

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ЛЕСА»

А.Н. Иванкин, А.В. Куликовский, О.П. Прошина

**ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ**

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
университета в качестве учебно-методического пособия для студентов
направления подготовки – Химическая технология



Москва
Издательство Московского государственного университета леса
2016

УДК 546

И18

Разработано в соответствии с ФГОС ВО на основе примерной программы дисциплины "Основы биотехнологии"

Рецензент: доцент кафедры химии и биотехнологии
лесного комплекса Жилин Ю.Н.

Работа подготовлена на кафедре химии

Иванкин, А.Н.

П18 Основы биотехнологии. Лабораторные работы.: учеб.-методич. пособие /А.Н. Иванкин, А.В. Куликовский, О.П. Прошина. – М.: ФГБОУ ВПО МГУЛ, 2016. – 20 с.

В учебно-методическом пособии представлены варианты лабораторных работ по биотехнологии, предназначенные для выполнения студентами технических специальностей.

Рекомендуется для студентов направления подготовки Химическая технология очной, очно-заочной, вечерней и дистанционной форм обучения МГУЛ.

УДК 546

И 18

Учебное издание

Иванкин Андрей Николаевич
Куликовский Андрей Владимирович
Прошина Ольга Петровна

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

В авторской редакции

Компьютерный набор и верстка авторов

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2016 год. Поз. доп.

Подписано в печать 20.04.2016 Формат 60х90/16 Бумага 80 г/м²
Гарнитура "Таймс". Ризография. Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ N

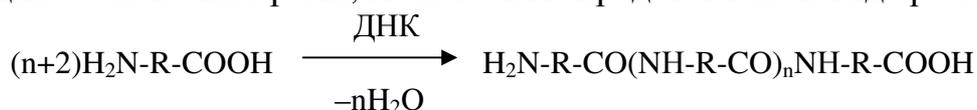
Издательство Московского государственного университета леса. 141005. Мытищи – 5,
Московская обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ
E-mail: izdat@mgul. ac. ru

© А.Н. Иванкин, А.В. Куликовский, О.П. Прошина, 2016
© ФГБОУ ВПО МГУЛ, 2016

Работа 1. Свойства аминокислот, пептидов и белков

Белки являются важнейшими составными частями всех живых организмов. Типичная клетка микроорганизма или млекопитающего содержит около 75 % воды и 10 – 15 % белков различного вида.

Синтез белков в организме происходит из аминокислот, которые имеют общую формулу $\text{H}_2\text{N-R-COOH}$, где R – алифатический остаток аминокислоты. Сокращенные наименования аминокислот обозначают первыми тремя буквами, например, глицин – Гли или англ. Gly, валин – Вал или Val, треонин – Тре или Thr. Общая схема получения белков, являющихся биополимерами, может быть представлена в виде реакции:



или



Второй вариант записи реакции указывает последовательность соединения аминокислот в белке (первичная структура белка). Индекс n – количество аминокислотных остатков в молекуле белка, например в проинсулине n = 86. Молекулы с n = 2 называют дипептидами, n = 3 трипептидами, n < 100 полипептидами. Среди множества аминокислот существует 20 важнейших природных аминокислот, из которых построено подавляющее большинство белков. Некоторые аминокислоты, являются незаменимыми, то есть они не образуются в организме, а должны поступать с пищей. К ним относятся валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан, аргинин, тирозин и гистидин.

Наличие среди аминокислот цистеина (Cys), содержащего в R-остатке лабильную –SH группу, приводит к образованию в свернутых молекулах белка (вторичная структура) так называемых дисульфидных -S-S- межмолекулярных и внутримолекулярных связей (фиксация третичной структуры белка). Наличие дисульфидных мостиков играет важнейшую роль в окислительной устойчивости белков и проявлении его биологической активности. Белки и полипептиды выполняют разные функции. Среди них имеются биорегуляторы (гормоны и ферменты), а также белки, используемые в качестве "конструкционного материала" – источника аминокислот для биосинтеза, протекающего в клетке.

Опыт 1.1. Определение pH растворов аминокислот

Реактивы и материалы: 1%-ные водные растворы глицина, лизина, аспарагиновой кислоты, pH-метр.

Наливают в стаканчики растворы аминокислот по 10 мл, погружают в раствор электроды pH-метра и проводят измерения значений pH с точностью до сотых долей. После каждого погружения электроды тщательно промывают дистиллированной водой.

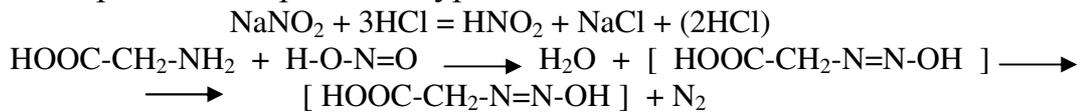
Записать в журнал наименования аминокислот и значения рН их растворов, а также привести уравнения диссоциации взятых аминокислот.

Опыт 1.2. Действие азотистой кислоты на аминокислоты

Реактивы и материалы: свежеприготовленный 7%-ный, раствор нитрита натрия NaNO_2 , 2%-ный раствор глицина, 7%-ный раствор соляной кислоты.

В пробирку помещают по 0,5 мл раствора глицина и раствора нитрита натрия и добавляют еще 0,5 мл соляной кислоты. После встряхивания пробирки наблюдают выделение газа.

Схема реакции выражается уравнениями:



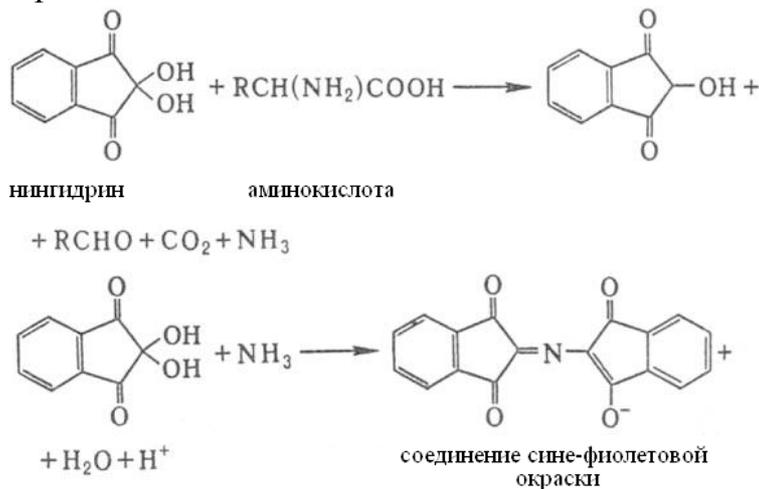
На этой реакции основано количественное определение аминогрупп в аминокислотах, белках и продуктах их распада или гидролиза.

