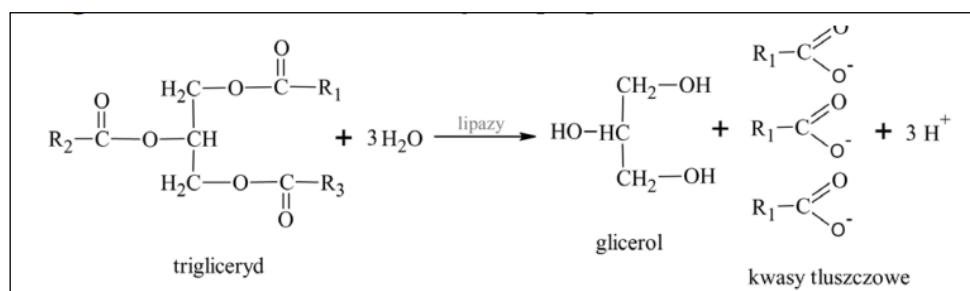
## ĆWICZENIE 6.

### Enzymatyczna hydroliza tłuszczu

**Enzymy** są katalizatorami pochodzenia biologicznego, które przyspieszają reakcje chemiczne, nie zużywając się w trakcie działania. Centrum aktywne to najważniejszy dla katalizy obszar w cząsteczce enzymu, gdzie odbywa się wiązanie substratu oraz zachodzą jego przekształcenia. Ma ono kształt trójwymiarowego zagłębienia, w których są ulokowane grupy czynne reszt aminokwasów, tzw. aminokwasy kontaktowe (His, Ser, Lys, Cys, Asp, Glu). Enzymy mogą być zbudowane z samego białka (np. trypsyna, ureaza, rybonukleaza), jednak w większości składają się z części białkowej (apoenzym) i niebiałkowej (małocząsteczkowe związki nieorganiczne, atomy metali, pochodne witamin) tzw. grup prostetycznych i koenzymów. Reakcje chemiczne przebiegają z różną szybkością (zmiana ilości substratów do produktów w jednostce czasu). Szybkość reakcji zależy od stężenia enzymu i substratu, temperatury (optimum działania enzymu zwykle mieści się w granicach 30–40°C), stężenia jonów wodorowych (optymalne pH reakcji jest różne dla różnych enzymów, np. dla pepsyny wynosi 1, dla arginazy – 10), obecności enzymatycznych aktywatorów i enzymatycznych inhibitorów. Wyróżnia się 7 klas enzymów: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy, ligazy, translokazy.

#### 1. Oznaczenie aktywności lipazy

**Lipazy (EC 3.1.x.x)** to enzymy uczestniczące w trawieniu tłuszczów. Najważniejszym z nich jest lipaza trzustkowa. Jest wytwarzana w formie nieaktywnego proenzymu aktywowanego w jelicie cienkim i dwunastnicy. Lipaza trzustkowa (EC 3.1.1.3) to enzym z klasy hydrolaz, który katalizuje hydrolizę tłuszczu prostych na glicerol i kwasy tłuszczowe.



Hydroliza triglicerydów z udziałem lipaz

W metodzie oznaczania aktywności lipaz wykorzystuje się zdolność do hydrolizy tłuszczów i oznacza się ilość uwolnionych kwasów tłuszczowych poprzez miareczkowanie mianowanym roztworem NaOH. Ponieważ substraty takie jak śmietana, mleko, oliwa, tran zawierają pewne ilości wolnych kwasów tłuszczowych wykonuje się próbę kontrolną, w której enzym zastępuje się roztworem buforu.



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



## Wykonanie oznaczenia

Do trzech kolbek stożkowych o pojemności 50 ml odmierzyć po 2 ml 5% roztworu chlorku wapnia. Do pierwszej kolbki dodać 2 ml 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,6 oraz 5 ml substratu (oleju) – próba kontrolna. Do kolbki drugiej i trzeciej odmierzyć po 5 ml substratu (oleju) i dodać po 2 ml wyciągu enzymu – próba badana. Oznaczenie wykonać również dla innego substratu (śmietana).

Zawartość wszystkich kolbek dobrze wymieszać i inkubować w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po inkubacji dodać do każdej kolbki 0,5 ml 0,02% alkoholowego roztworu fenolaftaleiny i szybko zmiareczkować 0,1 M roztworem wodorotlenku sodowego do barwy jasno-różowej. Zabarwienie wszystkich prób po zmiareczkowaniu powinno być jednakowe.

