

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Методические указания по выполнению лабораторных работ

для магистров I курса

Направление подготовки
19.04.01 Биотехнология

Магистерская программа
Пищевая биотехнология

Биотехнология получения белков и биологически активных веществ:
методические указания по выполнению лабораторных работ для студентов
направления подготовки 19.04.01 Биотехнология / сост.: Горельникова Е.А.,
Карпунина Л.В. // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова. –
Саратов, 2016. – 29 с.

Методические указания по выполнению лабораторных работ составлены в соответствии с программой дисциплины и предназначены для магистров направления подготовки 19.04.01 Биотехнология; содержат краткое описание лабораторных методов анализа белков и биологически активных веществ. Направлены на формирование у студентов навыков определения основных параметров биотехнологических процессов и анализа получения белков и биологически активных веществ микробиологическими и биохимическими методами. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих специалистов сельского хозяйства.

ВВЕДЕНИЕ

При разработке новых технологий синтеза белков и биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) необходимы знания в области микробиологии, биотехнологии, биохимии, основного и тонкого органического синтеза, а также инженерных наук для промышленной их реализации. Потребность в биологически активных веществах на современном этапе тесно связана с решением широкого круга проблем интенсификации производства и экологическим оздоровлением окружающей среды, а именно: получение новых видов продуктов различного назначения и, в первую очередь, препаратов профилактического и терапевтического действия; утилизация отходов промышленности и сельского хозяйства; получение экологически безопасных средств защиты сельскохозяйственных растений от болезней, вредителей, сорных растений для повышения их биологической продуктивности.

В настоящее время промышленностью производится широкий ассортимент белков и биологически активных веществ медицинского, пищевого, сельскохозяйственного назначения (антибиотики, вакцины, ферменты, полисахариды, гормоны, гликозиды, кормовые и пищевые добавки, аминокислоты, витамины, алкалоиды, пестициды, дефолианты и другие). Многие БАВ впервые были получены из природного растительного и животного сырья путем специальной его обработки.

Задачей лабораторной практики является закрепление студентами разделов основного теоретического материала и ознакомление с микробиологическими и биохимическими методиками получения и анализа белков и биологически активных веществ.

Кроме общепринятых методов анализа, алгоритма практического выполнения лабораторных работ в пособие представлены теоретические и справочные материалы для интерпретации результатов анализов и их оценки.

В каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, ход выполнения работы, перечень необходимого оборудования, пример расчета и список литературы.

ТЕМА 1 -2 . ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Цель: сформировать навык определения наличия белка в исследуемых растворах с помощью цветных реакций.

Белки – высокомолекулярные природные полимеры, построенные из остатков аминокислот, соединенных амидной (пептидной) связью $-CO-NH-$. Каждый белок характеризуется специфической аминокислотной последовательностью и индивидуальной пространственной структурой (конформацией). Функционирование белков лежит в основе важнейших процессов жизнедеятельности организма.

Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или химических группировок. К важнейшим из них относятся: биуретовая реакция (пептидные связи), ксантопротеиновая реакция (ароматические ядра остатков тирозина, триптофана, фенилаланина), Адамкевича реакция (индольное кольцо триптофана), Миллона реакция (фенольный радикал тирозина), Паули реакция (имидазольное кольцо гистидина), Сакагучи реакция (гуанидиновая группа аргинина) и нингидриновая реакция (аминогруппа).

Один из первых этапов выделения белка – получение соответствующих органелл (рибосом, митохондрий, ядер, цитоплазматической мембраны). Далее белки переводят в растворимое состояние путем экстракции буферными растворами солей и детергентов, иногда неполярными растворителями. Затем применяют фракционное осаждение неорганическими солями (обычно $(NH_4)_2SO_4$), этанолом, ацетоном или путем изменения pH, ионной силы, температуры. Для предотвращения денатурации работу проводят при пониженной температуре (около $4^\circ C$); с целью исключения протеолиза используют ингибиторы протеаз, некоторые белки стабилизируют полиолами, например, глицерином. Дальнейшую очистку проводят по схемам, специально разработанным для отдельных белков или группы гомологичных белков. Наиболее распространенные методы разделения – гель-проникающая хроматография, ионообменная и адсорбционная хроматография; эффективные методы – жидкостная хроматография высокого разрешения и афинная хроматография. Критерий чистоты белка – гомогенность при электрофорезе, хроматографии и ультрацентрифугировании.

Цветные реакции на белки и аминокислоты

При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции. Образование их обусловлено присутствием в молекуле белка той или иной аминокислоты, имеющей в своем составе определенную химическую группировку. Цветные реакции на белки являются реакциями на функциональные группы радикалов аминокислот, входящих в состав белков. Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность установить белковую природу вещества и доказать присутствие некоторых аминокислот в различных природных белках. На основании цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот. Цветные реакции проводят в пробирках одновременно с 1% раствором яичного белка и желатина, которые имеют различный аминокислотный состав.

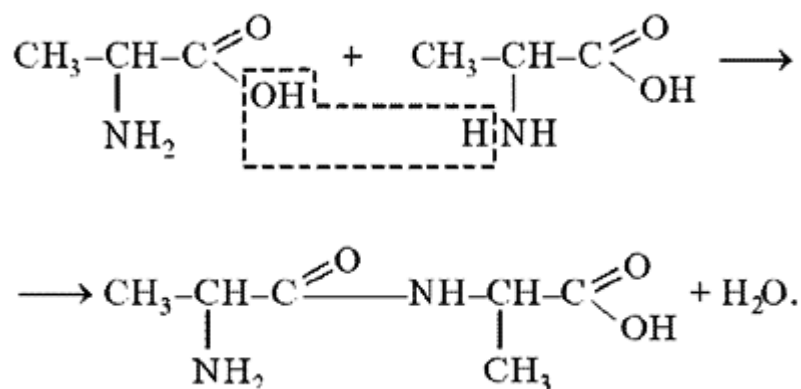
Универсальными считают биуретовую и нингидриновую реакции, так как их дают все белки. Ксантопротеиновая реакция, реакция Фоля и др. являются специфическими, так как они обусловлены радикальными группами определенных аминокислот в молекуле белка.

Цветные реакции позволяют установить наличие белка в исследуемом материале и присутствие определенных аминокислот в его молекулах.

На основании некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ. Реакция обусловлена наличием в белках, пептидах, полипептидах пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с ионами меди (II) комплексные соединения, окрашенные в фиолетовый (с красным или с синим оттенком) цвет. Окраска обусловлена наличием в молекуле не менее двух групп $-\text{CO}-\text{NH}-$, связанных непосредственно между собой или при участии атома углерода или азота.

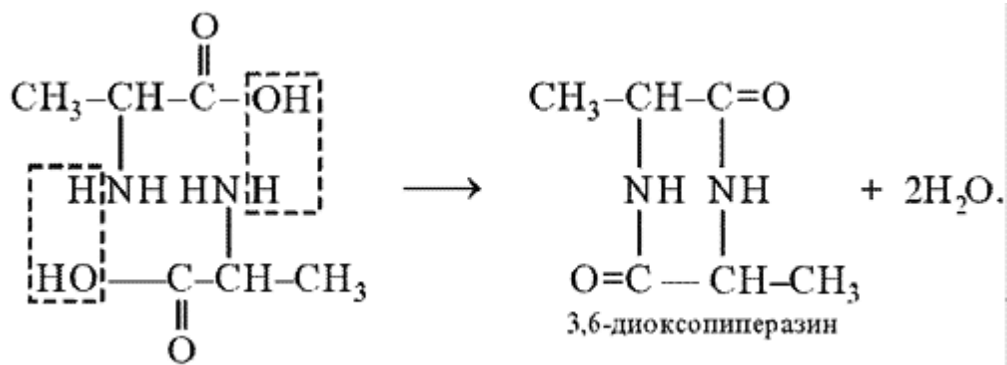
В белках аминокислоты связаны друг с другом по типу полипептидов и дикетопиперазинов. Образование полипептидов из аминокислот происходит путем отщепления молекулы воды от аминогруппы одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группы другой молекулы:



Образующаяся группа $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ называется пептидной группой, связь $\text{C}-\text{N}$, соединяющая остатки молекул аминокислот, – пептидной связью.