Опыт 1.3. Нингидриновая реакция аминокислот

Реактивы и материалы: полоски фильтровальной бумаги, 1 %-ные растворы аминокислот, 0,1%-ный раствор нингидрина в ацетоне (раствор хранить в холодильнике), электрическая плитка.

На полоску фильтровальной бумаги наносят по 1 капле растворов разных альфа-аминокислот и высушивают полоски над электроплиткой. На высохшие места нанесения аминокислот капают по 1 капле раствора нингидрина. Повторное прогревание пятен над плиткой приводит к появлению характерного окрашивания (синее, фиолетовое, желтое и др.).

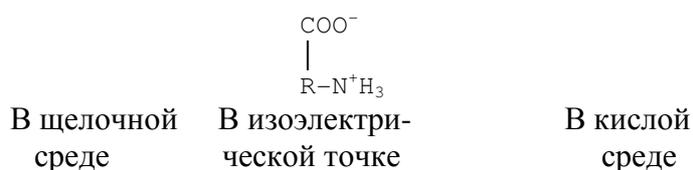
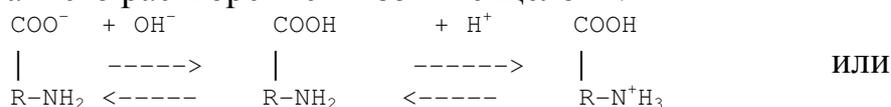
Реакция протекает по стадиям.



Опыт 1.4. Отношение белков к кислотам и щелочам

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, концентрированная уксусная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

В пробирке к 2 мл раствора яичного белка прибавить по каплям концентрированной CH_3COOH до появления мутного осадка. К полученному мутному раствору добавить по каплям раствор NaOH . При постепенной нейтрализации избытка кислоты наблюдают вновь появление осадка белка и его растворение в избытке щелочи.



Белки являются амфотерными электролитами, диссоциирующими в водных растворах по основному или кислотному типу.

При подкислении раствора кислотная диссоциация белка прекращается. При потере коллоидными частицами заряда они коагулируют и выпадают в осадок. Каждый белок коагулирует при определенной концентрации ионов водорода в растворе, отвечающей его изоэлектрической точке.

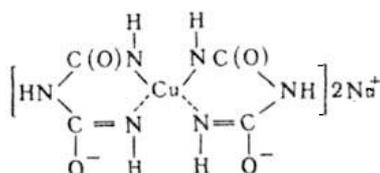
Избыток кислоты усиливает диссоциацию белка как основания. Гранулы белка приобретают положительный заряд и коллоидный раствор становится снова устойчивым, то есть наблюдается растворение осадка. Избыток щелочи повышает устойчивость отрицательно заряженных коллоидных частиц белка.

Опыт 1.5. Биуретовая реакция белков

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 1%-ный раствор сульфата меди (II), 30 %-ный раствор NaOH .

В пробирку наливают 1 мл раствора белка, добавляют равный объем концентрированного 30 %-ного раствора щелочи и 2 капли раствора CuSO_4 . Пробирку встряхивают и наблюдают появление ярко-фиолетовой окраски.

Биуретовая реакция связана с наличием в белках пептидных группировок $-\text{CO}-\text{NH}-$, которые дают окрашенные комплексы с ионами Cu^{2+}



Цвет образующихся медных комплексов определяется числом остатков аминокислот, связанных пептидной связью. Дипептиды дают синюю окраску, трипептиды фиолетовую, а тетрапептиды и более сложные пептиды – красную.

Опыт 1.6. Высаливание белков из растворов

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, насыщенный раствор сульфата аммония, сульфат аммония кристаллический, воронка с бумажным фильтром.

В пробирку к 3 мл раствора белка добавляют равный объем раствора сульфата аммония. Наблюдают помутнение раствора вследствие коагуляции глобулинов. Отливают 1 мл мутного раствора в другую пробирку и разбавляют большим количеством воды. Что происходит? Можно ли говорить об обратимости процесса высаливания?

Мутный раствор фильтруют через бумажный фильтр. К прозрачному фильтрату добавляют твердый $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до прекращения его растворения. Наблюдают помутнение раствора и образование осадка глобулинов.

Высаливание – процесс осаждения белков солями металлов I и II группы. Метод основан на выраженной способности сульфата аммония нейтрализовывать заряд молекул белка и вызывать их дегидратацию (потерю связанной воды). Это обуславливает осаждение белка. Процесс является обратимым. Разбавление приводит к восстановлению нативной структуры молекулы белка.

Опыт 1.7. Осаждение и денатурация белка из раствора этанолом

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 30%-ный раствор NaOH, концентрированный раствор HCl, спирт этиловый ректификат.

В пробирке смешивают 1 мл раствора белка с 1 мл этанола. Наблюдают процесс денатурации белка.

Для проверки, является ли денатурация яичного белка под воздействием этанола обратимым процессом, попробуйте растворить осадок белка в кислоте или щелочи.

Опыт 1.8. Осаждение и денатурация белка ионами тяжелых металлов

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 5%-ный раствор сульфата меди (II), 5%-ный раствор ацетата свинца (II).

В пробирках смешивают по 1 мл раствора белка с раствором сульфата меди (II) и ацетата свинца (II). Добавление растворов $\text{Cu}(\text{SO})_4$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ осуществляют по каплям, так как образующиеся осадки комплексов белка с ионами свинца и меди растворимы в избытке добавляемого раствора соли тяжелого металла. Наблюдают процесс денатурации белка.

