Издательство ИГХТУ разрешает свободное использование данного издания

Федеральное агентство по образованию

Государственное оборазовательное 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

Издательство ИГХТУ разрешает свободное использование данного издания

ηqddqγeΥ ϸЁ dəqЁϱЪγɜə d ɕɔɑbɔγ Jqddϒqγè

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)

ηqddqγeΥ ϸЁ dəqЁϱЪγɜə d ɕɔɑbɔγ Jqddϒqγè

ɳqddɑʏəʏ ɒɸ dəqɸɒʏəɔ ɑ ɛɔɑɒɔɔ ɹqddʏɑyè

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

ɳqddɑʏəʏ ɒɸ dəqɸɒʏəɔ ɑ ɛɔɑɒɔɔ ɹqddʏɑyè

ηqddqyeY bE dedEbYze d ecoaboy Jqddγqyè

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 pH 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

ηqddqyeY bE dedEbYze d ecoaboy Jqddγqyè

ηqddqYeY bƑ dəqƑpYɜə d ɛɔɔqbɔY Jqddϒqyè

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 сусла, 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.

ηqddqYeY bƑ dəqƑpYɜə d ɛɔɔqbɔY Jqddϒqyè

ηqddqγeγ bƩ dəqƩbγɜə ơ ɕɔɑbɔγ Jqddγqγè

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 HCI, ампула для гидролиза, мерная колба объемом 50 мл.

Сложный белок (рибонуклеопротеид), 10 %-й раствор H_2SO_4, дистиллированная вода, круглодонная колба объемом 100 мл, мерная колба объемом 100 мл, мерный цилиндр на 100 мл, плитка, асбестовая сетка.

ηqddqγeγ bƩ dəqƩbγɜə ơ ɕɔɑbɔγ Jqddγqγè

ηqddqYeY bE deqEgEpeY3e d ɛɔɔaɒɔʏ Jqddϒqyè

Выполнение работы

Кислотный гидролиз простого белка – альбумина

Белок гидролизуют без доступа воздуха в растворе 6 н. HCI 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. HCI 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].

ηqddqYeY bE deqEgEpeY3e d ɛɔɔaɒɔʏ Jqddϒqyè

ηqddqγeϒ ϸƐ dəqƐϸϷɜə ɗ ɛɔɑϸɔɔγ Jqddϒqγè

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

ηqddqγeϒ ϸƐ dəqƐϸϷɜə ɗ ɛɔɑϸɔɔγ Jqddϒqγè

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 λ = 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).

ηqddqyeY bE d9dEbYze d ɛɔɔaɔoY Jqddϒqyè

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.

ηqddqyeY bE d9dEbYze d ɛɔɔaɔoY Jqddϒqyè