При взаимодействии дипептида с новой молекулой аминокислоты получается трипептид и т. д.

Дикетопиперазины образуются при взаимодействии двух молекул аминокислот с отщеплением двух молекул воды:



Дикетопиперазины были выделены из белков Н.Д. Зелинским и В.С. Садиковым в 1923 г.

Наличие в белке повторяющихся пептидных групп подтверждается тем, что белки дают фиолетовое окрашивание при действии небольшого количества раствора медного купороса в присутствии щелочи.

Ионы меди (II) соединяются двумя ионными связями с группами $=\text{C}-\text{O}^-$ и четырьмя координационными связями с атомами азота ($=\text{N}-$).

Интенсивность окраски зависит от количества белка в растворе. Это позволяет использовать данную реакцию для количественного определения белка. Цвет окрашенных растворов зависит от длины полипептидной цепи. Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза (поли- и олигопептиды) – красную или розовую

окраску. Биуретовую реакцию дают не только белки, пептиды и полипептиды но и биурет ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2\text{-CO-CO-NH}_2$), гистидин.

ХОД РАБОТЫ. Берут пять пробирок и вносят по 1 мл : в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора α -аминокислоты. В каждую пробирку добавляют по 2 мл раствора гидроксида натрия 10 % и по 5-6 капель раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 минут для развития окраски. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить путем наслоения на раствор белка в щелочи 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %.

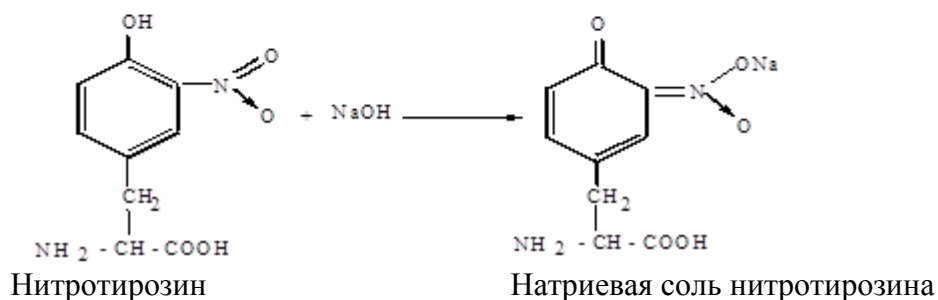
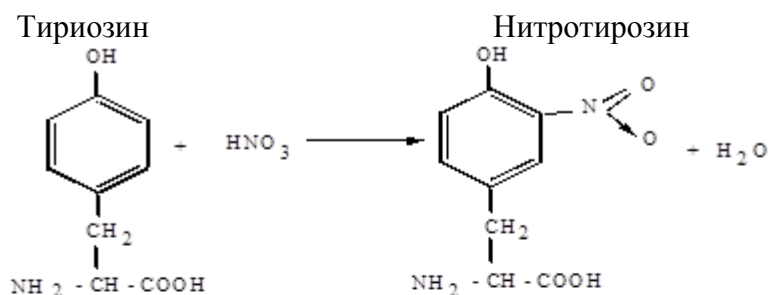
Результаты этой и всех других цветных реакций на белки и аминокислоты вносят в табл. 1.

Таблица 1.

Цветные реакции на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Биуретовая реакция		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
Нингидриновая реакция		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
Ксантопротеиновая реакция		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Фенол		
Реакция Фоля (на слабосвязанную серу)		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ. Ксантопротеиновая реакция указывает на наличие в белках остатков ароматических аминокислот – тирозина, фенилаланина, триптофана. Основана на нитровании бензольного кольца радикалов этих аминокислот с образованием нитросоединений, окрашенных в желтый цвет (греческое «Ксантос» – желтый). На примере тирозина эту реакцию можно описать в виде следующих уравнений.



В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

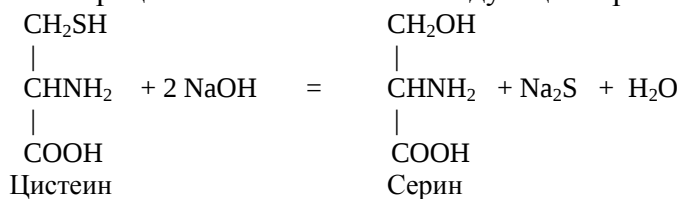
Ксантопротеиновую реакцию дают бензол и его гомологи, фенол и другие ароматические соединения.

ХОД РАБОТЫ. Берут четыре пробирки и вносят по 1 мл: в первую раствора казеина, во вторую – раствора яичного белка, в третью – раствора желатины, в четвертую – раствора фенола. Во все пробирки добавляют по 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое перемешивают встряхиванием и пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5-8 мин. Под действием кислоты появляется осадок белка, который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После бани пробирки выдерживают при комнатной температуре 4-5 мин и записывают окраску содержимого. Затем в каждую пробирку прибавляют по 1 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 30 % (или другую щелочь). Содержимое пробирок перемешивают, окраску записывают.

РЕАКЦИЯ ФОЛЯ. Реакцией Фоля (на слабосвязанную серу) открывают в белках радикалы цистеина содержащие как свободные $-\text{SH}$ (тиоловые) радикальные группы, так и окисленные с образованием дисульфидных ($-\text{S}-\text{S}-$) связей цистина.

При нагревании белка, содержащегося в молекуле остатки цистеина и цистина, с концентрированным раствором щелочи и ацетатом (или другой растворимой солью) свинца (реактив Фоля) образуется бурое или черное окрашивание. Это объясняют тем, что под действием щелочи от радикалов цистеина отщепляется сера в виде иона со степенью окисления минус два, который, взаимодействуя с ионом свинца (II), дает бурый или черный нерастворимый осадок сульфида свинца. Белки, в составе которых нет цистина и цистеина, реакцию Фоля не дают.

Химизм процесса можно описать следующими реакциями:





ХОД РАБОТЫ. Берут четыре пробирки и вносят по 1 мл: в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 30 % и по 6-8 капель раствора с массовой долей ацетата свинца 5 %, или можно приготовить реактив Фоля на всю подгруппу и добавить по 1 мл в каждую пробирку приготовленного раствора. Содержимое перемешивают встряхиванием, и пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5-7 мин. Окраску содержимого пробирок записывают. Результаты оформляют в табл. 1.

Нингидрин образует с аминокислотами соединения с двойной связью между углеродом и азотом, называемые имидами или основаниями Шиффа.



Нингидрин образует с аминокислотами соединения с двойной связью между углеродом и азотом, называемые имидами или основаниями Шиффа.

Эти соединения обладают высокой реакционной способностью. Дальнейшее превращение их приводит к промежуточному амину, который может реагировать со второй молекулой нингидрина, давая соединение окрашенное в сине-фиолетовый (пурпурный) цвет – сине-фиолетовый (пурпурный) Руэмана.

Очень легко реагируют с нингидрином α -аминокислоты. Наряду с ними сине-фиолетовый Руэмана образуют также белки, пептиды, первичные амины, аммиак и некоторые другие соединения. Вторичные амины, например пролин и оксипролин, дают желтую окраску.

Нингидриновую реакцию широко используют для c^{-} аружения и количественного определения аминокислот.

ХОД РАБОТЫ. Берут пять пробирок, и вносят по 1 мл: в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора аминокислоты (глицина). Затем в каждую пробирку добавляют по 10-12 капель раствора с массовой долей нингидрина в ацетоне или эт⁺ %. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и ставят их в кипящую водяную баню на 3-5 мин. Записывают химизм реакции, схему постановки опыта, строение окрашенных соединений.