Подумайте и объясните, почему белки применяют в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

Опыт 1.9. Денатурация и осаждение белка при нагревании

Реактивы и материалы: 1:5 водный раствор яичного белка, 1 %-ный раствор уксусной кислоты, газовая горелка или плитка..

В две пробирки наливают по 1 мл раствора белка. В одну добавляют 2 капли раствора уксусной кислоты. Содержимое пробирок нагревают до кипения.

В одной из пробирок происходит более быстрое помутнение. Разбавить содержимое пробирок водой. Происходит ли растворение осадка? Является ли денатурация белка обратимым процессом?

Контрольные вопросы

1. Что называют белками, их роль в природе?
2. Чем отличаются различные белки, полученные из разных источников? Назовите основные виды связей в белковой молекуле.
3. Что называют первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурой белков?
4. Объяснить механизм осаждения белков при нагревании, при добавлении кислот, щелочей или органических растворителей.

Работа 2. Определение изоэлектрической точки белка

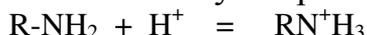
Белок представляет собой последовательность связанных аминокислотных остатков, то есть полимерную цепь, у которой имеются концевые карбоксильные $-\text{COOH}$ и аминогруппы $-\text{NH}_2$, а также боковые группы дикарбоновых и диаминокислот.

Т а б л и ц а 1.1

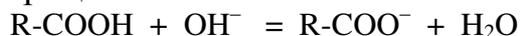
Значения изоэлектрических точек некоторых белков

Название белка	Изоэлектрическая точка (pI)
Пепсин	1,5
Альбумин яичный	4,6
Сывороточный альбумин из крови	4,8 – 4,9
Лактоглобулин	5,2 – 5,3
Фибриноген	5,5
Каталаза	5,6
Миоглобин быка	8,3
Рибонуклеаза	7,8 – 9,6
Химотрипсиноген	9,5
Цитохром С	10,6
Лизоцим	11,0

Молекулы белков обладают положительным или отрицательным зарядом. В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд



в щелочной среде – отрицательный



При определенном значении рН среды сумма положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой, суммарный заряд белка оказывается равным нулю (изоэлектрическое состояние белка, табл.1.1).

Значение рН, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка (ИЭТ).

Перевод белка в ИЭТ приводит к выпадению белкового осадка из-за неустойчивости молекулы в ИЭТ. Процесс протекает интенсивно в присутствии водоотнимающих органических растворителей (этанола, ацетона и др.) или неорганических веществ (H_2SO_4 , $CaCl_2$, $CaSO_4$).

Знание значения изоэлектрической точки позволяет в лабораторных и промышленных условиях оптимально осуществлять процесс очистки белков осаждением с минимальными потерями продукта.

Оборудование и реактивы. Химические стаканы и пробирки. Универсальная индикаторная бумага рН 1–14. 0,1%-ный раствор казеина. 0,2 М раствор ацетата натрия. 0,2 М раствор уксусной кислоты.

Ход определения. В шести пробирках готовят буферные смеси с разным значением рН, смешивая указанные в табл. 1.2 количества 0,2 М растворов ацетата натрия и уксусной кислоты.

Т а б л и ц а 1.2

Составы смесей

Номер пробирки	Состав буферной смеси		рН	Степень мутности раствора казеина	
	0,2 М р-р CH_3COOH	0,2 М р-р CH_3COONa		до добавления спирта	после добавления спирта
1	1,9	0,1	3,4		
2	1,8	0,2	3,8		
3	1,4	0,6	4,4		
4	1,0	1,0	4,7		
5	0,6	1,4	5,1		
6	0,2	1,8	5,7		

В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 0,1%-ного раствора казеина и встряхивают содержимое. Отмечают помутнение раствора. В каждую пробирку добавляют по 2 мл этилового спирта, отмечая мутность в пробирке до и после добавления спирта. Степень мутности оценивают по пятибальной шкале: 1 – отсутствие помутнения, 2 – слабое, 3 – умеренное, 4 – сильное, 5 – очень сильное или по шкале стандартов.

Построить график зависимости мутности от величины рН раствора. Отметить, при каком рН наблюдается минимальная растворимость казеина и сравнить полученное значение с ИЭТ других белков.

Контрольные вопросы

1. Что называют изоэлектрической точкой белка?
2. Почему у белков разные значения изоэлектрической точки?
3. Назвать ионизирующиеся группы, характерные для белков.

Работа 3. Полный гидролиз простых белков

Гидролизом белков называют процесс распада белковых молекул на составные части, то есть на пептиды и аминокислоты. Различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. Ферментативный

гидролиз осуществляют в присутствии ферментов. Этот процесс приводит, как правило, к незначительному разрушению молекулы белка: происходит разрыв полипептидной связи по определенному положению с высвобождением нескольких полипептидов, либо происходит одновременный распад молекулы белка на пептиды и аминокислоты.

При полном кислотном гидролизе конечными продуктами являются аминокислоты. Часть получаемых аминокислот при этом разрушается: триптофан полностью, а серин, треонин, цистин и фенилаланин – частично.

Щелочной гидролиз приводит к разрушению большинства аминокислот, а триптофан сохраняется.

Процессы гидролиза белков постоянно протекают в живом организме и являются составной частью метаболизма. В лабораторных условиях гидролиз используют для изучения состава и структуры белка. В промышленности белковые гидролизаты выпускаются для пищевых и медицинских целей.

Реактивы и материалы: запаиваемые ампулы или пробирки с пробками для гидролиза, шкаф-термостат с постоянной температурой 110° или 150°, баллон с инертным газом (азот, аргон), концентрированный 11,2 М раствор HCl, х.ч. или о.с.ч., 2 мг сухого белка или раствор белка с концентрацией 4 мг/мл.

В пробирку (не более чем на 1/3 объема) заливают раствор белка или засыпают сухую навеску белка, взятую на аналитических весах. Добавляют концентрированный раствор HCl, исходя из оптимального соотношения между количеством кислоты и белка, равного 100:1. Для трудно гидролизующихся белков избыток кислоты может составлять 1000:1.

