

Kopīgie norādījumi

Laboratorijas halātam jābūt mugurā visu laiku, kamēr esi laboratorijā!

Ēst un dzert laboratorijā ir stingri aizliegts! Pasaki laborantam, ja vēlies iziet padzerties vai uz tualeti!

Neskaties tieši lāzerstarā laikā, kad darbojies ar lāzeru!

Velc cimodus un izmanto aizsargbrilles, kad darbojies ar ķīmikālijām.

Ja kāda ierīce vai trauks ir saplīsis vai nedarbojas, palūdz laborantam to nomainīt. Izlijuši šķīdumi u.c. atkritumi ir jāsatīra pašam.

Lūdzu, esi labai draudzīgs un izmet atkritumus tiem paredzētajos konteineros - papīrs, plastmasa, metāls, stikls un šķīdumi.

Visi papīri, ko izmanto, arī melnraksti ir jāatstāj uz galda laboratorijas darba beigās.

Vērtēti tiks tikai tie rezultāti, kurus jūs būsiet ierakstījuši *dzeltenajās* lapās vai Excel failos.

Visus failus ar saviem datiem saglabājiet uz datora desktopa (darbvirsmas)!

Laboratorijas darbs sastāv no trim daļām, kuras var pildīt atsevišķi vai komandā. Uzdevumu lapu 2., 12. un 14. lappuses ir vienādas.

Milk day

UZDEVUMS A.1 Tauki pienā

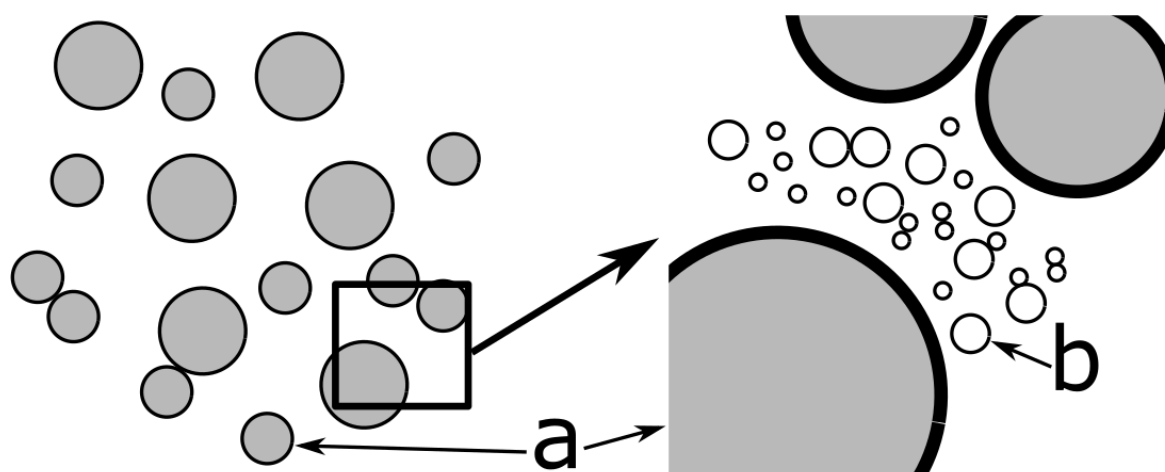
Pienu var aprakstīt kā koloīdu šķīdumu, kas satur olbaltumvielas (proteīnus), taukus un ogļhidrātus (cukurus, pārsvarā laktozi). Šodien tavs uzdevums ir veikt pētījumus par šīm piena sastāvdaļām, izmantojot fizikas, ķīmijas un bioloģijas metodes. Tavu darbu laboratorijā sponsorē firma cowBOOM. cowBOOM vēlas ražot vairākus specializētus piena produktus. Tavi pētījumi palīdzēs firmai izlemt vai piena paraugi ir piemēroti šiem mērķiem.

Kopējie piederumi:

- dators
- pildspalvas
- 2 noturīgie marķieri
- 2 zīmuļi (mehāniskais zīmulis ir domāts uzdevumam A.1)
- lineāls
- šķēres
- īsas un garas pincetes
- līmlapiņas
- pulkstenis
- kalkulators
- destilēts ūdens (500 mL strūklenē)
- aizsargbrilles
- papīra salvetes
- miskaste papīriem (zilā uzlīme)
- miskaste plastmasai (dzeltenā uzlīme)
- miskaste stikliem (zaļā uzlīme)
- miskaste šķidriem atkritumiem (dzeltenais trauks)

UZDEVUMS A.1 Tauki pienā

Piens ir gan dabiska koloidāla tauku globulu emulsija, gan hidrokoloidāla suspensija, ko veido kazeīna micellas, izkliedētas uz ūdeni bāzētā šķīdumā (Attēls 1.1). Katru tauku globulu ietver membrāna, kas attur atsevišķas globulas no savienošanās kopā. Šo daļiņu tilpuma daļa, saturs un izmērs ievērojami ietekmē piena produktu īpašības.



Attēls 1.1. Tauku globulas (a) un kazeīna micellas (b) pienā.

Piena tauku globulu (sīku tauku pilieniņu) izmērs variē robežās no 1 līdz 15 μm , atkarībā no govju šķirnes un gadalaika. Komerčiālais piens parasti ir homogenizēts – dabiska piena tauku globulas ir mehāniski sadalītas mazākos pilienos, lai tās nebūtu spējīgas uzpeldēt virspusē, veidojot krējuma slāni.

Kad gaisma iet caur pienu, to izkliedē piena tauku globulas un kazeīna micellas atstarošanās un difrakcijas ceļā. Izkliede samazina piena caurspīdību un vājina gaismu, kas iet caur piena slānīti.

Šajā uzdevumā dažādi gaismas izkliedes efekti tiek izmantoti, lai pētītu mikroskopisko daļiņu izmēru un koncentrāciju.

Paraugi:

- standarta stikla mikro-lodītes stobriņā, apzīmētas ar "Glass" ("Stikls")
- piena paraugi stobriņos "K", "L", "M" un "N".

stobriņi satur pienu ar dažādām īpašībām (nejaušā secībā):

dabisks (nehomogenizēts) piens ar 3,7% tauku saturu,
homogenizēts piens ar 3,7% tauku saturu,
dabisks (nehomogenizēts) piens ar 2,0% tauku saturu,
homogenizēts piens ar 2,0% tauku saturu,

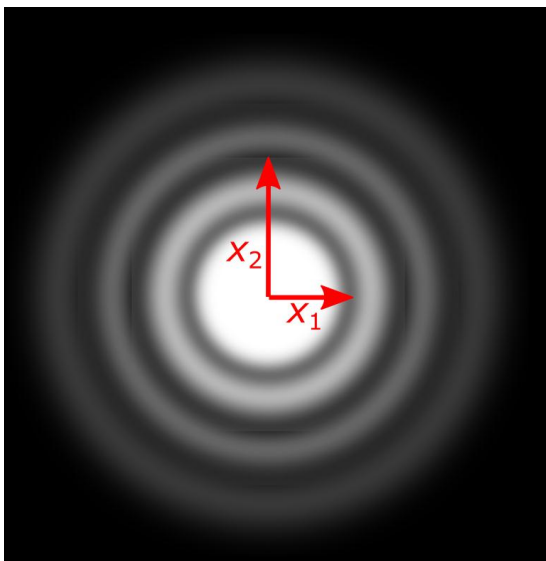
Nepieciešamā aprīkojuma saraksts

- optiskais statīvs ar zaļās gaismas lāzeru (viļņa garums $\lambda=532$ nm), parauga turētājs un ekrāns
- 14 priekšmetstikliņi
- automātiskā pipete un pipetes uzgaļi
- 4 papīra saspraudes
- papīrs (papīra lapa, no kā izgriezt papīra gabaliņus)
- testa objekts (papīra lapa ar drukātu tekstu)

UZDEVUMS A.1.1 Daļiņu izmēra novērtēšana, izmantojot gaismas difrakciju

A.1.1.1 Mikroskopisku stikla lodīšu izmēra novērtēšana

Šajā uzdevumā Tu novērtēsi standarta stikla lodīšu izmēru, novērojot to radīto difrakcijas ainu uz ekrāna. Kad lāzera starojums iet cauri vielai, kas satur mazas daļiņas, un krīt uz ekrāna, veidojas attēls, ko veido spilgts centrālais punkts, ko ietver koncentriski riņķveida gredzeni (attēls 1.2).



Attēls 1.2. Gaismas difrakcija no monoizkliedētām (vienāda izmēra) lodītēm. Attālumi no centra līdz pirmajam un otrajam minimumam ir apzīmēti ar, atbilstoši, x_1 un x_2 .

Izkliedētās gaismas leņķiskais sadalījums uz ekrāna ir atkarīgs no paraugā esošo daļiņu izmēra. Maziem difrakcijas leņķiem, sfērisku daļiņu diametrs D var tikt novērtēts no to radītā difrakcijas attēla, izmantojot formulu

$$D = k_i \lambda L/x_i, \quad (\text{Formula 1.1})$$

kur λ ir lāzera viļņa garums, L ir attālums no objekta līdz difrakcijas attēlam (uz ekrāna) un x_i ir attālums (uz ekrāna) no difrakcijas attēla centra līdz difrakcijas minimumam. Koeficients k ir atšķirīgs katram difrakcijas minimumam: pirmajam difrakcijas minimumam k_1 vērtība ir 1,22 (pirmais tumšais gredzens no centra) un otrajam difrakcijas minimumam k_2 vērtība ir 2,23.