Реактивы и оборудование: штативы с пробирками; пипетки; спиртовка; водяная баня, вода, растворы с массовыми долями: казеина 1 %, желатины 1 %, яичного белка 1 %, сульфата меди 1 %, гидроксида натрия 10 и 30 %, глицина (или другой аминокислоты) 0,1 %, фенола 0,1 %, ацетата свинца 5 %, нингидрина в ацетоне или этаноле 1 %; концентрированная азотная кислота, медный купорос, фенол, водяная баня.

Реактив Фоля готовят в пробирке перед определением. В пробирку вносят 1 мл 5 % раствора ацетата свинца и небольшими порциями (по 1,5-2 мл) приливают 30 % раствор гидроксида натрия с интервалом 30 сек, каждый раз, перемешивая, до растворения молочно-белого хлопьевидного осадка появившегося после внесения 1-ой порции NaOH.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Громова, Н.Ю.* Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие / Н.Ю. Громова, Ю.Ю. Косивцов, Э.М. Сульман. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84 с.
2. *Дубровина, Т.Н.* Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности «Биотехнология» / Т.Н. Дубровина. – Павлодар, 2009. – 27 с.
3. *Збарский, Б.И.* Практикум по биологической химии / Б.И. Збарский, И.Б. Збарский, А.И. Солнцев. – М.: Государственное издательство медицинской литературы Медгиз, 1954. – 348 с.
4. *Шапкарин, В.В.* Биохимия: сборник лабораторных работ / В.В. Шапкарин, А.П. Королев, С.Б. Гридина, Е.П. Зинкевич / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности.- Кемерово, 2005. – 84 с.

ТЕМА 3-4. МИКРООРГАНИЗМЫ - ПРОДУЦЕНТЫ БЕЛКА НА УГЛЕВОДОРОДНОМ СЫРЬЕ

Цель: сформировать навык составления рецептур питательных сред для микроорганизмов.

Микроорганизмы в принципе способны ассимилировать любые органические соединения. Однако каждый конкретный вид микроорганизмов, используемый в биотехнологии, весьма избирателен к питательным веществам.

Традиционным сырьем микробного синтеза является углеродсодержащее сырье: глюкоза, сахароза, лактоза, гидрол, крахмал, уксусная кислота, спирты, n-алканы, некоторые фракции нефти, каменный уголь, природный газ и другие. Многие побочные продукты производства являются сырьем для биотехнологической промышленности. Это: сульфитные щелока, смеси карбоновых кислот, меласса, зерновая и картофельная барда, соапсток, солодовое сусло, молочная сыворотка, депротеинизированный сок растений и картофеля, гидролизат древесных отходов, упаренный гидролизат торфа, пшеничные отруби.

Минеральным сырьем служат азотсодержащие соли: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_2CONH_2 , соли фосфорной кислоты, другие минеральные макроэлементы, а также микроэлементы. Естественно, что для роста биомассы необходимы кислород и вода. Кроме того, культивирование микроорганизмов окажется успешным, если в питательной среде будут находиться витамины, аминокислоты, цитокинины и другие биологически активные вещества.

Подсчитано, что в микробиологической промышленности основная доля сырья (более 90%) расходуется на производство этанола. Производство хлебопекарных дрожжей требует 5% сырья, антибиотики – 1,7%, органические кислоты и аминокислоты – 1,65%. На сырье в биотехнологических производствах затрачивается 40-50% общей стоимости продукции.

Составление рецептур питательных сред

ХОД РАБОТЫ.

1. Принципы составления сред для культивирования микроорганизмов

Сырье в биотехнологических производствах, особенно в крупнотоннажных, занимает первое место в статьях расхода и составляет 40-65 % общей стоимости продукции.

Питательный субстрат или питательная среда является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Основным принцип составления рецептур питательных сред – удовлетворение физиологических потребностей микроорганизмов, а также поддержание оптимальных значений pH, температуры, кислорода и стерильности среды.

Приготовление обычных сред. К ним относятся среды, применяемые для выращивания большинства микроорганизмов – мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и др.

Приготовление мясной воды. Свежее говяжье или конское мясо освобождают от костей, сухожилий, жира и фасций, измельчают в мясорубке или нарезают ножом мелкими кусочками. Навеску измельченного мяса (50 г) заливают двумя объемами дистиллированной или водопроводной воды и оставляют для экстрагирования в холодильнике при температуре $+4...+6\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 18-24 часа или помещают в термостат с температурой $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 2 часа. Настой кипятят до просветления (5-7 мин), охлаждают при комнатной температуре и фильтруют через ватный или бумажный фильтр. Фильтрат измеряют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой, разливают по

флаконам, стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С (1 атм.) в течение 30-40 мин и используют по назначению.

Правильно приготовленная мясная вода представляет слабокислую (рН 6,2), прозрачную, соломенно-желтоватую жидкость, не содержащую белков. В ней присутствует небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ.

Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ). К приготовленной мясной воде (100 мл) прибавляют 1% пептона и 0,5% хлористого натрия, кипятят 1-2 мин при помешивании, затем охлаждают и определяют рН. Добавлением щелочи (1н раствора гидроксида натрия) или кислоты (1н раствор соляной кислоты) устанавливают рН среды 7,4-7,6. Для стабилизации рН рекомендуется к бульону добавлять фосфатные буферные смеси. Кипятят 30-45 мин для выпадения осадка, затем охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Проверяют и доводят рН до 7,4-7,6, разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют в автоклаве при 120 °С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Такой мясо-пептонный бульон пригоден для выращивания большинства бактерий. Из него легко приготовить ряд сред специального назначения.

Приготовление мясо-пептонного агара (МПА). К приготовленному мясо-пептонному бульону добавляют 2-3% мелко нарезанного, хорошо промытого агара. Смесь кипятят или прогревают в автоклаве до полного растворения агара. Охлаждают до 50 °С и для просветления добавляют белок куриного яйца, тщательно взбитого в двойном количестве холодной воды (белок одного яйца на 1 л среды). Среду прогревают в автоклаве при 0,5 атм. в течение 45 мин. Белок адсорбирует взвешенные в среде частицы, свертывается при высокой температуре и оседает хлопьями на дно.

Агар фильтруют через слой ваты или фильтровальной бумаги в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с подогревом. Проверяют и корректируют рН. Разливают через стеклянную воронку с резинкой и зажимом в пробирки, флаконы, колбы и т.д., следя за тем, чтобы не смочить их края. Стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Пробирки с горячим жидким агаром извлекают из автоклава и раскладывают на столе в наклонном положении. Агар растекается по стенке пробирки и при застывании получается «скошенным». Для получения агара «столбиком» пробирки охлаждают в вертикальном положении.

Мясо-пептонный агар является основной плотной средой и служит для получения изолированных колоний микроорганизмов на питательной среде. Он употребляется в виде «простого» агара или после прибавления к нему питательных веществ и индикаторов в виде сложных дифференциально-диагностических или так называемых элективных сред.

Приготовление специальных сред. Применяют для выделения и культивирования определенных групп или видов микроорганизмов, например, среда Чапека – для культивирования грибов и т.д.

Приготовление дифференциально-диагностических сред. Эти среды применяют для изучения биохимических свойств и для выделения чистых культур некоторых микроорганизмов. Они позволяют выявить выделяемые микробами энзимы, одни из которых расщепляют в различной степени белки и углеводы, а другие вызывают реакции окисления и восстановления. Сюда относятся жидкие среды с углеводами Гиса, плотные среды с индикаторами Эндо, Левина, Плоскирева и другие.