Например, если берут сухую навеску белка, то добавляют 0,5 мл дистиллированной воды (или специального буфера для растворения белка) и 0,5 мл концентрированного раствора HCl, то есть получают 5,6 М раствор HCl, в котором содержится 194,5 г HCl/л. При соотношении 100:1 концентрация белка, взятого на гидролиз, должна составлять 2 мг/мл.

Через полученный раствор пропускают при небольшом токе пузырьков инертный газ для удаления следов кислорода. Остаточный кислород может приводить к окислению аминокислот в ходе гидролиза. Дегазирование можно провести, замораживая ампулу в жидком азоте или смеси сухого льда с ацетоном и последующим вакуумированием в атмосфере аргона.

Замороженную ампулу запаивают на газовой горелке. При маленьком коэффициенте заполнения ампулу можно осторожно запаять без замораживания.

Ампулу помещают в термостат и проводят гидролиз при температуре 110° в течение 24 ч (стандартные условия гидролиза) или при температуре 150° в течение 6 ч (ускоренный гидролиз).

По окончании гидролиза ампулу вскрывают, кислоту нейтрализуют и проводят анализ состава гидролизата методом тонкослойной хроматографии, анализом на аминокислотном анализаторе или формальным титрованием.

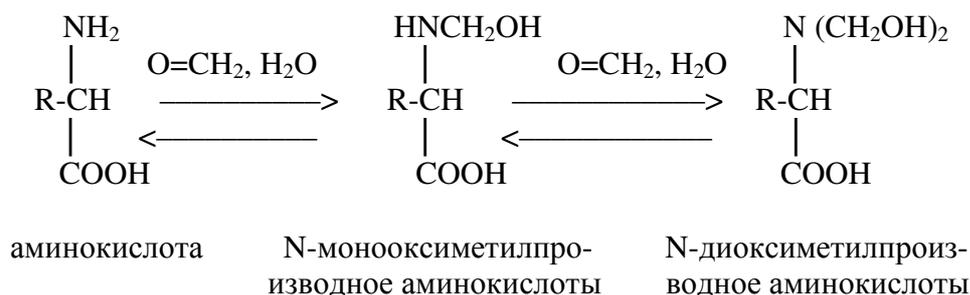
Контрольные вопросы

1. Что называют аминокислотным составом белка?
2. Какое значение имеют данные по аминокислотному составу?
3. Что такое "химический скор" белка?
4. Почему в ряде случаев мы говорим о неполноценном питании, в частности о несбалансированном по аминокислотному составу продуктах?

Работа 4 Определение содержания азота свободных аминогрупп (аминного азота)

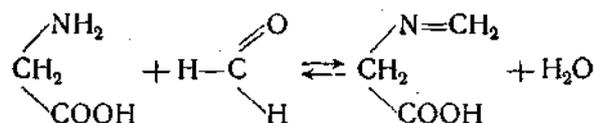
При проведении биохимических реакций часто бывает необходимо определить количество аминного азота, содержащегося в белках, пептидах или их гидролизатах.

В процессе гидролиза белка при распаде пептидных (амидных) связей $-NH-CO-$ образуются свободные амино- и карбоксильные группы.



Опыт 4.1. Формальное титрование по методу Зеренсена

Метод титрования по Зеренсену основан на том, что при прибавлении нейтрального формальдегида к раствору аминокислоты, аминогруппа связывается и образует с формальдегидом метиленовое соединение, после чего карбоксильная группа титруется так же, как в молекуле обычной карбоновой кислоты



Реакция обратима, равновесие устанавливается в зависимости от концентрации исходных веществ.

Зеренсену удалось провести реакцию количественно путем создания соответствующей концентрации ионов гидроксила, обеспечивающей полный сдвиг равновесия вправо. Это имеет место при pH 9,0 – 9,5.

При этих значениях рН наиболее подходящими индикаторами являются фенолфталеин, в присутствии которого титруют до появления красной окраски, или тимоловый синий.

Реактивы. Гидроксид бария, насыщенный раствор и 0,2 н. раствор. Едкий натр, 0,2 н. раствор. Лакмусовая бумага. Соляная кислота, 0,2 н. раствор. Фенолфталеин или тимоловый синий. Растворяют 0,5 г индикатора в 100 мл 95%-ного спирта. Формальдегид, 30 – 40%-ный. Раствор нейтрализуют по фенолфталеину до появления слабой розовой окраски. Хлорид бария, 20%-ный раствор. Этиловый спирт, 95%-ный.

Выполнение анализа. В мерную колбу емкостью 100 мл помещают 50 мл исследуемого раствора, 1 – 2 мл раствора фенолфталеина, 10 мл 20%-ного раствора хлорида бария, после чего осторожно прибавляют насыщенный раствор гидроксида бария до появления отчетливой красной окраски. После этого прибавляют еще 5 мл раствора гидроксида бария (избыток) и разбавляют раствор дистиллированной водой до метки. Через 15 мин раствор фильтруют через сухой фильтр. 50 мл окрашенного в красный цвет фильтрата возможно точно нейтрализуют до тех пор, пока капля раствора, нанесенная на лакмусовую бумагу, не окрасит ее в фиолетовый цвет. Прибавляют 20 мл 30 – 40%-ного формалина, предварительно нейтрализованного до слабо-розовой окраски. Затем титруют раствор 0,2 н. раствором едкого натра, не содержащим карбонатов, до появления окраски, соответствующей окраске раствора-свидетеля. По достижении этой окраски прибавляют еще несколько миллилитров раствора щелочи и столько же 0,2 н. раствора соляной кислоты, чтобы окраска раствора стала немного более слабой, чем окраска раствора-свидетеля. Наконец, опять прибавляют 0,2 н. раствор щелочи до повторного увеличения интенсивности окраски до интенсивности окраски раствора-свидетеля.

Для приготовления *раствора-свидетеля* смешивают в колбе для титрования 50 мл свежепрокипяченной воды и 20 мл раствора формальдегида. Приливают 5 мл 0,2 н. раствора едкого натра, 1 – 2 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,2 н. раствором соляной кислоты до слабо-розовой окраски. Затем прибавляют еще 3 капли раствора едкого натра до появления интенсивной красной окраски.