Eksperimentālā gaita:

1. Novieto zaļās gaismas lāzeru, parauga turētāju un ekrānu uz optiskā statīva. Skatoties pēc statīva lineāla, aptuvenās sākuma pozīcijas lāzera apertūrai (vietai, kur gaisma iznāk no lāzera) vajadzētu būt uz 40 cm atzīmes, paraugam uz 48 cm atzīmes un ekrānam uz 80 cm atzīmes.
2. Sagatavo paraugu, uzliekot stikla mikrolodīšu pulveri no stobriņa ar atzīmi "Glass" uz mikroskopa priekšmetstikliņa centra. Novieto otru priekšmetstikliņu uz pirmā un saspied stikliņus kopā, izmantojot papīra saspraudes.
3. Ievieto sagatavoto paraugu parauga turētājā.
4. Ieslēdz zaļās gaismas lāzeru. Pārliecinies, ka gaisma iet cauri paraugam un krīt uz ekrāna.
5. Pārviesto lāzeru un ekrānu attiecībā vienu pret otru, lai iegūtu pēc iespējas skaidrāku difrakcijas maksimumu un minimumu. Ja nepieciešams, izmanto papīra lapu kā aizsegu ēnas radīšanai, lai uzlabotu novērošanas apstākļus!
6. **Ja lāzera gaisma ir pārāk vāja, lai novērotu jebkādu difrakcijas ainu uz ekrāna, laboratorijas asistents var sagādāt jaunu bateriju vai nomainīt lāzeru (punkti netiks atņemti).**

A.1.1.1.1 Novēro difrakcijas ainu uz ekrāna. Uzskicē aptuveno grafiku, attēlojot gaismas intensitāti I atkarībā no novirzes x no ainas centra. Papildus, atzīmē grafikā novērotajā difrakcijas ainā redzamos attālumus difrakcijas minimumam un maksimumam x_1 un x_2 .

A.1.1.1.2 Nomēri (3 reizes) attālumu no lāzera stara centra līdz pirmajam un līdz otrajam difrakcijas minimumam. Precīzākiem mērījumiem, nomēri diametru gredzeniem, kas atbilst pirmajam un otrajam minimumam un rezultātu dali ar divi. Nomēri arī attālumu L no parauga līdz ekrānam. (Katru reizi Tu vari mainīt lāzera, parauga un ekrāna pozīcijas, lai iegūtu labāko difrakcijas ainu. Tu pats vari izvēlēties, kurā ekrāna pusē Tu mērīsi difrakcijas maksimuma un minimuma pozīcijas). Ieraksti rezultātus tabulā!

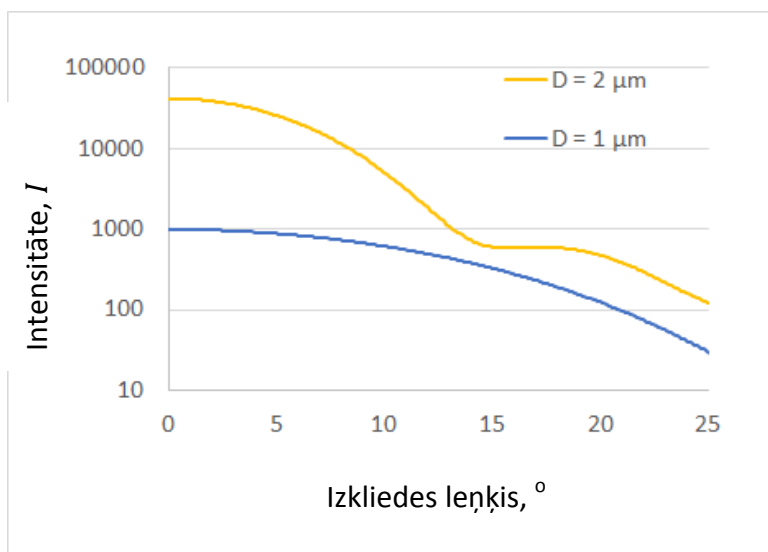
IZSLĒDZ LĀZERU, kad Tu to nelieto!

A.1.1.1.3 Aprēķini stikla lodīšu diametrus (izmantojot formulu 1.1), kas atbilst trīs mērījumiem no pirmajiem un otrajiem difrakcijas minimumiem, kopā seši rezultāti.

A.1.1.1.4 Aprēķini vidējo diametru stikla lodītēm.

A.1.1.2 Piena daļiņu aptuvenā izmēra novērtēšana

Atšķirībā no stikla lodītēm, plāns piena slānis neizkļiedē gaismu tādā veidā, lai veidotos skaidri difrakcijas gredzeni, jo visas piena tauku globulas nav vienādu izmēru. Izkļiedētās gaismas intensitāte uz ekrāna vienmērīgi samazināsies, palielinoties attālumam no lāzera stara centra.



Attēls 1.3. Piemērs izkļiedētās gaismas intensitātes leņķiskajam sadalījumam daļiņām ar dažādiem diametriem D.

Tai pat laikā, izgaismotā laukuma platums un leņķiskā izmaiņa gaismas intensitātei ir atkarīga no tauku globulu diametra pienā (skatīt attēlu 1.3 simulētam sadalījumam).

Eksperimentālā gaita:

1. Kā tiks aprakstīts soļos 2. – 5., sagatavo paraugu no stobriņa “K”, kas ir naturāls nehomogenizēts piens ar 3,7% tauku saturu.
2. Maigi apgriez stobriņu kājām gaisā, lai samaisītu pienu. Izmanto automātisko pipeti, lai iepilinātu 10 μL piena no stobriņa “K” uz mērstikliņa, ko apzīmē ar “K”.
3. Izmanto papīra gabaliņus, lai piergulētu piena slāņa biezumu starp priekšmetstikliņiem. Izgriez piemērotus papīra gabaliņus un novieto tos abās pusēs piena pilienam.
4. Apklāj priekšmetstikliņu ar citu priekšmetstikliņu, apzīmētu ar “K”.
5. Uzmanīgi saspied kopā priekšmetstikliņus, izmantojot divas papīra saspauces.

6. Pārkarāto eksperimentālo iekārtu: uz optiskā statīva novieto parauga turētāju un ekrānu pēc iespējas tuvāk vienu otram.
7. Ievieto sagatavoto piena paraugu parauga turētājā.
8. Ieslēdz zaļās gaismas lāzeru. Pārlicinies, ka gaisma iet caur paraugu un krīt uz ekrāna. Pārvieto lāzeru un parauga turētāju tā, lai iegūtu labi novērojamu izgaismotu izkliedētās gaismas laukumu uz ekrāna (Tu pats vari izvēlēties, kurā ekrāna pusē novērosi un mērīsi izgaismoto laukumu. Izmanto papīra lapu ēnas radīšanai, ja nepieciešams)

A.1.1.2.1 Uz ekrāna novēro izgaismoto laukumu. Uzskicē aptuveno grafiku gaismas intensitātes I atkarībai no novirzes x no stara ass. Atzīmē attālumu x_{milk} (mērīsi A.1.1.2.2.) grafikā.

A.1.1.2.2 Nosaki aptuveno attālumu x_{milk} no stara ass līdz izgaismotā laukuma malai (puse no platuma visam izgaismotajam laukumam). Lai to paveiktu, izmēri izgaismotā laukuma platumu un izdali iegūto rezultātu ar divi. Izmēri arī attālumu L_{milk} no parauga līdz ekrānam.
IZSLĒDZ LĀZERU!

A.1.1.2.3 Novērtē aptuveno piena tauku globulu izmēru. Izmanto parametrus, ko iegūvi no uzdevuma A.1.1.2.2., lai aprēķinātu piena tauku globulu diametru D_{milk} no formulas 1.1. Izmanto $k_2 = 2,23$ un $x_2 = x_{milk}$

A.1.2 Piena raksturošana no caurspīdības novērojumiem

Šajā uzdevumā Tu salīdzināsi četrus piena paraugus (**K**, **L**, **M** un **N** aprakstīti uzdevuma A.1. sākumā), lai identificētu to specifiskas īpašības.

Kad skaties uz kādu objektu (piem. drukātu tekstu) caur plānu piena slānīti, objekts izliekas mazāk ass un mazāk redzams. Gaisma, kas tiek atstarota no objekta, izkliedējas pret piena tauku globulām tās ceļā caur pienu. Izkliedētā gaisma parādās kā migla, padarot neskaidru novērojamo objektu, piemēram, samazinot tā redzamību. Piena slāņa caurspīdība samazinās, kad palielinās izkliede tajā.

Gaismas kvants tiek izkliedēts, kad tas trāpa tauku globulai ar šķērsriezuma laukumu $S = \pi D^2/4$, kur D ir globulas diametrs. Izkliešanas līmenis plānā piena slānītī ar biezumu z ir atkarīgs no piena tauku satura γ (tauku globulu tilpuma daļa) un vidējais izmērs (diametrs D) tauku globulām. Kad plāns piena slānītis ir izgaismots ar gaismu, kuras intensitāte ir I_0 , tad izkliedētās gaismas intensitāti I var aprakstīt ar formulu

$$I \sim I_0 \gamma z / D \quad (\text{Formula 1.2})$$

A.1.2.1 Noskaidro teorētiski, kurš no četriem tabulā 1.1 aprakstītajiem piena paraugiem radītu spēcīgāko, un kurš – vājāko izkliedi. Paraugi ietver homogenizētu un dabisku

(nehomogenizētu) pienu (ievērojot, ka $D_{homog} < D_{dabisks}$) ar diviem dažādiem tauku saturiem (ievērojot, ka $\gamma_1 < \gamma_2$).

Tabula 1.1. Piena paraugu 1-4 raksturlielumi.

Paraugs	Globulas izmērs	Tauku saturs
1	D_{hom}	γ_1
2	D_{hom}	γ_2
3	D_{nat}	γ_1
4	D_{nat}	γ_2

Eksperimentālā gaita:

1. Paņem 8 priekšmetstikliņus un apzīmē stikliņu pārus ar marķieri ar **K**, **L**, **M**, un **N**.
2. Novieto četrus priekšmetstikliņus blakus citu citam uz papīra lapas ar drukāto tekstu (testa objekts).
3. Sagatavo piena paraugus **K**, **L**, **M** un **N** kā aprakstīts stobriņam “K” soļos 1.-5. eksperimentālajā gaitā uzdevumā A.1.1.2.
4. Salīdzini redzamību drukātajam tekstam, skatoties caur paraugiem **K**, **L**, **M**, un **N**.

