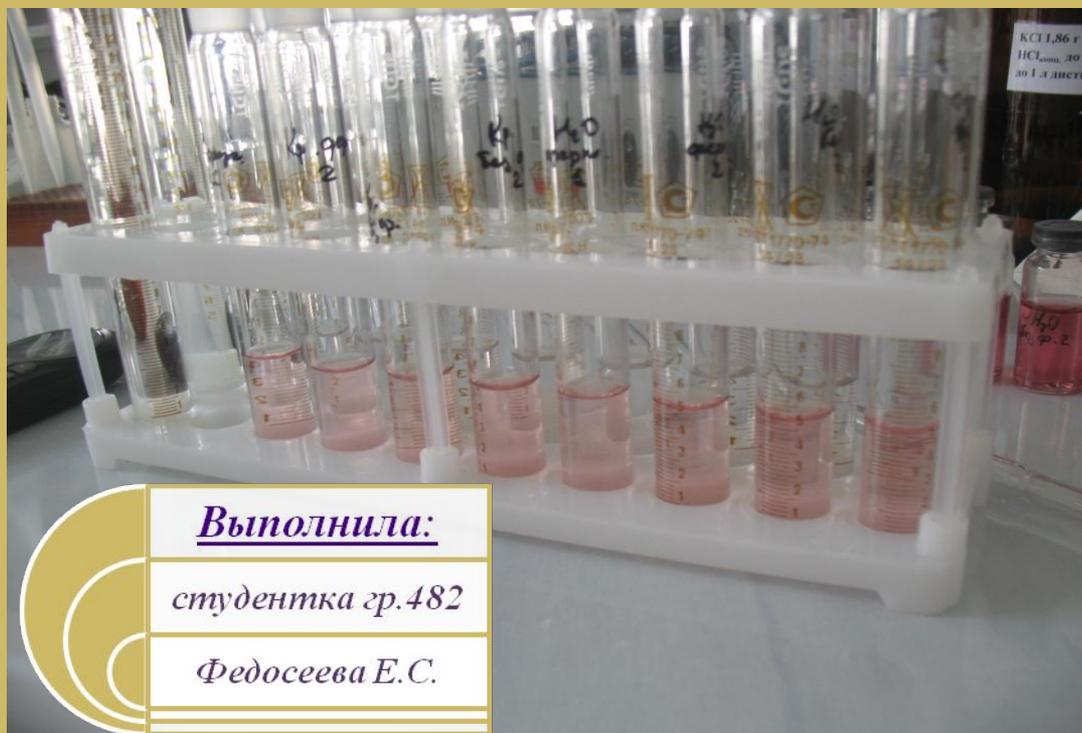


Российский Государственный Медицинский Университет
Медико-биологический факультет

ИЗУЧЕНИЕ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА



Выполнила:

студентка гр.482

Федосеева Е.С.

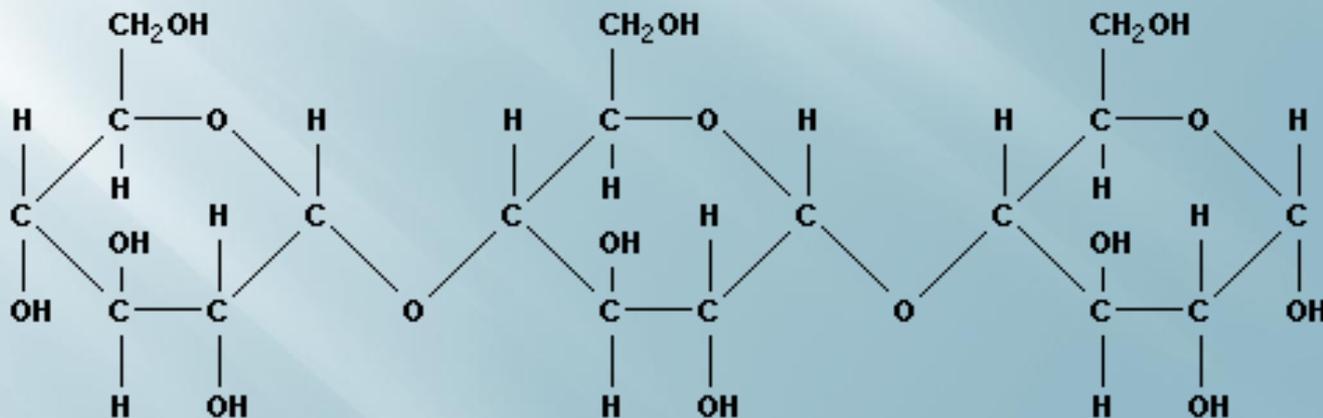
Содержание

- Введение
- Цели и задачи
- Ход эксперимента (шаг 1 шаг 1, шаг 2 шаг 1, шаг 2, шаг 3 шаг 1, шаг 2, шаг 3, шаг 4)
- Результаты измерений
- Расчеты
- Итоговый график
- Выводы
- Список литературы

Введение (1)

Крахмал – природный полимер (полисахарид), молекула которого состоит из остатков глюкозы. Он синтезируется растениями и откладывается в них в качестве запасного питательного вещества.