Среда Гисса. К 1% пептонной воде с рН 7,1 прибавляют 0,5-0,6 % соответствующего углевода (глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы и др.) и 0,5% индикатора Андреде (0,5 г кислого фуксина в 100 мл 1н раствора гидроксида натрия). Среды разливают по 4-5 мл в стерильные пробирки, на дно которых перед стерилизацией помещают узкий поплавочек. Среды стерилизуют текучим паром 2-3 раза по 30 мин через каждые 24 часа или однократно паром под давлением 0,5 атм. 30 мин. Вместо жидких сред Гиса часто применяют полужидкие среды, содержащие 0,3-0,5% агар-агара и индикатор РВ. При

сбраживании углеводов под действием ферментов среда изменяет цвет, а при образовании CO_2 в поплавке скапливается газ.

Среда Эндо. К 100 мл стерильного расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 1г лактозы, растворенной и прокипяченной в 5 мл дистиллированной воды, и 1 мл насыщенного спиртового основного фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агару 10 %-м водным раствором сульфата натрия до бледно-розового оттенка. Среду хорошо перемешивают, разливают в стерильные чашки и перед посевом подсушивают в термостате. Бактерии

(*E.coli*), ферментирующие лактозу с образованием кислоты, формируют на этой среде красные колонии, а бактерии, не разлагающие лактозу, - бесцветные.

Среда Левина. К 100мл стерильного расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 2 г лактозы, растворенной в 5мл прокипяченной дистиллированной воды, 1,5 мл подогретого 0,5% раствора метилметиленовой сини, 1,5 мл подогретого 2% раствора эозина (стерильные) и 0,2 г двухосновного фосфорнокислого калия, растворенного в небольшом количестве воды. Среду хорошо перемешивают, разливают в стерильные чашки Петри, чашки перед посевом подсушивают в термостате. Колонии бактерий, ферментирующих лактозу, на этой среде – темного цвета, не ферментирующих – бесцветные.

2. Составления сред для культивирования клеток растений и животных

Функции сред для выращивания клеток могут быть охарактеризованы следующим образом: 1 – поддержание необходимых для роста физико-химических условий (рН, осмолярность и др.); 2 – обеспечение клеток питательными веществами для синтеза клеточной биомассы и продуктов.

Для удобства среды могут быть подразделены на четыре группы: среды, необходимые для кратковременного выживания клеток; среды, необходимые для длительного выживания; среды, необходимые для обеспечения неограниченного роста клеток; среды, необходимые для осуществления специальных функций.

Кроме источников углерода, азота и других минеральных компонентов, среды для клеток многоклеточных организмов содержат специфические стимуляторы и регуляторы роста. Для клеток растений обычно необходимы индолилуксусная кислота, кинетин и гиббереллиновая кислота. Клетки животных нуждаются в ростовых веществах и незаменимых аминокислотах. Клетки растений и животных весьма чувствительны к присутствию посторонних ингредиентов, поэтому требуют химически чистых компонентов среды. Известен общий состав сред для культивирования клеток растений и животных (прил.1).

Среды для культивирования клеток могут создаваться на основе данных анализа плазмы крови и других биологических жидкостей (среда 199) или на основе уменьшения числа компонентов до минимума, необходимого для роста клеток (среда Игла, прил.2).

Магистры на лабораторном занятии учатся составлять минимальную незаменимую среду (MEM) Игла и теоретически рассчитывают два показателя.

1. Удельная скорость роста (μ) популяции клеток:

$$\mu = 1/n \cdot dn/dt,$$

где n - число клеток /мл;

t - время.

Следовательно, $\mu = \ln 2 / t_d$, где t_d - время удвоения популяции.

2. Урожайность роста (Y), определяется частным:

$$Y = \Delta x / \Delta s$$

где Δx - увеличение биомассы (число клеток или их масса) в результате использования определенного количества Δs субстрата.

Например, урожайность клеток Hela равна 0,295, а клеток LS – 0,76 (в граммах сухого вещества биомассы на грамм использованной глюкозы).

Реактивы и оборудование: мясной фарш из свежего говяжьего или конского мяса, куриные яйца, 1% пептон, сухой агар, натрий хлористый, 1н раствор гидроксида натрия, 1н раствор соляной кислоты, 10% раствор сульфата натрия, 2% раствор эозина, 0,5% раствор метиленовой сини, спиртовой основной раствор фуксина, индикатор Андрее, аммоний фосфорнокислый, калий фосфорнокислый одно- и двухзамещенный, магний сернокислый, кальций углекислый, глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, мед, натрий азотнокислый, калий хлористый, железо сернокислое; фильтровальная бумага, рН-метр, автоклав, весы, колбы, пробирки, чашки Петри, пипетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия Поволжья», 2004. – 106 с.

ТЕМА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Цель: изучить влияние различных факторов на активность ферментов.

Влияние некоторых факторов на ферментативные реакции

Температура - один из важных факторов, влияющих на скорость ферментативных реакций. Являясь веществами белкового происхождения, ферменты термолабильны, т.е. неустойчивы к воздействию высокой температуры и в большинстве случаев теряют свою активность в водных растворах уже при нагревании выше 70°C.

Для всех ферментов существует определенная оптимальная температура, при которой они наиболее активны.

Для проявления максимальной каталитической активности ферментов требуются определенные условия, в том числе оптимальная концентрация водородных ионов. Это значение получило название оптимума рН или оптимальной реакции среды.

1. Влияние температуры на активность ферментов

Температурный оптимум для большинства ферментов животного происхождения находится в пределах 40-50°C. *Особая чувствительность ферментов к температуре является одним из свойств, качественно отличающих эти биокатализаторы от неорганических катализаторов.* При более низкой температуре ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается и действие ферментов замедляется.

ХОД РАБОТЫ. В четыре пробирки наливают по 10 капель разведенной в 10 раз слюны и ставят первую пробирку в лед, вторую - в штатив при комнатной температуре, третью - в водяную баню при температуре 40° и четвертую - в кипящую водяную баню. Через 10 минут во все пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. После этого во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя и отмечают, в каких пробирках и насколько глубоко произошел гидролиз крахмала.

Различная окраска при реакции с йодом, а следовательно, и различная степень гидролиза крахмала обусловлены неодинаковой скоростью ферментативного катализа при разных температурных условиях опыта.

2. Влияние рН среды на активность ферментов

Активность ферментов во многом зависит от реакции среды, в которой они находятся. Для каждого фермента имеется определенное значение рН среды, при котором он наиболее активен. Для большинства ферментов животного происхождения оптимум рН находится в пределах 4-7. Отклонение рН от оптимума может нарушить связь между белковой частью ферментов и их простетическими группами, может влиять на связывание субстрата с ферментом. Активность амилазы слюны является наиболее высокой при рН=6,8 и понижается в кислой и щелочной средах. *Изменение пространственного расположения активных участков молекулы фермента под влиянием рН и приводит к изменению скорости ферментативного действия.*

ХОД РАБОТЫ. В трех пробирках готовят буферные растворы с различным значением рН. Для этого точно отмеривают 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия и 0,1 М раствор лимонной кислоты в количествах, указанных в приведенной ниже таблице 3.

После встряхивания во все пробирки добавляют по 10 капель 0,5% раствора крахмала и по: 10 капель слюны, разведенной в 10 раз. Перемешав жидкости, пробирки ставят в штатив и оставляют при комнатной температуре. Через 2-3 минуты из второй пробирки

берут капельную пробу для реакции с йодом. Если получают синее окрашивание, пробу повторяют через следующие 2-3 минуты. Когда в капельной пробе получается желтое окрашивание, во все пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя и заносят в таблицу полученные окраски с йодом. Оптимум pH для действия амилазы определяют по той пробирке, в которой произошло более глубокое расщепление крахмала (желтое окрашивание).