A.1.2.2 Novēro tekstu caur piena slāņiem un nosaki, kuri divi piemēri izrāda vispēcīgāko un vājāko izkliedi (attiecīgi, sliktāko un labāko redzamību). Identificē divu izvēlēto paraugu īpašības, ņemot vērā paraugu aprakstu A.1. uzdevuma sākumā un rezultātus no uzdevuma A.1.2.1.

A.1.2.3 Izveido kopsavilkumu paraugu identificēšanai tabulā. Izlem, kā katrs no paraugiem **K**, **L**, **M** un **N** ir ticis apstrādāts un kāds ir to tauku saturs. Ņem vērā savas iepriekš iegūtās atbildes un noderīgo informāciju, kas dota tekstā.

UZDEVUMS A.1.3 Tauku globulu izmēra novērtēšana izmantojot gaismas pavājināšanās mērījumus

Uzdevumā A.1.2. Tu pētīji izkliedētu gaismu no plāna piena slānīša. Šajā uzdevumā Tu mērīsi gaismas daļu, kas var iziet caur biezu ūdens slāni, kas satur nelielu piena daudzumu. Tīrā

ūdenī gaismas stari var brīvi pārvietoties pa taisnu trajektoriju. Ja ūdenim tiek pievienots piens, tauku globulas nonāk gaismas staru ceļā un novirza to kustību no oriģinālā taisnā ceļa. Jo garāks ir ceļš, ko gaismai ir jāveic caur vidi, kas satur daļiņas, jo augstāka varbūtība, ka gaismas stars sadursies ar daļiņu. Gaismas daļa, kas tiek brīvi laista cauri videi, var tikt aprakstīta ar Bēra-Lamberta likumu:

$$I = I_0 e^{-NSz}, \quad (\text{Formula 1.3})$$

kur I ir caurlaistās gaismas intensitāte, I_0 ir krītošās gaismas intensitāte, N ir daļiņu skaits uz tilpuma vienību, z ir slāņa biezums un S ir šķērsriezuma laukums vienai daļiņai. Pieņemot, ka visas tauku globulas pienā ir ar vienādiem diametriem D , katra no tām darbojas kā sfēriska šķērsliņa ar šķērsriezuma laukumu

$$S = \pi D^2 / 4 \quad (\text{Formula 1.4})$$

gaismas ceļā.

Šajā eksperimentā Tu mērīsi gaismas pavājināšanos, pievienojot pienu konteineram ar fiksētu biezumu, ko sākotnēji papildīsi ar tīru ūdeni. Piena pievienošana rada palielinājumu daļiņu skaitā (tauku globulas), kas noved pie caurlaistās gaismas intensitātes samazināšanās. Eksperimenta mērķis ir mērīt gaismas pavājināšanās atkarību no piena koncentrācijas ūdenī, lai noteiktu parametrus, kas nepieciešami tauku globulu izmēra aprēķināšanai.

Tu izmantosi luksmetru (Lux meter) lai kvantificētu lāzera stara intensitāti staram, kas izgājis caur vidi, kas satur tauku globulas. Taču gaisma no fona vides (piemēram, saules gaisma, kas spīd no logiem un telpas apgaismojums) ietekmē luksmetra rādījumus. Lai iegūtu intensitāti, kas atbilst tikai lāzera staram, Tev vajadzēs atņemt mērījumu, kas atbildīs fona gaismai. Precīzas instrukcijas veicamajai procedūrai ir dotas tālākā tekstā.

Piederumi un materiāli:

- sarkanās gaismas lāzers statīvā
- ūdens konteiners (50 mL graduēta pudele ar zilu korķīti)
- luksmetrs statīvā
- automātiskā pipete un pipetes uzgaļi
- piena paraugs stobriņā apzīmētā ar **K**
- Excel fails "Milk A.1.3 Latvia Team A/B.xlsx" uz darba virsmas (desktop) Tavas komandas portatīvajam datoram

Eksperimentālā gaita:

1. Novieto sarkanās gaismas lāzeru, ūdens konteineru un luksmetru uz sava galda tā, lai lāzera stars iet caur ūdens konteineru pa ceļam uz luksmetra sensoru. **Svarīgi:** novieto ūdens konteineru tā, lai lāzestars tajā ieiet perpendikulāri sānu virsmai. Novieto ūdens konteineru aptuveni 20 – 40 cm attālumā no luksmetra.

2. Iespraud sarkano lāzeru datorā USB pieslēgumvietā. Ieslēdz datoru. Pielāgo lāzera novietojumu tā, lai gaismas stars būtu aptuveni horizontāls.
3. Pārlicinies, ka lāzerstars ir fokusēts (lāzera punkts ir pēc iespējas mazs) uz luksmetra sensora un ka tas ietiet sensorā caur caurumiņu sensora priekšā. Ja nepieciešams, pielāgo lēcu, kas atrodas lāzera priekšā, pagriežot tā korķīti.
4. Ieslēdz luksmetru. Veic mērījumu atbilstošajā luksmetra mērdiāpazonā, piemēram, "2000" vai "20000".
5. Piepildi ūdens konteineru ar destilētu ūdeni līdz 50 mL atzīmei. Piefiksē, ka ūdens slāņa biezums $z = 25$ mm.
6. **Svarīgi:** Izšķirošs faktors ir tas, ka pēc gaismas sensora un lāzera novietošanas, to **atrašanās vietas paliek fiksētas** visu atlikušo eksperimentu. Ja Tu netīšām izkustini lāzeru vai sensoru, ieteicams mērījumus veikt no jauna (sākot ar tīru ūdeni).

A.1.3.1 Nomēri un pieraksti **Excel failā** gaismas intensitātes un kopējo piena tilpumu ūdenī katrā solī sava eksperimenta gaitā kā aprakstīts soļos 8-12. Pieraksti arī ūdens tilpumu V_0 .

7. Nomēri rādījumu I_0 no luksmetra, kas atbilst caurlaistās gaismas intensitātei tīram ūdenim. (Šis rādījums sevī ietver arī fona vides daļu). Pieraksti nomērīto vērtību I_0 **savā Excel failā tabulā. Datorproblēmu gadījumā (ķibeles ar programmatūru, iztrūkstoši faili utt), palūdz laboratorijas asistenta palīdzību (punkti netiks noņemti).**
8. Nomēri rādījumu B_0 , atbilstošu gaismas intensitātei, kas nāk no fona vides. Lai veiktu šo mērījumu, aizsedz lāzera staru ar roku, nomēri rādījumu no luksmetra un pieraksti vērtību B_0 savā **Excel failā**.
9. Izmantojot automātisko pipeti ar uzgali, paņēmi daļu no piena ar tilpumu $V_1 = 20\mu L$ no stobriņa ar atzīmi "K". Pievieno pienu ūdenim un samaisi šķīdumu, aizverot konteineru un pāris reizes to apgriežot.
10. Noliec konteineru atpakaļ tā sākuma pozīcijā. Nomēri un pieraksti (**Excel failā**) rādījumu I_1 no luksmetra, kad lāzera stars iet caur konteineru. Aizsedz lāzera staru un pieraksti (**Excel failā**) rādījumu B_1 , kas atbilst fona gaismai.
11. Atkārtoti procedūru, katru reizi pievienojot $20\mu L$ piena konteinerā. Pēc katras porcijas pievienošanas, samaisi šķīdumu, pieraksti kopīgo pievienotā piena tilpumu V_i , luksmetra rādījumu I_i un luksmetra rādījumu B_i **Excel failā**. Atkārtoti šādu procedūru līdz brīdim, kad ir pievienoti 10 pilieni piena vai līdz brīdim, kad lasījums I_i ir tuvs fona gaismai atbilstošajam rādījumam B_i .

A.1.3.2 Katram datu punktam aprēķini tilpuma koncentrāciju C_i pienam ūdenī un relatīvo caurlaidības koeficientu $\alpha_i = (I_i - B_i)/(I_0 - B_0)$. Veic aprēķinus **Excel failā**.

A.1.3.3 Uzzīmē grafiku ar relatīvā caurlaidības koeficienta naturāllogaritmu $\ln \alpha_i$ atkarībā no piena koncentrācijas ūdenī C_i (**Excel failā**).

A.1.3.4 Uzzīmē aproksimācijas taisni (trendline), kas raksturo Tavus datus kā lineāru attiecību $\ln \alpha = -\beta C$ **Excel failā**. Atrodi koeficienta β skaitlisko vērtību. Uzraksti β vērtības moduli **Atbilžu lapā**.

A.1.3.5 Piena paraugs, kas apzīmēts ar "K" satur noteiktu tilpuma daļu ar tauku globulām (kopējais tauku tilpums vienā tilpuma vienībā piena) - $\gamma = 0.037$. Izved formulu skaita blīvumam N_0 tauku globulām pienā (tauku daļiņu skaits vienā tilpuma vienībā, SI sistēmas vienībās $1/m^3$ izsakot to ar lielumiem D kā globulu diametrs un γ .

A.1.3.6 Izved formulu skaita blīvumam N tauku globulām piena un ūdens maisījumam, izsakot to ar lielumiem C (piena koncentrācija ūdenī) un D (vienas tauku globulas diametrs), un γ

A.1.3.7 Izved formulu diametra D aprēķināšanai tauku globulām Tavā piena paraugā un aprēķini skaitlisko vērtību lielumam D. **Padoms:** ņem vērā, ka paņemot logaritmu no Bēra-Lamberta likuma $I = I_0 e^{-NSz}$ (apskatīts ievadā uzdevumam A.1.3.), mēs iegūstam lineāru sakarību $\ln \alpha = \ln \frac{I}{I_0} = -NSz$ starp logaritmu no caurlaidības koeficienta un daļiņu skaita blīvuma (tauku globulām). Izmanto savus eksperimentālos rezultātus, lai aprēķinātu skaitlisko vērtību tauku globulu diametram.

Milk day

Uzdevums A.2 Siera ražošana un proteīnu saturs

Pienu var aprakstīt kā koloīdu šķīdumu, kas satur olbaltumvielas (proteīnus), taukus un ogļhidrātus (cukurus, pārsvarā laktozi). Šodien tavs uzdevums ir veikt pētījumus par šīm piena sastāvdaļām, izmantojot fizikas, ķīmijas un bioloģijas metodes. Tavu darbu laboratorijā sponsorē firma cowBOOM. cowBOOM vēlas ražot vairākus specializētus piena produktus. Tavi pētījumi palīdzēs firmai izlemt vai piena paraugi ir piemēroti šiem mērķiem.

