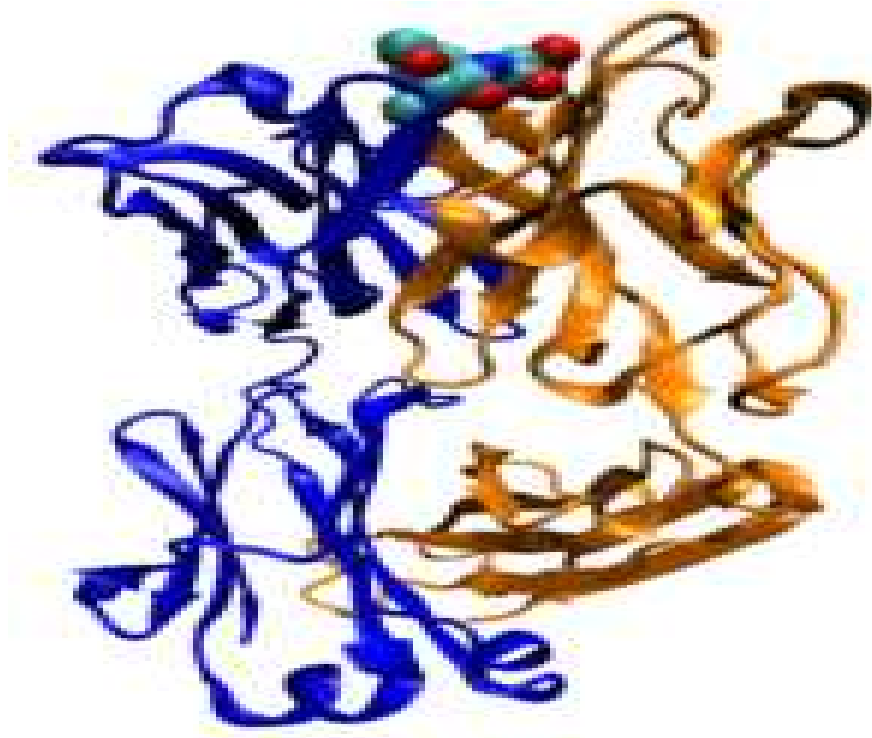


Федеральное агентство по образованию
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Ивановский государственный химико-технологический университет

П.Б. РАЗГОВОРОВ, С.В. МАКАРОВ

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ.
БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ



И В А Н О В О
2 0 0 9

УДК 577.1

Разговоров, П.Б. Биохимические процессы. Белки, ферменты: лабораторный практикум / П.Б. Разговоров, С.В. Макаров; Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2009. – 72 с.

Рассмотрены вопросы, связанные с проведением качественных испытаний пищевых продуктов на наличие ферментов, и представлены основные аналитические методы белковой химии. Приведены лабораторные работы по определению активности белков и ферментов в составе пищевых продуктов и изучению их общих химических свойств. Материал предназначен для магистрантов высших учебных заведений, обучающихся по направлению 260100 «Технология продуктов питания» (программа «Биокаталитические процессы в пищевых технологиях»), и студентов специальности 240902 «Пищевая биотехнология».

При пользовании лабораторным практикумом задачей студентов является закрепление теоретических знаний, накопленных на лекционных занятиях, и обретение навыков исследования физических и химических свойств указанных веществ.

Табл. 10. Ил. 2. Библиогр.: 14 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета Ивановского государственного химико-технологического университета.

Рецензенты:

Центр семейной медицины «Мега» (г. Иваново);
доктор химических наук **Д.Б. Березин**

(Ивановский государственный химико-технологический университет)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ	6
Лабораторная работа № 1. Гидролиз белков	6
Лабораторная работа № 2. Хроматография аминокислот на бумаге....	8
Лабораторная работа № 3. Тонкослойная хроматография аминокислот	10
Лабораторная работа № 4. Определение белка методом Лоури	12
Лабораторная работа № 5. Определение аминного азота нингидриновым методом	14
2. ФЕРМЕНТЫ	16
2.1. ПОЛУЧЕНИЕ И ОТКРЫТИЕ ФЕРМЕНТОВ.....	16
Лабораторная работа № 6. Получение сахаразы из дрожжей	17
Лабораторная работа № 7. Получение уреазы из соевой муки	18
Лабораторная работа № 8. Получение препарата амилаз из плесневых грибков	20
Лабораторная работа № 9. Открытие амилазы в слюне	22
Лабораторная работа № 10. Открытие альдегиддегидрогеназы в сыром молоке	24
Лабораторная работа № 11. Открытие пероксидазы в картофеле	26
2.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ	28
Лабораторная работа № 12. Количественное определение амилазы по Вольгемуту	29
Лабораторная работа № 13. Определение активности пектинэстеразы.....	31
Лабораторная работа № 14. Определение общей осахаривающей активности ферментной системы	34
Лабораторная работа № 15. Определение активности АсТ и АлТ	38

Лабораторная работа № 16.	Определение активности гексокиназы ...	41
Лабораторная работа № 17.	Определение активности каталазы субстрата по А.Н. Баху и А.И. Опарину ...	42
Лабораторная работа № 18.	Определение активности уреазы в единицах ферментативной активности	44
2.3. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ		48
Лабораторная работа № 19.	Специфичность действия ферментов	49
Лабораторная работа № 20.	Влияние температуры на активность ферментов	54
Лабораторная работа № 21.	Влияние рН на активность амилазы слюны	56
Лабораторная работа № 22.	Действие активаторов и ингибиторов на ферменты	57
2.4. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ		60
Лабораторная работа № 23.	Переаминирование глутаминовой кислоты с пировиноградной кислотой ...	60
Лабораторная работа № 24.	Расщепление фруктозо-1,6-дифосфата ферментом альдолазой	61
3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ХИМИИ СУСЛА		67
Лабораторная работа № 25.	Определение кислотности лабораторного сусла	67
Лабораторная работа № 26.	Определение вязкости лабораторного сусла	68
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		71

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторный практикум включает почти три десятка работ различной степени сложности, которые освещают тему физических и химических свойств белков и ферментов, а также способы их качественного открытия и количественного определения.

В нем представлены основные положения химии указанных соединений, обсуждаются результаты экспериментов, приведены схемы протекания реакций, а также представлен небольшой раздел, касающийся исследования суслу, включающего оба класса указанных соединений в определенных пропорциях. Лабораторный практикум насыщен таблицами и формулами.

Для удобства пользования материалом в начале каждой работы приведен список реактивов, посуды и оборудования, необходимых для ее выполнения.

При подготовке лабораторного практикума большое внимание уделено доступности биологического материала для исследований.

1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Лабораторная работа № 1

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Гидролиз белков представляет собой распад сложных белковых молекул на составные части. В зависимости от применяемого катализатора различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. При кислотном гидролизе белка разрушаются некоторые аминокислоты: триптофан – полностью, а серин, треонин, цистин, тирозин и фенилаланин – частично. При щелочном гидролизе белка разрушение аминокислот происходит в большей степени, чем при кислотном гидролизе. Ферменты гидролизуют белки в зависимости от специфичности их структуры. В организме гидролиз белка протекает в процессе пищеварения и жизнедеятельности клеток под действием протеолитических ферментов. В лабораторных условиях гидролиз белков является важным методом исследования их состава и строения. Кислотные и ферментативные гидролизаты белков применяются в качестве лечебных препаратов для парентерального питания [1].

Цель работы:

Провести кислотный гидролиз простого (альбумина) и сложного белка (рибонуклеопротеида).

Реактивы, посуда, оборудование:

Белок альбумин, 6 н. раствор HCl, ампула для гидролиза, мерная колба объемом 50 мл.

Сложный белок (рибонуклеопротеид), 10 %-й раствор H₂SO₄, дистиллированная вода, круглодонная колба объемом 100 мл, мерная колба объемом 100 мл, мерный цилиндр на 100 мл, плитка, асбестовая сетка.

Выполнение работы

Кислотный гидролиз простого белка – альбумина

Белок гидролизуют без доступа воздуха в растворе 6 н. HCl в течение 20–24 ч при температуре 105–110 °С. Чем больше отношение кислоты к белку, тем меньше потери при гидролизе. Обычно используют такие количества кислоты и белка, при которых отношение кислоты к гидролизуемому белку равно 100:1 или 1000:1.

К 5 г альбумина добавляют 5 мл перегнанной 6 н. HCl и помещают раствор в ампулу для гидролиза. Содержимое ампулы охлаждают смесью ацетон–сухая углекислота и откачивают из ампулы воздух, затем ампулу запаивают и помещают в термостат при 105–110 °С на 20–24 ч. После окончания гидролиза ампулу вскрывают, содержимое переносят в мерную колбу на 50 мл. Полученный раствор используют для определения аминокислот.

Кислотный гидролиз сложных белков – рибонуклеопротеидов

1 г выделенных из дрожжей рибонуклеопротеидов помещают в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 20 мл 10 %-го раствора серной кислоты и 20 мл воды. Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятят под тягой в течение 1 ч на асбестовой сетке при слабом нагревании. Через час после начала кипения нагревание прекращают, дают раствору остыть, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до 100 мл водой и используют полученный раствор для определения составных частей рибонуклеопротеидов – фосфора, рибозы и рибонуклеиновой кислоты [2].

Лабораторная работа № 2

ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ НА БУМАГЕ

Цель работы:

Провести хроматографическое разделение аминокислот на бумаге и построить калибровочную кривую.

Реактивы, посуда, оборудование:

При разделении в смеси бутанол–вода–уксусная кислота (4:1:5) используют следующие аминокислоты: а) гистидин, глицин, валин, лейцин; б) аргинин, глутаминовая кислота, аланин, метионин; в) лизин, серин, тирозин, фенилаланин. Кроме этого, необходим 0,2 %-й раствор нингидрина в ацетоне, 0,005 %-й раствор сульфата меди в 75 %-м этаноле, а также требуется специальная бумага для хроматографии, капилляр (микропипетка), фотоэлектроколориметр.

Выполнение работы

Метод хроматографического разделения аминокислот на бумаге основан на их распределении между двумя фазами – неподвижной (вода на целлюлозных волокнах бумаги) и подвижной (органические растворители, их смеси). Аминокислоты, нанесенные на бумагу, распределяются между этими фазами в соответствии с их коэффициентами распределения.

Для хроматографии используют специальные сорта бумаги, отличающиеся емкостью и скоростью движения растворителей на ней. Эффективное разделение аминокислот на бумаге возможно при использовании нескольких растворителей путем последовательного пропускания их через одну и ту же хроматограмму или при использовании одного растворителя, но при многократном его пропускании. Получают так называемые двумерные хроматограммы, пропуская сначала один растворитель, а затем другой в направлении, перпендикулярном первому. Наиболее часто для разделения

аминокислот используют смесь бутанол–вода–уксусная кислота (4:1:5). Количество аминокислот, наносимое на бумагу, не должно превышать 5–10 мкл 0,01 М раствора аминокислот. Одновременно с исследуемым раствором наносят смесь известных кислот – так называемых «метчиков». Концентрация «метчиков» в смеси должна соответствовать концентрации аминокислот в испытуемом растворе [3].

Перед нанесением раствора аминокислот бумагу разрезают на полосы, отмечают линию старта (место нанесения растворов аминокислот) и точки нанесения каждой аминокислоты. Раствор аминокислот наносят на бумагу с помощью калиброванного капилляра, небольшими порциями, высушивая пятно после каждого нанесения.

Полоски бумаги после нанесения аминокислот помещают в хроматографическую камеру, содержащую растворитель и насыщенную его парами. Пропускают растворитель почти до конца полосы, затем высушивают полосу и повторяют пропускание раствора 2–3 раза.

Полосы бумаги после неоднократного пропускания растворителя высушивают, опрыскивают 0,2 %-м раствором нингидрина в ацетоне и помещают в шкаф на 10 мин при температуре 80–90 °С.

Пятна аминокислот, окрашенные нингидрином, вырезают и помещают в пробирки, предварительно измельчив их ножницами. В пробирки добавляют по 5 мл 0,005 %-го раствора сульфата меди в 75 %-м этаноле. Фиолетовая окраска аминокислотных производных переходит в оранжево-красную вследствие образования комплексов с медью. Пробирки помещают в темное место на 30–40 мин. и затем фотометрируют против контрольной пробы на спектрофотометре при $\lambda = 540$ нм или на фотоэлектроколориметре, пользуясь синим фильтром. Количество аминокислот определяют по калибровочному графику, на котором по оси абсцисс отложена концентрация аминокислоты, а по оси ординат – оптическая плотность раствора (D).

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят растворы аминокислот, содержащие в 1 мкл 0,01 мкмоль каждой аминокислоты. С помощью автоматической микропипетки или калиброванного капилляра на бумагу наносят 5, 10, 15 и 20 мкл раствора аминокислоты, чтобы каждая точка калибровочной кривой соответствовала 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мкмоль аминокислоты. Чтобы приблизить условия построения калибровочного графика к условиям анализа исследуемой пробы, в одном объеме растворяют несколько аминокислот, причем подбирают аминокислоты таким образом, чтобы их пятна не перекрывались на хроматограмме при однократном пропускании растворителя. Как уже отмечалось выше, рекомендуется использовать следующие аминокислотные смеси при разделении в смеси бутанол–вода–уксусная кислота (4:5:1): а) гистидин, глицин, валин, лейцин; б) аргинин, глутаминовая кислота, аланин, метионин; в) лизин, серин, тирозин, фенилаланин.

Хроматографическое разделение аминокислот и определение окрашенных производных при построении калибровочного графика проводят так же, как это описано выше для исследуемого раствора [4].

Лабораторная работа № 3

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ

Цель работы:

Провести хроматографическое разделение аминокислот на носителе, закрепленном на пластинке в виде тонкого слоя.

Реактивы, посуда, оборудование:

Пластинки для тонкослойной хроматографии, буфер (лимонная кислота, гидроксид натрия, соляная кислота, вода), капилляр, хроматографическая камера, 0,5 %-й раствор нингидрина в ацетоне.

Выполнение работы

Анализ смеси аминокислот может быть проведен на носителе, закрепленном на пластинке в виде тонкого слоя. Тонкослойная хроматография - очень простая, быстрая и удобная процедура, при которой разделяемые вещества обнаруживаются легко и в течение короткого промежутка времени [3].

Для эффективного разделения аминокислот в тонком слое наиболее подходящим оказался тонкий слой ионообменника, нанесенного на пластинку. В качестве ионообменника обычно используют синтетические смолы типа дауэкс, получаемые путем сополимеризации стирола и дивинилбензола. Для тонкослойной хроматографии аминокислот могут быть использованы пластинки «Фиксион» 50x8 венгерского производства. В названии пластинки цифрой 50 указан тип смолы (катионообменник), а цифра 8 указывает на содержание дивинилбензола в смоле, равное 8 %.

При проведении тонкослойной хроматографии на пластинках необходимо создавать условия, близкие к тем, которые применяются при работе на колонках (молярность и рН буфера, температура) с учетом типа ионообменника.