Реактивы и оборудование: Разбавленная слюна (предварительно ополаскивают рот дистиллированной водой, затем набрав в рот приблизительно 20-25 мл дистиллированной воды и продержав ее там в течение нескольких минут, собирают и фильтруют ее); 1%-ный раствор крахмала; 0,3%-ный раствор хлористого натрия; реактив Люголя. 0,2 М раствор фосфата натрия двухзамещенный; 0,1 М раствор лимонной кислоты; 0,5%-ный раствор крахмала; штатив с пробирками; пипетки; стакан со льдом; спиртовка; водяная баня с термометром.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Блинов, В.А.* Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия Поволжья», 2004. – 106 с.
2. *Громова, Н.Ю.* Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие / Н.Ю. Громова, Ю.Ю. Косивцов, Э.М. Сульман. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84 с.

ТЕМА 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

Цель: изучить методы определения витаминов

Витамины - низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, необходимые для осуществления жизненно важных биохимических и физиологических процессов в живых организмах. Витамины обладают высокой биологической активностью и требуются организму в очень небольших количествах.

Витамины получают химическим (витамины А, В₆, тиамин, фолиевая кислота и другие) и микробиологическим (рибофлавин, витамин В₁₂) синтезом или выделяют из природных источников (витамин Е, аскорбиновая кислота). В настоящее время биотехнологическим путем получают витамины А₁; Д; В₂; аскорбиновую кислоту, цианкобаламин (витамин В₁₂).

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ ГИДРОЛИЗАТА ДРОЖЖЕЙ

ХОД РАБОТЫ.

Витамин D. К 2 мл гидролизата дрожжей прибавляют 1-2 капли анилинового реактива, перемешивают и нагревают. Появляется красно-бурое окрашивание.

Витамин В₂. К 2 мл гидролизата дрожжей добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Начинается бурное выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно окрашивается в красный цвет, затем окраска бледнеет.

Кислота никотиновая. К 3 мл теплого гидролизата дрожжей приливают 1 мл 5% раствора сульфата меди. Выпадает осадок синего цвета.

Витамин В₆. К 1 мл гидролизата дрожжей прибавляют 2 капли 5% раствора хлорида железа (III), появляется красное окрашивание, исчезающее при добавлении 20% серной кислоты.

Реактивы и оборудование: гидролизат дрожжей, анилиновый реактив (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты), концентрированная соляная кислота, цинк металлический, 5% раствор сульфата меди, 5% раствор хлорида железа (III), 20% серная кислота; газовая горелка, пробирки, пипетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов, В.А. Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия поволжья», 2004. – 106 с.

ТЕМА 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГОРМОНОВ

Цель: изучить строение гормонов с помощью качественных реакций.

Гормоны – это биологически активные вещества, оказывающие регуляторное влияние на обмен веществ. Влияние проявляется разными путями: гормоны могут изменять скорость ферментативных реакций, скорость синтеза белков, влиять на проницаемость клеточных мембран.

Гормоны способствуют поддержанию постоянства внутренней среды (гомеостаза), например сахара крови, минеральных веществ и т.д. Гормоны участвуют в размножении и росте, в адаптационных реакциях на внешние раздражители (стресс) и т.д. Одной из систем, регулирующих обмен веществ в организме, является гормональная система, которая включает действие всех эндокринных желез внутренней секреции. Клетки эндокринных желез продуцируют особые вещества, называемые гормонами. По химической природе гормоны условно делят на белковые и стероидные. Белковые образуются из белков, пептидов или отдельных аминокислот. К ним относятся гормоны гипофиза, щитовидной железы, поджелудочной железы, мозгового слоя надпочечников. Стероидные гормоны образуются из стероидного ядра так называемого циклопентанпергидрофенантрена, к ним относятся гормоны коры надпочечников и половых желез.

Качественные реакции, подтверждающие белковую природу инсулина

Гормон поджелудочной железы – инсулин. Инсулин является простым белком. Он играет важную роль в метаболизме углеводов, снижая содержание сахара в крови. Он способствует биосинтезу гликогена в печени и мышцах, а также липогенезу, т.е. образованию жиров из углеводов. Инсулин является антагонистом адреналина по отношению к гликогену. Влияние инсулина на следующие обменные процессы:

Углеводный обмен: увеличивает проницаемость клеточных мембран (переход из крови в ткани); инсулин активирует глюкокиназу, функцией которой является фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат; увеличивает синтез гликогена и окисление глюкозы (способствует гипогликемии); стимулирует цикл трикарбоновых кислот, усиливая конденсацию ацетил-КоА со щавелево-уксусной кислотой; стимулирует пентозный цикл, активируя дегидрогеназы, таким образом влияет на процесс синтеза кислот.

Белковый обмен: стимулирует синтез белков, увеличивает проницаемость клеточных мембран для аминокислот; уменьшает распад белков (аминокислот, угнетая активность аминотрансфераз).

Липидный обмен: усиливает липогенез (синтез жира из углеводов).

Минеральный обмен: снижает содержание в крови фосфата и калия и обогащает клетку кальцием.

Инсулин дает характерные реакции на белок (Геллера, биуретовую, Фоля, Миллона и др.)

ХОД РАБОТЫ

1) Биуретовая реакция. К 1 мл раствора инсулина добавляют 5-6 капель раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди (II), перемешивают. Жидкость окрашивается в розовато-фиолетовый цвет.

2) Реакция Миллона. К 5-6 каплям раствора инсулина добавляют 2-3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Образуется осадок в виде сгустка красного цвета.

3) Реакция Фоля. К 5-6 каплям раствора инсулина, (использовать неразбавленный препарат) добавляют 2-3 мл раствора NaOH и кипятят 10 мин на маленьком пламени

горелки. После охлаждения добавляют 1-2 капли раствора $Pb(ONa)_2$ - появляется бурое окрашивание.

Примечание. Раствор $Pb(ONa)_2$ приготовить в отдельной пробирке. Для этого к одной капле раствора ацетата свинца добавляют по каплям раствор 10%-ного гидроксида натрия до растворения образовавшегося осадка гидроксида свинца.

При стоянии или нагревании бурое окрашивание может усилиться до черного и может выпасть черный осадок.

Реактивы и оборудование: препарат инсулина в ампулах (можно использовать в разведении 1:100), 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный $CuSO_4$; реактив Миллона; 5%-ный раствор ацетат свинца; 10%-ный раствор K_2CO_3 ; 10%-ный раствор серной кислоты; 1%-ный раствор крахмала; штатив с пробирками; пипетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубровина, Т.Н. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности «Биотехнология» / Т.Н. Дубровина. – Павлодар, 2009. – 27 с.

ТЕМА 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Цель: изучить строение антибиотиков с помощью качественных реакций.

Антибиотики – вещества, синтезируемые микроорганизмами, а также продукты химической модификации этих веществ, избирательно подавляющие рост патогенных микроорганизмов, низших грибов, некоторых вирусов и клеток злокачественных новообразований.

Описано более 6000 природных антибиотиков. Большинство антибиотиков получают в промышленности микробиологическим синтезом – в ферментаторах на специальных питательных средах. Синтезированные микроорганизмами антибиотики извлекают и подвергают химической очистке. Продуценты антибиотиков представляют собой почвенные микроорганизмы – лучистые грибы (актиномицеты), плесневые грибы и бактерии.

Основные направления создания новых антибиотиков – химическая и микробиологическая модификация природных антибиотиков и получение полусинтетических антибиотиков. Однако лишь некоторые из них обладают ценными для медицины и сельского хозяйства свойствами.

Качественные реакции на антибиотики

ХОД РАБОТЫ.

1. Качественные реакции на антибиотики группы пенициллина

Гидроксамовая реакция. В две пробирки помещают по 0,01 г бензилпенициллина, приливают 1 каплю раствора, состоящего из 1 мл 1н раствора гидроксиламина гидрохлорида и 0,3 мл 1н раствора гидроксида натрия. Через 2-3 мин к смеси добавляют 1 каплю ледяной уксусной кислоты, тщательно перемешивают. Затем добавляют в первую пробирку 1 каплю 5% раствора хлорида железа (III). Образуется красно-фиолетовое окрашивание. Во вторую пробирку прибавляют 1 каплю 5% раствора нитрата(сульфата) меди – образуется зеленое окрашивание.