Kopējie piederumi:

- dators
- pildspalvas
- 2 noturīgie marķieri
- 2 zīmuļi (mehāniskais zīmulis ir domāts uzdevumam A.1)
- lineāls
- šķēres
- īsas un garas pincetes
- līmlapiņas
- pulkstenis
- kalkulators
- destilēts ūdens (500 mL strūklenē)
- aizsargbrilles
- papīra salvetes
- miskaste papīriem (zilā uzlīme)
- miskaste plastmasai (dzeltenā uzlīme)
- miskaste stikliem (zaļā uzlīme)
- miskaste šķidriem atkritumiem (dzeltenais trauks)

Uzdevums A.2 Siera ražošana un proteīnu saturs

Sieru ražo no piena tam pievienojot īpašas baktērijas, enzīmu - renīnu un Ca^{2+} jonus. Siera ražošanā ir vairāki soļi - paskābināšana, koagulācija, atūdeņošana un nobriedināšana. Šodien tu gūsi ieskatu šo soļu bioķīmiskajos un biofizikālajos pamatos.

Šajā uzdevumā tev būs jāgatavo siers. Lai to izdarītu, bez piena ir nepieciešams CaCl_2 šķīdums, olbaltumvielas šķeļošu enzīmu maisījums, ko sauc par renīnu, kā arī noteiktu baktēriju maisījums, ko sauc par starta kultūru. Baktērijas ražo pienskābi, kas pazemina piena pH līdz 5,0 - 6,0. Pie šī pH piena olbaltumvielas - kazeīni - sāk veidot agregātus. Šis pH ir optimāls renīna darbībai. Renīns sāk šķelt olbaltumvielas, kas veicina to agregāciju un nogulšņu (biezpiena) veidošanos. Kalcija jonus pievieno, lai vēl vairāk veicinātu nogulšņu veidošanos, jo tas neitralizē elektrostatisko atgrūšanos starp olbaltumvielu agregātiem un veidojas blīvākas nogulsnes. Tev ir visas siera ražošanai nepieciešamās izejvielas. CaCl_2 , renīns un baktērijas ir apzīmētas kā **substance A, B, un C** (nejaušā secībā) un tavs uzdevums ir noteikt kā apzīmēta katra izejviela.

Uzdevums A.2.1 Siera ražošana

Nepieciešamo piederumu saraksts:

- piens 300 mL plastmasas pudelē (ar atzīmi **MILK**)
- substance A (20 mg centrifūgas stobriņā; 3 stobriņi)
- substance B (3 mg centrifūgas stobriņā; 3 stobriņi)
- substance C (20 μL centrifūgas stobriņā; 3 stobriņi)
- 8 50 mL stobriņi
- stobriņu statīvs
- 12 plastmasas pipetes
- 4 plastmasas Petri plates
- 250 mL vārglāze
- plastmasas piltuve (balta)
- 4 filtrēšanas audumi (caurspīdīgā maisiņā)
- Trauks ar siltu ūdeni (ūdens vanna), palūdz laborantam pēc tam, kad esi veicis 1.–4. soli

Darba gaita:

1. Samaisi pienu pudelē tā, lai sajauktu iespējamās slāņus tajā. Uzmanies, nesakrati pienu tā, lai veidotos putas.
2. Ielej aptuveni 50 mL piena 4 50 mL stobros. Apzīmē stobriņus kā **I, II, III, and IV**.
3. Izšķīdini substanci A (stobriņā ir iesvērti 20 mg) 1 mL destilēta ūdens (ūdeni vari ieliet 250 ml vārglāzē, ūdeni nomēri izmantojot plastmasas pipeti). Pievieno iegūto šķīdumu 50 mL stobriņā, ko esi apzīmējis ar **I**
 - a. Atkārti šo darbību ar stobriņiem **II** un **III** (katru reizi no jauna izšķīdini substanci A)
4. Izmantojot jaunu plastmasas pipeti, paņem aptuveni 1 mL no stobriņa **I** un iepilini to centrifūgas stobriņā, kurā atrodas substance B (jau iesvērti 3 mg). Izšķīdini substanci un ielej to atpakaļ stobriņā **I**
 - a. Atkārti šo darbību ar stobriņiem **II** un **IV** (katru reizi no jauna izšķīdini substanci B)
5. Sajauc stobriņus tos vairākas reizes apvēršot (stobriņiem jābūt aizskrūvētiem) un ieliec tos siltā ūdens vannā uz 30 minūtēm (**siltā ūdens trauku palūdz laborantam**). Kamēr paraugi inkubējas, atbildi uz teorētiskajiem jautājumiem.

A.2.1.1 Kurai piena sastāvdaļai ir mazāks blīvums - saldajam krējumam vai vājpienam? Kāpēc?

1. saldajam krējumam, jo tam ir lielāks tauku saturs
2. vājpienam, jo tam ir mazāks tauku saturs
3. saldajam krējumam, jo tam ir lielāks olbaltumvielu saturs
4. vājpienam, jo tam ir mazāks olbaltumvielu saturs
5. saldajam krējumam, jo tam ir lielāks cukuru daudzums
6. vājpienam, jo tam ir zemāks cukuru daudzums

A.2.1.2 Pienotavās pienu ar centrifūgu sadala divās frakcijās pēc to blīvuma - vājpienā un saldajā krējumā. Tauku saturu šajās frakcijās ir iespējams noteikt ar infrasarkanu spektroskopiju vai citām metodēm.

cowBOOM firmas pienotava saņēma 200,0 L piena ar tauku saturu 4,1 %. Siera ražo no piena ar tauku saturu 2,9%. Pienotavā ir separatora (centrifūga), kas spēj nošķirt saldo krējumu ar 20% tauku saturu un pienu ar standarta 2,9% tauku. Cik litru saldā krējuma un standarta piena jūs varat iegūt no atvestā piena? Aprēķinos neņem vērā nelielās blīvumu atšķirības starp piena frakcijām.

Turpini siera ražošanu!

6. Izmanto jaunu plastmasas pipeti un izšķīdini substanci C (stobriņā jau ir iesvērti 20 mg) tāpat kā tu izšķīdināji substanci A (sk. 3. punktu) Pievieno substanci C I stobriņam
 - a. Atkārti šo darbību ar stobriņiem **III** un **IV** (katru reizi no jauna izšķīdini substanci C)
7. Samaisi stobru saturu apvēršot stobrus vairākas reizes un inkubē visus stobriņus 30 minūtes ūdens vannā
8. Izmantojot filtrēšanu, atdali šķidrumu (sūkalas) no nogulsnēm (biezpiena). Lai izfiltrētu iegūto masu, ieklāj tīrā piltuvē filtrējamo audumu un ievieto piltuvi tīrā 50 mL centrifūgas stobriņā. Lai paātrinātu filtrēšanu, vari pamaisīt ar lāpstiņu. Katram paraugam izmanto savu centrifūgas stobriņu. Izmazgā un nožāvē piltuvi un lāpstiņu starp filtrēšanas reizēm. Iegūtās nogulsnes ieliec Petri platēs. Nomarkē stobriņus ar sūkalām kā **Whey I**, **Whey II** utt., ņemot vērā no kura stobra tā ir nākušas, Tāpat nomarkē iegūto biezpienu, uzrakstot **Curd I**, **Curd II** utt uz Petri platēm. Saglabā šos paraugus, jo tos tev vajadzēs uzdevumā A2.2.

A.2.1.3.1 Aizpildi tabulu **atbilžu lapā**, kas apraksta biezpiena veidošanos

A.2.1.3.2 Kurā Petri platē ir viskrēmīgākais, visšķidrākais biezpiens? Uzraksti atbilstošo parauga numuru **atbilžu lapā**. Neņem vērā paraugus, kuros biezpiens neveidojās vispār

A.2.1.4 Pamatojoties uz taviem novērojumiem un A3 uzdevuma rezultātiem (tos ieguva tavs komandas biedrs), nosaki kāda ir katras nezināmas substances loma. Izvēlies no piedāvātajiem variantiem:

1. ierosina biezpiena veidošanos
2. uzlabo biezpiena veidošanos
3. patērē laktozi

A.2.1.5 Pamatojoties uz ievada tekstu un A.2.1.4. uzdevuma 1. - 3. atbildi, nosaki, kas ir substances A, B un C.

1. CaCl_2
2. renīns
3. startera baktērijas

Uzdevums A.2.2. Kopējā olbaltumvielu daudzuma noteikšana ar Bredforda reaģentu

Siera taisīšanas procesa laikā tu pamanīji, ka veidojas divas frakcijas - sūkalas un biezpiens. Biezpiens izgulsnējas, jo pienā esošais kazeīns pēc saskarsmes ar enzīmu maisījumu - renīnu, salīp lielos sakopojumos - agregātos. Kā renīns izmaina kazeīnu tiks apspriests zemāk.

Olbaltumvielu agregātu veidošanos var panākt arī, ja stipri paskābina pienu. Zemā vides pH kazeīns salīp agregātos.