Перед началом работы пластинки необходимо уравновесить буфером (рН 3,3), содержащем 1,4 г лимонной кислоты, 0,8 гидроксида натрия и 1,2 мл концентрированной соляной кислоты в 1 л воды. Для уравновешивания погружают пластинку в буфер на глубину 1–2 см в закрытой хроматографической камере и оставляют на 20–24 ч. При уравновешивании создается соответствующая ионная среда и удаляются примеси, находящиеся в слое. На пластинке простым карандашом отмечают линию старта на расстоянии

1,5 см от нижнего края. Исследуемый раствор наносят капилляром (не более 5 мкл). Если нужно нанести больший объем раствора, то наносят его порциями, подсушивая каждый раз пятно. После нанесения раствора, а также аминокислот – «метчиков» пластинку помещают в хроматографическую камеру, на дне которой находится слой буферного раствора высотой 1 см. Для разделения используют буфер, аналогичный по составу буферу для уравнивания и имеющий то же значение рН (3,3), но большую ионную силу. Состав буфера в данном случае: 84 г лимонной кислоты, 16 г NaOH и 5,9 мл HCl (конц.) в 1 л воды.

Хроматографию проводят при комнатной температуре до тех пор, пока фронт буферного раствора не достигнет 1–2 см до края пластинки. Пластинку извлекают из камеры и высушивают феном или в шкафу, затем опрыскивают 0,5 %-м раствором нингидрина в ацетоне и нагревают 5–10 мин при 90 °С до проявления пятен аминокислот [4].

Лабораторная работа № 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Цель работы:

Определить наличие белка методом, основанном на сочетании биуретовой реакции на пептидные связи и реакции Фолина на ароматические аминокислоты.

Реактивы, посуда, оборудование:

2 %-й раствор Na₂CO₃ (приготовленный на 0,1 %-м растворе NaOH), 0,5 %-й раствор CuSO₄ · 5H₂O (приготовленный на 1 %-м растворе лимоннокислого натрия), реактив Фолина-Чокальтеу, раствор белка, содержащий 0,25 мг/мл.

Выполнение работы

Данный метод основан на сочетании биуретовой реакции на пептидные связи и реакции Фолина на ароматические аминокислоты. Метод Лоури является наиболее чувствительным и точным из существующих в настоящее время методов количественного определения белка.

Реактив Фолина-Чокальтеу

В круглодонную колбу на 1 л наливают 850 мл воды, вносят 50 г вольфрамата натрия и 12,5 молибдата натрия и перемешивают до полного растворения. К полученному раствору приливают 25 мл 85 %-ного раствора фосфорной кислоты, 50 мл концентрированной соляной кислоты и смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 ч. Затем добавляют 75 г сернокислого лития, 25 мл воды, 3–4 капли брома и кипятят без холодильника в течение 15 мин под тягой для удаления избытка брома. Раствор охлаждают до комнатной температуры и водой доводят до 500 мл, перемешивают и фильтруют. Из фильтрата отбирают 1 мл разводят в 10 раз водой и титруют 0,1 М раствором NaOH до нейтральной реакции по фенолфталеину. После этого добавляют к раствору такое количество воды, чтобы получить конечную концентрацию кислоты в растворе, равную 1 н. Хранить готовый реактив следует в темной склянке с притертой пробкой.

1,0 мл раствора белка, содержащего от 10 до 100 мкг белка, смешивают с 5 мл реактива (смесь 1 мл раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 50 мл Na_2CO_3) оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляют 1 мл реактива Фолина-Чокальтеу, разведенного водой 1:1, и через 30 мин измеряют поглощение при 750 нм на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре, используя красный светофильтр.

Для построения калибровочной кривой в 6 пробирок помещают 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, и 1,0 мл раствора белка, содержащего 0,25 мг/мл (т.е. 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкг), доводят водой до 1,0 мл и затем проводят определение, как

указано выше. Величины оптической плотности откладывают на оси ординат, а концентрацию белка – на оси абсцисс.

Примечания

1. 0,5 %-й глицин уменьшает интенсивность окраски на 50 %.
2. 0,1 М фосфатный буфер вызывает образование осадка.
3. 0,5 %-е растворы мочевины, гуанидина, ацетона, вольфрамата, а также нейтрализованные растворы HClO и Ba(OH)_2 не мешают определению. Эфир и этанол не мешают в концентрации 5 %, сульфат цинка и сульфат аммония не мешают в концентрациях 0,1 и 0,15 % соответственно [5].

Лабораторная работа № 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА НИНГИДРИНОВЫМ МЕТОДОМ

Цель работы:

При помощи нингидриновой реакции, являющейся одной из наиболее чувствительных реакций на аминогруппы, определить количество аминокислот в автоматических анализаторах аминокислот. Для его расчета построить калибровочную кривую по тирозину.

Реактивы, посуда, оборудование:

0,1 %-й цитратный буфер, 4 М ацетатный буфер (рН 5,5), 4 %-й раствор нингидрина в метилцеллозольве, нингидриновый реактив (смешивают 0,1 М цитратный буфер (рН 5,5), 4 М ацетатный буфер (рН 5,5) и 4 %-й раствор нингидрина в отношении 1:1:2, в полученный раствор добавляют хлористое олово из расчета 160 мг SnCl_2 г/100 мл), 60 %-й этиловый или изопропиловый спирт, фотоэлектроколориметр.

Выполнение работы

Аминокислоты в реакции с нингидрином подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию (схема 1.1):

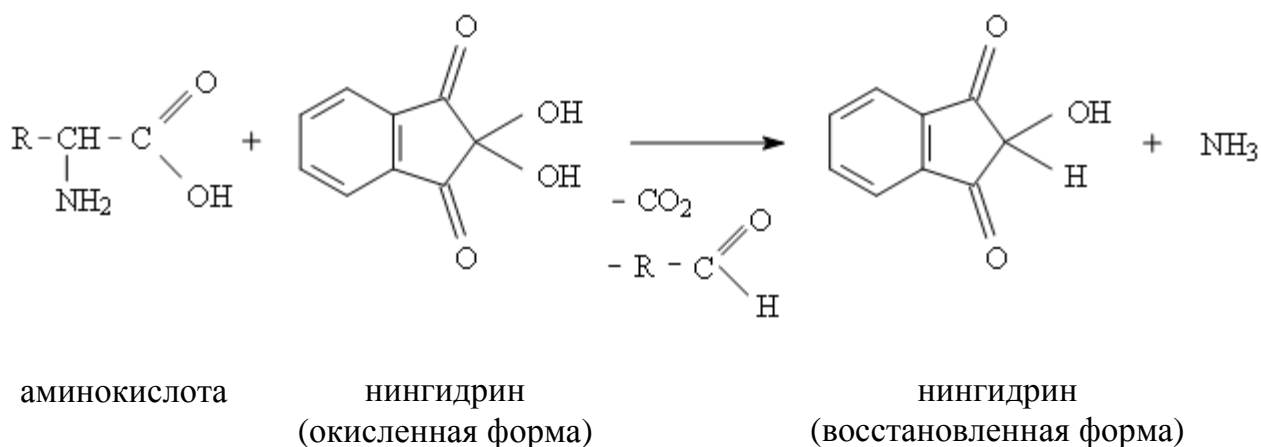


Схема 1.1. Реакция аминокислоты с нингидрином

Полученный восстановленный нингидрин взаимодействует с аммиаком и второй молекулой нингидрина, в результате образуется окрашенный в сине-фиолетовый цвет продукт конденсации (схема 1.2):

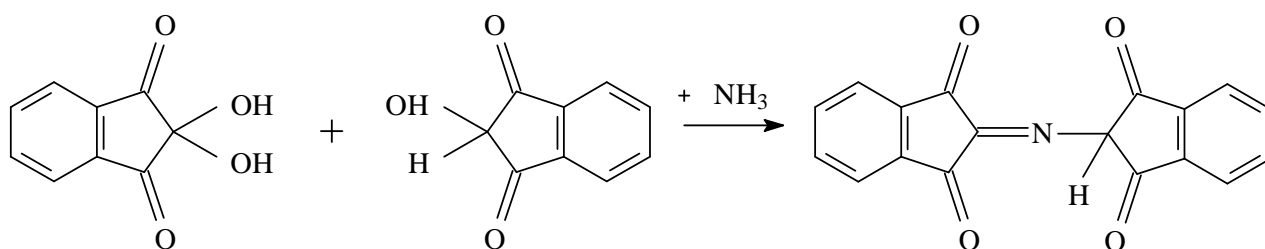


Схема 1.2. Реакция восстановленной формы нингидрина с аммиаком и второй молекулой нингидрина

К 1 мл пробы, содержащей от 0,0001 до 0,001 М аминокислоты, добавляют 1 мл нингидринового реактива и нагревают при 100 °С в течение 15 мин (на кипящей водяной бане), добавляют 5 мл 60 %-ного этилового или изопропилового спирта и определяют поглощение раствора при $\lambda = 540$ нм [6].

Для расчета количества аминокислоты строят калибровочную кривую по тирозину, проводя нингидриновую реакцию с растворами тирозина различной концентрации (от 0,0001 до 0,001 М) так, как это указано выше.

2. ФЕРМЕНТЫ

2.1. ПОЛУЧЕНИЕ И ОТКРЫТИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферментами или биологическими катализаторами называются специфические белки, входящие в состав всех клеток и тканей организмов, ускоряющие течение отдельных химических реакций и обладающие специфичностью действия.

Ферменты обладают рядом особенностей, отличающих их от неорганических катализаторов [7].

В настоящее время около 140 ферментов получено в кристаллическом состоянии. Источниками выделения ферментов являются различные животные и растительные ткани, а также дрожжи и микроорганизмы. Из одних только плесневых грибов получено около 80 различных ферментных препаратов: амилолитических, протеолитических и пектолитических, нашедших широкое применение в народном хозяйстве. Существует несколько методов получения ферментных препаратов. Основной — извлечение фермента водой на холоду из тканей, высушенных каким-либо обезвоживающим веществом, ацетоном или солевыми растворами. Хорошо измельченные и высушенные препараты тканей долгое время могут служить источником получения ферментов. Для получения более чистых препаратов сухой порошок ткани экстрагируют водой (или глицерином), отделяют жидкость центрифугированием. Ферменты водного экстракта либо осаждают ацетоном, осадок отделяют и высушивают, либо водный экстракт подвергают лиофильной сушке. Полученный порошок гигроскопичен, его нужно хранить в запаянных ампулах или в герметически закупоренных баночках в холодном месте. Для получения чистых препаратов ферментов широко используют в настоящее время такие эффективные методы, как электрофорез и ионообменную хроматографию. При сочетании этих методов с методами адсорбции и дробного высаливания белков, применявшимися ранее для очистки ферментов, значительно возросли возможности препаративного получения чистых ферментов [8].

Лабораторная работа № 6

ПОЛУЧЕНИЕ САХАРАЗЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы:

Получить сахаразу из дрожжей. Провести качественную пробу на сахаразу.

Реактивы, посуда, оборудование:

Пекарские дрожжи, ацетон, тимол, фелинговая жидкость, песок, вода, стекло, ступка, складчатый фильтр, термостат.

Выполнение работы

100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с песком, наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Всю массу оставляют стоять в термостате при 25–30 °С на 1–2 ч. Затем массу вновь растирают в жидкость, отделяют центрифугированием в течение 10 мин или фильтрованием через складчатый фильтр. Отфильтрованную прозрачную вытяжку упаривают в вакууме при 35 °С до небольшого объема и выливают в пятикратный объем ацетона, перемешивают и через несколько мин. центрифугируют. Образующийся осадок высушивают при температуре 38 °С и растирают в ступке в порошок. Сахароза (инвертаза) длительно сохраняется, если к порошку добавить кристаллик тимола в качестве антисептика.

Качественная проба на сахаразу

Сахароза расщепляет тростниковый сахар (схема 2.1)

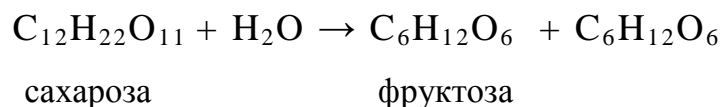


Схема 2.1. Реакция расщепления тростникового сахара под действием сахаразы

В две пробирки берут по 0,5 мл раствора фермента сахаразы. Содержимое одной из них кипятят для разрушения фермента и охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл раствора сахарозы и ставят в водяную баню при 40 °С на 10–15 мин. По истечении указанного времени в обе пробирки добавляют по 2 мл фелинговой жидкости и нагревают до начинающегося кипения. В пробирке, где фермент разрушен, осадка закиси меди не появляется. В другой же пробирке с активным ферментом образуется красный осадок закиси меди, что указывает на присутствие глюкозы [5].

Лабораторная работа № 7

ПОЛУЧЕНИЕ УРЕАЗЫ ИЗ СОЕВОЙ МУКИ

Цель работы:

Получить уреазу из соевой муки и проверить её на активность.

Реактивы, посуда, оборудование:

Бобы сои, петролейный эфир (или серный эфир), 1 %-ный водный раствор мочевины, 1 %-й спиртовой раствор фенолфталеина, ацетон, воронка Бюхнера, кофейная мельница, колба для отсасывания, резиновая трубка с зажимом.

Выполнение работы

Сухие бобы сои дважды размалывают на кофейной мельнице и хорошо растирают в ступке. Муку высыпают в колбу и встряхивают в течение 10–15 мин с петролейным эфиром (или диэтиловым) для обезжиривания, после чего смесь фильтруют на воронке Бюхнера. Процесс экстрагирования эфиром повторяют 5–6 раз. Обезжиренную муку высушивают, распределяя ее тонким слоем на стекле. Высушенная обезжиренная мука хранится в закрытой банке в сухом месте и может долго давать активные вытяжки уреазы.

Для работы отвешивают 20–30 г обезжиренной муки и настаивают ее с пятикратным количеством воды в течение 15–20 ч на холоде. Затем всю массу центрифугируют. Центрифугируют упаривают в вакууме при температуре 38–40 °С до небольшого объема (5–10 мл) и этот раствор вливают в четырех-пятикратный объем ацетона. Выпавший осадок обрабатывается несколько раз безводным ацетоном и окончательно высушивается. Полученный порошок хорошо растворяется в воде. Для проверки активности готовят 0,01 %-й раствор уреазы.

Проверка активности

В пробирку наливают 5 мл мочевины, 2–3 капли фенолфталеина и 0,1 мл раствора уреазы (0,01 %-й раствор). Пробирку помещают на 30 мин в термостат при температуре 38 °С. Смесь окрашивается в малиново-красный цвет, и ощущается запах аммиака при наличии активного фермента. Уреаза расщепляет мочевины на CO₂ и NH₃ (схема 2.2).

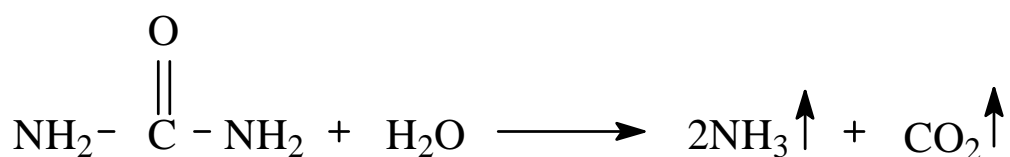


Схема 2.2. Реакция расщепления мочевины под действием уреазы

Уреаза содержится в больших количествах в семенах сои, белой акации, в микроорганизмах и др. У позвоночных животных она отсутствует [9].

Лабораторная работа № 8

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА АМИЛАЗ ИЗ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБКОВ

Цель работы:

Получить препарат амилаз путем культивирования плесневых грибов. Провести качественную пробу на амилазу.

Реактивы, посуда, оборудование:

Синтетическая питательная среда, универсальный индикатор, среда Чапека, колба, термостат, фарфоровая ступка, битое стекло, грибная масса, 1 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, воронка, фарфоровая пластинка, колбы на 100 мл, раствор йода, вода.