Химическая формула крахмала:
 $(C_6H_{10}O_5)_n$



Введение (2)



Модифицированный крахмал – это крахмал, свойства которого изменены в результате специальной обработки с целью получения заданных свойств.

Модификация позволяет получать *жидкокипящие*, *набухающие* и *экструзионные* крахмалы.

Крахмалу свойственно **набухание** – это способность медленно и в определенной мере впитывать холодную воду, не растворяясь в ней.



α -амилаза – это фермент поджелудочной железы, который гидролизует крахмал в желудочно-кишечном тракте. При разложении крахмала образуются более простые углеводы – мальтоза и глюкоза.

Цели и задачи

изучение влияния различных концентраций фермента на субстрат

поиск оптимального соотношения фермента и субстрата

расчет конечной концентрации глюкозы в зависимости от времени гидролиза крахмала

Приборы и реагенты (1)

- Исходя из поставленной в эксперименте задачи, **фермент-субстратное соотношение** подбиралось таким образом, чтобы при спектрофотометрическом определении данные попадали в пределы от 0,2 до 0,6-0,8. В этих пределах значения прибора (спектрофотометра) содержат наименьшую вероятность ошибки.
- **Крахмал:** модифицированный, хладонабухающий «Прежефло» E1422 (от «Милорадо») из восковой кукурузы. Точная навеска в эксперименте:
m крахмала = 4,000г на 100мл дистиллированной воды. C крахмала = 40мг/мл. Раствор крахмала готовится при непрерывном помешивании с помощью магнитной мешалки. Магнитную мешалку помещаем в стакан со 100 мл дистиллированной воды и медленно, маленькими порциями, равномерно добавляем в него крахмал.
- **Фермент:** α -Amylase from hog pancreas, Mr 50000, активность 57U. Точная навеска в эксперименте: m фермента = 0,501г на 4,998 мл воды. C фермента = 100мг/мл. После разведения фермент фильтруется.

Приборы и реагенты (2)

Состав рабочего реагента:

- **Реагент 1.** 4 флакона, содержащие буферную смесь, предназначенную для приготовления рабочего раствора, в состав которого входят: три-буциновый буфер 0,1М, п-фенолсульфонат 20мМ, 4-аминоантипирин 1,2 мМ. Каждый флакон рассчитан на приготовление 50 мл буферного раствора.

Реагент 2. 4 флакона, содержащие смесь лиофилизированных ферментов: глюкозооксидазы, активность в конечном растворе 20000 Е/л, и пероксидазы, активность в конечном растворе 10000 Е/л. Каждый флакон рассчитан на приготовление 50 мл основного реагента. Реагент 1 перенести в мерную колбу емкостью 50 мл и довести до 50 мл дистиллированной водой. Затем Реагент 2 растворить в 50 мл раствора Реагента 1. Раствор должен быть прозрачным.

- **Виала** - сосуд объемом 20 мл, используемый в эксперименте.
- ***Глюкоза-моногидрат:*** Mr = 198,17, чистота 99,5%;

Точная навеска в эксперименте: m глюкозы-моногидрата = 40,5 мг доводим водой до 40,5мл. C глюкозы = $(40,5\text{мг}/40,5\text{мл}) \cdot (180/198) = 0,9091\text{мг/мл}$ – концентрация чистой глюкозы.

Ход эксперимента (шаг 1)

Данная работа посвящена изучению особенностей гидролиза крахмала в присутствии фермента (панкреатическая панкреатическая α -амилаза). В эксперименте использовался модифицированный хладонабухающий крахмал с концентрацией **C = 40 мг/мл.**

*Расчет концентраций разведений матричного р-ра фермента (0,5 мг на 5 мл воды, **C = 100 мг/мл.**):*

| № пробы | Концентрация фермента, мг/мл | Количество фермента, мл | Количество дистиллированной воды |
|---------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | 40 | 0,4 | 0,6 |
| 2 | 60 | 0,6 | 0,4 |
| 3 | 80 | 0,8 | 0,2 |
| 4 | 100 | 1 | - |

Ход эксперимента (шаг 2)

Расчет количества рабочего реагента:

Для гидролиза
к **5 мл** крахмала
добавим **0,35 мл**
фермента.

Измерения оптической
плотности проведем
в 2 точках: **20 и 40 минут** –
время инкубации смеси
крахмал/фермент.