Piena koagulācija ar tā paskābināšanu

Nepieciešamo piederumu saraksts:

- piens, **Whey I** un **Curd I** (tas pats, kas uzdevumā A.2.1)
- 1 M HCl (0.5 mL centrifūgas stobriņā)
- 2 plastmasas pipetes
- 3 gab. 15mL stobriņi
- filtrpapīrs (caurspīdīgajā maisiņā)
- Petri plate
- Excel fails "Milk A.2.2 Latvia Team A/B.xlsx" uz jūsu komandas datora desktopa

Darba gaita:

1. Pārlicinies, ka esi uzvilcis halātu, aizsargbrilles un cimdus.
2. Izmantojot plastmasas pipeti, ielej 10 mL piena tīrā 15 mL stobriņā. Nomarķē stobriņu kā **paskābinātais piens**.
3. Izmanto tīru plastmasas pipeti un uzmanīgi pārnes 0,5 mL 1M HCl stobriņā ar pienu. Aizver stobriņu un samaisi to apvēršot vairākas reizes.
4. Atdali šķidrumu no nogulsnes, izfiltrējot iegūto šķidrumu tīrā 15 mL stobriņā (izmanto filtrpapīru!). Kamēr šķidrums filtrējas, vari risināt teorētiskos uzdevumus. Kad lielākā daļa no šķidruma ir izfiltrēta (tev nav jāgaida, kamēr cauri filtrpapīram izsūksies viss šķidrums) nomarķē stobriņu ar izfiltrēto šķidrumu kā **„LIQ”**
5. Pārnes nofiltrētās nogulsnes Petri platē un nomarķē tās kā **"SOL."**

Bredforda reaģentu izmanto, lai spektroskopiski noteiktu kopējo olbaltumvielu saturu šķīdumā. Lai to paveiktu, sajauc mērāmo paraugu ar Bredforda šķīdumu un mēra gaismas absorbciju redzamajā gaismā. Atkarībā no šķīduma pH, Bredforda reaģentā esošā krāsviela Kumasī briljanzilais var būt trīs formās - katjonu (sarkana), neitrālā (zaļa) un anjonu (zila). Zemā pH šī krāsviela ir piesaistījusi protonus un ir tās sarkanajā formā ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$). Bet, ja šķīdumā ir olbaltumvielas, tad hidrofobu un jonu mijiedarbību dēļ, krāsviela saistās pie olbaltumvielām, atdod tām protonus un pārvēršas stabilā zilajā formā ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$). Šos olbaltumvielas - krāsvielas kompleksus var nomērīt pie 595 nm ar spektrofotometru vai daudzlauciņu platīšu lasītāju.

Lai mērījums būtu precīzs, veido kalibrācijas līkni. Kalibrācijas līkni veido izmantojot šķīdumus ar zināmu olbaltumvielu saturu. Kalibrācijas līknes veidošanai izmanto samērā lētus un tīrus proteīnu šķīdumus, tu izmantosi BSA (liellopa seruma albumīnu)

A.2.2.1 Attēlā zemāk vari redzēt trīs absorbcijas līknes. Viena ir no parauga bez olbaltumvielām, viena no parauga ar nelielu olbaltumvielu koncentrāciju un viena no parauga ar lielu olbaltumvielu koncentrāciju. Izvēlies, kura līkne atbilst kuram paraugam

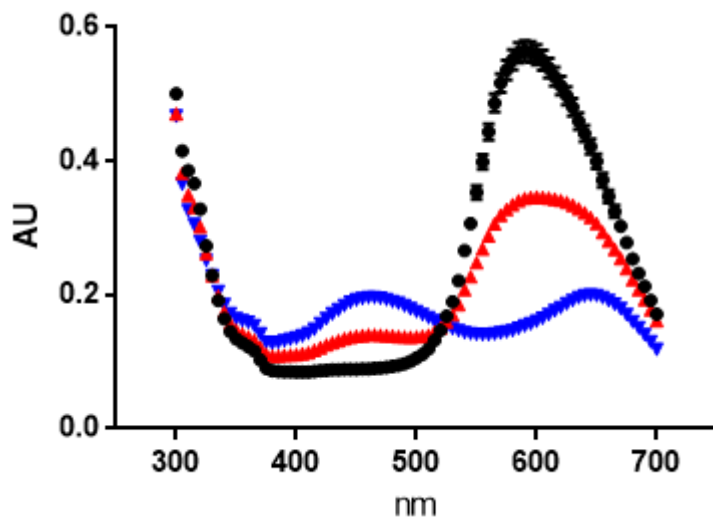


Figure 2.1. Paraugu absorbcijas (AU, relatīvās absorbcijas vienības) spektrs pie dažādiem viļņu garumiem (nm). (●) data series 1, (▲) data series 2, (▼) data series 3.

Atšķaidījumu sērijas gatavošana. Spektrofotometrija.

Nepieciešamo piederumu saraksts:

- piens (tas pats, ko izmantoji uzdevumā A.2.1)
- Bredforda reaģents (5 mL, stobriņā)
- Liellopa seruma albumīns, BSA (1.5 mg, centrifūgas stobriņā)
- PBS buferis (fosfāta sāļu buferis; 20 mL, stobriņā)
- 1% Triton X šķīdums (3 mL, stobriņā)
- 15 plastmasas pipetes
- 10 centrifūgas stobriņi (ar tilpumu 2 mL)
- centrifūgas stobriņu statīvs
- lāpstiņa
- stobriņu kratītājs (vortekss)
- automātiskā pipete ar uzgaļiem
- daudzlauciņu platīte (caurspīdīgā 96-lauciņu plate)

Darba gaita:

1. Izmantojot plastmasas vai automātisko pipeti, centrifūgas stobriņā ar 1,5 mg liellopa seruma albumīnu (BSA) pārnes precīzi 1,5 mL fosfāta sāļu bufera (PBS buferis)

šķīduma. Vairākas reizes apvērs stobriņu un izmanto stobriņu kratītāju (vorteksu) līdz viss BSA ir izšķīdis šķīdumā (3-5 minūtes).

Ievēro! Tu vari izmantot vienu un to pašu plastmasas pipeti PBS šķīduma pievienošanai visos eksperimenta soļos, ja esi pārliecināta, ka pipete nav sasmērēta. Ja neesi par to pārliecināta, katru reizi izmanto jaunu pipeti.

2. Pagatavo 1% piena šķīdumu centrifūgas stobriņā. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 10 µL piena. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „**MILK#1**”

Ievēro! Izmet automātiskās pipetes uzgali pēc katras pipetes izmantošanas reizes!

3. Citā centrifūgas stobriņā pagatavo 0,02% piena šķīdumu. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 20 µL iepriekš pagatavotā šķīduma „**MILK#1**”. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „**MILK#2**”
4. Pagatavo 1% šķīdumu no **LIQ**, kas iegūts iepriekš, filtrējot paskābinātu pienu. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 10 µL iepriekš iegūtā šķīduma „**LIQ**”. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „**LIQ#1**”
5. Pagatavo 0.2% šķīdumu, no **LIQ**, kas iegūts iepriekš, filtrējot paskābinātu pienu. Izmantojot automātisko pipeti, vispirms pārnes 160 µL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 40 µL iepriekš pagatavota šķīduma „**LIQ#1**”. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „**LIQ#2**”
6. No Petri plates „**SOL**” jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā ar lāpstiņu pārnes nelielu, redzamu daudzumu nogulšņu, kas iegūtas iepriekš. Apzīmē stobriņu kā „**SOL#1**”. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes stobriņā 1 mL 1% Triton X šķīduma (veicina olbaltumvielu šķīšanu no nogulsniem). Izmantojot stobriņu kratītāju, 3-5 minūtes kārtīgi sajauc maisījumu līdz visas nogulsnes ir vienmērīgi sajaukušās ar šķīdumu.

Gadījumā, ja nav sanācis iegūt nogulsnes SOL, lūdz pēc palīdzības laborantam! Tev iedos izmantošanai gatavu paraugu, bet par to tiks noņemti 2 punkti.

7. Pagatavo 2% šķīduma no šķīduma, kas iegūts iepriekš 6. solī. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 20 µL iepriekš iegūtā tīrā šķīduma daļas no „**SOL#1**”. Pārnes tikai tīru šķīdumu bez nogulsniem! Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „**SOL#2**”

8. Pagatavo 1% sūkalu „WHEY I” šķīdumu. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 10 µL iepriekš iegūtā sūkalu šķīduma WHEY I. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „WHEY#1”
9. Pagatavo 0,2% sūkalu šķīdumu. Izmantojot automātisko pipeti, vispirms pārnes 160 µL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 40 µL iepriekš pagatavota šķīduma „WHEY#1”. Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „WHEY#2”
10. Izmantojot lāpstiņu, pārnes nelielu, redzamu biezpiena „CURD I” daudzumu jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā. Apzīmē stobriņu kā „CURD#1”. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes stobriņā 1 mL 1% Triton X šķīduma. Izmantojot stobriņu kratītāju, 3-5 minūtes kārtīgi sajauc maisījumu līdz visas nogulsnes ir vienmērīgi sajaukušās ar šķīdumu.

Gadījumā, ja nav sanācis iegūt biezpienu, lūdz pēc palīdzības laborantam! Tev iedos izmantošanai gatavu paraugu, bet par to tiks noņemti 2 punkti.

11. Pagatavo 2% šķīduma no šķīduma iepriekš iegūtajā maisījumā „CURD#1”. Izmantojot plastmasas pipeti, pārnes 1 mL PBS šķīduma jaunā, tīrā centrifūgas stobriņā un, izmantojot automātisko pipeti, pievieno 20 µL iepriekš iegūtā tīrā šķīduma daļas no „CURD#1”. Pārnes tikai tīru šķīdumu bez nogulsnēm! Izmantojot stobriņu kratītāju, sajauc maisījumu un apzīmē to kā „CURD#2”
12. Tagad tev būtu jābūt kopā 10 paraugiem un vienam PBS standartam centrifūgu stobriņos. Tagad tu vari ar pipeti pārnest paraugu šķīdumus daudzlauciņu platītē. Esi uzmanīgs, pārnesos šķīdumus, jo olbaltumvielas saturoši šķīdumi mēdz veidot burbuļus, kas var izraisīt mērīšanas kļūdu. Ja šķīdumā veidojas burbuļi, vari mēģināt tos pārplēst ar asāko pipetes uzgaļa daļu.
13. Pārlicinies, ka tavas komandas nosaukums ir uzrakstīts uz platītes vāciņa. **Ja uzraksta nav, jautā laborantam.** Noņem vāciņu un uzmanies, lai vāciņu netišām nepaņem kāda cita komanda.
14. Vispirms daudzlauciņu platītē, izmantojot automātisko pipeti, pagatavo BSA šķīduma atšķaidījumu sēriju:
 - a. Ar pipeti pārnes 140 µL PBS šķīduma lauciņā H1. Tad lauciņos A1-G1 katrā pārnes 75 µL PBS šķīduma.
 - b. Lauciņā H1 pievieno 10 µL BSA šķīduma un iegūto maisījumu sajauc, ar pipeti vairākas reizes iesūcot un izlejot iegūto šķīdumu.
 - c. No lauciņa H1 paņem 75 µL iegūtā šķīduma un pārnes to lauciņā G1. Līdzīgi kā iepriekš, izmantojot pipeti, kārtīgi samaisi iegūto šķīdumu. 75 µL šajā lauciņā

iegūtā šķīduma pārnes lauciņā F1. Atkal samaisi iegūto šķīdumu. Analogiski atkārti soļus līdz tiek līdz lauciņam B1.