Otrzymane wyniki przedstawić w tabeli:

Rodzaj substratu	Ilość ml NaOH zużytego na zmiareczkowanie		Ilość NaOH zużyta na zobojętnienie kwasu tłuszczowego <b>b-a</b>	Ilość uwolnionych kwasów tłuszczowych (milirównoważnik) <b>(b-a) x 0,1 (M NaOH)</b>
	Próby pełnej <b>b</b>	Próby kontrolnej <b>a</b>		
<b>olej</b>				
<b>śmietana</b>				

**Wnioski:**



## Witaminy

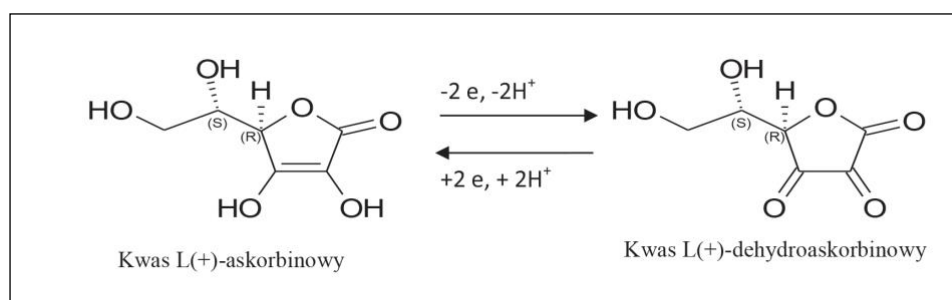
Pojęcie „witamina” (od vita – życie, amina - związek zawierający grupę aminową) zaproponował Kazimierz Funk. Witaminy to niskocząsteczkowe związki organiczne. Ich obecność w organizmie w niewielkich ilościach jest niezbędna do prawidłowego przebiegu wielu procesów metabolicznych. Dla wielu organizmów, w tym zwierząt i człowieka są to związki egzogenne i muszą być dostarczane z pożywieniem. Mogą być pochodzenia naturalnego lub otrzymywane syntetycznie. Witaminy możemy podzielić m.in. pod względem właściwości fizycznych na:

- witaminy rozpuszczalne w tłuszczach: A (retinol i jego pochodne), D (cholekalcyferol), E (tokoferol), K (filochinon);
- witaminy rozpuszczalne w wodzie: C (kwas askorbinowy), B1 (tiamina), B2 (ryboflawina), B3 (niacyna), B5 (kwas pantotenowy), B6 (pirydoksyna), B7 (biotyna, witamina H), B12 (cyjanokobalamina), kwas foliowy.

### 1. Oznaczanie witaminy C w materiale roślinnym

#### Zasada metody:

Reakcja polega na redukcji barwnika 2,6-dichlorofenoloidofenolu przez kwas L-askorbinowy na bezbarwny związek:



Zawartość kwasu askorbinowego można oznaczyć przez miareczkowanie w środowisku kwaśnym mianowanym roztworem barwnika do wystąpienia różowego zabarwienia. Miareczkowanie przeprowadza się w środowisku kwaśnym, gdyż w tych warunkach samoutlenianie się kwasu askorbinowego tlenem z powietrza jest bardzo powolne, enzymy utleniające się w tkankach są nieczynne, a inne związki utleniają się wolniej od kwasu askorbinowego.



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



### **Wykonanie próby właściwej:**

2 g materiału roślinnego rozetrzeć w moździerz z 5 ml 3% kwasu metafosforowego w 8% kwasie octowym. Homogenat przelać do cylinderka i uzupełnić kwasem do 10 ml. Po przesączeniu pobrać 5 ml klarownego przesączu i miareczkować mianowanym roztworem barwnika do utrzymującej się przez 30 sekund barwy różowej.

### **Wykonanie próby kontrolnej:**

5 ml 3% kwasu metafosforowego w 8% kwasie octowym zmiareczkować mianowanym roztworem barwnika do barwy różowej utrzymującej się przez 30 sekund.

### Obliczenia:

- podać ilość kwasu askorbinowego w przeliczeniu na 100 g świeżej masy
- od ilości barwnika zużytego na zmiareczkowanie próby właściwej odjąć ilość barwnika zużytego na zmiareczkowanie próby kontrolnej
- 1 ml barwnika zawiera 0,08 mg 2,6- dichlorofenolindofenolu, co odpowiada 0,09 mg kwasu askorbinowego

### **Wyniki:**

#### **2. Oznaczanie zawartości kwasu askorbinowego w tabletkę witaminy C**

Tabletkę witaminy C dokładnie rozgnieść w moździerz. Uzyskany proszek przenieść do zlewki zawierającej 250 ml wody destylowanej i wymieszać (część substancji zawartej w tabletkę nie rozpuszcza się). Pobrać 5 ml roztworu i przenieść do kolbki. Dodać 0,5 ml 5% kwasu metafosforowego i wymieszać.