Разность между общим расходом щелочи и общим расходом кислоты в миллилитрах соответствует содержанию карбоксильных групп (1 мл = 0,0090 г карбоксильных групп) или связанного формальдегидом азота (1 мл = 0,0023 г азота).

Если исследуемое вещество содержит аммиак, его надо предварительно определить обычным способом, например перегонкой в присутствии оксида магния, и вычесть количество азота, соответствующее его содержанию, из количества азота, связанного с формальдегидом.

Формольным титрованием можно определить также аминокислоты, содержащие аминогруппы не только в α -положении, а также метиламинокислоты. Пониженные результаты получаются, если метиленаминосоединения, образующиеся после прибавления формальдегида, имеют очень, слабо выраженные кислотные свойства и диссоциируют при концентрации ионов водорода, меньшей, чем концентрация ионов водорода, соответствующая изменению окраски индикатора. Результаты анализа оказываются завышенными, если аминокислоты содержат также другие кислотные группы. Мочевина и гуанидин после прибавления формальдегида имеют нейтральную реакцию. Аргинин титруется, как основная кислота.

Формольное титрование может быть также проведено и электрометрическим методом с помощью рН-метра или иономера.

Опыт 4.2. Формольное титрование с рН-метром

Оборудование и реактивы. Лабораторный рН-метр с бюреткой вместимостью 50 мл. Химические стаканы и пипетки. 37 %-ный раствор формалина. Растворы NaOH: 0,2 М, 0,1 М, 0,05 М. Растворы H₂SO₄: 0,2 н., 0,1 н., 0,05 н. Гидролизат белка или питательная среда.

Ход работы. 1. В химический стакан вносят точно 1 мл препарата (питательной среды или гидролизата), затем приливают 10 мл воды. Доводят рН раствора до значения рН = 7 потенциометрически (по рН-метру), используя для этого 0,05 М, 0,1 М, 0,2 М растворы гидроксида натрия и серной кислоты (концентрация растворов определяется наличием карбоксильных групп).

2. В отдельной емкости нейтрализуют примерно 20 мл 37%-ного формалина потенциометрически до значения рН = 7. Для нейтрализации используют те же растворы едкого натра и серной кислоты.

3. В химический стакан с препаратом опускают электроды рН-метра, приливают 6 мл свеженейтрализованного формалина. Значение рН при этом сдвигается в кислую сторону из-за освобождения карбоксильных -COOH групп после взаимодействия формалина с аминогруппами.

4. Не вынимая электроды из стакана, пробу титруют 0,1 М раствором NaOH при помешивании до значения рН = 9,1. Записывают в качестве результата А количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл.

5. Параллельно проводят контрольный опыт, где вместо препарата берут 1 мл воды (холостая проба). Титрование проводится потенциометрически. В качестве результата В записывают количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование холостой пробы, мл.

Расчет. Содержание аминного азота X (в граммах аминного азота на 100 мл препарата) рассчитывают: $X = (A - B) \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100 / Y$, где А –

количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл;
 В – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля (холостой пробы), мл; К – поправка к титру 0,1 М NaOH (К = 1 при использовании точно титрованного 0,1 М раствора NaOH);
 1,4 – количество азота (в мг), эквивалентное 1 мл пробы; Y – объем пробы, взятой на определение, мл; 100 – пересчет на 100 мл пробы.

Контрольные вопросы

1. Какой азот называют аминным?
2. Что называется потенциометрическими методами определения?
3. На чем основан метод формольного титрования для определения количества аминного азота? Опишите химизм процесса.
4. Что называют аминокислотами, пептидами, белками?
5. В каких реакциях белки подвергаются гидролизу?

Работа 5. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии на бумаге

Индивидуальные аминокислоты в растворе или в смесях могут быть разделены методом тонкослойной хроматографии.

Т а б л и ц а 5.1

Значения R_f аминокислот в системе растворителей
 бутанол : уксусная кислота: вода 4:1:5 (при температуре 20°C)

Аминокислота	Аминокислотный остаток	R_f
Цистин	Cys	0,04
Цистеин	–	0,05
Лизин	Lys	0,14
Гистидин	His	0,16
Аргинин	Arg	0,18
Серин	Ser	0,22
Аспарагиновая кислота	Asp	0,24
Глицин	Gln	0,25
Глутаминовая кислота	Glu	0,28
Треонин	Thr	0,29
Аланин	Ala	0,36
Тирозин	Tyr	0,45
Валин	Val	0,50
Метионин	Met	0,50
Фенилаланин	Phe	0,66
Изолейцин	Ile	0,68
Лейцин	Leu	0,69

Метод основан на различной растворимости отдельных аминокислот в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой – водонасыщенный органический растворитель, например смесь бутанола с уксусной кислотой. Водная фаза является неподвижной, так как вода в данном случае оказывается сорбированной на инертном носителе – бумажной целлюлозе, которая в закрытой хроматографической

камере в насыщенной влажной атмосфере удерживает до 20% воды. Подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель.

В зависимости от растворимости аминокислоты в воде или органическом растворителе наблюдается разная скорость движения аминокислот при смачивании бумаги с нанесенным на нее для анализа образцом. Для усиления видимости пятен, соответствующих аминокислотам, хроматограмму "проявляют", то есть обрабатывают веществом, окрашивающим пятна. Наиболее часто для этих целей применяют нингидрин.

Типичная хроматограмма после окрашивания представляет собой полоску бумаги, на которой слабо просматривается стартовое пятно и хорошо видны пятна индивидуальных аминокислот, которые располагаются выше старта. Местоположение вещества на хроматограмме зависит от коэффициента распределения α :

$$\alpha = \frac{\text{концентрация вещества в подвижной фазе}}{\text{концентрация вещества в неподвижной фазе}}.$$

Для характеристики положения пятна с веществом применяют величину R_f – коэффициент скорости движения (*retention factor* – фактор удерживания):

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное аминокислотой от старта, мм}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя от старта, мм}}.$$

R_f является характерной постоянной для данного вещества и зависит от качества применяемого растворителя, его состава, pH, температуры, плотности бумаги и других факторов. Если указаны условия определения и значение R_f , то можно точно указать, о каком веществе идет речь (табл. 5.1).