- d. No lauciņa B1 **nepārnes** 75 µL šķīdumu lauciņā A1, bet izmet šo šķīduma daudzumu kopā ar pipetes uzgali. Tagad tev katrā lauciņā plates 1. kolonnā būtu jābūt 75 µL šķīduma.
- e. Atkārti procedūru tāpat kā iepriekš arī lauciņiem plates 2. kolonnā.

15. Tagad ar pipeti platē pārnes 75 µL citu paraugu šķīdumus tā, kā parādīts 2.1. tabulā. Paraugu „SOL#1” un „CURD#1” gadījumā pārlicinies, ka pārnes tikai parauga šķīduma daļu, bet ne neizšķīdušās daļiņas. Katru reizi sajauc šķīdumu lauciņā ar pipetes palīdzību, vairakkārt iesūcot un izlejot šķīdumu.

2.1. tabula Paraugu izvietojums daudzlauciņu platītē mērīšanai ar Bredforda šķīdumu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS		MILK #1	MILK #1	CURD #1	CURD #1					
B	BSA šķīduma atšķaidījums	BSA šķīduma atšķaidījums		MILK #2	MILK #2	CURD #2	CURD #2					
C				LIQ#1	LIQ#1							
D				LIQ#2	LIQ#2							
E				SOL#1	SOL#1							
F				SOL#2	SOL#2							
G				WHEY #1	WHEY #1							
H				WHEY #2	WHEY #2							

16. Beidzot, visiem lauciņiem platītē, kuros ir šķīdums, pievieno 75 µL Bredforda reaģenta. Kad pievieno reaģentu, sajauc šķīdumus līdzīgi kā iepriekš, izmantojot pipeti, iesūcot un izlejot šķīdumu dažas reizes. Lauciņi, kur šķīdums satur olbaltumvielas, nokrāsosies zilā krāsā. Aizver plati ar vāciņu un gaidi 5 minūtes kamēr

notiek reakcija. Tad plati nodod laborantam, kas izmērīs gaismas absorbcijas vērtības.

A.2.2.2 Aprēķini BSA koncentrāciju (mg/mL) lauciņos A1-H1. Izmantojot iegūtās absorbcijas vērtības, ko tev iedos laborants, aprēķini vidējās absorbcijas vērtības katram BSA paraugam (piemēram, H1 un H2) un PBS kontrolēm. **Aizpildi tabulu Excel failā.**

A.2.2.3 Excel failā izveido grafiku, izmantojot A.2.2.2 uzdevumā iegūtās vērtības. Uz x ass atliec BSA koncentrāciju, bet uz y ass – vidējo absorbcijas vērtību.

A.2.2.4 Izmantojot laboranta nomērītās absorbcijas vērtības, aprēķini vidējās absorbcijas vērtības katram no paraugiem plates 4.-7. kolonnā (piemēram, lauciņiem A4 un A5). **Aizpildi tabulu Excel failā.**

A.2.2.5 Izmantojot kalibrēšanas līkni, kas iegūta uzdevumā A.2.2.3 un aprēķinātās absorbcijas vērtības, novērtē aptuveno olbaltumvielu saturu mg/mL visiem paraugiem plates 4.-7. kolonnās.

Ja izmērītā absorbcijas vērtība paraugam ir ārpus kalibrēšanas līknes apgabala: i) ja vērtība ir mazāka par minimālo, izmanto simbolu „<”; ii) ja vērtība ir lielāka par maksimālo – izmanto simbolu „>”.

Ja ar saviem datiem nespēj izveidot kalibrēšanas līkni, jautā asistentam pēc palīdzības. Tev iedos lietošanai gatavus datus, bet par to noņems 4 punktus. **Aizpildi tabulu Excel failā.**

A.2.2.6 Izmantojot visprecīzākās vidējās vērtības rezultātus, aprēķini kopējo olbaltumvielu koncentrāciju paraugos. **Aizpildi tabulu Excel failā.**

Uzdevums A.2.3 Proteīna sastāva izmaiņu konstatēšana izmantojot SDS-PAGE

Aptuvenais svaiga piena olbaltumvielu sastāvs ir redzams tabulā 2.2. zemāk.

Table 2.2. Relatīvais olbaltumvielu sastāvs un šo olbaltumvielu molmasa

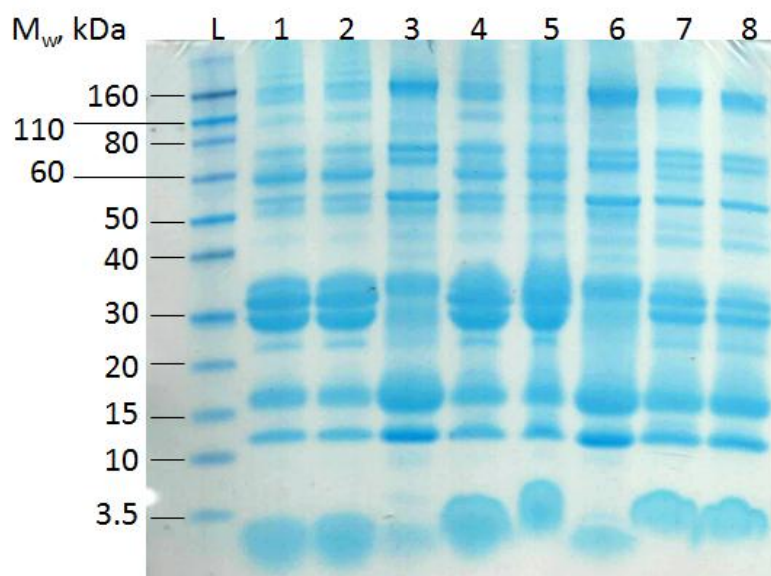
Olbaltumvielu grupa	Daļa no svaiga piena proteīniem, %	Molmasa, g/mol (Da)
α -kazeīni	45–55	32 000
β -kazeīni	25–35	29 000
κ -kazeīni	8–15	25 000
β -laktoglobulīni	7–12	17 000
α -laktoalbumīni	2–4	12 000

Karsējot pienu, piena olbaltumvielas mijiedarbojas savā starpā un veido kompleksus ar lielu molmasu (vairāk kā 50 000 Da).

Govs pienā vairāk kā 90% no kazeīniem ir agregējušies sakopojumos, ko sauc par micellām. Svaigā pienā micellu tālāka apvienošanās nenotiek, jo kazeīnam ir ūdenī šķīstoša daļa. Renīns atšķēļ šo ūdenī šķīstošo daļu un kazeīnam samazinās molmasa un tas kļūst ūdenī mazāk šķīstošs (hidrofobs). Hidrofobās daļiņas apvienojas lielākos sakopojumos, kas veicina nākamo daļiņu pievienošanos un veidojas lielas nogulsnes - biezpiens. Biezpiens savās daļiņās ieslēdz ūdeni, taukus un baktērijas.

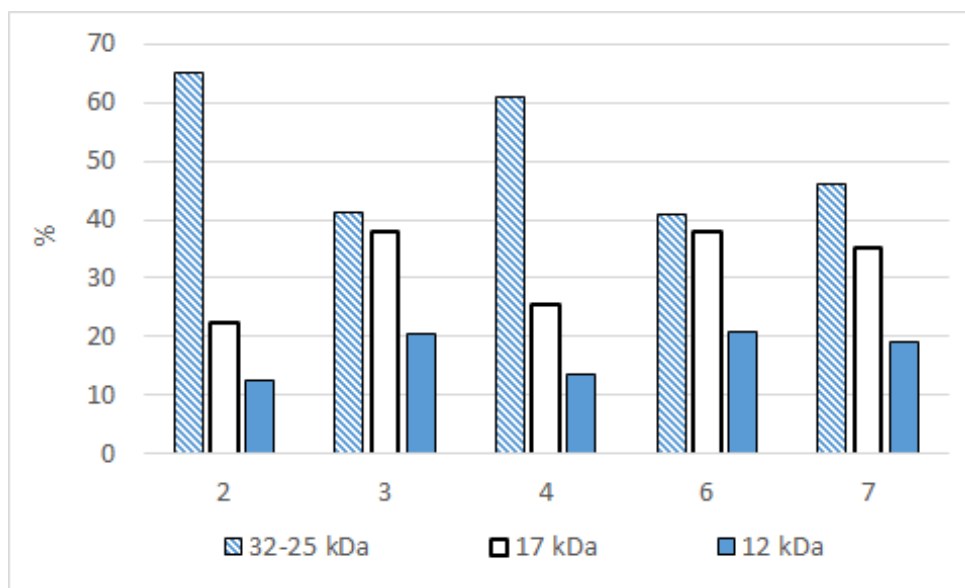
Nātrija dodecil sulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze (SDS-PAGE) ļauj sadalīt olbaltumvielas pēc to molmasas. Olbaltumvielas sākumā apstrādā ar deterģentu - nātrija dodecil sulfātu (SDS) un uzkaršē. Pēc karsēšanas SDS piesaistās pie olbaltumvielu aminoskābēm un piešķir olbaltumvielai negatīvu lādiņu. Paraugu vēlāk ienes gelā, un gelu ievieto elektriskajā laukā. Negatīvi lādētās olbaltumvielas migrē uz elektriskā lauka pozitīvo galu. Tā kā gels ir poraina struktūra, mazākās molekulas cauri gelam izklūst ātrāk kā lielākās, tādā veidā molekulas tiek sašķirotas pēc izmēra (molmasas). Lai palīdzētu noteikt, cik lielas ir molekulas katrā gela zonā, uz gela uznes arī olbaltumvielu maisījumu, kas sastāv no olbaltumvielām ar zināmiem izmēriem. Šo parauga joslu izmanto kā lineālu, lai noteiktu nezināmo paraugu izmērus. Kad paraugi noteiktu laiku ir bijuši elektriskajā laukā un sadalījušies pēc izmēriem, olbaltumvielas var nokrāsot ar krāsvielu Kumasī zilo un novērot kā tās ir sadalījušas gelā.