Выполнение работы

Культивирование плесневых грибов

Плесневые грибки развиваются на синтетических питательных средах. Состав одной из них (среды Чапека) представлен в табл. 2.1.

Для определения рН среды пользуются универсальным индикатором.

Для накопления грибной массы вносят кусочек плесени (с заплесневевшего предмета или пользуются чистой культурой гриба *Aspergillus niger*) в питательную среду Чапека. Засеянную колбу помещают на несколько дней в термостат при температуре 25–28 °С. Через 5–6 дней на поверхности среды вырастает мощная пленка, вполне пригодная для работы. Грибную массу отделяют от среды фильтрованием, распределяют ее небольшими кусочками на поверхности стекла и высушивают при температуре 37 °С. Затем воздушно-сухую массу тщательно растирают в фарфоровой ступке с битым стеклом, взятым в отношении 3:1 к весу микробной массы. Полученный тонкий однородный порошок и будет служить объектом для проведения ферментных опытов.

Состав среды Чапека

Компонент (pH≈7)	Количество компонента в среде, г
Сахароза	3,0
NaNO ₃	0,2
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄	0,05
KCl	0,05
FeSO ₄ или Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,001
Вода	100,0

Качественная проба на амилазу

Ферменты амилазы осуществляют гидролиз α -1,4-глюкановых связей в полисахаридах (крахмал, гликоген и др.) и олигосахаридах с образованием в качестве конечных продуктов либо мальтозы, либо глюкозы. В процессе постепенного дробления молекулы крахмала под действием α -амилаз возникают в качестве промежуточных продуктов распада декстрины (амилодекстрины, эритродекстрины, ахродекстрины). Протекание процесса гидролиза крахмала можно проследить по изменению окраски крахмала с йодом. Крахмал дает синее окрашивание с йодом, растворимый крахмал – сине-фиолетовое, амилодекстрины – фиолетовое, эритродекстрины – от красно-бурого до красного, ахродекстрины не изменяют окраски йода.

Препарат плесневых грибов характеризуется большим содержанием α -амилазы.

2 г смеси (0,5 г грибной массы + 1,5 г стеклянного порошка) смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37 °С, энергично встряхивают в течение 5 мин, а затем оставляют еще на 2 ч при температуре 37 °С. После повторного встряхивания осадок отфильтровывают. Фильтрат является ферментной вытяжкой.

В пробирку наливают 5 мл вытяжки. Прибавляют 10 мл 1 %-го раствора крахмала и тотчас же несколько капель содержимого пробирки смешивают на фарфоровой пластинке с одной-двумя каплями раствора йода. Проба окрашивается в интенсивно-синий цвет. Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через определенные промежутки времени (через 2, 4, 6 и т.д. мин) повторяют взятие проб. По мере расщепления крахмала пробы с йодом будут окрашиваться в различные цвета (от синего к фиолетовому, от красного до желтого, отвечающего цвету йода) вследствие образования декстринов разной степени сложности и олигосахаридов. Гидролиз можно считать законченным, когда проба с йодом окрашивается в желтый цвет, т.е. сохраняется цвет йода [10].

Лабораторная работа № 9

ОТКРЫТИЕ АМИЛАЗЫ В СЛЮНЕ

Цель работы:

Выделить амилазу из слюны и под ее действием провести гидролиз крахмала.

Реактивы, посуда, оборудование:

Раствор крахмального клейстера, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, фелинговая жидкость, дистиллированная вода, вата, воронка, водяная баня, стаканы на 100 мл, колбочки на 100 мл, термометр до 100 °С, фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Приготовление разбавленной слюны

Ополаскивают 2–3 раза рот, чтобы удалить остатки пищи. Отмеряют цилиндром 20 мл дистиллированной воды, сливают ее в стакан и ополаскивают ею рот в течение 1–2 мин, выливают жидкость в другой стакан или колбу. Эту

операцию повторяют 2–3 раза. Собранную жидкость (примерно 50–60 мл) фильтруют через вату и фильтрат употребляют для работы.

Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны

В две пробирки наливают по 5 мл крахмального клейстера и в одну из них 5 мл воды, а в другую 5 мл раствора слюны. Обе пробирки со стеклянными палочками одновременно помещают в водяную баню при 40 °С. Через несколько сек наблюдают уменьшение опалесценции жидкости в пробирке со слюной вследствие образования растворимого крахмала. Через 1 мин с момента нагревания пробирок в водяной бане от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают ее с каплей заранее нанесенного на пластинку йода. Повторяют подобное исследование действия фермента через 2, 4, 6, 8 мин. Окраска с йодом проб жидкости из пробирки со слюной меняется от синей к сине-фиолетовой, буро-красной, красной и наконец желтой, т.е. сохраняется цвет йода. После этого к оставшейся жидкости в опытной пробирке добавляют 1–2 мл фелинговой жидкости, смесь нагревают на пламени горелки до начала кипения. Образуется красный осадок закиси меди. Восстановление окиси меди в закись меди производится образовавшейся мальтозой, а также низкомолекулярными декстринами. Жидкость в контрольной пробирке (вода) не изменяется при выстаивании в водяной бане: пробы ее дают синее окрашивание с йодом, и она не восстанавливает гидрата окиси меди в закись меди [4].

Лабораторная работа № 10

ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫРОМ МОЛОКЕ

Цель работы:

Определить содержание альдегиддегидрогеназы в сыром молоке, которая способна окислять ряд субстратов, таких, как формальдегид и другие альдегиды алифатического ряда.

Реактивы, посуда, оборудование:

Свежее коровье молоко, 0,4 %-й раствор формальдегида, 0,01 %-й раствор метиленовой сини, вазелиновое масло, водяная баня.

Выполнение работы

Коферментом альдегиддегидрогеназы является ФАД (флавинадениндинуклеотид). Существуют многочисленные вещества, которые, будучи добавлены в реакционную смесь, легко принимают на себя водород (промежуточные акцепторы водорода). Особенно интересны некоторые красители, которые, присоединяя к себе водород, обесцвечиваются. Так, например, метиленовая синь, присоединяя водород (восстанавливаясь) от субстрата при его окислении под действием альдегиддегидрогеназы, переходит в бесцветное соединение (лейкосоединение). При взбалтывании на воздухе бесцветная форма метиленовой сини отдает принятый водород кислороду воздуха (окисляется) и снова приобретает свою окраску [11].

В три пробирки наливают приблизительно по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробу кипятят в течение 2–3 мин и остужают. В прокипяченную пробу (№ 1) и в одну из некипяченных проб (№ 2) добавляют по 1 мл 0,4 %-го раствора формалина, а в пробу № 3 – 1 мл воды. Во все три пробы приливают по 1 мл метиленовой сини. Содержимое хорошо перемешивают и доливают сверху 3–4 капли вазелинового масла, чтобы предохранить жидкость от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробы помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через некоторое время жидкость в той из некипяченных проб, в которую был добавлен формалин, обесцвечивается. Обесцвечивание обусловлено восстановлением за счет атомов водорода, который при участии альдегиддегидрогеназы молока отщепляется от формальдегида, превращающегося при этом в муравьиную кислоту (см. схему 2.3):

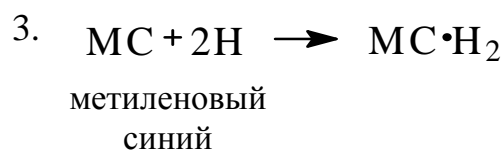
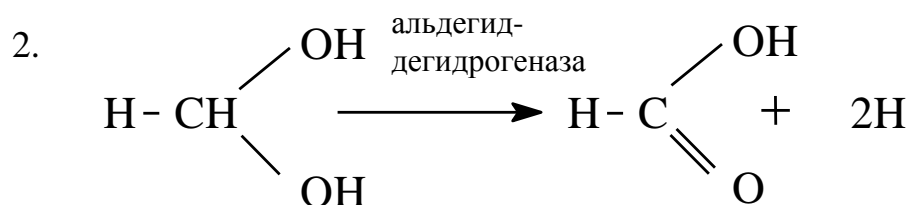
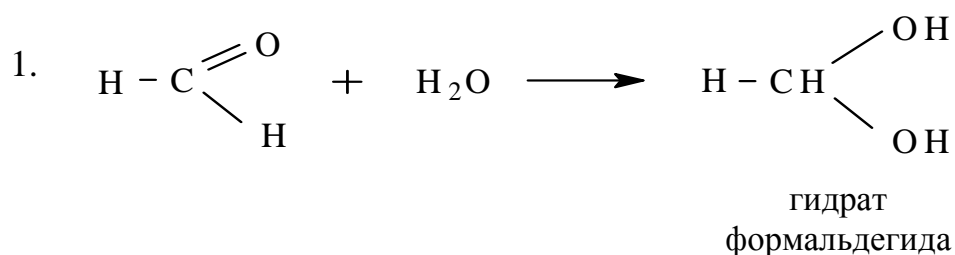


Схема 2.3. Химические превращения в ходе реакций с пробами молока

Если затем бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть на воздухе, раствор вновь приобретает синий цвет, так как восстановленная форма отдает водород кислороду воздуха с образованием перекиси водорода:

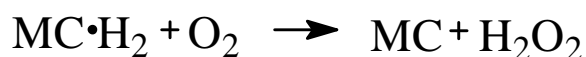


Схема 2.4. Возвращение цвета раствора метиленового синего

Результаты опыта заносят в табл. 2.2.

Таблица 2.2

Определение дегидрогеназы молока

№ пробы	Состав смеси				Результаты опыта
	Молоко, мл	Формалин, мл	Вода, мл	Метиленовая синь, мл	
1	5 (прокипяч.)	1	–	1	
2	5	1	–	1	
3	5	–	1	1	

В прокипяченной пробе и некипяченой пробе (без добавления формальдегида) обесцвечивания метиленового синего не происходит вследствие отсутствия активного фермента в первой и отсутствия субстрата во второй [10]. Результаты опыта заносят в табл. 2.2.

Лабораторная работа № 11

ОТКРЫТИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ В КАРТОФЕЛЕ

Цель работы:

Определить содержание пероксидазы в картофеле.

Реактивы, посуда, оборудование:

Сырой картофель, 1 %-й раствор пирогаллола, 2 %-й раствор перекиси водорода.

Выполнение работы

Пероксидаза катализирует окисление перекисью водорода различных полифенолов и ароматических аминов (схема 2.5):

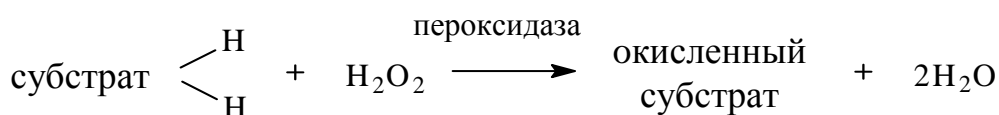


Схема 2.5. Каталитическое окисление полифенолов и ароматических аминов

Пероксидаза распространена в растительных тканях, особенно в хрене. В животном организме она почти не встречается, в небольших количествах ее можно обнаружить лишь в лейкоцитах и в молоке. Пероксидаза – сложный железосодержащий белок, простетическая группа которого близка к гему гемоглобина; железо в пероксидазе находится в трехвалентном состоянии.

Фермент обнаруживают при помощи гваяковой настойки (синяя окраска) или по появлению пурпурогаллина (желто-бурый осадок).

Картофель натирают на терке. Небольшое количество его с водой переносят в пробирку, добавляют 1–2 мл 1 %-го раствора пирогаллола и 1–2 капли 2 %-го раствора перекиси водорода. При выстаивании выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина. Образование пурпурогаллина происходит согласно нижеприведенной схеме 2.6:

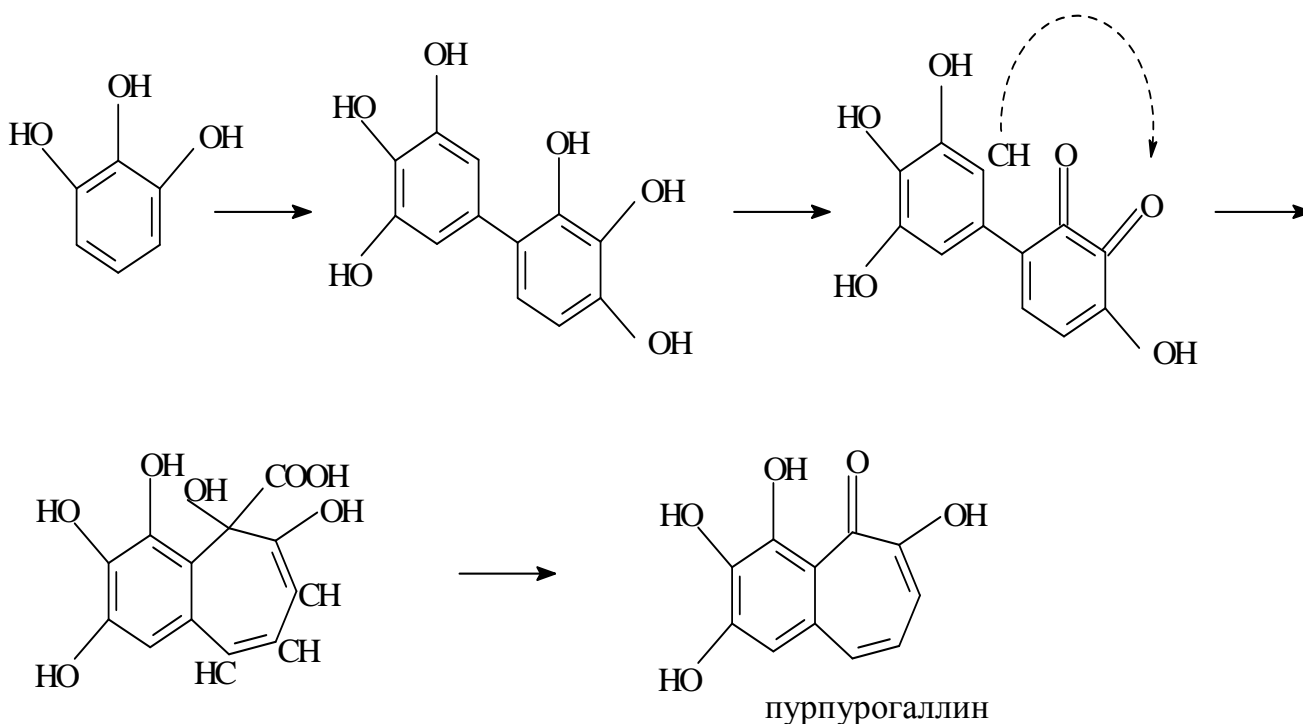


Схема 2.6. Образование пурпурогаллина

2.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Большинство существующих методов количественного определения ферментов основано на определении их активности. О присутствии фермента в растворе судят, как правило, по его действию на определенный субстрат (или на определенный тип химической связи в молекуле субстрата) в условиях, оптимальных для действия фермента.

Общим для всех методов является положение, согласно которому активность фермента, выражаемая в ферментных единицах, определяется количеством превращенного субстрата при определенных стандартных условиях: концентрации субстрата, температуры и рН среды. При определении активности фермента следует не забывать о том, что она резко меняется при различных условиях реакции.