Возьмём **4 пробы**
фермента различных
концентраций, в каждой
ставим по 3 параллели

Для выполнения опыта
необходимо взять
24 виалы с 5 мл раствора
реагента в каждой.

Ход эксперимента (шаг 3)

Конечная концентрация глюкозы определяется путем измерения оптических плотностей опытной пробы относительно калибровочной. Расчет в каждой серии проводится по формуле:

$E_{оп} / E_{кп} * C$ (глюкозы в растворе) = **содержание глюкозы в образце** (ммоль/л), где:

$E_{оп}$ – поглощение опытной пробы,

$E_{кп}$ – поглощение калибровочной пробы.

Приготовление калибровочного раствора:

Взвешиваем в колбе или стаканчике 0,05 г моногидрат глюкозы, доводим дистиллированной водой до 50 мл.

 В эксперименте была поставлена промежуточная задача – оценить влияние непрерывного помешивания инкубируемой смеси на степень гидролиза крахмала.

Ставим ещё одну параллель с концентрацией фермента **100 мг/мл** (без перемешивания во время инкубации), для нее также берем точки **20 и 40** минут.

Ход эксперимента (шаг 4)

- Раствор крахмала разливаем в виалы (по 5 мл в каждую) и добавляем в них по 0,35 мл фермента с различными концентрациями (40,60,80 и 100мг/мл). Все сосуды перемешиваем в одном ритме на протяжении всего инкубационного периода, а одну виалу (с концентрацией 100мг/мл) - только в момент добавления фермента.
- Предварительно разлив во все виалы по 5 мл рабочего реагента, на 20-ой минуте после начала инкубации добавляем по 50 мкл смеси крахмал/фермент в раствор реагента и отставляем для развития окраски на 1 час.
- То же самое повторяем на 40-ой минуте.



Результаты измерений

| № пробы | D, 20 мин | D, 40 мин |
|----------------------|-----------|-----------|
| 1 | 0,3478 | 0,4429 |
| с(40мг/мл) | 0,3503 | 0,4572 |
| | 0,7423 | 0,457 |
| 2 | 0,4111 | 0,5179 |
| с(60мг/мл) | 0,4212 | 0,5262 |
| | 0,405 | 0,5335 |
| 3 | 0,4709 | 0,5985 |
| с(80мг/мл) | 0,4285 | 0,5626 |
| | 0,481 | 0,6 |
| 4 | 0,5148 | 0,661 |
| с(100мг/мл) | 0,5116 | 0,6748 |
| | 0,508 | 0,6609 |
| 4(без перемешивания) | 0,5034 | 0,6213 |
| калибратор | 0,2383 | |

Результаты измерений на спектрофотометре (при $\lambda = 500$ нм) – поглощение/оптическая плотность опытной и калибровочной проб



Расчеты

Усредненные значения оптической плотности

| | D ср. 20 мин | D ср. 40 мин |
|---|--------------|--------------|
| 1 | 0,34905 | 0,4524 |
| 2 | 0,4124 | 0,5259 |
| 3 | 0,4601 | 0,587 |
| 4 | 0,5115 | 0,6656 |