Метод является простым и широко используется для определения аминокислот и других органических веществ в количествах от десятых до сотых долей миллиграмма. Чувствительность метода 2 – 5 мкг индивидуального вещества в одном пятне.

Оборудование. Пинцет, хроматографическая камера, бумага для хроматографии или хроматографические пластинки типа Silufol, стеклянный капилляр, ножницы, сушильный шкаф на 70°C, пульверизатор.

Реактивы. Бутиловый спирт х.ч. или ч.д.а., уксусная кислота ледяная х.ч., вода дистиллированная (готовят заранее смесь для хроматографирования), 0,5 %-ный раствор в ацетоне, смесь аминокислот: например, глутаминовая кислота – 60 мг, аланин – 40 мг, глицин – 40 мг, растворенные в 10 мл дистиллированной воды (можно использовать раствор смеси по 50 мг других аминокислот в 10 мл воды).

Ход работы. Вырезают полоску хроматографической бумаги длиной в 15 см и шириной в 1,5 см. Можно использовать специальные пластинки Silufol или Merck для тонкослойной хроматографии. Размеры

вырезаемой полоски должны соответствовать размерам хроматографической камеры.

Приготавливают хроматографическую камеру, которая представляет собой большую пробирку с пробкой, цилиндр с притертой крышкой или специальную прямоугольную стеклянную камеру, герметично закрываемую сверху притертым стеклом. На дно камеры заливают 2 мл смеси бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4:1:5 и закрывают крышкой.

На полоске бумаги карандашом ставят черточку примерно в 2 см от нижнего края и капилляром наносят касанием 1 каплю испытуемой смеси. Пластиночке дают подсохнуть над горячей поверхностью плитки или сушильного шкафа и повторяют процедуру касания капилляром 3 раза. Место нанесения пробы не должно соприкасаться с растворителем при помещении полоски бумаги в хроматографическую камеру (карандашная полоска должна быть на 0,5 см выше слоя растворителя).

Пинцетом опускают вертикально в камеру полоску бумаги нижним краем в растворитель и закрывают камеру. Процесс хроматографирования проводят в течение 1 – 2 ч. При этом происходит продвижение вверх фронта растворителей и разделение аминокислот. Хроматограмму извлекают из камеры, отмечают границу продвижения фронта растворителя (карандашом или надрезанием края бумаги) и высушивают под тягой.

На высушенную хроматограмму наносят пульверизатором или осторожным смачиванием путем погружения 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне и подсушивают на воздухе. При смачивании не допускать подтеков. Проявление хроматограммы проводят, нагревая полоску бумаги в сушильном шкафу при 70°C в течение 15 мин.

Идентификацию аминокислот осуществляют по найденным значениям R_f . Для этого линейкой измеряют расстояния пробега фронта растворителя и каждого отдельного пятна соответствующей аминокислоты от места нанесения пробы, выраженные в мм. Определяют коэффициент пробега и фактор разделения R_f , значения которых сравнивают с табличными данными.

По значениям R_f проводят точную идентификацию наличия конкретных аминокислот в анализируемой смеси.

Контрольные вопросы

1. Какие свойства аминокислот положены в основу их хроматографического определения?
2. Какие факторы влияют на точность определения аминокислот хроматографией на бумаге?
3. Методические возможности хроматографического разделения веществ, как аналитического метода, применяемого в биотехнологии.

Работа 6. Получение иммобилизованных ферментов

Для стабилизации ферментов с целью более длительного сохранения их активности и возможности многократного использования применяют различные способы химической или физико-химической фиксации молекул фермента в твердом носителе, например в полимерном геле. Такой процесс называют иммобилизацией и используют для получения полимерных гранул, содержащих включенный в них фермент.

Оборудование. Лабораторный рН-метр или универсальная индикаторная бумага. Магнитная мешалка. Стаканы вместимостью 25, 50, 100 мл. Сито металлическое с ячейками размером 0,5 – 0,7 мм.

Реактивы. 1. Пенициллинацилаза (ПА), активностью 50 – 100 Е/мг. 2. Акриламид (АА) $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NH}_2$. 3. N,N'-метиленабисакриламид (бис-АА) $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NHC}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$. 4. Глутаровый альдегид (ГА), 25%-ный раствор. 5. Аммония персульфат (ПСА) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. 6. Натрия фосфат двузамещенный $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 7. Калия фосфат однозамещенный KH_2PO_4 . 8. Раствор натрия гидроксида, 30%-ный. Все реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а.

Ход определения. 1. Приготовление буферного раствора. Растворяют 11,876 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл дистиллированной воды (раствор 1). Растворяют 9,078 г KH_2PO_4 в 1000 мл дистиллированной воды (раствор 2). Смешивают 84 мл раствора 1 и 16 мл раствора 2.

2. Приготовление раствора пенициллинацилазы. 1 г порошка ПА смешивают с 5 мл буферного раствора и выдерживают в течение суток в холодильнике при температуре 4°C. Затем суспензию перемешивают в течение 30 мин на магнитной мешалке и используют для иммобилизации.

3. Приготовление раствора мономеров. 3,2 г АА 0,2 г бис-АА помещают в стакан и добавляют 3,4 мл фосфатного буфера рН 7,5. Вещества перемешивают на магнитной мешалке до получения прозрачного раствора и доводят значение рН раствора до величины 7,5 добавлением 30 %-ного раствора NaOH.

4. Приготовление 25 %-ного раствора ПСА. В стакане растворяют 1,2 г ПСА в 3,6 мл фосфатного буфера и устанавливают, если необходимо, значение рН, равное 7,5 добавлением 30 %-ного раствора NaOH.

5. Проведение иммобилизации. Иммобилизацию фермента проводят в стеклянном стакане с механической мешалкой. Стакан помещают в баню со льдом. Температура процесса иммобилизации должна быть < 4 – 6°C.