Различные методы количественного определения активности ферментов основаны на следующих принципах:

1. Определяется наименьшее количество ферментного препарата, способного за определенный промежуток времени и при определенных условиях расщепить требуемое количество субстрата.
2. Определяется остаток субстрата после воздействия фермента и по полученным данным рассчитывается количество субстрата, расщепившегося под действием определенного количества фермента.
3. Активность фермента обозначают по времени, в течение которого определенная навеска ферментного препарата катализирует превращение определенной доли субстрата в стандартных условиях начальной концентрации субстрата, температуры и рН среды.

Согласно правилам, рекомендованным в 1961 г. комиссией по ферментам Международного биохимического союза, за единицу активности (*E*) любого фермента принимается такое его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата при оптимальных условиях.

Если субстратом служит белок, полисахарид или иная молекула, в которой фермент атакует более одной связи, то вместо «микромоль субстрата» следует говорить «микроэквивалент затронутых реакцией групп», т. е. за меру скорости реакции принимается число расщепленных пептидных или гликозидных связей, а не общее число молекул [7].

Лабораторная работа № 12

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЛАЗЫ ПО ВОЛЬГЕМУТУ

Цель работы:

Определить количественное содержание амилазы, методом, основанном на установлении предельного разбавления раствора амилазы, при котором еще происходит в определенных условиях расщепление определенного количества крахмала до эритродекстрина.

Реактивы, посуда, оборудование:

Ферментная вытяжка из плесневого порошка, 1 %-й раствор растворимого крахмала, 10 %-й раствор серной кислоты; 1 %-й раствор йода в йодистом калии, штатив, пробирки, термостат.

Выполнение работы

Готовят убывающий ряд разбавлений ферментной вытяжки из плесневых грибов (содержат амилазу), для чего в цилиндр вносят 1 мл вытяжки и 9 мл воды. Нумеруют 10 пробирок (см. табл. 2.3). Вносят в каждую пробирку по 1 мл воды. Далее 1 мл вытяжки, разбавленной в 10 раз, помещают в пробирку № 1. Жидкость хорошо перемешивают, затем 1 мл жидкости из пробирки № 1 переносят в пробирку № 2. Жидкость в пробирке № 2 так же тщательно перемешивают, и 1 мл жидкости из нее переносят в пробирку № 3 и т. д. Из последней (№ 10) пробирки 1 мл смеси выливают.

Опытные данные для определения активности амилазы

Показатели	№ пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Объем крахмала, мл										
Разведение вытяжки	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Окраска после добавления йода в йодистом калии										

В каждую пробирку вносят по 2 мл 0,1 %-го раствора растворимого крахмала. Все пробирки помещают в термостат при 39 °С на 30 мин; а затем в них прибавляют по 1 мл 10 %-й серной кислоты (для прекращения действия фермента) и 1–2 капли раствора йода в йодистом калии. Отмечают, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала, т.е. отмечают последнюю пробирку с желтой окраской, за которой следует пробирка с эритродекстринами, окрашенная в красновато-фиолетовый цвет (в ней содержится минимальное количество фермента).

Пример расчета

Допустим, полный гидролиз произошел в пробирке 4 (последняя пробирка с желтой окраской). Умножив 2 мл на величину разбавления (в данном случае она равна 160), получим амилазное число для данного раствора: $160 \cdot 2 = 320$, т.е. 1 мл неразбавленной ферментной вытяжки расщепляет за 30 мин при 37 °С 320 мл 0,1 %-го раствора крахмала [2].

Лабораторная работа № 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕКТИНЭСТЕРАЗЫ

Цель работы:

Определить пектинэстеразную активность (*ПЭАк*), характеризующую способность фермента катализировать гидролиз сложноэфирных связей в молекуле пектина.

Реактивы, посуда, оборудование:

Фермент, дистиллированная вода, стакан на 50 мл, мерная колба на 50 мл, колба на 300 мл, микробюретка, пипетка, часовое стекло, складчатый фильтр, аналитические весы, термостат, потенциометр.

Выполнение работы

Реакция протекает с образованием метилового спирта. При этом в пектине высвобождаются карбоксильные группы. Метод определения пектинэстеразной активности основан на определении скорости гидролиза сложноэфирных связей, устанавливаемой по количеству освобожденных карбоксильных групп, которое определяется ацидометрическим методом.

За единицу активности пектинэстеразы принято такое количество фермента, которое катализирует при 30 °С и оптимальном рН 1 мкэкв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин. Активность пектинэстеразы выражают числом единиц активности в 1 г (или 1 мл) исследуемого препарата.

Определяемая величина активности пектинэстеразы находится в непосредственной зависимости от степени этерификации пектина. Сравнимые результаты при работе с различными субстратами можно получить лишь при пересчете полученных данных на субстрат со 100 %-й степенью метоксилирования. При установленных параметрах определенное число гидролизованных сложноэфирных связей прямо пропорционально количеству фермента только в пределах 20 % гидролиза пектина [5].

Для анализа из средней пробы исследуемого препарата готовят основной ферментный раствор. При установлении активности препаратов типа ПХ или ГХ взвешивают 5 г пробы с точностью до 0,01 г, затем вводят ее в колбу на 200–300 мл. Добавляют с помощью пипетки 100 мл дистиллированной воды и настаивают в течение 1 ч при комнатной температуре, перемешивая через каждые 10 мин. Далее раствор фильтруют через бумажный складчатый фильтр.

При анализе препаратов типа П10Х или Г10Х на аналитических весах взвешивают 0,5 г измельченной исследуемой пробы с точностью до тысячных долей. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой в небольшом объеме дистиллированной воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки. Раствор фильтруют и используют в день приготовления.

Для приготовления инактивированного ферментного раствора 25 мл основного ферментного раствора помещают в колбу вместимостью 50 мл, закрывают пробкой с воздушным холодильником и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 1 ч.

В четыре стакана вместимостью 50 мл вводят по 20 мл субстрата, накрывают часовыми стеклами и ставят с промежутками в 10 мин в термостат при температуре $(30 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Через 15 мин в два стакана прибавляют по 10 мл раствора инактивированного фермента. Общий объем реакционной смеси 30 мл. При анализе более активного препарата берут не 10 мл, а меньшее количество его и в этом случае к реакционной смеси добавляют дистиллированной воды до 10 мл, которую вводят перед добавлением ферментного раствора. Через 1 ч после введения ферментного раствора пробу извлекают из термостата и при помощи потенциометра быстро титруют опытные и контрольные растворы из микробюретки 0,1 н. раствором гидроксида натрия.

Пектинэстеразную активность (ед./г, ед./мл) определяют:

$$P_{\text{эАк}} = \frac{100 (V_1 - V_2) 100k}{t_{\text{ак}}}$$

где 100 – число микроэквивалентов гидролизованных сложноэфирных связей, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия; V_1 и V_2 – количества 0,1 н. растворов гидроксида натрия, пошедших на титрование опытного и контрольного растворов, мл; $100k$ – степень этерификации пектина, на который ведут расчет, умноженная на поправочный коэффициент титра гидроксида натрия; t – продолжительность гидролиза, мин; a – количество ферментного препарата, взятого для анализа, г; x – степень этерификации пектина, использованного в качестве субстрата [4].

При расчете активности используют те определения, в которых степень гидролиза эфирных связей не превышает 10 %. Вследствие этого величину активности рассчитывают исходя из степени метоксилирования субстрата. Если степень метоксилирования пектина равна 90 %, масса групп $-\text{OCH}_3$ в пектине составляет 14,6 % от массы пектина.

Во взятых на анализ 20 мл 1 %-го раствора пектина содержится 20 мг указанного вещества. Следовательно, в этом же количестве будет находиться 29,2 мг групп $-\text{OCH}_3$, (т.е. $200 \cdot 14,6/100$). 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия соответствует 3,1 мг метоксильных групп (т.е. $31 \cdot 4/40$, где 31 – молекулярная масса группы $-\text{OCH}_3$). От общего числа групп $-\text{OCH}_3$ в реагирующей смеси это число составит 10,6 % (т.е. $3,1 \cdot 100 / 29,2$). Предельно допустимое количество 0,1 н. раствора гидроксида натрия, которое расходуется на титрование освободившихся в результате действия фермента карбоксильных групп $-\text{COOH}$ и соответствует 20 %-му гидролизу сложноэфирных связей, не должно превышать 1,88 мл (т.е. $1 \cdot 20 / 10,6$). В случае более высокой или более низкой степени этерификации количество щелочи соответственно возрастает или уменьшается. Когда разность между количеством щелочи, расходуемой на титрование опытного и контрольного растворов, менее 0,5 или более 1,88 мл, определение повторяют с большим или меньшим количеством фермента [12].

Лабораторная работа № 14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ОСАХАРИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ

Цель работы:

Определить осахаривающую активность, показывающую суммарную активность амилолитической ферментной системы исследуемого препарата при гидролизе крахмала до восстанавливающих сахаров – мальтозы или мальтозы в смеси с глюкозой.

Реактивы, посуда, оборудование:

Раствор крахмала (1 %-й), раствор гипосульфита (0,1 н.), раствор серной кислоты, раствор гидроксида натрия или калия (0,1 н.), раствор соляной кислоты (1 н.), ферментный раствор, колба объемом 300 мл, коническая колба объемом 50 мл, пипетка, бюретка, термостат.

Выполнение работы

За единицу осахаривающей активности (*ОС*) принято такое количество фермента, которое в стандартных условиях за 1 мин при 30 °С катализирует расщепление до восстанавливающих сахаров 1 мкэкв связей. *ОС* выражают числом указанных единиц в 1 г ферментного препарата.

Для определения осахаривающей активности проводят гидролиз 1 %-го раствора растворимого крахмала и йодометрически определяют количество образовавшихся сахаров.

Для анализа готовят 0,1 н. раствор йода (25 г х.ч. йодида калия растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды и добавляют 12,7 г х.ч. йода. После полного растворения йода объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой. Раствор хранят в темной склянке); 0,1 н. раствор гипосульфита (25 г х.ч. серноватистокислого натрия растворяют в дистиллированной воде, не содержащей углекислоты, и доводят объем раствора

до 1 л); раствор серной кислоты (к 4 объемам дистиллированной воды приливают 1 объем х.ч. концентрированной серной кислоты); 0,1 н. раствор гидроксида натрия или калия (4 г гидроксида натрия или 5,6 г гидроксида калия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 л); 1 н. раствор соляной кислоты (82,2 мл х.ч. концентрированной соляной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 1 л).

В конические колбы вместимостью 50 мл отмеривают пипеткой 20 мл 1 %-го раствора крахмала и ставят их в термостат при температуре 30 °С на 10 мин. По достижении содержимым температуры 30°С в колбы с крахмалом добавляют от 1 до 10 мл ферментного раствора и тщательно перемешивают. Общий объем реакционной смеси должен быть 30 мл, следовательно, если на определение берут 10 мл ферментного раствора, недостающий объем дополняют водой перед введением фермента.

Реакцию проводят в течение 10 мин после добавления фермента при 30 °С и затем действие фермента прекращают добавлением 2 мл 1 н. раствора соляной кислоты.

Для определения образовавшихся редуцирующих сахаров содержимое колбы после осахаривания количественно переводят, смывая водой, в колбу вместимостью 300–400 мл, добавляют пипеткой 20 мл 0,1 н. раствора йода и сразу же 60 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия или калия. Щелочь приливают по каплям при перемешивании, затем колбу накрывают часовым стеклом и оставляют на 15 мин в защищенном от света месте. Через 15 мин добавляют 2 мл серной кислоты и титруют выделившийся йод 0,1 н. раствором гипосульфита.

Одновременно ставят контрольный опыт с теми же количествами всех реагентов в колбе вместимостью 300–400 мл, только ферментный раствор вводят после добавления 2 мл 1 н. соляной кислоты (без выдержки на водяной бане). Разность между объемами 0,1 н. раствора гипосульфита, пошедшими на титрование контрольного и опытного растворов, должна быть 0,5–6,0 мл.

**Перевод миллилитров 0,1 н. раствора гипосульфита в единицы ОС
(в микроэквивалентах гликозидных связей)**

Объем 0,1 н. раствора Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	Единицы ОС	Объем 0,1 н. раствора Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	Единицы ОС	Объем 0,1 н. раствора Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	Единицы ОС
0,1	5,0	2,1	118,9	4,1	273,8
0,2	10,0	2,2	225,5	4,2	283,2
0,3	15,0	2,3	132,1	4,3	292,8
0,4	20,2	2,4	138,9	4,4	302,7
0,5	25,5	2,5	145,8	4,5	312,8
0,6	30,8	2,6	152,8	4,6	323,1
0,7	36,2	2,7	159,9	4,7	333,6
0,8	41,6	2,8	167,1	4,8	344,4
0,9	47,0	2,9	174,5	4,9	355,5
1,0	52,6	3,0	181,9	5,0	366,9
1,1	58,2	3,1	189,5	5,1	378,6
1,2	63,9	3,2	197,2	5,2	390,6
1,3	69,7	3,3	205,1	5,3	402,9
1,4	75,5	3,4	213,1	5,4	415,6
1,5	81,5	3,5	221,3	5,5	428,8
1,6	87,6	3,6	229,6	5,6	442,3
1,7	93,6	3,7	238,1	5,7	456,2
1,8	99,8	3,8	246,8	5,8	470,6
1,9	106,1	3,9	255,6	5,9	485,0
2,0	112,5	4,0	264,6	6,0	501,2

В случае, если таковая окажется ниже 0,5 или выше 6,0 мл, анализ повторяют с большим или меньшим количеством ферментного раствора (табл. 2.4).

Осахаривающую активность (ед./г) определяют:

$$ОС = e / ht,$$

где e – число единиц активности в микроэквивалентах гликозидных связей, найденное по табл. 1 в соответствии с результатами титрования (разность между объемами 0,1 н. раствора Na₂S₂O₃, пошедшими на титрование

контрольного и опытного растворов); h – навеска препарата, взятого для анализа, г; t – продолжительность гидролиза, мин.

Примечания

1. В связи с кислотоустойчивостью амилазы культур *Asp. awamori* и *Asp. niger* при нахождении ОС препаратов из этих культур в технику определения вносят некоторые изменения. Для прекращения реакции добавляют не 2 мл 1 н. раствора HCl, а 10 мл, соответственно изменяется и количество щелочи: сначала добавляют 8 мл 1 н. раствора NaOH, а затем 60 мл 0,1 н. раствора NaOH.
2. Определение осаживающей активности в культурах и препаратах *Bac. subtilis* проводят по приведенной методике, но раствор крахмала готовят не на ацетатном буферном растворе, а на фосфатном (рН 5,9) (в 100 мл раствора крахмала должно быть 10 мл фосфатного буферного раствора). Осаживающую активность рассчитывают, используя табл. 2.5 для перевода числа миллилитров 0,1 н. раствора гипосульфита в единицы активности [4].