A.2.3.1 Attēlā zemāk var redzēt šāda SDS-PAGE gela, kas ir nokrāsots ar Kumasī zilo, piemēru. Katra vertikālā jolsa atbilst vienam paraugam. Atbilžu lapas attēlā norādi, kādā augstumā gelā būs joslas, kas atbildīs α -kazeīnam (*), β -kazeīnam (**), κ -kazeīnam (***), β -laktoglobulīniem (#), α -laktoalbumīniem (‡).



2.2. attēls. SDS-PAGE gels, kas ir nokrāsots ar Kumasī zilo. Kreisā malējā joslā (apzīmēta ar L) satur olbaltumvielu maisījumu ar zināmām molmasām (M_w) Molmasa norādīta kiloDaltonos (kDa). Joslas 1 un 2 satur proteīnus no piena, 3. josla satur paskābinātā piena šķidro daļu, 4. un 5. josla satur proteīnus no paskābinātā piena nogulsnēm, 6. josla satur sūkalas, 7. un 8. josla saturēs olbaltumvielas no biezpiena **Curd I**.

A.2.3.2 Izmantojot datorprogrammu tika aprēķināts zonu spilgtums reģionos, kas atbilst 35–25 kDa, 17 kDa un 12 kDa lielām olbaltumvielām. Rezultāti ir parādīti kā % no kopējās aprēķinātās intensitātes (skat attēlu 2.3). Novērtē apgalvojumus par iegūtajiem rezultātiem kā patiesus (ieraksti +) vai aplamus (ieraksti 0) **atbilžu lapā**.



2.3. attēls Olbaltumvielu relatīvais daudzums (%) norādītajās gela joslās. Joslu numuri uz x ass atbilst joslām attēlā 2.2

Nr	Apgalvojums
1	Grafikā redzamās 32- 25 kDa lielo olbaltumvielas izmaiņas nevar izskaidrot ar iepriekš aprakstītajiem fizikālajiem un ķīmiskajiem procesiem, kas norisinās piena paskābināšanas laikā.
2	Paskābinātā piena šķidrās daļas un sūkalu relatīvais kazeīnu daudzums ir mazāks, jo kazeīni kļūst slikti šķīstoši siera ražošanas un piena paskābināšanas laikā.
3	Paskābinātā piena šķidrās daļas relatīvais kazeīnu daudzums ir mazāks, jo paskābināšanas laikā kazeīni noārdās.
4	Biezpiena relatīvais kazeīnu daudzums ir mazāks, jo siera ražošanas laikā kazeīni noārdās.
5	Sūkalu relatīvais β -laktoglobulīnu un α -laktoalbumīnu daudzums ir lielāks, jo bakērijas ražo šīs olbaltumvielas siera gatavošanas laikā
6	Paskābinātā piena šķidrās daļas relatīvais β -laktoglobulīnu un α -laktoalbumīnu daudzums ir lielāks, jo samazinās kazeīnu daudzums tajā.
7	Sūkalās ir relatīvi vairāk olbaltumvielas, kas ir 17 kDa un 12 kDa lielas, jo tās atbilst produktiem, kas veidojas pēc enzimatiskās kazeīna šķelšanas
8	Piena un paskābinātā piena nogulšņu olbaltumvielu sastāvs ir ļoti atšķirīgs, jo skābe noārda olbaltumvielas.

Milk day

UZDEVUMS A.3

Jodometriska laktozes titrēšana

Pienu var aprakstīt kā koloīdu šķīdumu, kas satur olbaltumvielas (proteīnus), taukus un ogļhidrātus (cukurus, pārsvarā laktozi). Šodien tavs uzdevums ir veikt pētījumus par šīm piena sastāvdaļām, izmantojot fizikas, ķīmijas un bioloģijas metodes. Tavu darbu laboratorijā sponsorē firma cowBOOM. cowBOOM vēlas ražot vairākus specializētus piena produktus. Tavi pētījumi palīdzēs firmai izlemt vai piena paraugi ir piemēroti šiem mērķiem.

Kopējie piederumi:

- dators
- pildspalvas
- 2 noturīgie marķieri
- 2 zīmuļi (mehāniskais zīmulis ir domāts uzdevumam A.1)
- lineāls
- šķēres
- īsas un garas pincetes
- līmlapiņas
- pulkstenis
- kalkulators
- destilēts ūdes (500 mL strūklenē)
- aizsargbrilles
- papīra salvetes
- miskaste papīriem (zilā uzlīme)
- miskaste plastmasai (dzeltenā uzlīme)
- miskaste stikliem (zaļā uzlīme)
- miskaste šķidriem atkritumiem (dzeltenais trauks)

UZDEVUMS A.3

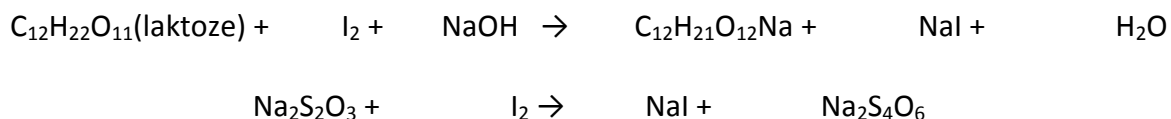
Jodometriskā laktozes titrēšana

Laktoze ir disaharīds, ko veido viena galaktozes un viena glikozes molekula. Laktozes daudzumu kādā šķīdumā iespējams noteikt jodometriski titrējot. Šajā titrēšanā jods darbojas kā oksidētājs, bet laktoze – kā reducētājs. Šajā titrēšanā piena paraugam ar nezināmu laktozes daudzumu pievieno precīzi zināmu daudzumu joda pārākuma. Zināms joda daudzums izreaģē ar laktozi paraugā. Tālāk pāri palikušo neizreaģējušo jodu titrē ar zināmas koncentrācijas nātrija tiosulfāta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ šķīdumu. Tādā pašā veidā tiek veikta arī „kontroles” šķīduma (destilēta ūdens) titrēšana, lai novērtētu joda zudumus, kas radušies pašā metodē, bet ne reakcijā ar laktozi. Izmantojot starpību starp titrēšanā noteikto joda daudzumu „kontroles” paraugā un analizētajiem piena paraugiem, iespējams aprēķināt, cik daudz joda ir izreaģējis ar laktozi. Izmantojot šos datus, iespējams aprēķināt, cik daudz laktozes ir piena paraugā.

Jums būs arī raudzēta piena paraugs. Tas ir pagatavots no tā paša piena, ko Jūs izmantosiet titrēšanā, taču pienam dienu iepriekš ir pievienota viela B (tā pati, kas uzdevumā A.2.1). Jums būs jānosaka, kā laktozes daudzums šajā laikā ir mainījies (palicis nemainīgs, palielinājies vai samazinājies).

A.3.1 Atbilžu lapā jums būs dota laktozes struktūrformula un iespējamās laktozes atvērta cikla struktūras. Katrai struktūrai izvērtējiet, vai tā ir pareiza laktozes atvērta cikla struktūra!

A.3.2 Pierakstiet atbildes atbilžu lapā. Zemāk ir doti ķīmiskie vienādojumi, kas attēlo ķīmiskās pārvērtības, kas norisinās eksperimenta laikā. Novienādojiet dotos ķīmiskos vienādojumus – izlieciet koeficientus pirms katras vielas ķīmiskās formulas, izņemto gadījumus, kas koeficients ir 1 (nav jānorāda).



Praktiskajā daļā jūs noteiksiet laktozes masas daļu procentos parastā pienā un raudzētā pienā. Lai to paveiktu, jūs izmantosiet jodometrisko titrēšanu.

Nepieciešamās vielas un aprīkojums:

- piens 300 mL plastmasas pudelē (ar atzīmi „MILK”)
- raudzēts piens (50 mL plastmasas traukā)
- CuSO₄ šķīdums (50 mL plastmasas traukā)
- 0.5 M NaOH šķīdums (50 mL plastmasas traukā)
- 1 M HCl šķīdums (50 mL plastmasas traukā)
- 0,5% cietes šķīdums (pilināmā plastmasas pipetē)
- 0,0500 M I₂ šķīdums (100 mL koniskajā Erlenmeijera kolbā, kas aptīta ar alumīnija foliju)
- 2 mērkolbas ar plastmasas korķiem (250 mL)
- 4 Erlenmeijera koniskās kolbas ar stikla korķiem (250 mL)
- 2 vārglāzes (250 mL)
- 100 mL vārglāze (destilētam ūdenim)
- 10 mL Mora pipete
- 25 mL Mora pipete
- stikla nūjiņa
- birete nostiprināta laboratorijas statīvā (piepildīta ar 0.100 M Na₂S₂O₃)
- vārglāze atkritumiem zem bires (100 mL)
- apaļš filtrpapīrs (plastmasas maisiņā)
- plastmasas piltuve (zilā krāsā)
- 7 plastmasas pipetes
- 3 plastmasas mērstobriņi (15 mL)
- sviri
- 3 loksnes ar alumīnija foliju
- 2 pipešu uzpildāmie

Jautājiem laborantiem, ja jums izbeigušās un nepieciešamas papildus ķimikālijas (Na₂S₂O₃ šķīdumu bīretē ielies laborants), filtrpapīrs vai papīra salvetes. Par to punkti netiks noņemti.

Darba gaita:

levēro! Bez kontroles parauga jums būs jāsatavo un jātitrē divi paraugi – piens un raudzēts piens. Lūdzu, pievērs uzmanību darba gaitas 13. punktam labākai laika plānošanai!