Реакция обнаружения серы. К 0,01 г бензилпенициллина прибавляют 2-3 мл концентрированной азотной кислоты и кипятят под тягой в течение 2-3 мин. По охлаждении прибавляют 0,5 мл 5% раствора хлорида бария. Выпадает белый осадок.

Реакция на первичные ароматические амины. Около 0,01 г бензилпенициллина растворяют в 2 мл воды, прибавляют 0,5 мл 15% соляной кислоты, 0,5 мл 1% раствора нитрита натрия. Полученный раствор хорошо перемешивают и прибавляют 1 мл щелочного раствора бета-нафтола. Появляется вишнево-красное окрашивание.

2. Качественные реакции на антибиотики группы стрептомицина

Реакции на альдегидную группу:

- растворяют около 0,05 г стрептомицина сульфата в воде и прибавляют по каплям реактив Несслера. Появляется бурое окрашивание вследствие выпадения металлической ртути;

- растворяют около 0,05 г стрептомицина в 1 мл воды и прибавляют 0,5 мл реактива Фелинга, нагревают. Появляется красное окрашивание вследствие образования оксида меди (I);

- нагревают около 0,05 г стрептомицина с 1,5-2,0 мл 10% раствора гидроксида натрия. Идет выделение аммиака, который можно обнаружить по изменению окраски индикаторной бумаги.

3. Качественные реакции на антибиотики группы тетрациклина

Реакция изомеризации под действием гидроксида натрия. 0,01 г тетрациклина растворяют в 2 мл 10% раствора гидроксида натрия. Появляется коричневое окрашивание. Нагревают в кипящей водяной бане в течение 1-2 мин – появляется синяя флюоресценция, наблюдаемая в УФ свете.

Реакция образования ангидротетрациклина. 0,01 г стрептомицина растворяют в 2 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2-3 мин. Тетрациклин дает желто-зеленую флюоресценцию, наблюдаемую в УФ свете.

Реакция с концентрированной серной кислотой. К 1-2 мг стрептомицина прибавляют 2 мл концентрированной серной кислоты. Появляется фиолетовое окрашивание.

Реакция с хлоридом железа (III). 0,01 г стрептомицина растворяют в 2 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2-3 мин. Тетрациклин дает желто-зеленую флюоресценцию, наблюдаемую в УФ свете.

4. Качественные реакции на антибиотики группы левомицетина

Реакция с гидроксидом натрия. 0,1 г левомицетина растворяют при нагревании на огне газовой горелки в 5 мл 20% раствора гидроксида натрия. При этом появляется желтое, затем красно-оранжевое окрашивание, усиливающееся при кипячении раствора, выпадает осадок кирпично-красного цвета, обусловленный образованием азобензойной кислоты. Кроме того, ощущается запах аммиака (из амидной группы).

Реакция комплексообразования. К 0,01 г левомицетина прибавляют 3 капли 5% раствора сульфата меди и 0,5 мл 1н раствора гидроксида натрия. Через 1 мин взбалтывают с 1 мл бутанола. Слой бутанола окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Исследуемый материал: бензилпенициллина натриевая соль, стрептомицина сульфат, тетрациклин, левомицетин.

Реактивы и оборудование: бензилпенициллина натриевая соль, стрептомицина сульфат, тетрациклин, левомицетин, 1н раствор гидроксиламина, 1 н, 10% и 20% растворы гидроксида натрия, ледяная уксусная кислота, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты, 15% соляная кислота, бутанол, 5% растворы хлорида железа (III), нитрита (сульфата) меди и хлорида бария, 1% раствор нитрита натрия, щелочной раствор бета-нафтола, реактив Несслера, реактив Фелинга, пробирки, пипетки, газовая горелка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов, В.А. Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия поволжья», 2004. – 106 с.

ТЕМА 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Цель: изучить методы качественного определения моносахаридов и полисахаридов.

Качественные реакции на углеводы

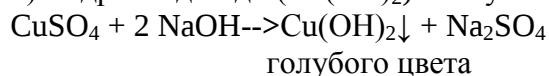
Свойства моносахаридов восстанавливать металлы обусловлено наличием в их структуре карбонильной группы, которая очень легко вступает в окислительно-восстановительные процессы. Особенно легко восстанавливаются такие металлы как серебро, медь, железо, висмут. Поэтому эти свойства были взяты в основу методов качественного определения моносахаридов.

ХОД РАБОТЫ.

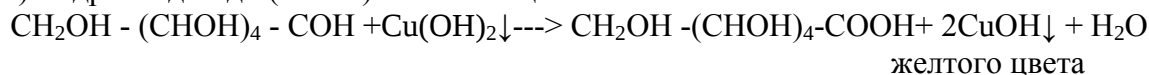
1. Реакция Троммера.

При реакции Троммера могут образоваться следующие соединения меди:

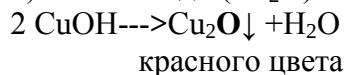
1) Гидроксид меди ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) - голубого цвета



2) Гидроксид меди (CuOH) - желтого цвета



3) Закись меди (Cu_2O)- красного цвета



4) Оксид меди (CuO) - черного цвета

К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1/3 часть объема едкого натрия и по каплям 1%-ный раствор CuSO_4 . В присутствии глюкозы образующийся осадок гидроксида меди (I) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого, затем красного осадка указывает на окисление глюкозы и на восстановление меди (Cu_2O).

Примечание: Реакция между сахаром и гидроксидом меди идет количественно и избыток сульфата меди при нагревании, теряя воду, переходит в черный оксид меди (II), что затемняет основную реакцию. Поэтому при реакции Троммера следует избегать излишка сульфата меди!

2. Реакция Фелинга

Проба с жидкостью Фелинга основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Отличие заключается в том, что в реакции Фелинга прибавляют сегнетовую соль для связывания избытка гидроксида меди (II), из которого при нагревании образуется CuO т.е. осадок черного цвета, затемняющий реакцию при малых количествах глюкозы в исследуемом растворе. Жидкость Фелинга представляет собой медный алкоголь сегнетовой соли.



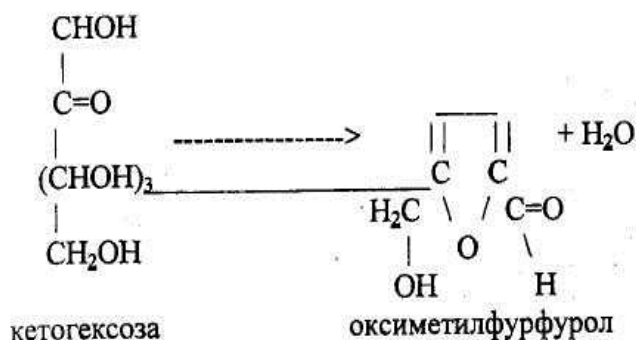
ХОД РАБОТЫ. К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1 мл жидкости Фелинга. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появляется, как и в пробе Троммера,

желтый осадок гидроксида меди (I) и красный осадок оксида меди (I). Кислород идет на окисление углевода.

3. Реакция Селиванова для распознавания кетоз

Реакция Селиванова применяется специально для распознавания кетоз. Особенно хорошо получается с фруктозой и теми сложными сахарами, которые при гидролизе дают фруктозу (сахароза, инулин). Реакция основана на образовании из фруктозы при нагревании с кислотой нестойкого вещества – оксиметилфурфурола, который с резорцином (мета-диоксибензолом) дает красное окрашивание.