Таблица 2.5

Перевод миллилитров 0,1 н. раствора гипосульфита в единицы ОС (в микроэквивалентах гликозидных связей)

Объем 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мл	Единицы ОС	Объем 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мл	Единицы ОС	Объем 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, мл	Единицы ОС
0,9	45,0	2,0	113,1	3,2	278,2
1,0	52,1	2,2	128,8	3,3	312,1
1,1	58,7	2,3	138,0	3,4	366,2
1,2	63,3	2,4	150,3	3,5	452,3
1,3	67,8	2,5	158,3	3,6	517,9
1,4	74,7	2,6	169,7	3,7	585,7
1,5	81,4	2,7	180,9	3,8	662,7
1,6	85,9	2,8	192,3	4,0	811,9
1,7	92,7	2,9	209,9	4,1	891,6
1,8	99,6	3,0	226,1	4,2	968,1
1,9	108,5	3,1	250,6	4,3	998,7

Лабораторная работа № 15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АсТ И АлТ

Цель работы:

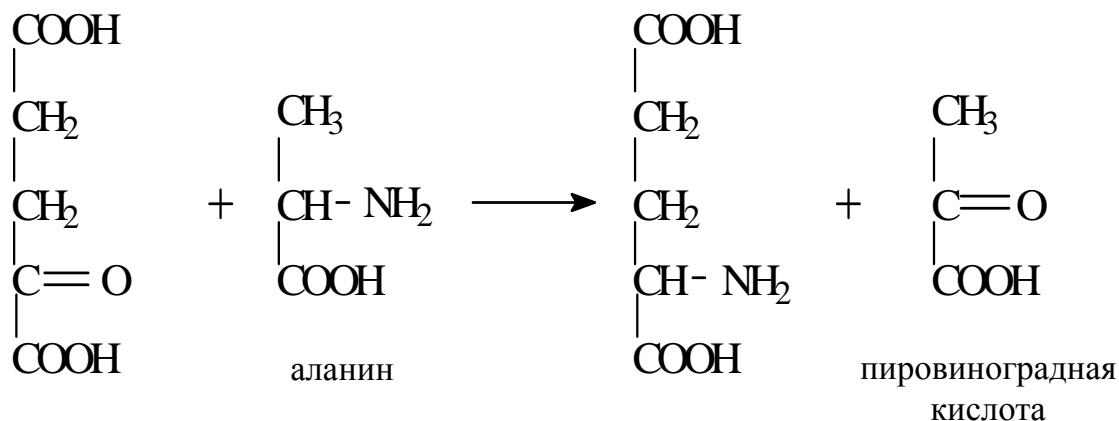
Определить активность аспаратаминотрансферазы (АсТ) и аланинаминотрансферазы (АлТ), обладающих большой каталитической активностью. Построить калибровочную кривую.

Реактивы, посуда, оборудование:

0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4) стандартный раствор пирувата натрия для калибровочного графика, субстратный раствор для определения активности АсТ, субстратный раствор для определения активности АлТ, раствор 2,4-ДНФГ, 0,4 н. NaOH, сыворотка, фотоэлектроколориметр.

Выполнение работы

При участии аминотрансфераз осуществляется перенос аминогрупп аминокислот на кетокислоты, то есть реакции переаминирования. Наибольшее значение имеет определение активности аспаратаминотрансферазы (АсТ) и аланинаминотрансферазы (АлТ), широко распространенных и обладающих большой каталитической активностью (см. схему 2.7):



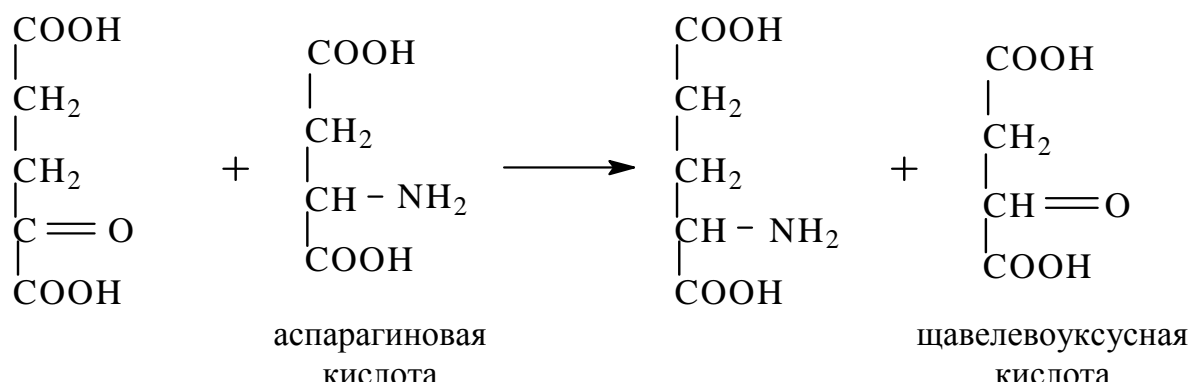


Схема 2.7. Реакции переаминирования

Реакции переаминирования с участием АлТ и АсТ

Существуют две основные группы методов определения активности аминотрансфераз – колориметрические и спектрофотометрические.

Спектрофотометрические методы основаны на использовании оптического теста Варбурга. В настоящее время они являются наиболее специфичными и точными, но необходимо применять труднодоступные и дорогостоящие реактивы. Колориметрические методы основаны на образовании окрашенного динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, которая образуется в результате реакции переаминирования. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

В результате переаминирования (при действии АлТ и АсТ) образуются пировиноградная и щавелевоуксусная кислоты соответственно. Последняя способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. После добавления кислого 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) ферментативный процесс останавливается и образуется гидразон пировиноградной кислоты, который в щелочной среде дает окрашивание. Интенсивность его пропорциональна количеству пирувата [13].

Определение АсТ

К 0,5 мл субстратного раствора прибавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют 60 мин при 37 °С. Затем добавляют 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ и выдерживают 20 мин. при комнатной температуре. После этого приливают 5 мл 0,4 н. NaOH, перемешивают и через 10 мин. измеряют оптическую плотность на ФЭК-е с зеленым или синим фильтром в 10-мм кюветах против контроля на реактивы. Контрольная проба на реактивы содержит все ингредиенты, только вместо сыворотки берут 0,1 мл дистиллированной воды. Кроме того, ставят контроль на сыворотку. Контрольные пробы на сыворотку готовят также как и опытные, но раствор 2,4-ДНФГ добавляют до инкубации.

Определение АлТ

К 0,5 мл субстратного раствор для определения активности АлТ прибавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют 60 мин при 37 °С. Дальнейший ход анализа такой же, как и при определении АсТ.

Расчет аминотрансферазной активности производят по калибровочному графику. Найденную по графику величину (количество мг пирувата) умножают на 10 и получают число единиц фермента в 1 мл раствора сыворотки.

Построение калибровочной кривой. В пробирки наливают 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 мл стандартного раствора пирувата натрия для калибровочного графика и доводят объем до 0,6 мл, добавляя соответственно 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30 мл дистиллированной воды. Затем в каждую из них добавляют по 0,5 мл 2,4-ДНФГ, перемешивают и через 20 мин вводят по 5 мл 0,4 н. NaOH.

Пробы колориметрируют в кюветах толщиной 10 мм (зеленый или синий фильтр) против контрольного образца, где взамен пирувата взята дистиллированная вода [10].

Лабораторная работа № 16

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕКСОКИНАЗЫ

Цель работы:

Определить активность гексокиназы методом, основанным на уменьшении количества фосфора АТФ, который легко гидролизуется при инкубации АТФ с глюкозой, гексокиназой и ионами магния.

Реактивы, посуда, оборудование:

Медиал-ацетатный буфер (рН 7,5), 0,056 М раствор хлористого магния, 0,05 М раствор АТФ (готовят перед началом работы), 0,11 М раствор глюкозы (готовят перед началом работы), 2 %-й раствор бикарбоната натрия (готовят перед началом работы), 5 %-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), раствор гексокиназы (содержащий 2–4 мг белка/ мл), пять пробирок.

Выполнение работы

Гексокиназа катализирует первую реакцию гликолиза:

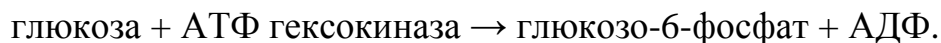


Схема 2.8. Реакция гликолиза в присутствии гексокиназы

В 1 н. растворе НСІ при температуре 100 °С АТФ гидролизуется в течение 10 мин при этом отщепляется кислото-лабильный фосфор, а количество глюкозо-6-фосфата остается неизменным. Количество фосфора, которое гексокиназа переносит с АТФ на глюкозу, то есть активность гексокиназы, определяют как разницу между содержанием кислото-лабильного фосфора АТФ до и после инкубации с гексокиназой.

Готовят смеси всех реактивов на холоду, учитывая, что каждая проба должна содержать 0,5 мл медиал-ацетатного буфера (рН 7,5); 0,25 мл 0,055 М раствора хлористого магния 0,3 мл 0,05М раствора АТФ; 0,25 мл 0,11 М

раствора глюкозы и 1,5 мл 2 %-го раствора бикарбоната натрия. Общий объем пробы равен 2,8 мл.

Для определения активности гексокиназы берут 5 пробирок. В две пробирки добавляют сначала по 2,85 мл 5 %-го раствора ТХУ, затем во все пять пробирок вносят по 2,8 мл смеси растворов: медиал-ацетатного буфера, хлористого магния, АТФ, глюкозы и бикарбоната натрия, и по 0,05 мл раствора гексокиназы. Пробы инкубируют в течение 15 мин при 37 °С затем в третью, четвертую и пятую пробирки добавляют по 2,85 мл 5 %-й раствора ТХУ. Оставляют стоять пробы в течение 10 мин. Образовавшийся осадок отделяют фильтрованием. Из каждого фильтрата отбирают по 1 мл раствора в две пробирки. В одну из пробирок добавляют 1 мл 2 н. раствора НСІ и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. В пробирку с другой порцией фильтрата добавляют 1 мл воды. Отбирают по 0,5 мл раствора из обеих пробирок и определяют количество фосфора. По разности в количестве фосфора до и после 10 мин гидролиза в 2 н. НСІ определяют содержание АТФ в пробе, а по разности между содержанием АТФ в опытных и контрольных пробах определяют активность гексокиназы в микромолях АТФ/мг белка [14].

Лабораторная работа № 17

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ СУБСТРАТА

ПО А.Н. БАХУ И А.И. ОПАРИНУ

Цель работы:

Определить активность каталазы субстрата (перекиси водорода) по А.Н. Баху и А.И. Опарину.

Реактивы, посуда, оборудование:

Свежий растительный материал, песок, 0,1 н. раствор марганцовокислого калия, 10 %-й раствор серной кислоты, углекислый кальций, 0,1 н. раствор

перекиси водорода, вытяжка каталазы, бюретки на 50 мл, пипетки на 20–25 мл, мерный цилиндр на 10–25 мл, коническая колба на 200 мл, ступка с пестиком.

Выполнение работы

Приготовление вытяжки растительного материала

Свежий растительный материал (морковь, картофель) в количестве 2 г растирают с песком в ступке, добавляя 2–3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют углекислый кальций. После растирания всю массу переносят в мерную колбу и доливают водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30–60 мин, после чего ее фильтруют.

К 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода добавляют 20 мл вытяжки фермента (оба раствора отмеряют пипетками). Через 30 мин действие фермента прекращают прибавлением 5 мл 10 %-го раствора серной кислоты и титруют смесь 0,1 н. раствором марганцовокислого калия (до образования устойчивого в течение 1 мин розового окрашивания). Отмечают количество миллилитров раствора марганцовокислого калия, израсходованного на титрование оставшейся неразложившейся перекиси водорода. Одновременно ставится контрольный опыт с инактивированным нагреванием в кипящей водяной бане (5 мин) ферментным раствором (20 мл). К этому раствору после нагревания и последующего охлаждения добавляют 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода. Смесь оставляют стоять на 30 мин, после чего добавляют 5 мл 10 %-го раствора серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором марганцовокислого калия. Отмечают количество миллилитров раствора марганцовокислого калия, израсходованного на титрование.

Расчет количества перекиси водорода, разложившейся ферментом, ведется по разности опытного и контрольного определения. Ход процесса определяется схемой 2.9:

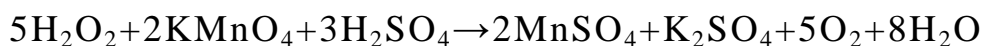


Схема 2.9. Химизм процессов в присутствии марганцовокислого калия

1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг перекиси водорода, поскольку:

$$Э \cdot n / 1000 = 17 \cdot 0,1 / 1000 = 0,0017 \text{ г, или } 1,7 \text{ мг.}$$

Пример расчета

Приготовлена вытяжка каталазы из 1,25 г моркови в 100 мл. На титрование опытной пробы (20 мл вытяжки + 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода) затрачено 15,5 мл, а на контрольную — 30,2 мл 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложенной перекиси в пробе отвечает: $30,2 - 15,5 = 14,7$ (мл) 0,1 н. раствора перманганата калия, т.е. $14,7 \cdot 1,7 \text{ мг} = 24,99 \text{ мг}$ перекиси водорода. Количество перекиси водорода, которое может быть разложено каталазой в 1 г моркови, равно $24,99 \cdot 100 / 20 \cdot 1,25 = 99,96 \text{ мг}$.

Активность каталазы, определяемая количеством разложенной перекиси водорода, обычно пересчитывают на 1 г абсолютно сухого вещества, из которого была получена вытяжка фермента [4].

Лабораторная работа № 18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ В ЕДИНИЦАХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Цель работы:

Получить кристаллическую уреазу и определить активность фермента, учитывая величину отрезка времени, в течение которого происходят определенные химические превращения. Найденная величина (показатель времени) будет обратно пропорциональна активности фермента, или числу единиц ферментативного действия, т.е. препараты, имеющие вдвое меньшую

активность, будут требовать вдвое больше времени для проведения того же объема химических превращений.

Реактивы, посуда, оборудование:

Обезжиренная мука из бобов сои, 31,6 %-й раствор ацетона, 0,5 М цитратный буфер (рН 6), сплавленный хлористый кальций, натронная известь, воронка, стаканы,

Ферментный раствор (1 мл раствора содержит 0,01 мг уреазы), 2 %-й раствор мочевины в фосфатном буфере (рН 7,0), 0,01 н. раствор серной кислоты, 0,01 н. раствор едкого натра, смешанный индикатор, чашки Конвея, пипетки на 2 мл, микробюретки.

Выполнение работы

Получение кристаллической уреазы

Обезжиренную муку из бобов сои быстро экстрагируют пятикратным объемом 31,6 %-ного ацетона (при 22–28 °С) при размешивании и фильтруют на складчатом фильтре на холоде. Фильтрат оставляют на ночь в холодильнике. На следующий день из фильтрата выпадает осадок, состоящий из кристаллов уреазы, который отделяют центрифугированием. Полученный кристаллический осадок растворяют в 3 мл воды, считая на каждые 100 г муки, взятой для опыта. Раствор уреазы далее центрифугируют с большой скоростью на холоде в течение 1–2 ч или фильтруют, также на холоде, до прозрачного состояния. Сливают оставшийся раствор и на каждые 20 мл его добавляют по 1 мл 0,5 М цитратного буфера (рН 6). Затем приливают при размешивании 0,2 объема ацетона и смесь помещают в холодильник. Кристаллизация заканчивается в течение 30 мин. Ацетон следует предварительно перегнать над сплавленным CaCl_2 и натронной известью, вода должна быть также перегнана в стекле. Кристаллический препарат хранится в темной склянке в холодильнике (в склянку положить кристаллик тимола).

Определение активности уреазы

Метод основан на определении количества аммиака, образующегося в результате действия уреазы на мочевины. Аммиак поглощается определенным количеством титрованной серной кислоты, а избыток ее оттитровывают раствором щелочи. Определение проводится в чашках Конвея (рис. 2.1).

Чашка Конвея состоит из двух камер: наружной и внутренней. Диаметр наружной камеры равен 7–8 см, внутренней – 3 см. Высота наружной камеры – 1,5 см, внутренней – 1 см. Чашка плотно закрывается хорошо шлифованной к внешней камере стеклянной крышкой. Шлиф крышки следует смазать вазелином.