1. **Katru reizi, pirms paņemt piena paraugu**, viegli, bet kārtīgi sakrati trauku ar pienu vai raudzētu pienu, lai dažādie šķidrumu slāņi labi sajauktos kopā. Nekrati paraugus pārāk intensīvi, lai izvairītos no putu veidošanās.
2. 250 mL **mērkolbā** ar plastmasas pipeti pārnes un nosver aptuveni 10 g piena. **Atbilžu lapas 3.1.** tabulā pieraksti precīzu mērkolbā pārnestā piena masu. Pienam mērkolbā aptuveni līdz pusei kolbas pievieno destilētu ūdeni un kolbu noslēdzot ar korķi, maisījumu kārtīgi sakrati.
3. Lai nogulsnētu pienā esošās olbaltumvielas, mērkolbā ar plastmasa mērstobriņu vai plastmasas pipeti pievieno aptuveni 5 mL CuSO_4 šķīduma un maisījumu samaisi. Tad ar plastmasa mērstobriņu vai plastmasas pipeti pievieno aptuveni 4 mL 0.5 M NaOH šķīduma un atkal maisījumu samaisi.
4. Mērkolbu līdz atzīmei piepildi ar destilētu ūdeni, noslēdz ar plastmasas korķi. Maisījumu kolbā intensīvi sakrati un atstāj uz 20 minūtēm, kuru laikā norisināsies atbilstošās reakcija. Uz kolbas uzlīmē līmlapiņu ar reakcijas sākuma laiku ērtākai laika sekošanai.
5. Kad 20 minūtes ir pagājušas, izmantojot piltuvi, sausu filtrpapīru un, ja nepieciešams, stikla nūjiņu, nofiltrē mērkolbā esošo maisījumu 250 mL vārglāzē.
6. Nomēri 25,00 mL nofiltrētā šķīduma un pārnes to 200 mL koniskajā Erlenmeijera kolbā.
7. Pievieno 10,00 mL 0,0500 M I_2 šķīduma un maisījumu viegli samaisi.
8. Izmantojot plastmasa mērstobriņu vai plastmasas pipeti, maisījumam pievieno aptuveni 7,5 mL 0,5 M NaOH šķīduma un maisījumu samaisi.
9. Noslēdz konisko Erlenmeijera kolbu ar stikla korķi un ietin kolbu alumīnija folijā, lai maisījumu neietekmētu gaisma. Atstāj maisījumu uz 20 minūtēm.
10. Kad atbilstošais laiks ir pagājis, ar plastmasa mērstobriņu vai plastmasas pipeti pievieno maisījumam 4 mL 1 M HCl šķīduma. **Atbilžu lapas 3.2 tabulā pieraksti biretes sākotnējo rādījumu.** Tad sāk titrēšanu, kurā neizreaģējušais jods reaģēs ar 0,100 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ šķīdumu. Kad šķīdums kļūst gaiši dzeltens, pievieno dažus pilienus cietes šķīduma līdz maisījums iekrāsojas tumši zilā krāsā. Turpini titrēšanu, līdz zilais krāsojums izzūd un neparādās atpakaļ turpmākajās 30 sekundēs. Nolasi rādījumu uz biretes un pieraksti to **Atbilžu lapas 3.2.** tabulā.
11. Atkārto soļus 6.-10. tik reizes, cik uzskati par nepieciešamu, lai būtu iespējams precīzi aprēķināt laktozes daudzumu paraugā.

12. Analógiski atkārto eksperimentu ar „kontrolēs” paraugu (destilēts ūdens). „Kontrolēs” parauga analīzei veic soļus 6. – 11. nofiltrētā šķīduma vietā izmantojot destilētu ūdeni. Titrēšanas rezultātu pieraksti **Atbilžu lapas** 3.2. tabulā. Mora pipeti, 250 mL vārglāzi un piltuvi, ja nepieciešams, noskalo ar destilētu ūdeni un piltuvi noslauki ar papīra salveti. Tāpat, var izmantot izlietni galda galā.
13. Izmantojot raudzētu pienu, atkārto soļus 1. – 11. Šai titrēšanai nav jābūt pārlietu precīzai (titrēšana divreiz ir pietiekama). Svarīgi ir novērtēt, kā mainās laktozes saturs raudzētā pienā – palielinās, paliek nemainīgs vai samazinās – salīdzinot ar laktozes daudzumu parastā piena paraugu.

Titrēšanas rezultātus pieraksti **Atbilžu lapas** 3.1. un 3.3. tabulās.

25 mL Mora pipeti pirms parauga ņemšanas jāizskalo ar raudzēta piena parauga filtrēšanā iegūto šķīdumu, bet 250 mL mērkolbu, ja nepieciešams, - ar destilētu ūdeni.

A.3.3 Pārbaudi, vai aizpildīji tabulas 3.1, 3.2 un 3.3 **Atbilžu lapās** kā prasīts.

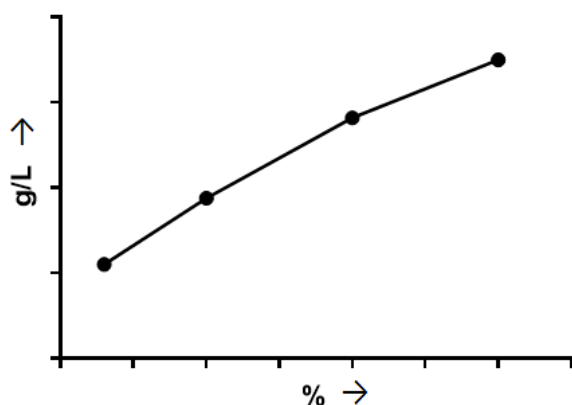
A.3.4 Aprēķini laktozes masas daļu procentos piena paraugā un raudzēta piena paraugā. Izmanto vērtības no Atbilžu lapu 3.2 un 3.3 tabulām un izmanto titrēšanās izmantotās vidējās tilpuma vērtības. Laktozes molmasa ir 342 g/mol.

UZDEVUMS A.4 Piena ražotne – rezultātu kopā salikšana

Šajā uzdevumā jūs izlemsiet, vai piens, ko jūs analizējāt iepriekšējos uzdevumos (Uzdevumi A.1-A.3) ir piemērots dažādām mārketinga idejām, ko plāno ieviest start-up kompānija ar nosaukumu “cowBOOM”.

A.4.1 cowBOOM vēlētos pārdot vērtīgu produktu, kuram ir pievienots D vitamīns. 4.1. attēlā parādīta D vitamīna šķīdība pienā atkarībā no tauku procentuālā satura pienā. Balstoties uz A.1 uzdevumā iegūtajiem rezultātiem, izlemiet, kurš no piena paraugiem (**K, L, M, vai N**) būtu piemērotākais šim nolūkam?

Salīdzināšanas un kvalitātes nodrošināšanas nolūkos, ir svarīgi, ka piens neveido putas uz virsmas.

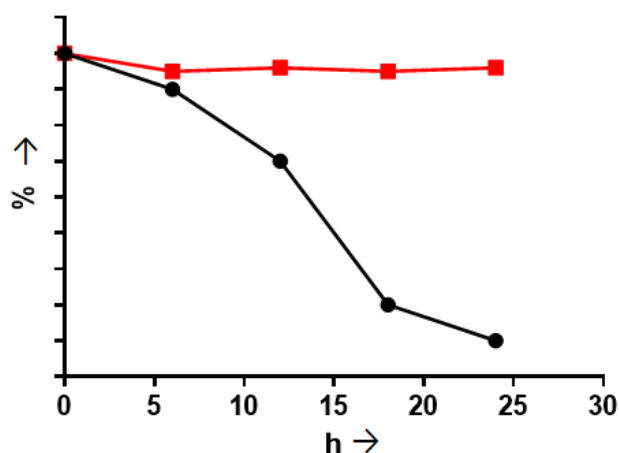


4.1. attēls D vitamīna šķīdība (g/L) atkarībā no procentuālā tauku satura pienā. Bultiņas norāda vērtību paaugstināšanās virzienu

A.4.2 *cowBOOM* plāno ražot no alergēniem brīvu pienu cilvēkiem, kam ir alerģija uz noteiktu antibiotiku veidu – gentamicīnu.

4.2. attēlā parādīts laktozes saturs atkarībā no inkubēšanas laika (analoģiski uzdevumam A.2.1) antibiotiku klātienē un bez tām. Laktoze šajā gadījumā pirms inkubēšanas tiek sajaukta ar vielu B (kā uzdevumā A.2.1).

Novērtējiet, vai piena paraugi, ko jūs analizējāt uzdevumos A.2 un A.3 būtu piemēroti šāda gentamicīna antibiotiku nesaturoša piena ražošanai!



4.2. attēls. Laktozes procentuālais saturs pienā atkarībā no inkubēšanas laika vielas B iedarbībā bez antibiotikas gentamicīna (●) un antibiotikas gentamicīna klātienē (■). Bultiņas norāda vērtību paaugstināšanās virzienu.

A.4.3 Pasaulē aptuveni 65% cilvēku ir laktozes nepanesamība. *cowBOOM* vēlētos izmantot šo faktu un pārdot pienu, kas piemērots cilvēkiem ar šādu laktozes nepanesamību. Šādā pienā laktozes saturs nedrīkst pārsniegt vairāk kā 0,01% laktozes pēc masas.

Novērtējiet, vai piena paraugi, ko jūs analizējāt uzdevumos A.2 un A.3 būtu piemēroti tāda piena ražošanai, uz kura būtu iespējams norādīts – „bez laktozes”!

A.4.4 Visbeidzot, *cowBOOM* plāno ražot bezalergēnu pienu cilvēkiem, kam ir alerģija uz kazeīnu. Šādā pienā kazeīna saturs nedrīkst pārsniegt vairāk kā 0,005% kazeīna (kopējā α , β un κ) pēc masas.

Novērtējiet, vai piena paraugi, ko jūs analizējāt uzdevumos A.2 un A.3 būtu piemēroti tāda piena ražošanai!