ХОД РАБОТЫ. К 2-3 мл раствора глюкозы прибавляют 1 мл жидкости Фелинга. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появляется, как и в пробе Троммера, желтый осадок гидроксида меди (I) или же красный осадок оксида меди (I). Кислород идет на окисление углевода.



4. Реакция Люголя

Цветная реакция на обнаружения крахмала, которая основана на появлении синего цвета раствора при взаимодействии крахмала с йодидом калия.

ХОД РАБОТЫ. К 2-3 мл раствора крахмала прибавляют 1-2 капли раствора Люголя; жидкость окрашивается в синий цвет, исчезающий при нагревании и появляющийся снова при охлаждении. Поэтому пробу с йодом необходимо проводить только с холодным раствором крахмала.

Реактивы и оборудование: 1%-ный раствор глюкозы, 1%-ный раствор фруктозы, 1%-ный раствор крахмала, 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор CuSO₄; реактив Фелинга; реактив Люголя; концентрированная соляная кислота, резорцин кристаллический; дистиллированная вода; штатив с пробирками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов, В.А. Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия Поволжья», 2004. – 106 с.
2. Дубровина, Т.Н. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности «Биотехнология» / Т.Н. Дубровина. – Павлодар, 2009. – 27 с.

ТЕМА 10. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ

Цель: изучить методы определения содержания лактозы.

Для определения содержания лактозы в молочной сыворотке используют ряд методов. Наиболее часто используют рефрактометрические и фотоколориметрические методы. *Рефрактометрический метод* основан на способности молочной сыворотки по разному преломлять проходящий через нее свет в зависимости от концентрации лактозы. Показатель преломления молочной сыворотки устанавливают по углу отклонения светового луча сывороткой, заключенной между призмами рефрактометра.

Рефрактометрический метод определения содержания лактозы

ХОД РАБОТЫ.

Предварительно готовят молочную сыворотку. В пробирку отмеривают 5 мл свежего молока и добавляют 5 капель 4% раствора хлорида кальция. Пробирку плотно закрывают пробкой и для полного осаждения белков ставят ее на кипящую водяную баню. Через 10 мин пробирку вынимают из бани и охлаждают. Затем берут пипетку с ватным тампоном в нижней части и набирают сыворотку, фильтруя ее, таким образом, через вату. Сыворотку кисломолочных напитков (простокваша, кефир) получают после их центрифугирования.

Далее каплю прозрачной сыворотки наносят на поверхность нижней призмы рефрактометра. Производят отсчет и по таблице (прил.3) находят процентное содержание лактозы в молочной сыворотке. Аналогичным образом находят содержание лактозы в сыворотке скисшего молока, простокваше и кефире, предварительно определяя их титруемую кислотность.

При повышенной кислотности молока в пределах $18-30^{\circ}\text{T}$ вносят поправку – вычитают из содержания молочного сахара 0,011 на каждый градус сверх 17°T ; в пределах $30-60^{\circ}\text{T}$ поправка равна 0,008. Например, если при кислотности молока в 28°T по таблице найдено содержание лактозы 4,89%, то поправку на кислотность делают следующим образом:

$$28^{\circ}\text{T} - 18^{\circ}\text{T} = 10^{\circ}\text{T};$$

$$10 \cdot 0,011 = 0,11\%; \quad 4,89 - 0,11 = 4,78\%.$$

Реактивы и оборудование: молоко, кефир, 4% раствора хлорида кальция, водяная баня рефрактометр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов, В.А. Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия Поволжья», 2004. – 106 с.
2. Дубровина, Т.Н. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности «Биотехнология» / Т.Н. Дубровина. – Павлодар, 2009. – 27 с.

ТЕМА 11-12.

ВЫДЕЛЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ БЕЛКОВ

Цель: ознакомить аспирантов с методом выделения агглютинирующих белков с поверхности бактерий.

Лектины - это белки не иммунной природы, способные к специфическому узнаванию и обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов. Природными источниками лектинов являются растения (фитогемагглютинины), животные, микроорганизмы. Лектины относят к биологически активным веществам с широким спектром действия. Связывание лектинов с поверхностью плазматической мембраны клеток имеет разнообразные последствия для структурного и функционального состояния мембран, например, вызывает изменения в расположении поверхностных белков и гликопротеинов, изменяет проницаемость мембраны для различных веществ и влияет на активность ферментов. Бактериальные гемагглютинирующие белки были впервые описаны R.Kraus, S.Ludwig в 1902 году (Kraus, Ludwig, 1902). Лектины бактерий являются важными факторами патогенности, играющими ключевую роль в инфицировании и колонизации бактериями макроорганизма. Исследования молекулярных основ патогенности бактерий показали, что первой ступенью инфекционного процесса является специфическая адгезия бактериальных клеток к клеткам различных тканей хозяина. Бактериальные лектины могут быть связаны или с какими-либо филаментами клетки (пилями или фимбриями, жгутиками), или равномерно распределены по поверхности бактериальной клетки. Одним из важнейших свойств лектинов является адгезивная. Для многих бактерий показано, что их поверхностные адгезины (лектины) участвуют в прикреплении к клеткам-мишеням, связываясь с гликоконъюгатами клеток. Некоторые лектины бактерий наряду с гемагглютинирующей активностью обладают и ферментативной активностью, что позволяет говорить о наличии на их поверхности двух активных центров: лектинового и ферментативного. Помимо адгезивной роли, лектины бактерий способны выполнять самые разнообразные функции в жизнедеятельности самой клетки, например, влиять на активность некоторых гидролитических ферментов. Они способны изменять протеолитическую, β -глюкозидазную активность, активность сукцинатдегидрогеназы растительной клетки. Лектины бактерий способны взаимодействовать с внеклеточными полисахаридными компонентами почвенных азотфиксирующих бактерий, влиять на состояние их мембранного аппарата, проявлять бактерицидное воздействие на микроорганизмы. Кроме того, лектины бактерий могут специфически взаимодействовать с белками плазмы крови (*in vitro*), специфически связываться с поверхностными структурами макрофагов, повышать интенсивность углеводного и белкового обмена, оказывать стимулирующее воздействие на активность адгезии бактерий при фагоцитарном процессе, оказывать влияние на цитокиносинтезирующую способность макрофагов при фагоцитозе некоторых условно патогенных бактерий и т.д. То есть роль лектинов бактерий как в самой бактериальной клетке, так и в метаболизме макрохозяина (растение или животный организм) достаточно велика.

Задание. Выделить агглютинины из бактерий (ризобий и бацилл).

ХОД РАБОТЫ.

Первый день.

1. Приготовить 500 мл синтетической питательной среды для *Rhizobium leguminosarum* 252 (среда Ковалевской).
2. Приготовить 500 мл синтетической питательной среды для *Paenibacillus polymyxa* 1460 (среда Moore).
3. Простерилизовать питательные среды при 0,5 атм в течение 20 мин.

4. Пересеять ризобии и бациллы с твердой среды (с косяка) в колбы на жидкую синтетическую среду для ризобий и бацилл.
5. Колбы поместить в термостат (28 °С) на 2-3 суток.

Второй день.

1. Биомассу бактериальных клеток ризобий и бацилл, выращенную при 28 °С на соответствующей жидкой питательной среде, трижды, путем центрифугирования (6000g, 5-10 минут), отмыть физиологическим раствором (0,85% NaCl);
- неоднократно пропустить через иглы шприца разного диаметра в 0,15 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH=7,2 (NaCl – 8,5 г, Na₂HPO₄ · 2 H₂O – 1,34 г, NaH₂PO₄ · 2 H₂O – 0,39 г на 1 л дистиллированной воды, pH = 7, 2) и в 1 % растворе NaCl (в случае бацилл);
- очистку агглютининов ризобий проводить осаждением двумя объемами спирт (этиловый)-ацетоновой смеси (1:1), высаливать сульфатом аммония в концентрации 15-20 %; агглютинины бацилл получают путем осаждения белка 2,5 объемами ацетона;
- далее агглютинирующие белки ризобий или бацилл поставить на диализ, который проводят на холоду против дистиллированной воды в течение 15-20 часов.