Во внутреннюю камеру чашки Конвея наливают из микробюретки 2 мл 0,01н. раствора серной кислоты. Добавляют к серной кислоте каплю смешанного индикатора, имеющего в кислой среде (рН = 4,4) фиолетовую окраску, а при рН, равном 6,2, — зеленую. Во внешнюю камеру одной из чашек (опытная проба) вносят 1 мл раствора уреазы, в другую (контрольная проба) — столько же прокипяченного раствора фермента. В обе чашки наливают затем по 5 мл 2 %-ного раствора мочевины (во внешнюю камеру). Содержимое наружных камер тщательно и быстро перемешивают и чашки тотчас закрывают крышками и ставят на 30–40 мин. в термостат при 37 °С. Сначала всю указанную процедуру проделывают с опытной пробой, а затем – с контрольной.

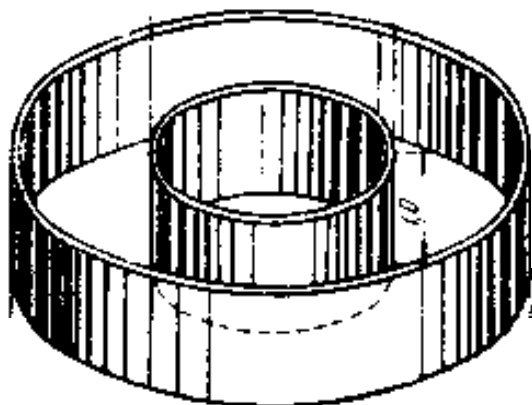


Рис.2.1. Чашка Конвея

ной. По истечении указанного времени снимают крышки с чашек и титруют избыток кислоты во внутренней камере 0,01 н. раствором щелочи из микробюретки до зеленого цвета. Единицей указанного действия считают такое количество фермента, которое способно образовать из мочевины за 1 мин при рН, равным 7,0, 1 мг азота аммиака. Действие уреазы на мочевины в буферном растворе представляет собой реакцию нулевого порядка:

$$x = k \tau,$$

где x – количество расщепленной мочевины, τ – время действия фермента, k – константа. Если количество расщепленной мочевины (или образовавшегося азота аммиака) пропорционально времени действия, то количество единиц уреазы (мг) можно определить по формуле:

$$C = (A - B) \cdot 0,14 / \tau,$$

где A – количество 0,01 н. раствора щелочи, израсходованной на титрование контрольной пробы; B – количество 0,01 н. раствора щелочи, затраченной на титрование опытной пробы; $(A - B)$ – количество 0,01 н. раствора серной кислоты, связанной аммиаком (1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты связывает 0,14 мг азота); τ – время, на протяжении которого действовал фермент. Зная содержание кристаллической уреазы во взятом количестве ферментного раствора (1 мл), можно рассчитать уреазную активность 1 мг препарата, т.е. активность уреазы равна $C/0,01$ (единиц) [14].

2.3. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Ферменты как биологические катализаторы характеризуются признаками как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов, а именно они проявляют обычно свое каталитическое действие в водных растворах, но ввиду большого молекулярного веса (от десятков до сотен тысяч) в растворе ферментов существует микроповерхность раздела, характерная для гетерогенных катализаторов. Каталитическая активность ферментов определяется наличием на их поверхности особых участков — активных центров (участков с определенным сочетанием аминокислот в третичной структуре молекулы), обладающих специфической реакционной способностью. Многие ферменты, например ферменты переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях, ферменты, участвующие в биосинтезе белка, функционируют, будучи «вмонтированными» в сравнительно жесткие структурные компоненты клетки, обладающие макроповерхностью раздела (митохондрии, рибосомы и т.п.). Наряду с общими признаками как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов ферменты обладают рядом особых свойств, отличающих их от катализаторов небиологической природы.

Главные отличия ферментов состоят в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия. Причины этого лежат в особенностях строения и механизма действия ферментов. Как известно, скорость реакции зависит от величины энергетического барьера (энергии активации), который должен быть преодолен реагирующими веществами. Ферменты, как и катализаторы вообще, влияют на энергию активации, снижая ее, однако в случае ферментов, как правило, достигается относительно большее снижение энергии активации. Это дает огромное возрастание скорости реакции при действии ферментов.

Характерной особенностью ферментативного катализа является его мультиплетность (полифункциональность), т.е. одновременное участие в реакции нескольких (обычно более трех) группировок активного центра и

соответственно субстратов. Согласованность каталитического действия всех необходимых групп активного центра достигается в ферментах благодаря упорядоченному их расположению в белковой молекуле. Наличие в активном центре фермента на определенном расстоянии друг от друга группировок, характеризующихся электронодонорными и электроноакцепторными свойствами, приводит к тому, что при взаимодействии с соответствующими группировками субстратов образуются стабилизированные комплексы, и каталитическая реакция происходит внутримолекулярно. Такие реакции, естественно, требуют значительно меньшей энергии активации [8].

Лабораторная работа № 19

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Цель работы:

Определить виды специфичности и то, как они проявляются.

Реактивы, посуда, оборудование:

Разбавленный раствор слюны (1:10), 0,5 %-й раствор крахмала, раствор дрожжевой сахаразы, 2 %-й раствор тростникового сахара, 1%-й раствор сернокислой меди, 10 %-й раствор едкого натра, раствор йода в йодистом калии, пипетки на 2 мл, термометр на 100 °С.

Мышечная кашица, 3 %-й нейтрализованный раствор янтарной кислоты, 3%-ный нейтрализованный раствор яблочной кислоты, 0,02 %-ный раствор метиленовой сини, 0,9 %-й раствор хлористого натрия, 10 %-ный раствор едкого натра, пипетки на 1 мл, термометр.

Соевая мука, раствор дрожжевой сахаразы, 1 %-й раствор сахарозы, 1 %-й раствор рафинозы, 5 %-й раствор мочевины, 5 %-й раствор ацетамида, лакмусовая бумага, реактив Селиванова (0,5 г резорцина в 100 мл соляной кислоты 1:1), водяная баня, пипетки на 5 мл, термометр на 100 °С.

Выполнение работы

Специфичность действия ферментов выражается в том, что каждый фермент действует лишь на определенный субстрат или на определенный тип химической связи в молекуле.

Если связь или химическая группировка, на которую воздействует данный фермент, встречается в различных соединениях, то все эти соединения будут изменяться под влиянием одного и того же фермента (групповая специфичность). Например, фермент сахараза разрывает β -гликозидную связь и в молекуле сахарозы, и в молекуле рафинозы. Напротив, некоторые ферменты обладают строго абсолютной специфичностью (например, уреазы). Специфичность действия ферментов выражается и в том, что при наличии нескольких стереоизомеров фермент действует только на один из них (стереоспецифичность). Так, фермент глюкозооксидаза окисляет только лишь β -D-глюкозу, превращая ее в δ -глюконолактон.

Специфичность действия объясняют в настоящее время строгой комплементарностью структуры активного центра фермента структуре субстрата, т.е. фермент оказывается активным катализатором химических превращений лишь таких веществ, в структуре которых имеются определенные по электронной и стерической характеристике функциональные группы, расположенные в пространстве строго определенным образом. Комплементарность – динамическое свойство активных центров фермента, так как именно при сближении субстрата с активным центром фермента вследствие их взаимного влияния происходит трансформация структуры обеих реагирующих молекул, благодаря чему достигается наибольший каталитический эффект.

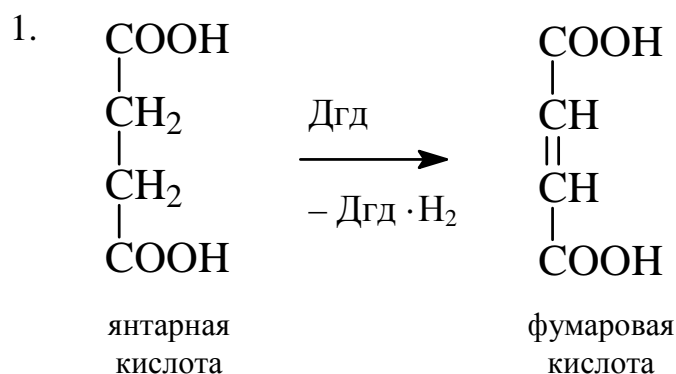
Амилаза и сахараза

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки с номерами 1 и 2 наливают по 2 мл раствора крахмала; в пробирки с номерами 3 и 4 – по 2 мл раствора сахарозы.

Затем в пробирки с номерами 1 и 3 вносят по 0,5 мл слюны, а в пробирки с номерами 2 и 4 – по 0,5 мл раствора дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин. в водяную баню, нагретую до 38–40 °С. После охлаждения проводят реакции с йодом и на восстановление гидрата окиси меди.

Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа (флавопротеид, обозначенный далее Дгд) окисляет янтарную кислоту в фумаровую путем отнятия от первой двух атомов водорода. Роль промежуточного акцептора водорода в нашем опыте играет метиленовая синь, которая далее отдает водород кислороду воздуха. Ход процесса можно выразить схемой 2.10:



2.

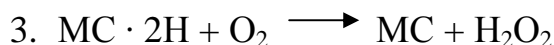
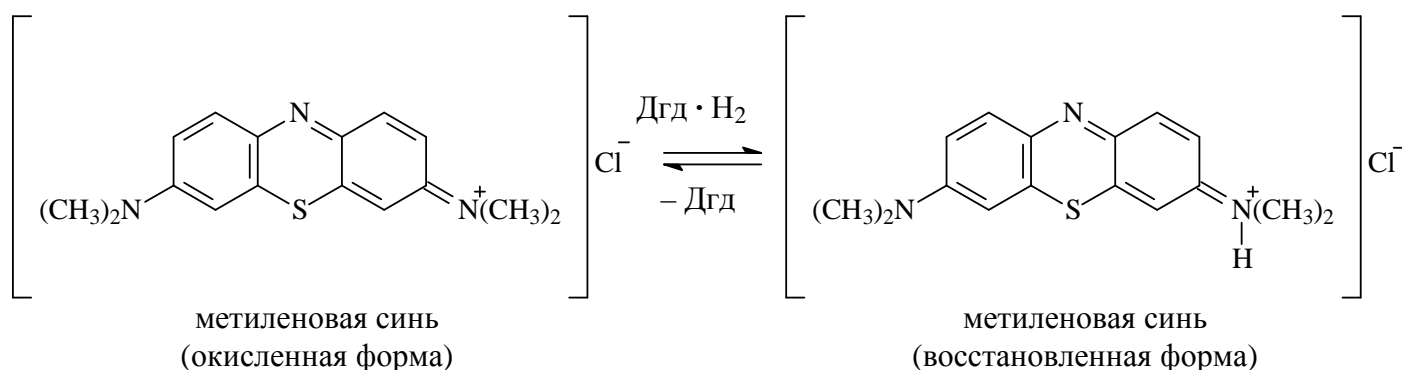


Схема 2.10. Реакция окисления янтарной кислоты

Для получения сукцинатдегидрогеназы мясо (лучше от молодых животных) пропускают через мясорубку и многократно промывают при помешивании водой до тех пор, пока промывные воды не перестанут окрашиваться в розовый цвет от присутствующей в мышцах крови. Промытую и отжатую мышечную кашицу настаивают в течение часа в 0,9 %-м растворе поваренной соли.

В три пронумерованные пробирки помещают по 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую – около 0,5 мл 3 %-го раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10 %-м раствором едкого натра, во вторую пробирку наливают 0,5 мл нейтрализованного 3 %-го раствора яблочной кислоты и в третью пробирку – 0,5 мл воды. В каждую пробирку добавляют по 2–3 капли 0,02 %-го раствора метиленовой сини (до окрашивания смеси в голубой цвет). Содержимое каждой пробирки перемешивают, и пробирки одновременно помещают в водяную баню при температуре 37–40 °С. Через 5–10 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других. Первую пробирку после обесцвечивания сильно взбалтывают, появляется вновь синее окрашивание вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини (восстановленной формы – $MS \cdot H_2$) кислородом воздуха.

Групповая и абсолютная специфичность

1. Групповая специфичность действия сахаразы (инвертазы).
Наливают в одну пробирку 2 мл 1 %-го раствора сахарозы, а в другую – 2 мл 1 %-ного раствора рафинозы. Добавляют в обе пробирки по 1 мл раствора дрожжевой сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их на 5–10 мин. в водяную баню при 35–40 °С. После нагревания исследуют содержимое обеих пробирок на присутствие восстанавливающих углеводов, которые при нагревании с фелинговой жидкостью легко окисляются с образованием красного осадка закиси меди. В обе пробирки наливают по 3 мл фелинговой жидкости, хорошо перемешивают и смесь нагревают до кипения (см. схемы. 2.11, 2.12).

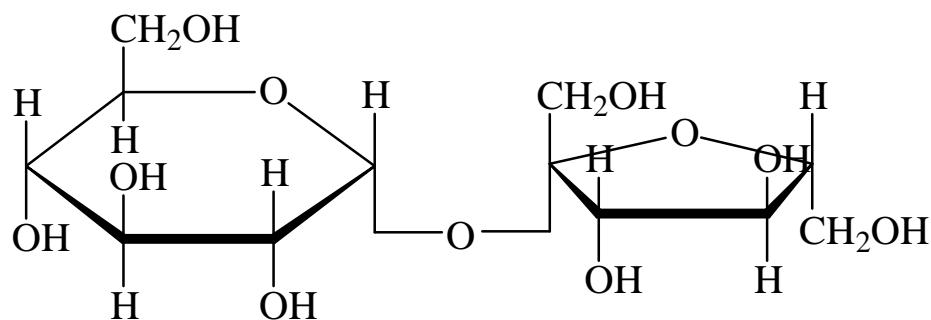


Схема 2.11. α -D-глюкопиранозидо-1-2- β -D-фруктофуранозид (сахароза)

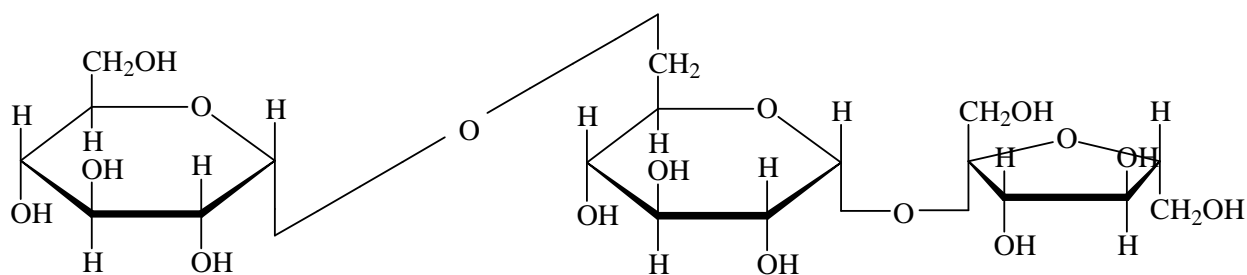


Схема 2.12. α -D-галактопиранозидо-1-6'- α -D-глюкопиранозидо-1''-2''- β -D-фруктофуранозид (рафиноза)

Фермент сахараза (β -фруктофуранозидаза) разрывает кислородный мостик между глюкозой и фруктозой (β -гликозидную связь) и в сахарозе, и в рафинозе. Образующиеся углеводы дают при окислении фелинговой жидкостью характерный красный осадок закиси меди.