В стакан вносят раствор фермента, приготовленный по описанной методике, добавляют раствор мономеров и 1,2 мл 25%-ного раствора ГА, в котором, в случае необходимости, доводят значение рН до величины 7,5 добавлением 30%-ного раствора NaOH. Реагенты перемешивают в течение 30 мин, корректируя значение рН 7,5 добавлением раствора щелочи, добавляют 4,8 г раствора ПСА, перемешивают еще 30 мин,

останавливают мешалку и выдерживают смесь примерно в течение 5 мин при температуре 4 – 6°С до образования геля.

Полученный гель протирают через сито с размером отверстий 0,5 – 0,7 мм и получают гранулы иммобилизованного фермента, которые промывают в 100 мл дистиллированной воды при температуре 4 – 6°С. Гранулы отжимают на фильтровальной бумаге и сохраняют в холодильнике во влажном состоянии.

Выход иммобилизованного фермента составляет около 35% от активности, взятой на иммобилизацию.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводят иммобилизацию ферментов?
2. Какие способы иммобилизации ферментов известны и в чем их различие?
3. Что такое выход по активности иммобилизованного фермента?
4. Почему при иммобилизации используют буферные растворы?

Работа 7. Количественное определение содержания углеводов

Углеводы вместе с белками и жирами образуют основную группу веществ клеток, являясь главным источником энергии для живого организма. Эта энергия высвобождается за счет биохимического окисления углеводов. Разделяют моносахариды, ди- и олигосахариды и полисахариды, состоящие из циклических гликозидных звеньев общей формулы $C_x(H_2O)_x$. Углеводы составляют более 75% органических веществ в мире и до 80 % калорийности пищевого рациона человека.

Углеводы входят в состав пищевых продуктов в связанном состоянии с другими биополимерами, образуя химические комплексы различной прочности, поэтому количественное определение сахаров связано с разрушением этих комплексов в условиях, когда возможно разрушение и самих сахаридов, что приводит к неоднозначности результатов количественного анализа.

Опыт 7.1. Анализ содержания углеводов

Метод основан на способности углеводов образовывать с органическими реагентами окрашенные комплексы, поглощающие в видимой части спектра при заданной длине волны.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр с кюветами или фотоэлектроколориметр. Термостат или водяная баня на 100°С. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба на 250 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20–100°С. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100 – 250 мл. Раствор углевода, содержащий 50 – 100 мг/мл основного вещества. Вода дистиллированная. Стандартные растворы глюкозы в воде, содержащие

в 1 мл: 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Антроновый реактив. Готовят непосредственно перед определением путем растворения 0,25 г антрона в 25 мл дистиллированной воды, с последующим прибавлением к раствору 100 мл концентрированной серной кислоты. Спирт этиловый ректифицированный, 80 % раствор в воде. Соляная кислота х.ч., разбавленный (1:1) водный раствор. Гидроксид натрия х.ч., 1 М раствор. Ацетат свинца ч.д.а., 30%-ный раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия х.ч., 1 М раствор. Дистиллированная вода.

Ход работы. 10 г измельченного образца заливают 50 мл 80% этанола, нагревают смесь при 80°C в течение 15 мин, спиртовую вытяжку отфильтровывают, остаток подвергают экстрагированию 80% спиртом еще 2 раза. Объединенный экстракт упаривают до объема 30 мл при температуре 40°C для отделения этанола. Упаренный экстракт количественно переносят в круглодонную колбу, добавляют 2 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты, греют смесь при температуре 70°C в течение 3 мин и получают гидролизат, содержащий экстрагированные моносахариды и моносахариды, образованные при легком гидролизе из сахарозы, который количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл дистиллированной воды.

К гидролизату добавляют по капле 1 М раствор гидроксида натрия до нейтральной реакции, прибавляют 2 мл 30%-ного раствора ацетата свинца, перемешивают и отстаивают смесь в течение 1 ч, добавляют по капле раствор сульфата натрия до прекращения выпадения осадка для связывания избытка ацетата свинца и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор отстаивают и фильтруют.

В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр.

В колбу заливают 4 мл раствора препарата, содержащего около 0,3 г сухого определяемого вещества или экстракта из измельченного пищевого продукта и доводят объем раствора до 100 мл.

В 2 пробирки заливают по 5 мл антронового реактива и осторожно по стенке приливают: в 1-ю – 1 мл раствора углевода (проба), во 2-ю – 1 мл воды (контроль).

Пробирки помещают в кипящую водяную баню и выдерживают при температуре 100°C в течение 15 мин, охлаждают до комнатной и проводят измерение поглощения при 540 нм против контроля.

Построение калибровочной кривой. Предварительно проводят определение содержания углеводов в растворах глюкозы с известной концентрацией, содержащих в 1 мл 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Стандартные растворы можно готовить соответствующим разбавлением (1 г на 100 мл) раствора глюкозы.

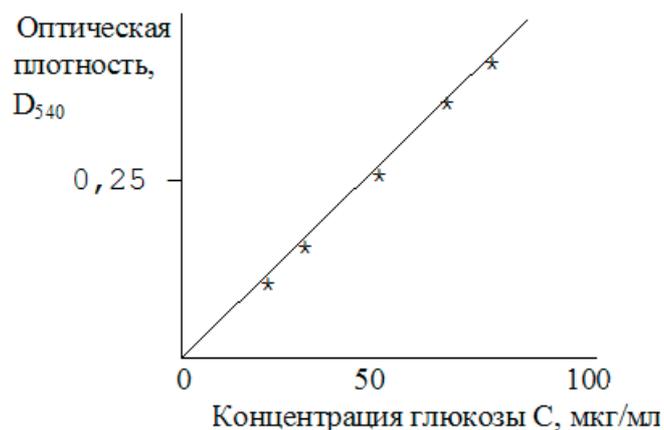


Рис. 7.1. Градуировочный график определения содержания углеводов с антроновым реактивом при 540 нм

Расчет. Определение содержания углеводов в анализируемой пробе раствора в мкг/мл осуществляют по калибровочному графику (рис. 7.1).