Дальнейшую очистку проводят методом гель-фильтрации на колонке, используя носитель Toyopearl HW-55. Выход белка регистрируют на приборе Uvicord S-II при 278 нм или применяют коллектор фракций и измеряют белок по методу Bradford.

Гемагглютинирующую активность выделенных белков определяют реакцией гемагглютинации с самопроизвольным осаждением эритроцитов, используя для этой цели 2% суспензию кроличьих эритроцитов. Реакцию гемагглютинации проводят в планшетах для иммунологических реакций. Для этого к 0,05 мл ФСБ добавляют 0,05 мл раствора белка и 0,05 мл суспензии кроличьих эритроцитов. Титр гемагглютинирующей активности выражали как наибольшее разведение раствора белка, вызывающее агглютинацию.

Реактивы и оборудование.

Термостат, центрифуга, хроматографическая колонка, Toyopearl HW-55, Uvicord SII, планшеты для иммунологических реакций, кроличьи эритроциты, питательная среда для *Rhizobium leguminosarum* 252 (среда Ковалевской), питательная среда для *Paenibacillus polymyxa* 1460 (среда Moore), физиологический раствор (0,85% NaCl), фосфатно-солевой буфер, pH=7,2 (NaCl – 8,5 г, Na₂HPO₄ · 2 H₂O – 1,34 г, NaH₂PO₄ · 2 H₂O – 0,39 г на 1 л дистиллированной воды, pH = 7, 2), 1 % раствор NaCl, спирт, ацетон, сульфат аммония в концентрации 15-20 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Луцик, М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
2. Карпунина, Л.В. Молекулярная биотехнология микроорганизмов: методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 240901 – “Биотехнология” /Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова, Т.В. Спиряхина.- Саратов: ФГОУ ВПО “Саратовский ГАУ”, 2010. – 28 с.
3. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V.72, N 1. –P. 248-254.
4. Moore A.W. Nitrogen fixation by *Bacillus* strains isolated from Nigerian soils/ A.W. Moore, J.H. Becking // Nature (London). –1963. –V.198, N 4883. –P. 915-916.

Состав сред (в мг/л) для клеток животных и растений

Компоненты	Клетки животных	Клетки растений
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	185 – 264	150 – 440
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,03 – 0,1	---
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	---	27 – 28
KCl	320 – 440	---
KNO_3	---	1900 – 2500
KH_2PO_4	60	170 – 340
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	170	---
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	161 – 242	250 – 370
NaCl	5100 – 8000	---
NaHCO_3	350 – 3700	---
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 – 1500	134
NH_4NO_3	---	1200 – 1650
Незаменимые аминокислоты	+	---
Ростовые вещества	инсулин-0,1-10,0; глюкагон-0,05-5,0; простагландины E_1 - E_2 -по 0,01; соматомедин С-0,001; гидрокортизон-до 0,03; прогестерон-до 0,03; эстрадиол-до 0,003; тестостерон до 0,003 и др.	индолилуксусная кислота – 1-30; кинетин-0,02-10,0; 6-бензиладенин 1,0-5,0; гиббереллиновая кислота-0,5-10,0 и др.

Минимальная незаменимая среда Игла

Компоненты	Количество*	Компоненты	Количество*
<i>L-аминокислоты</i>		<i>Витамины</i>	
Аргинин	0,6	Холин	8,3
Цистин	0,1	Фолиевая кислота	2,3
Глутамин	2,0	Инозитол	11,0
Гистидин	0,2	Никотинамид	8,2
Изолейцин	0,4	Пантотенат	4,6
Лейцин	0,4	Пиридоксаль	6,0
Лизин	0,4	Рибофлавин	0,27
Метионин	0,1	Тиамин	3,0
Фенилаланин	0,2	<i>Неорганические ионы</i>	
Треонин	0,4		
Триптофан	0,05	NaCl	116,0
Тирозин	0,2	KCl	5,4
Валин	0,4	CaCl_2	1,8
<i>Источники углерода</i>		$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0
		$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,1
Глюкоза	5,5	NaHCO_3	23,8
<i>Добавки</i>			
Цельная или под-вергнутая диализу сыворотка	5-10% по объему		

* - все величины даны в миллимолях, за исключением витаминов, содержание которых показано в микромолях.

Зависимость массовой доли лактозы от показателя преломления молочной сыворотки

Показатель преломления	Содержание лактозы, %	Показатель преломления	Содержание лактозы, %	Показатель преломления	Содержание лактозы, %
1,3390	3,01	1,3405	3,77	1,3420	4,52
1,3391	3,06	1,3406	3,82	1,3421	4,57
1,3392	3,11	1,3407	3,87	1,3422	4,62
1,3393	3,16	1,3408	3,92	1,3423	4,67
1,3394	3,21	1,3409	3,97	1,3424	4,72
1,3395	3,26	1,3410	4,02	1,3425	4,77
1,3396	3,31	1,3411	4,07	1,3426	4,82
1,3397	3,36	1,3412	4,12	1,3427	4,87
1,3398	3,42	1,3413	4,17	1,3428	4,92
1,3399	3,47	1,3414	4,22	1,3429	4,97
1,3400	3,52	1,3415	4,27	1,3430	5,02
1,3401	3,57	1,3416	4,32	1,3431	5,07
1,3402	3,62	1,3417	4,37	1,3432	5,12
1,3403	3,67	1,3418	4,42	1,3433	5,17
1,3404	3,72	1,3419	4,47	1,3434	5,22

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Блинов, В.А. Общая биотехнология (методические указания) / В.А. Блинов, С.Н. Буршина. – Саратов: «Полиграфия поволжья», 2004. – 106 с.
2. Громова, Н.Ю. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие / Н.Ю. Громова, Ю.Ю. Косивцов, Э.М. Сульман. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84с.
3. Дубровина, Т.Н. Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности «Биотехнология» / Т.Н. Дубровина. – Павлодар, 2009. – 27 с.
4. Збарский, Б.И. Практикум по биологической химии / Б.И. Збарский, И.Б. Збарский, А.И. Солнцев. – М.: Государственное издательство медицинской литературы Медгиз, 1954. – 348 с.
5. Луцик, М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик – Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
6. Карпунина, Л.В. Молекулярная биотехнология микроорганизмов: методические указания к лабораторным занятиям для студентов специальности 240901 – «Биотехнология» /Л.В. Карпунина, Е.А. Горельникова, Т.В. Спиряхина.- Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2010. – 28 с.
7. Клунова, С.М. Биотехнология: учебник / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – Москва: Академия, 2010. – 256 с.
8. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева. – Москва: Академия, 2008. – 256 с.
9. Шапкарин, В.В. Биохимия: сборник лабораторных работ / В.В. Шапкарин, А.П. Королев, С.Б. Гридина, Е.П. Зинкевич / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. – Кемерово, 2005. – 84 с.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V.72, N 1. –P. 248-254.
11. Moore A.W. Nitrogen fixation by *Bacillus* strains isolated from Nigerian soils/ A.W. Moore, J.H. Becking // Nature (London). –1963. –V.198, N 4883. –P. 915-916.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Тема 1-2. Выделение и определение белков	4
Тема 3-4. Микроорганизмы продуценты белка на углеводородном сырье	10
Тема 5. Определение активности ферментов	14
Тема 6. Определение витаминов	16
Тема 7. Определение гормонов	17
Тема 8. Определение антибиотиков	19
Тема 9. Определение углеводов	21
Тема 10. Методы определения лактозы	23
Тема 11-12. Выделение агглютинирующих белков	24
Приложения	26
Библиографический список	28
Содержание	29