2. Абсолютная специфичность уреазы. Уреаза (карбамид-амидогидролаза) обладает высокой специфичностью, субстратом для нее является мочевины (карбамид) (схема 2.13):

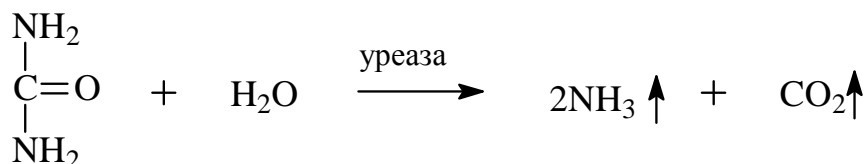


Схема 2.13. Специфичное действие уреазы

В одну пробирку наливают 5 %-й раствор мочевины, а в другую – 5 %-й раствор ацетамида. Добавляют при помешивании в каждую пробирку около 1 г соевой муки. В отверстие пробирок вставляют полоску влажной красной лакмусовой бумажки и оставляют пробирки на некоторое время в штативе.

Через несколько минут лакмусовая бумажка в пробирке с мочевиной синееет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху. В пробирке с ацетамидом изменения окраски лакмусовой бумажки не наблюдается, что подтверждает высокую специфичность действия уреазы [12].

Лабораторная работа № 20

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Цель работы:

Узнать, как влияет температура на активность амилазы слюны, и сделать выводы:

- об оптимальной температуре действия фермента;
- об изменении активности фермента в результате кипячения его раствора.

Реактивы, посуда, оборудование:

1 %-й раствор крахмала, фильтрованная и разбавленная (1:10) слюна, раствор йода в йодистом калии, 10 %-ный раствор едкого натра, 1 %-й раствор сернокислой меди, водяная баня, пипетки на 1 и 2 мл, стеклянные палочки, фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Скорость ферментативных реакций, как и большинства любых химических процессов, увеличивается при нагревании. Однако, в отличие от неферментативных реакций, это увеличение скорости в случае ферментов наблюдается в сравнительно узком температурном интервале. По достижении некоторой температуры, характерной для каждого фермента, скорость реакции достигает максимального значения, после чего с повышением температуры падает. Температура, соответствующая максимальной скорости, называется оптимальной (t_{opt}).

Для большинства ферментов, выделенных от теплокровных животных, такой оптимальной температурой является 37–40 °С. Уменьшение скорости ферментативной реакции при температурах, более высоких, чем оптимальная, объясняется термолабильностью ферментов, т.е. чувствительностью к действию высокой температуры. Как правило, ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70 °С. Степень инактивации фермента зависит не только от температуры, но и от длительности теплового воздействия. Уменьшение скорости ферментативной реакции при повышении температуры объясняется неспецифической тепловой денатурацией белковой молекулы фермента и потерей вследствие этого каталитической активности.

При более низких температурах скорость ферментативного катализа замедляется, падая при 0 °С до очень малой величины.

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 0,5 %-го раствора крахмала. Пробирку с номером 1 помещают в кипящую баню; пробирку № 2 – в баню при 40 °С; пробирку № 3 оставляют на рабочем столе (при комнатной температуре); пробирку № 4 помещают в лед. В течение 10 мин содержимое пробирок принимает температуру окружающей среды. Далее во все пробирки добавляют по 0,5 мл слюны (разбавленной в 10 раз), перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза осуществляют с помощью йодной реакции. Для этого наносят на

Таблица 2.6

Влияние температуры на активность фермента

№ пробирки	Количество 0,5 %-го раствора крахмала, мл	Объем слюны (1:10), мл	Температура, °С	Продолжительность опыта	Реакция с йодом
1	2	0,5	100		
2	2	0,5	40		
3	2	0,5	15–20		
4	2	0,5	0		

фарфоровую пластинку несколько капель раствора йода в йодистом калии и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из каждой пробирки, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 8 мин. По изменению окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза. Схема опыта приведена в табл. 2.6 [11].

Лабораторная работа № 21

ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Цель работы:

Определить, как влияет pH на активность амилазы слюны, и ответить на вопрос: при каком значении pH активность амилазы слюны наивысшая?

Реактивы, посуда, оборудование:

$1/15$ М раствор фосфатного буфера, 0,5 %-й раствор крахмала, раствор йода в йодистом калии, бюретка на 50 мл, пипетки на 2 и 5 мл, водяная баня, термометр на 100 °С, фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Для получения среды с определенным значением pH удобно воспользоваться фосфатным буфером. В пять пробирок наливают по 5 мл фосфатной буферной смеси, составленной из различных количеств растворов $1/15$ М двухзамещенного фосфата натрия и $1/15$ М однозамещенного фосфата калия со следующими значениями pH: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04. В каждую пробирку добавляют по 1 мл 0,5 %-ного раствора крахмала и по 1 мл разбавленной (1:15) слюны. Далее все пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 42 °С. Спустя 3–5 мин из всех пробирок наносят по капле смеси на фарфоровую пластинку, на которую предварительно был нанесен реактив Люголя (раствор йода в йодистом калии). Если наблюдается различие по окрас-

Результаты исследования влияния pH на активность амилазы

Показатели	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
pH буферной смеси					
Окраска с йодом					
Оптимум pH					

ке с йодом в испытуемых пробах, то пробирки вынимают из бани, охлаждают и добавляют в каждую пробирку по 3–4 капли раствора йода в йодистом калии. По окраске с йодом определяют степень расщепления крахмала амилазой слюны. При отсутствии заметного различия в окраске с кодом проб на фарфоровой пластинке продолжают нагревание пробирок в водяной бане еще 10–15 мин, а затем вновь испытывают пробы на степень расщепления крахмала. Результаты исследования целесообразно представить в виде табл. 2.7 [4].

Лабораторная работа № 22**ДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ НА ФЕРМЕНТЫ****Цель работы:**

Определить присутствие в растворе ряда химических соединений, одни из которых повышают активность ферментов (активаторы), другие, напротив, действуют на них угнетающим образом (ингибиторы, или парализаторы).

Реактивы, посуда, оборудование:

Слюна профильтрованная, 0,5 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор поваренной соли, 1 %-й раствор сернистой меди, раствор йода в йодистом калии, бюретка на 50 мл, пипетки на 2 мл и 1 мл, водяная баня, термометр на 100 °С.

Кристаллическая поваренная соль, кристаллический йодистый натрий, порошок бертолетовой соли, картофель (или яблоко).

Мышечная каша, 1 %-й раствор малоновой кислоты (предварительно нейтрализованный щелочью), 1 %-й раствор янтарной кислоты, 1 %-й раствор метиленовой сини, вазелиновое масло, водяная баня, пипетки на 1 мл.

Выполнение работы

Действие активаторов и парализаторов на амилазу слюны

В качестве активатора амилазы слюны используют 1 %-й раствор хлористого натрия; в качестве парализатора – 1 %-й раствор сернокислой меди. Приготовьте три ряда пронумерованных пробирок, по 10 в каждом ряду. Во все пробирки следует влить из бюретки по 1 мл воды; затем в первые пробирки каждого ряда – по 1 мл фильтрованной неразбавленной слюны. Содержимое пробирки хорошо перемешать. Далее 1 мл смеси из пробирки 1 (в каждом ряду) переносят в пробирку № 2, перемешивают, снова набирают 1 мл смеси и переносят в пробирку № 3 и т. д. вплоть до пробирки № 10, из которой после перемешивания выливают 1 мл жидкости (степень разбавления возрастает).

Во все пробирки I ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд); в пробирки II ряда – по 1 мл раствора хлористого натрия и в пробирки III ряда – по 1 мл раствора сернокислой меди. Далее во все пробирки наливают из бюретки по 2 мл раствора крахмала в следующем порядке: сначала – в первые номера всех рядов, затем – во вторые и т.д. Содержимое перемешивают и ставят в водяную баню на 15 мин при 38–40 °С.

Затем все пробирки вынимают, охлаждают и ставят в штатив по порядку, после чего в каждую из них добавляют по капле раствора йода, перемешивают, отмечают в каждом ряду последнюю пробирку, в которой отсутствует реакция йода на крахмал, и вычисляют в ней концентрацию слюны. Активность фермента обратно пропорциональна количеству слюны, при котором еще наблюдается расщепление крахмала. Схема опытов представлена в табл. 2.8.

Схема проведения испытаний

№ опыта	Активатор	Парализатор	Контроль	№ последней неокрашенной пробирки	Количество слюны в последней неокрашенной пробирке, мл
1	–	–	H ₂ O		
2	–	–	–		
3	NaCl	CuSO ₄	–		

Ингибирующее действие иона хлора на дегидрогеназы картофеля

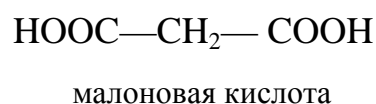
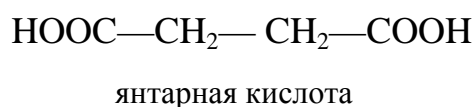
Две картофелины разрезают пополам. Одну половину оставляют для контроля; вторую – посыпают поваренной солью; третью – йодистым натрием; четвертую – бертолетовой солью. Оставляют материал на воздухе на 15–20 мин. За это время срезы трех половинок темнеют, а срез с поваренной солью остается без изменения. Объясните результаты опыта.

Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности

В три пронумерованные пробирки помещают 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую – 0,4 мл воды; во вторую – 0,2 мл 1 %-го раствора малоновой кислоты и 0,2 мл воды и в третью – 0,4 мл 1 %-го раствора малоновой кислоты. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 1 %-го раствора янтарной кислоты, по 2–3 капли 1 %-го раствора метиленовой сини и после перемешивания 3–4 капли вазелинового масла.

Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через 3–5 мин. наблюдается почти полное исчезновение голубой окраски в пробирке № 1; некоторое уменьшение интенсивности окраски происходит во второй пробирке; в пробирке № 3 – голубая окраска сохраняется полностью [14].

Сукцинатдегидрогеназная активность снижается в присутствии малоновой кислоты, являющейся структурным аналогом янтарной кислоты:



2.4. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Лабораторная работа № 23

ПЕРЕАМИНИРОВАНИЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТОЙ

Цель работы:

Отметить убыль глутаминовой кислоты в опыте по сравнению с контролем и появление аланина. Составить схему реакции переаминирования между пировиноградной кислотой и α -глутаминовой кислотой.

Реактивы, посуда, оборудование:

Пипетка на 1 мл с делениями, водяная баня, воронка с фильтрами, глутаминовая кислота (1 %-й раствор, нейтрализованный едким калием), пировиноградная кислота (1 %-й раствор, нейтрализованный едким калием), 0,1 %-й раствор кислого углекислого калий, монобромуксусная кислота (0,025 %-й раствор, нейтрализованный едким калием), мышечная кашица, реактивы, необходимые для распределительной хроматографии на бумаге, 2 %-й раствор уксусной кислоты.

Выполнение работы

В две пробирки помещают по 0,5 мл раствора глутаминовой кислоты, 0,5 мл раствора пировиноградной кислоты, 1 мл раствора двууглекислого калия и 0,25 мл раствора монобромуксусной кислоты. Далее в обе пробирки помещают по 0,5 г свежей мышечной кашицы. Вторую (контрольную) пробирку сейчас же нагревают до кипения и осторожно кипятят в течение 1–2 мин.

Обе пробирки закрывают пробками и ставят в водяную баню при 38 °С на 1,5–2 ч, многократно перемешивая содержимое. Через 1,5–2 ч вынимают пробирки из бани, добавляют в каждую по 0,25 мл уксусной кислоты и кипятят до полного свертывания белков. Содержимое каждой пробирки

отфильтровывают в чистые пробирки (сохранить ту же нумерацию). Закрывают пробирки пробками и оставляют их до следующего занятия в холодном месте. На следующем занятии оба раствора хроматографируют.

На хроматограмме должно быть три полосы: одна – для испытуемого раствора, другая – для контрольной пробы и третья для стандартной смеси аминокислот. На каждую полосу следует нанести до 0,015–0,018 г раствора. Хроматограмму помещают в растворитель, составленный из бутанола, уксусной кислоты и воды (300:60:140). Через 2 ч ее вынимают, сушат и проявляют нингидрином [6].

Лабораторная работа № 24

РАСЩЕПЛЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА ФЕРМЕНТОМ АЛЬДОЛАЗОЙ

Цель работы:

Провести расщепление фруктозо-1,6-дифосфата.

Реактивы, посуда, оборудование:

Коллодийный мешочек, стаканы на 200 мл, натриевая соль фруктозодифосфата, 0,1 н. раствор соляной кислоты, 0,1 н. раствор едкого натра (или едкого калия), насыщенный раствор сернокислого натрия, 0,1 %-й раствор бромтимолового синего, реактивы для определения фосфотриоз, реактивы для определения фруктозодифосфата, 5 %-й раствор трихлоруксусной кислоты.

2 н. раствор едкого натра, 2 н. раствор соляной или серной кислоты, 0,1 н. раствор соляной кислоты, магниезиальная смесь, 10 %-й раствор аммиака, молибденовокислый аммоний (2,5 %-й раствор в 5 н. растворе серной кислоты), раствор эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота), стандартный

раствор фосфата, 0,5 %-й спиртовой раствор фенолфталеина, мерные колбочки на 10 мл, пробирки.

Выполнение работы

Процесс расщепления фруктозо-1,6-дифосфата на две триозы является важнейшим этапом при дихотомическом распаде углеводов. Он происходит по схеме 2.14:

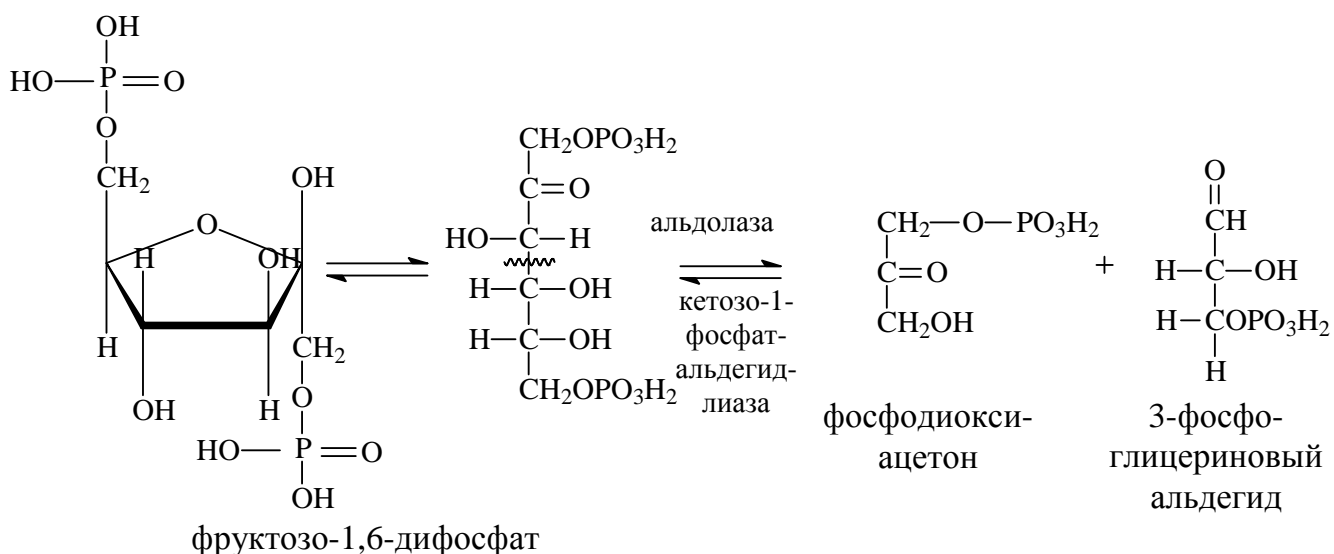


Схема 2.14. Реакция расщепления фруктозо-1,6-дифосфата ферментом альдозазой

Приготовить диализированный экстракт из мышц животного можно следующим образом: мышцы убитого животного охлаждают, помещая их в лед. Тщательно измельченные ножницами или пропущенные через мясорубку мышцы экстрагируют двойным объемом охлажденной до 0 °С дистиллированной воды [8].