Miareczkować zawartość kolbki roztworem DCPIP (2,6 dichlorofenolindofenolu)



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



### Wykonanie próby kontrolnej:

0,5 ml 5% kwasu metafosforowego zmiareczkować mianowanym roztworem barwnika do barwy do barwy różowej utrzymującej się przez 30 sekund.

1 ml barwnika zawiera 0,08 mg 2,6- dichlorofenoloidofenolu (DCPIP), co odpowiada 0,09 mg kwasu askorbinowego

Na podstawie ilości zużytego do miareczkowania roztworu DCPIP obliczy zawartość kwasu askorbinowego w tabletkę wit. C.

### 3. Oznaczanie stężenia kwasu askorbinowego w moczu

Dobowe wydalanie kwasu askorbinowego z moczem wynosi 5–55 mg. Ilość witaminy C wydalana z moczem w ciągu doby wskazuje na nasycenie organizmu tym związkami. Podejrzewając niedobór witaminy C w organizmie, należy podać dużą jej dawkę (15 mg kg<sup>-1</sup> masy ciała), a następnie oznaczyć jej zawartość w dobowej zbiorce moczu. Jeżeli w ciągu 24 h zostanie wydalone około 60% podanej jednorazowo dawki witaminy, oznacza to, że nie ma jej deficytu w organizmie. Wydalanie witaminy C poniżej 60% podanej dawki świadczy o jej niedoborze w organizmie

Świeżo oddany mocz zakwasić kilkoma kroplami kwasu octowego lodowatego.

Pobrać 1 ml moczu i miareczkować mianowanym roztworem dichlorofenoloidofenolu (barwę obserwować na białym tle) do uzyskania różowego zabarwienia utrzymującego się przez 30 s.

1 ml barwnika zawiera 0,08 mg 2,6- dichlorofenoloidofenolu (DCPIP), co odpowiada 0,09 mg kwasu askorbinowego



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



#### 4. Reakcje barwne witamin A, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>

##### a) Witamina A reakcja z kwasem siarkowym

###### Wykonanie:

Do 40 kropli chloroformowego roztworu witaminy A dodać 1 ml stężonego kwasu siarkowego (VI). W obecności witaminy A i  $\beta$ -karotenu powstaje barwa niebieska.

##### b) Witamina D reakcja z kwasem siarkowym

###### Wykonanie:

Do 40 kropli chloroformowego roztworu witaminy D dodać 10 kropli bezwodnika kwasu octowego i 1 ml stężonego kwasu siarkowego (VI). W obecności witaminy D występuje czerwona barwa przechodząca w niebieskozieloną.

##### c) Witamina B<sub>1</sub>

Pod wpływem środków utleniających bezbarwna tiamina przechodzi w tiochrom – związek wykazujący w zakresie ultrafioletu niebieską fluorescencję. Tiochrom jest rozpuszczalny w alkoholu izobutyłowym.

###### Wykonanie:

Do 20 kropli roztworu witaminy B<sub>1</sub> dodać 1 ml 2 N NaOH i 2-3 krople 1% roztworu K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> i 2-3 krople alkoholu izobutyłowego. W obecności tiochromu warstwa alkoholowa wykazuje w ultrafiolecie niebieską fluorescencję.

##### d) Witamina B<sub>2</sub>

Roztwór wodny ryboflawiny w środowisku obojętnym fluoryzuje żółto-zielono pod wpływem promieniowania ultrafioletowego. Zjawisko to wykorzystuje się w metodzie ilościowego oznaczania ryboflawiny. Pod wpływem czynników redukujących ryboflawina barwy żółtej przechodzi w formę bezbarwną, nie wykazując zdolności do fluorescencji.

###### Wykonanie:

Do 10 kropli roztworu witaminy B<sub>2</sub> dodać 5 kropli stężonego HCl i wrzucić kawałek metalicznego cynku. Wydzielające się pęcherzyki wodoru powodują odbarwienie związku.

Obydwa roztwory wodne witaminy B<sub>2</sub> podstawić pod analityczną lampę kwarcową i obserwować fluorescencję.



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita  
Polska

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



**Wyniki:**