Процентное содержание углеводов в пробе, в пересчете на глюкозу, вычисляют по формуле $X = a / 100 b$, где X – содержание углеводов в препарате, в г на 100 мл препарата; a – количество микрограммов глюкозы в 1 мл исследуемого раствора, найденное по калибровочной кривой; b – количество мл препарата, взятое для приготовления 100 мл раствора (или навеска).

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах углеводов основан метод спектрофотометрического определения?
2. Какую роль играют углеводы в жизнедеятельности клеток?
3. Опишите устройство и принцип работы фотометра.
4. Какие химические элементы входят в состав углеводов?
5. В чем заключается особенность работы с белками и ДНК, по сравнению с углеводами?

Опыт 7.2. Определение содержания лигнина

Сернокислотный метод основан на гидролизе древесных полисахаридов серной кислотой. Сначала действуют конц. (65–80%-ной) серной кислотой при нормальной температуре, а затем смесь лигнина с кислотой разбавляют и кипятят для доведения гидролиза до конца, то есть для превращения образовавшихся на первой стадии олигосахаридов в моносахариды. Значительное количество лигнина, особенно в случае лиственной древесины, растворяется в концентрированной серной кислоте, но осаждается при разбавлении и кипячении.

На результаты анализа влияют концентрация кислоты, температура и продолжительность обработки. При концентрации кислоты ниже 65% целлюлоза гидролизуеться не полностью, а при концентрации выше 80% наблюдается осмоление сахаров с образованием гуминов. Наиболее

точные результаты получатся при использовании 72%-ной серной кислоты как для хвойных, так и для лиственных пород.

Реактивы и материалы. Серная кислота 72%-ная. Индикатор метиловый оранжевый, раствор. Устройство для кипячения.

Ход работы. Навеску воздушно-сухих опилок (около 1 г), предварительно обработанных смесью спирта и бензола для удаления смол, помещают в коническую колбу вместимостью 50 мл с притертой пробкой. К навеске добавляют 15 мл 72%-ной H_2SO_4 плотностью $1,64 \text{ г/см}^3$) в выдерживают в термостате при $24 - 25^\circ\text{C}$ в течение 2,5 ч при осторожном периодическом перемешивании без образования комков. Затем смесь лигнина с кислотой переносят в коническую колбу вместимостью 500 мл, смывая лигнин 200 мл дистиллированной водой. Разбавленную смесь кипятят с обратным холодильником на электрической плитке (слабое кипение) в течение 1 ч. Частицам лигнина дают укрупниться и осесть. Затем лигнин отфильтровывают на стеклянном пористом фильтре, предварительно высушенном до постоянной массы. Фильтрование рекомендуется проводить на следующий день с последующей промывкой дистиллированной водой. Для установления конца промывания лигнина на фильтре каплю жидкости, стекающей с фильтра, наносят на фильтровальную бумагу и добавляют каплю индикатора (метилового оранжевого). Если цвет не меняется, промывку считают законченной.

Фильтр с лигнином сушат в сушильном шкафу при температуре 103°C до постоянной массы и взвешивают.

Расчет. Массовую долю лигнина в процентах рассчитывают по отношению к абсолютно сухой исходной древесине (в которой предварительно определена влажность по стандартной методике) по формуле: $L = (m_1 - m) / m_2 \cdot K_3 \cdot 100$, где m_1 – масса фильтра с лигнином, г; m – масса пустого фильтра, г; m_2 – абсолютно сухая навеска обессмоленной древесины, г; K_3 – коэффициент экстрагирования органическим растворителем.

Контрольные вопросы

1. На каких свойствах полисахаридов основан метод их определения в древесных образцах?
2. В чем отличие работы с древесными сахарами по сравнению с растворимыми гетерополисахаридами животной ткани?
3. Что разрушается в образцах при их обработке серной кислотой?

Библиографический список

1. **Иванкин, А.Н.** Расчетные решения в химии и экологических проблемах производств: учеб. пособие / А.Н. Иванкин, Г.Л. Олиференко. – М. : ГОУ ВПО МГУЛ, 2008. – 401 с (<http://mgul.ac.ru/info/fmhtd/chem/met.shtml>).
2. **Неклюдов, А.Д.** Практический курс по общей химии, биотехнологии и экологическим проблемам производств: учеб. пособие / А.Д. Неклюдов, А.Н. Иванкин, Г.Н. Федотов. – М.: МГУЛ, 2004. – 500 с.

Оглавление

Работа 1. Свойства аминокислот, пептидов и белков.....	3
Опыт 1.1. Определение рН растворов аминокислот	3
Опыт 1.2. Действие азотистой кислоты на аминокислоты	4
Опыт 1.3. Нингидриновая реакция аминокислот	4
Опыт 1.4. Отношение белков к кислотам и щелочам	4
Опыт 1.5. Биуретовая реакция белков	5
Опыт 1.6. Высаливание белков из растворов	6
Опыт 1.7. Осаждение и денатурация белка из раствора этанолом	6
Опыт 1.8. Осаждение и денатурация белка ионами тяжелых металлов	6
Опыт 1.9. Денатурация и осаждение белка при нагревании	7
Контрольные вопросы	7
Работа 2. Определение изоэлектрической точки белка	7
Контрольные вопросы.....	8
Работа 3. Полный гидролиз простых белков	8
Контрольные вопросы	10
Работа 4. Определение содержания азота свободных аминогрупп (аминного азота)	10
Опыт 4.1. Формольное титрование по методу Зеренсена.....	10
Опыт 4.2. Формольное титрование с рН-метром	12
Контрольные вопросы.....	13
Работа 5. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии на бумаге	13
Контрольные вопросы	15
Работа 6. Получение иммобилизованных ферментов	16
Контрольные вопросы	17
Работа 7. Количественное определение содержания углеводов	17
Опыт 7.1. Анализ содержания углеводов	17
Контрольные вопросы	19
Опыт 7.2. Определение содержания лигнина	19
Контрольные вопросы	20
Библиографический список	21
Оглавление.....	22