Экстракцию проводят на холоде в течение 20–30 мин при частом помешивании. Затем мышечную ткань отжимают через двойной слой марли и экстракт центрифугируют (центрифугат хранят до опыта на льду). Часть экстракта помещают в коллодийный мешочек, который погружают в стакан с 0,5 %-м раствором хлористого калия и подвергают диализу в течение 2–3 ч. Далее содержимое мешочка выливают в стакан и хранят до опыта на льду.

Состав проб, мл

№ пробы	Диализированный экстракт		Раствор фруктозо-дифосфата	Вода	Время инкубации, мин
	активный	кипяченный			
1	2	–	–	3	15
2	–	2	1	2	15
3	2	–	1	2	5
4	2	–	1	2	15

Опыт проводят так, как это указано в табл. 2.9.

Во все пробирки (кроме второй) наливают по 2 мл диализированного экстракта, стоявшего при комнатной температуре, а во вторую – предварительно прокипяченный и охлажденный экстракт. Затем во вторую, третью и четвертую пробирки добавляют по 1 мл раствора фруктозодифосфата и воды – до 5 мл (см. схему опыта). Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на определенное время (от 5 до 15 мин, как следует из схемы) при комнатной температуре, после чего к смеси добавляют по 5 мл 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают. Выпавший осадок белка удаляют центрифугированием или фильтрованием. В центрифугате проводят определение триозофосфорных соединений и фруктозодифосфата с целью определения убыли фруктозодифосфата. По убыли фруктозодифосфата можно судить об активности альдолазы в исследуемой ткани.

Фосфотриозы в щелочной среде уже при комнатной температуре подвергаются гидролизу с отщеплением неорганической фосфорной кислоты, поэтому количество образовавшейся фосфорной кислоты будет соответствовать количеству фосфора фосфотриоз.

В одну серию колбочек берут по 1 мл безбелкового трихлоруксусного фильтрата (1/10 объема всего фильтрата) и по 1 мл 2 н. раствора щелочи. Пробы перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре 20 мин. По истечении этого времени добавляют для нейтрализации щелочи по 1 мл 2 н. раствора серной кислоты. Во вторую серию колб тоже берут по 1 мл

безбелкового фильтрата и для соблюдения равенства условий с растворами первой серии добавляют в каждую по 1 мл 2 н. раствора серной кислоты и по 1 мл 2 н. раствора щелочи. Далее во всех растворах определяют количество неорганического фосфата. В растворах первой серии фосфата будет, конечно, больше, так как, кроме преобразованного фосфата, в них будет находиться фосфат, образовавшийся в результате гидролиза триозофосфатов. Определение фосфора проводится по методу Фиске–Суббароу.

Во все колбы добавляют по 1,2 мл 2,5 %-го раствора молибдата аммония и по 1 мл разбавленного раствора эйконогена. Пробы доводят водой до 10 мл (в данном случае нужно добавить по 4,8 мл), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 20 мин. В течение этого времени развивается синяя окраска раствора, которую сравнивают в колориметре с окраской стандартного раствора фосфата. Стандартные растворы фосфата готовят одновременно с исследуемыми растворами. В отдельные колбочки берут пипеткой 0,4, 0,8 и 1,6 мл стандартного раствора. В каждую колбу добавляют по 1,2 мл молибдата аммония, 1 мл разбавленного эйконогена и воду до 10 мл. При колориметрировании следует пользоваться тем стандартным раствором, окраска которого наиболее близка к окраске исследуемого раствора. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,025 мг, или 25 мкг фосфора; следовательно, в первом растворе имеется 10 мкг фосфора, а во втором – 20 мкг и в третьем – 40 мкг фосфора. По разности в количестве неорганического фосфата в пробах 1-й и 2-й серии рассчитывают содержание фосфотриоз.

При колориметрировании двух растворов, находящихся в разных кюветах, изменяют толщину (высоту) слоя одного из растворов, обыкновенно исследуемого, стремясь получить одинаковую интенсивность его окраски со стандартным раствором, поставленным на какую-то определенную высоту. Интенсивность окраски измеряют со светофильтром для 660 нм.

Расчет производят по формуле:

$$x = a \cdot h_1 / h,$$

где a – количество вещества в стандартном растворе;

h – высота (толщина) слоя стандартного раствора;

h_1 – высота слоя исследуемого раствора.

Найденное количество фосфора умножается на 10, чтобы найти его количество во всем объеме безбелкового раствора или в 5 мл исходного раствора.

Следующим этапом работы является определение убыли фруктозо-1,6-дифосфата.

Вследствие сравнительно большого содержания фруктозо-1,6-дифосфата в анализируемых пробах для количественного определения следует из безбелкового фильтрата пробы брать по 1 мл, добавлять 1 мл воды и далее 2 мл раствора резорцина и 6 мл соляной кислоты, как это указано в работе по количественному определению фруктозы [10].

Результаты следует занести в ячейки табл. 2.10.

Таблица 2.10

Результаты лабораторного исследования найденных веществ

№ пробы	Найдено в 5 мл, мкг				Молярные концентрации, моль/л	
	неорганического фосфора	неорганического фосфора после щелочного гидролиза	фосфора триозофосфатов	фруктозо-1,6-дифосфата	триозофосфатов	фруктозо-дифосфата
1						
2						
3						
4						

Для расчета молярных концентраций следует пересчитать количества триозофосфатов и фруктозодифосфата на литр, выразить концентрацию в граммах и разделить на грамм-молекулярный вес. Например, найдено фосфора триозофосфатов 150 мкг в 5 мл, т.е. 0,15 мг в 5 мл. Тогда содержание фосфора в литре равно: $0,15 \cdot 1000/5 = 30$ мг, или 0,030 г.

Молярная концентрация триозофосфатов равна: $0,003/31 = 0,0009$. или для каждого триозофосфата 0,00045 М, или $0,45 \cdot 10^{-3}$ М. Сравнивая нарастание концентрации триозофосфатов и убыль молярной концентрации фруктозодифосфата, можно констатировать соответствие двух этих величин [4].

3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ХИМИИ СУСЛА

Лабораторная работа № 25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ СУСЛА В СОЛОДЕ

Солод имеет следующий химический состав (в % на сухое вещество): крахмал 57,0; редуцирующие сахара 4,0; сахароза 5,0; растворимые пентозаны 1,0; нерастворимые пентозаны и гексозаны 9,0; клетчатка 5,5; белковые соединения 10,0; некоагулируемые азотсодержащие вещества 2,5; формольнотитруемые азотсодержащие соединения 1,0; жиры 2,5; минеральные вещества 2,5. При этом в состав белковых и азотсодержащих веществ входят ферменты амилофосфатаза, α -амилаза, протеиназа, пептидаза, цитаза, фитаза.

Для качества используемого сусла большое значение имеет его белковый состав. Так, из азотсодержащих соединений в сусле содержится альбумозы и пептоны, аминокислоты и амиды, а также аммиачный азот, значительная часть которого (около 45–50 %) является усвояемой. Эти соединения оказывают существенное влияние на кислотность лабораторного сусла.

Цель работы:

Определить общую и активную кислотность лабораторного сусла в солоде.

Реактивы, посуда, оборудование:

Лабораторное сусло, раствор 0,1 н. раствор NaOH, фенолфталеин красный, коническая колба, бюретка, фарфоровая пластинка, стеклянная палочка, потенциометр или pH-метр.

Выполнение работы

Кислотность среды принято оценивать двумя показателями — общей и активной кислотностью.

Общая кислотность характеризует содержание в растворе веществ, вступающих в реакцию с сильными щелочами, и определяется титрованием.

Активная кислотность характеризует концентрацию водородных ионов в среде и обозначается показателем рН. Эта величина изменяется от 1 до 14.

Для анализа готовится 0,1 н. раствор NaOH на прокипяченной и охлажденной без доступа CO₂ дистиллированной воде.

В ходе определения 50 мл лабораторного сусла титруют в конической колбе 0,1 н. раствором NaOH до тех пор, пока четыре капли сусла, вынесенные из колбы стеклянной палочкой на фарфоровую пластинку, перестанут обесцвечивать две капли красного фенолфталеина.

Кислотность (в мл 1 н. раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию 100 г экстрактивных веществ солода) определяют:

$$K = \frac{a \cdot 2 \cdot 100}{10dc} = \frac{20a}{dc},$$

где a – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл;
 c – массовая доля сухих веществ в сусле, %; d – относительная плотность сусла.

Обычно кислотность солода составляет 10,5–14,0 мл 1 н. раствора NaOH.

Определение активной кислотности в солоде производят с помощью потенциометров или рН-метров. рН затора обычно составляет 5,5–5,6 [10].

Лабораторная работа № 26

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ЛАБОРАТОРНОГО СУСЛА

Цель работы:

Определить относительную вязкость лабораторного сусла.

Реактивы, посуда, оборудование:

Дистиллированная вода, лабораторное сусло, каучуковая трубка, вискозиметр Оствальда, водяная баня, секундомер.

Выполнение работы

Величина относительной вязкости лабораторного сусла до некоторой степени может характеризовать солод с точки зрения получения из него пива с хорошей пенистостью: чем выше вязкость сусла, тем лучше пенистость пива из такого солода.

Для определения относительной вязкости используют вискозиметр Оствальда (рис. 3.1), представляющий собой U-образную трубку с различной шириной колен. Более узкое колено выполняется в виде капиллярной трубки, имеющей в верхней части расширение с метками *a* и *б*; широкое колено также имеет расширение внизу.

Сущность определения сводится к последовательному установлению времени истечения дистиллированной воды, а затем исследуемого сусла из одного и того же объема, ограниченного метками *a* и *б*. Во избежание влияния температурных колебаний на скорость истечения жидкостей определение проводят при 20 °С, поэтому вискозиметр помещают на водяную баню при этой температуре. Во время определения в тщательно вымытый и ополоснутый дистиллированной водой вискозиметр наливают столько воды, чтобы она не доходила до капилляра. Воду всасывают через каучуковую трубку, присоединенную к узкому колену, в расширение с метками, чтобы верхний мениск воды установился выше метки *a* и при помощи зажима на каучуковой трубке фиксируют это положение. Вискозиметр выдерживают на водяной бане при 20 °С 15–20 мин. Затем открывают зажим и по секундомеру

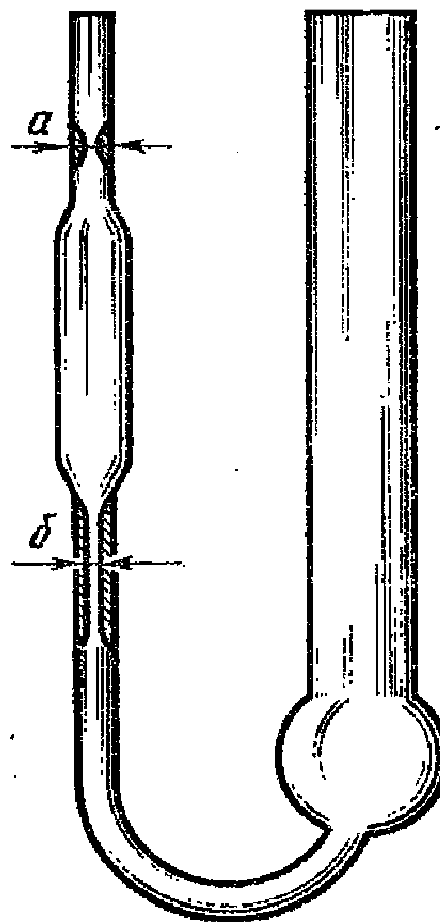


Рис. 3.1. Вискозиметр Оствальда

устанавливают время, необходимое для вытекания воды из пространства, заключенного между метками *a* и *б*. После этого вискозиметр ополаскивают лабораторным сусликом и определяют время его вытекания из фиксированного объема таким же образом, как и в случае с водой.

Относительную вязкость суслика определяют по формуле:

$$d = \tau_2 / \tau, \quad (3.2)$$

где τ_2 – время истечения суслика, с; τ – время истечения воды, с; d – относительная плотность суслика [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Нечаев, А.П.** Пищевая химия/ А.П. Нечаев, С.Е. Траубенберг, А.А. Кочеткова и др. Под ред. А.П. Нечаева.– СПб.: ГИОРД, 2001.
2. Современные методы в биохимии/ Под общ. ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1984.
3. **Детерман, Г.** Гель-хроматография.– М.: Мир, 1970.
4. **Смолин, А.Н.** Практикум по общей биохимии/ А.Н. Смолин, Ю.Б. Филиппович, Н.В. Васильев, Т.А. Егорова. – М.: Изд. Моск. гос. пед. ин-та им. В.И. Ленина, 1969.
5. **Страйер, Л.** Биохимия: В 3 т. Т. 1/ Пер. с англ.– М.: Мир, 1985.
6. **Браунштейн, А.Е.** Современные представления о природе активных центров ферментов/ В сб. «Актуальные вопросы современной биохимии».– М.: Изд-во АН СССР, 1962.
7. **Диксон, М.** Ферменты/ М. Диксон, Э. Уэбб: В 3 т. Т. 3.– М.: Мир, 1982.
8. **Берхард, С.** Структура и функции ферментов.– М.: Мир, 1971.
9. **Березов, Т.Т.** Биологическая химия: Учебник/ Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. Под ред. С.С. Дебова.– М.: Медицина, 1983.
10. **Луценко, Н.Г.** Лабораторные работы по биохимии/ Н.Г. Луценко, О.В. Лукин. Под ред. Н.Н. Суворова – М.: Изд. Моск. хим.-тех. ин-та им. Д.И. Менделеева, 1979.
11. **Мосолов, В.В.** Протеолитические ферменты.– М.: Мир, 1971.
12. **Филиппович, Ю.Б.** Общая биохимия.– М.: Высшая школа, 1969.
13. Нуклеиновые кислоты/ Под общ. ред. Дж. Девидсона, У. Кон.– М.: Мир, 1965.
14. Методы практической биохимии/ Под общ. ред. Б. Уильямс, К. Уилсон. – Л.: Мир, 1978.

Учебное издание

**РАЗГОВОРОВ Павел Борисович
МАКАРОВ Сергей Васильевич**

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ.
БЕЛКИ, ФЕРМЕНТЫ.**

Лабораторный практикум

Редактор В.Л. Родичева

Подписано в печать 25.12.2009. Формат 60×84¹/16. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 4,19. Уч.-изд. л. 4,64. Тираж 100 экз. Заказ 1964

ГОУ ВПО Ивановский государственный
химико-технологический университет

Отпечатано на полиграфическом оборудовании
кафедры экономики и финансов ГОУ ВПО «ИГХТУ»
153000, г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7