$$D \text{ ср.} = (D1 + D2 + D3)/3$$

$$C \text{ об.} = D \text{ оп.} / D \text{ калибр.} * C \text{ глюкозы}$$

Концентрация глюкозы в опытных образцах

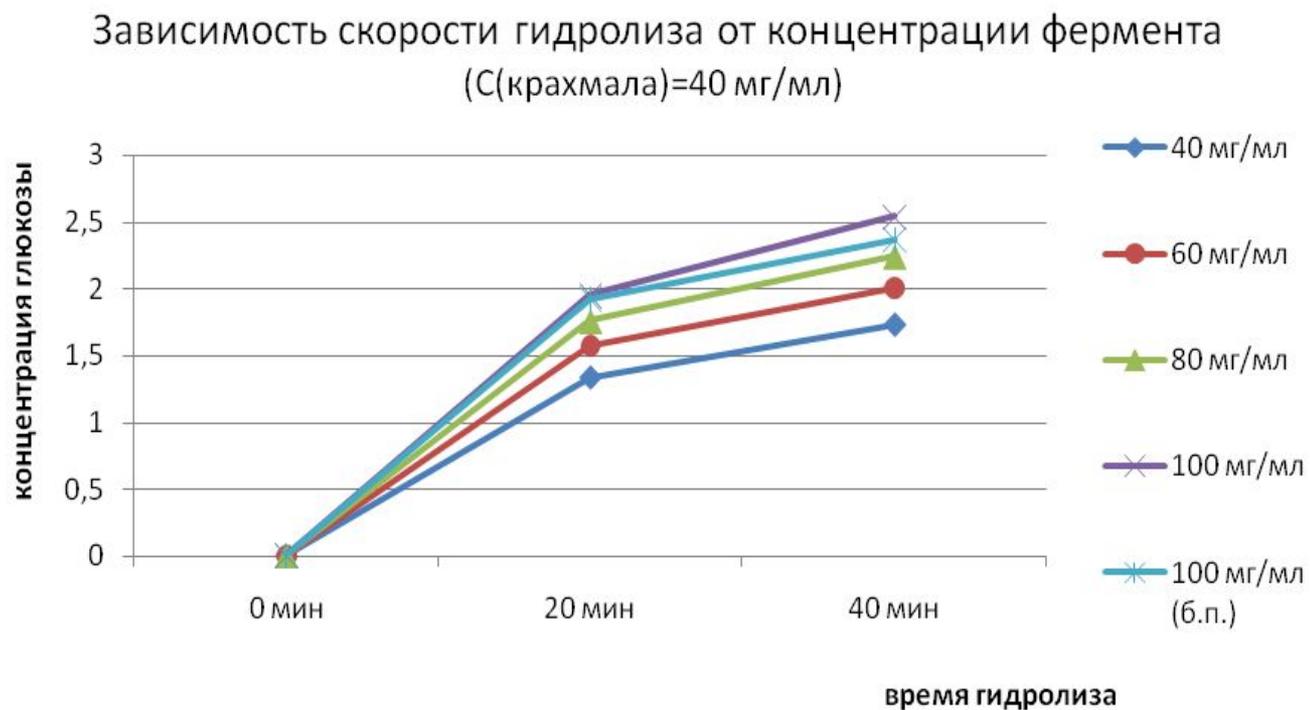
| | C(20 мин) | C(40 мин) |
|-------|-----------|-----------|
| 1 | 1,332 | 1,726 |
| 2 | 1,573 | 2,006 |
| 3 | 1,755 | 2,239 |
| 4 | 1,951 | 2,539 |
| 4 б/п | 1,92 | 2,37 |



[Содержание](#)



Итоговый график



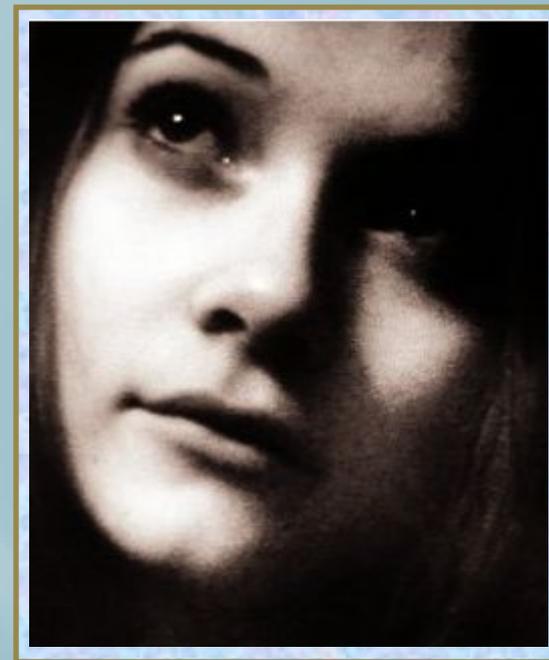
Выводы

- *При сравнении данных, полученных при перемешивании и без перемешивания при одной и той же концентрации фермента видно, что на малых временных отрезках они отличаются незначительно.*
- *При измерении оптической плотности инкубационной смеси, добавленной на 20-ой минуте, даже спустя час значительного изменения окраски растворов не происходит. Поэтому время инкубации может быть определено не столь строго, так как это мало влияет на величину оптической плотности.*
- *С увеличением концентрации фермента растет оптическая плотность растворов опытных образцов и, соответственно, количество глюкозы в полученных образцах.*

Информация об авторе:

Презентация выполнена
студенткой 4-го курса
отделения биохимии МБФ (группа 482)
Федосеевой Евгенией Сергеевной.
e-mail: dorigen@mail.ru

Основой для презентации стал отчет о летней биохимической практике, которая проводилась на базе НИИ Питания РАМН в лаборатории «Обмена веществ и энергии» под руководством к.м.н, старшего научного сотрудника Соколова А.И.



В ходе работы был проведен ряд экспериментов, раскрывающих особенности гидролиза крахмала. Моя презентация посвящена проблеме влияния различных концентраций фермента на субстрат и нахождения оптимального соотношения фермента и субстрата.

Список литературы:

- Грачева И.М. , Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – 3-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во “Элевар” 2000. 512с. ил.
- А.Ленинджер, Биохимия. М.: Изд-во “Мир” 1976. 272с.
- Экстракционная хроматография, под ред. Т. Браун и др., пер. с англ., М., 1978; Snyder L. R., Kirkland J.J.,
- Novotny M., Ishii D., Microcolumn separations columns, instrumentation and ancillary techniques, Amst., 1985 (v.30).

